

2023年度（第48回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	北 里 大 学 メデ ^ィ カルセンター	
研 究 課 題	早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 ーKK-LC-1を標的とした前がん診断/がん予防ワクチ ンの検証ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①腫瘍抗原 ②治療 ③診断 ④予防			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
福 山 隆	北里大学メデ ^ィ カルセンター	上級研究員	研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 岡 有 紀 子	医 学 部	講 師	動物実験
山 崎 大 賀	北里大学メデ ^ィ カルセンター	上級研究員	動物実験
長 塩 亮	医 療 衛 生 学 部	教 授	血中診断開発
小 寺 義 男	理 学 部	教 授	タンパク質解析
小 泉 和 三 郎	医 学 部	名 誉 教 授	免疫組織化学染色
山 崎 等	北里大学メデ ^ィ カルセンター	非 常 勤 医 師	抗体の評価
草 野 央	医 学 部	教 授	臨床検体回収

早期がん/前がん抗原を利用したがん診断/予防戦略 —KK-LC-1 を標的とした前がん診断/がん予防ワクチンの検証—

1. 研究の目的

(1) がん予防ワクチンの検証

我々は抗体医薬候補のモノクローナル抗体を KK-LC-1 の特定領域のペプチドより作製している。同ペプチドをワクチナイズすることで KK-LC-1 に対する有用な抗体が産生されることが考えられる。本研究年限内に、治療開発を推進すると共に、ヒト KK-LC-1 置換マウスの作製およびそれを用いた KK-LC-1 ワクチンのがん予防に対する安全性および有効性を証明する。

(2) 発がん予知検証

現時点で、前がん領域で KK-LC-1 が発現していることは証明されたが、KK-LC-1 陽性症例から発癌することを立証する必要がある。そこで、本研究では、前がん症例を用いた KK-LC-1 の検出と発癌の関連性について検証し、血液診断システムの構築にも着手する。

2. 研究の計画

(1) KK-LC-1 予防ワクチン効果の証明

① KK-LC-1 の機能解析のため、我々は未同定であったマウス Kk-1c-1 を同定した。当該年度は、マウス Kk-1c-1 の機能解析を行うためノックアウトマウスを作製し、当該分子の機能を明らかにする。

② さらに、*mKk-1c-1* 遺伝子を *huKK-LC-1* に置換したマウスを作製し、開発中の抗体医薬および予防ワクチン開発における前臨床試験へ供する。

(2) 発がん予知検証

① 保険診療を見据えた発がん予測診断として、KK-LC-1 遺伝子測定キットを作製する。作製するにあたり、検査キット会社との提携体制を整え、薬事承認にかかる品質性能試験を実施する。さらに、臨床性能試験の実施を見据え、キットの仕様に沿った KK-LC-1 遺伝子の測定方法について検証する。

② LC-MS/MS により同定された 7kDa KK-LC-1 ペプチドの組換えタンパク質を標準抗原として、ELISA を構築する。構築できなかった場合、7kDa KK-LC-1 に標識酵素付加し、競合法による KK-LC-1 ペプチドの検出を試みる。

3. 研究の成果

(1) KK-LC-1 予防ワクチン効果の証明

① 前年度の *mKk-1c-1* 欠損精子の異常動態を受けて、当該年度は精子運動解析システム CASA を用いて欠損精子の運動性について数値化し受精能低下の原因を精査した。CASA における精子前進速度、尾振幅、尾振回数等の複数のパラメータで欠損精子の数値が減少しており、それらのパラメータから算出した超活性化運動の割合を算出したところ、欠損精子ではその割合が顕著に減少していた。欠損精子では、透明帯通過時に重要な超活性化運動が減弱していることを明らかにした。

② *mKk-1c-1*ノックアウトマウスに対して、CRISPR/Cas9および相同組換え技術を用いて *huKK-LC-1*置換マウスを1個体のみであるが作出することに成功した。ファウンダー個体(F0)についてgenotyping PCRを行い *huKK-LC-1*が *mKk-1c-1*の遺伝子座にノックインされていることを確認した。しかしながら、*huKK-LC-1*の遺伝子発現およびタンパク質発現については確認することができなかった。

(2) 発がん予知検証

① Hp除菌後でも胃がんは発症するが、除菌後の発がんリスク指標がない点に着目し、111例のHp除菌成功症例のKK-LC-1の発現とその後の胃がん発症について解析した。KK-LC-1陽性症例は19例(17%)であり、当該症例の累積胃がん発症率は

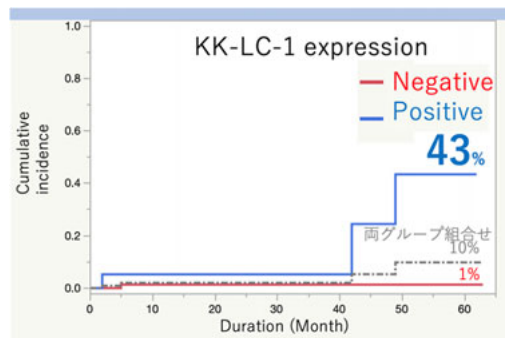


図1 Hp除菌成功者でKK-LC-1陽性症例は発癌率が高い

43%(KK-LC-1陰性では1%)であった(図1)。当該結果は、KK-LC-1がHp除菌後の胃がん発症のリスク指標になりうることを証明した。本成果は、保険収載を目指す計画に加え、代表者の所属する北里大学メディカルセンターの自由診療検査として2023年9月1日に開設するに至った。また本検出技術の海外展開も見据え、PCT出願を行った。

② 当該年度は、固相化抗体が認識するペプチド(91-113)から遠位のペプチド(61-80)を認識するKK-LC-1モノクローナル抗体を新たに作製した。現在追加免疫中であり、今年度中にハイブリドーマの構築およびKmaxのKK-LC-1分泌ペプチドに対する結合を評価する。質量分析計Q-Exactiveを用いて培養上清中のKK-LC-1ペプチド解析を行ったが、検出には至らなかった。KK-LC-1ペプチドには糖鎖が付加されているため、バックアップとして、検出プローブにレクチンを用いることを計画した(図2)。Concanavalin AのKK-LC-1糖鎖に対する強い結合能が確認できた。

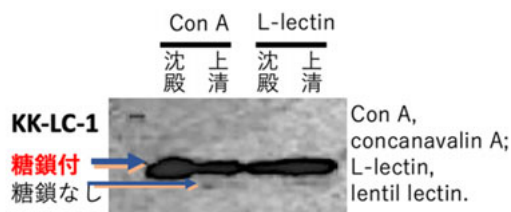


図2 レクチンに対するKK-LC-1の結合

4. 研究の反省・考察

(1) KK-LC-1 予防ワクチン効果の証明

① 本項については、*mKk-1c-1*の生殖細胞における機能を明らかにすることができた。*mKk-1c-1*は新規の遺伝子/タンパク質であり、かつ、がん治療の標的となる*huKK-LC-1*と同様の発現プロファイルを持っており、*huKK-LC-1*の腫瘍細胞における機能と、*mKk-1c-1*の生殖細胞における機能も相同点が見られたことは、今まで未同定であった*mKk-1c-1*を同定しかつ、その機能はヒトマウス種間で保存されていることも類推することができた。

② *huKK-LC-1*ノックインマウスの作出には成功したが、87個の受精卵を用いてわずか1個体のみの成功であった。同じ実験を複数回試行することで*huKK-LC-1*を発現するマウスの作製につなげたい。

(2) 発がん予知検証

① KK-LC-1陽性であれば、Hp除菌が成功しても発がんするリスクが高いことを証明することができた。我々のチーム含め、KK-LC-1を標的とした多くの治療開発現時点で展開されており、これらの治療技術を予防的に投与可能な仕組みを構築することで、本検査のコンパニオン診断としての臨床的意義も確立できると思われる。

② 当初はサンドイッチELISAによるKK-LC-1ペプチドの検出を試みたが、全長113アミノ酸の一部が分泌されることから、サンドイッチELISAの構築は非常に困難であったと考えられた。現在、KK-LC-1のレクチンに対する結合を確認できたため、今後は、レクチンと使用予定のモノクローナル抗体が競合しないことを確認する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Tubular Endogenous Erythropoietin Protects Renal Function against Ischemic

Reperfusion Injury.

Yukiko Yasuoka, Yuichiro Izumi, Takashi Fukuyama, Tomomi Oshima, Taiga Yamazaki, Takayuki Uematsu, Noritada Kobayashi, Masayoshi Nanami, Yoshitaka Shimada, Yasushi Nagaba …

International journal of molecular sciences 25(2) 2024

② Single-cell sequencing on CD8+TILs revealed the nature of exhausted T cells recognizing neoantigen and cancer/testis antigen in non-small cell lung cancer
Hiroyasu Komuro, Shuichi Shinohara, Yasunori Fukushima, Ayako Demachi-Okamura, Daisuke Muraoka, Katsuhiko Masago, Takuya Matsui, Yusuke Sugita, Yusuke Takahashi, Reina Nishida, Takashi Fukuyama …

Journal for ImmunoTherapy of Cancer 11(8) e007180-e007180 2023

(2) 口頭発表

① 北里大学メディカルセンター発胃癌発症予測技術の研究開発と実用化に向けての取り組み (口頭)

福山 隆。 第35回北足立郡市医師会 医学会 2023年。

② KK-LC-1は胃がんの発症を予測する新たなバイオマーカーになりうるか (シンポジウム)

福山 隆、大塚俊和、添野孝文、二渡信江、草野央、比企直樹、小林憲忠。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

③ Helicobacter pylori感染胃癌と癌/精巣抗原KK-LC-1発現との関連性 (ワークショップ)

前原 惇治、二渡 信江、秋元 佑介、岡本 陽祐、日原 大輔、横内 幸、高橋 啓、福山 隆、渡邊 学、斉田 芳久。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

④ Helicobacter pylori感染とKK-LC-1発現：胃がん発生リスクの新規指標の可能性 (一般口演)

大塚 俊和、福山 隆、小林 憲忠、草野 央。第96回日本胃癌学会総会 2024年。

⑤ 癌精巣抗原KK-LC-1マウスホモログの同定と機能解析 (ポスター)

山崎大賀、安岡有紀子、加藤恵太、中村啓哉、小林憲忠、高橋倫子、河野菜摘子、山下哲郎、福山 隆、田中住明。第46回日本分子生物学会年会 2023年。

⑥ Helicobacter pylori infection and expression of cancer/testis antigen KK-LC-1 in gastric cancer (Oral)

Junji Maehara, Nobue Futawatari, Yusuke Akimoto, Yoshimasa Horie, Daisuke Hihara, Yuki Yokouchi, Kei Takahashi, Takashi Fukuyama, Manabu Watanabe, Yoshihisa Saida. The 78th General Meeting of the Japanese Society of Gastroenterological Surgery 2023.

⑦ 発がん予測技術のキット化 Development of a Kit for carcinogenesis prediction –我々は発癌予測検査の開発に係る協業先を探しています– (医薬品/創薬 presentation)

福山 隆。 Bio Japan 2023。

(3) 出版物

該当なし。