

# MUSCAT-Assay の個別化医療への応用

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科（工学部・化学生命系学科）

二見 淳一郎

Key word: がん免疫、自己抗体、腫瘍免疫応答、診断薬、タンパク質工学

## Abstract

免疫系が排除すべき異常な細胞を排除できなくなると「発がん」し、守るべき自己細胞を誤って攻撃して「自己免疫疾患」となる。我々はこの免疫監視の状態を反映するバイオマーカーとして自己抗体に注目している。医療現場でごく微量の血液から網羅的に自己抗体を迅速に定量評価するためには、全長・水溶性抗原の調製技術が鍵となる。個別化医療の対応を目指して我々が開発中の自己抗体の迅速測定システムの概要についてご紹介したい。

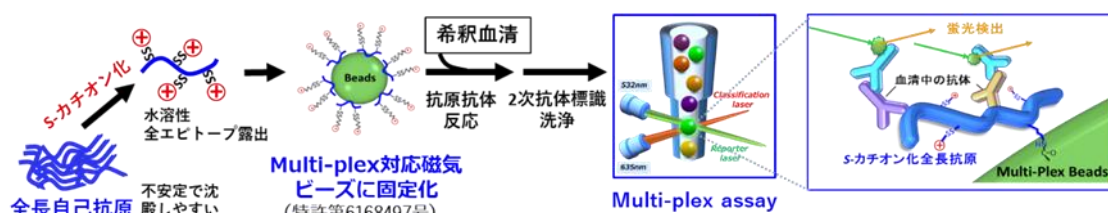
進展するであろう。我々は免疫監視の状態を反映するバイオマーカーとして自己抗体に注目している。本稿では自己抗原のタンパク質工学を活用した免疫監視状態のモニタリング技術の開発についてご紹介したい。

## 1. 自己抗原タンパク質の抗原性と物性

がん細胞内で異常発現して免疫系に認識される「がん抗原」や、自己免疫疾患で誤って免疫系から認識される「自己抗原」は、免疫寛容システムの観点から抗原性は高くないものと考えられる。しかし炎症反応等をきっかけに液性免疫が誘導され、最終的に自己抗体を生産するメモリーB細胞が生じる機構が確実に存在する。腫瘍免疫学的に重要な共通抗原である Cancer-Testis 抗原(CT 抗原)や、Tumor-Associate Antigen に対する自己抗体を調べると、これらはポリクローナル抗体であり、各抗原のエピトープの個人差と自己抗体の出現パターンの個人差が大きい<sup>1)</sup>。自己免疫疾患における自己抗体は、重症筋無力症の病因物質となる抗アセチルコリン受容体抗体のように、細胞表面タンパク質に対する自己抗体も

## はじめに

個々人の体内では常に免疫監視機構が働いて恒常性を維持している。健常人の体内でも日々「免疫系とがん細胞」の長い戦いが続いているかもしれないし、「免疫系と自己抗原」の間に炎症反応を伴う相互作用が続いているかもしれない。そしてある時、この免疫監視機構が破綻・暴走するとがんや自己免疫疾患を発症してしまう。この免疫監視機構の状況をモニタリング・診断する技術が確立すれば、発症機構の理解が進み、個別化医療が大きく



(図 1) MUSCAT-Assay 法による自己抗体の網羅的測定

S-カチオン化法で可溶化・精製した全長抗原を、Luminex ビーズ表面に固定化することで多種多様な自己抗体を網羅的かつ迅速に評価できる。

一部存在するが、その他の多くの自己抗体は細胞内タンパク質を認識している点も特徴的である。我々はヒト CT 抗原を中心として 130 種類以上の全長自己抗原の組換えタンパク質の生産系（大腸菌と Hek293 細胞を宿主）を整備済みであるが、ヒト細胞内で強制発現させると大半が凝集しやすい物性で、不安定なタンパク質であることが判明している。

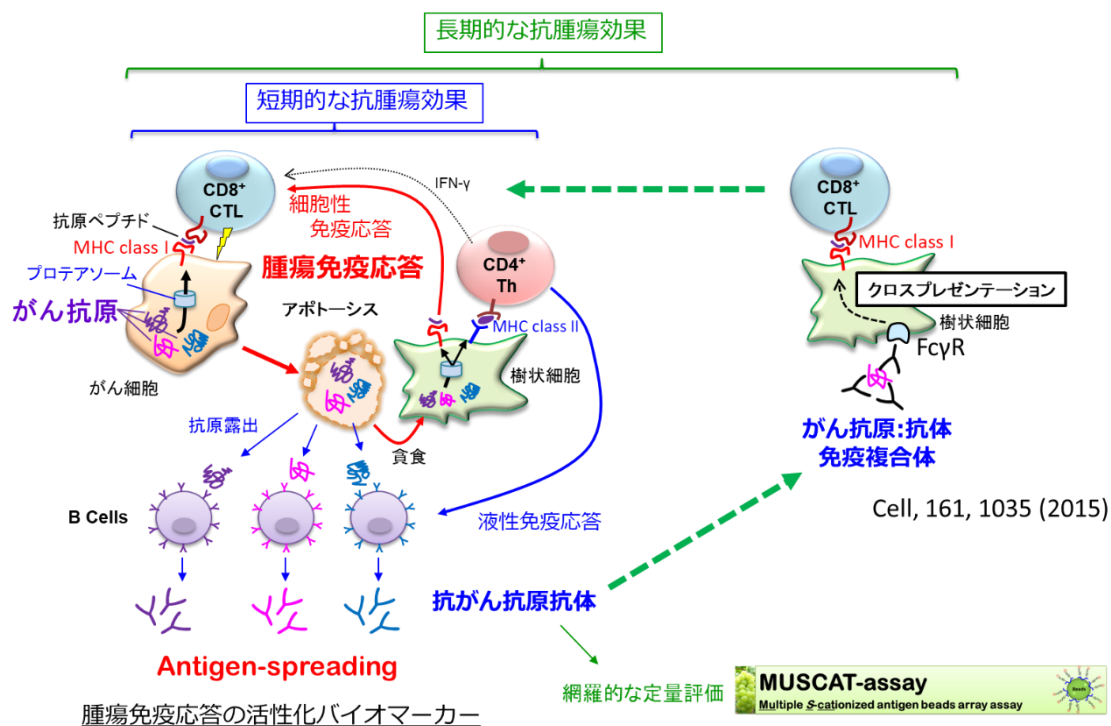
## 2. S-カチオン化技術による全長・水溶性自己抗原タンパク質の調製

主に CT 抗原を中心としたがん抗原での実施例になるが、大半の全長自己抗原は大腸菌で不溶性のインクルージョンボディとして生産させている。ほとんどの抗原タンパク質には複数の Cys 残基が存在しており、変性剤中で Cys 残基特異的に正電荷を導入する S-カチオン化を施すと高い水溶性を維持した全長抗原が取得できる<sup>2)</sup>。この S-カチオン化抗原は全ての配列エピトープが露出した変性状態であり、配列エピトープを認識する自己抗体の網羅的検出に有用である。幸いなことに Cys 残基は最もエピトープとして選択されにくいアミノ酸であり<sup>3)</sup>、正電荷付

与による非特異的な抗体吸着も軽微で、ポリクローナル抗体の補足率にはほとんど影響がないものと推定される。がん患者の血清中でしばしば認められる抗がん抗原抗体は、合成ペプチドでエピトープ解析が進められてきた実績もあり<sup>1)</sup>、ほとんどが配列エピトープを認識する自己抗体であると考えられる。大半のがん抗原が安定な立体構造を維持しにくい物性からも、構造エピトープを認識する抗体産生 B 細胞が選択されてくる可能性は高くはないものと推定される。

## 3. Luminex-beads 法による迅速・網羅的な自己抗体定量評価

我々は全長・水溶性 S-カチオン化自己抗原を、蛍光色素で塗り分けられた Multi-plex 磁気ビーズ表面に固定化し、ごく微量の血清から抗体価を定量評価できる新技術：MUSCAT-Assay (Multiple S-cationized antigen beads array assay) 法を完成したのでご紹介したい (図 1)。我々が標準的に実施している条件では、96well プレーートの 1well に 1 抗原当たり 1000 個のビーズを 10 種類 (10-plex) 混合・分注し、×1600 希釈した血清を添加し



(図 2) 腫瘍免疫応答の活性化を反映するバイオマーカーとなる抗がん抗原抗体

血清中に存在する抗がん抗原抗体の変動は腫瘍免疫応答の活性化レベルを反映する。さらに免疫複合体を介した樹状細胞内への抗原の取り込みが細胞性免疫誘導を促進することから長期の腫瘍免疫効果に抗がん抗原抗体が関与している。

で抗原抗体反応・自動洗浄を経てフローサイトメトリーの原理で同時に多項目の抗体価を測定している。この条件では 8well で 80 抗原の抗体価が測定でき、1 プレートで 12 検体分が 3 時間程度で測定が完了する。1 抗原あたり 50 ビーズ以上の測定値の平均値を採用すると、ほぼ正規分布の中央値と見なせる。原理的には 1 $\mu$ L の血清があれば数百抗原の抗体価が網羅的に解析可能で、定量性や再現性が極めて高く pM レンジの抗体 (IgG) 価の変動が評価できる。

#### 4. 自己抗体の網羅的定量評価系の個別化医療への応用

CT 抗原を中心としたがん抗原パネルを搭載した MUSCAT-Assay 系で抗体価を測定すると、がん患者由来血清では様々な抗がん抗原抗体が高値を示し、免疫系が個々人のがん細胞で何が抗原として認識されていたのかが明確にわかる。腫瘍免疫応答を活性化する治療を施すと、様々な抗がん抗原抗体の抗体価が上昇する。より多数の抗体価が上昇した症例では治療予後が良くなる傾向である<sup>2)</sup>。この抗体価の上昇は、がん抗原の露出に伴う 2 次免疫応答で説明される。また免疫学的な重要性として、抗がん抗

原抗体とがん抗原の免疫複合体が樹状細胞表面の Fc 受容体を介して取り込まれると、長期の抗腫瘍効果に極めて重要な細胞性免疫が誘導される機構が報告されており<sup>4)</sup>、この抗体価測定はがん免疫治療のバイオマーカーとして合理性がある(図2)。原理的には体細胞変異に由来する neoantigen を標的とした細胞性免疫応答の活性化も液性免疫応答が補助的に関わっている可能性が高い。大規模試験が必要となるが、バイオバンク等に集積された血清を活用してこの抗体価の出現・変動パターンを解析すれば、がん免疫治療の奏効率の予測や治療経過の評価・診断に適用するためのパラメータが見えてくるであろう。

未病の健常人でも自己抗体の陽性例が散見されることが知られているが、がん抗原抗体も例外ではない。この自己抗体の出現は、がんの早期発見に向けたバイオマーカーにもなるかもしれないが、CT 抗原の場合は精巣特異的なタンパク質でもあり、血液精巣関門の傷害や男性不妊との相関も示唆される。自己免疫疾患に関連する自己抗体も、炎症反応初期には配列エピトープを認識する自己抗体の生産が優先的で、構造エピトープを認識する抗体の出現に伴って病態が重症化すると考えられている<sup>5)</sup>。バイオバンク等に集積された血清を活用して、自己抗体の出現パターンと臨床経過の相関を解析することで、重症化を防ぐ治療法開発のヒントが見つかることが期待される。

#### 謝辞

本稿で取り上げた研究の一部は JSPS 科研費 16H04580, AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム, シーズ A(H29)の助成を受け

たものです。

#### 文献

- 1) Kawabata R, Wada H, Isobe M, *et al.*, Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007; 120(10) : 2178-2184.
- 2) Futami J, Nonomura H, Kido M, *et al.*, Sensitive Multiplexed Quantitative Analysis of Autoantibodies to Cancer Antigens with Chemically S-Cationized Full-Length and Water-Soluble Denatured Proteins. *Bioconjug Chem* 2015; 26(10) : 2076-2084.
- 3) Ramaraj T, Angel T, Dratz EA, *et al.*, Antigen-antibody interface properties: composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(3) : 520-532.
- 4) DiLillo DJ and Ravetch JV, Differential Fc-Receptor Engagement Drives an Anti-tumor Vaccinal Effect. *Cell* 2015, 161(5) : 1035-1045.
- 5) Wu X and Tüzün E, Are linear AChR epitopes the real culprit in ocular myasthenia gravis? *Med Hypotheses* 2017, 99 : 26-28.