

表 3 各種固型癌における HLA クラス I 発現性

Origin	Total	Positive	Down/Negative (%)
・ Oral cancer	78	33	45 (58%)
・ <b>Breast cancer</b>	<b>41</b>	<b>6</b>	<b>35 (85%)</b>
・ Lung cancer	35	28	7 (20%)
・ Colon cancer	15	11	4 (27%)
・ Renal cell cancer	45	29	16 (36%)
・ Bladder cancer	53	35	18 (34%)
・ <b>Prostate cancer</b>	<b>49</b>	<b>9</b>	<b>40 (82%)</b>

構からの解除の可能性が想定される。

### 抗原提示関連分子の発現低下とその原因

著者らは、独自に提案しえたヒト HLA クラス I 発現性を検証するシステムによって、各種の癌組織における HLA クラス I 分子の発現レベルを検討したところ、発現低下例の頻度が癌種別に大きな差を生じていること、例えば、乳癌や前立腺癌ではその割合が多く(表 3)、この発現低下が独立した予後因子となりうることも明らかとなった<sup>3,4)</sup>。さらに HLA クラス I 分子は重鎖と軽鎖  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2M$ ) とのヘテ

ロダイマーから構成されるため、これらのいずれかの遺伝子発現低下を生じると、癌細胞膜上での MHC クラス I の発現低下につながる。重鎖については HLA-A, B, C の 3 種があるものの  $\beta_2M$  は共通な分子として存在するため、 $\beta_2M$  は HLA のすべての発現に関与する。前立腺癌や乳癌の多くにみられる HLA クラス I 分子発現低下の原因が  $\beta_2M$  遺伝子のヒストン脱アセチル化であることが解明された<sup>4)</sup>。

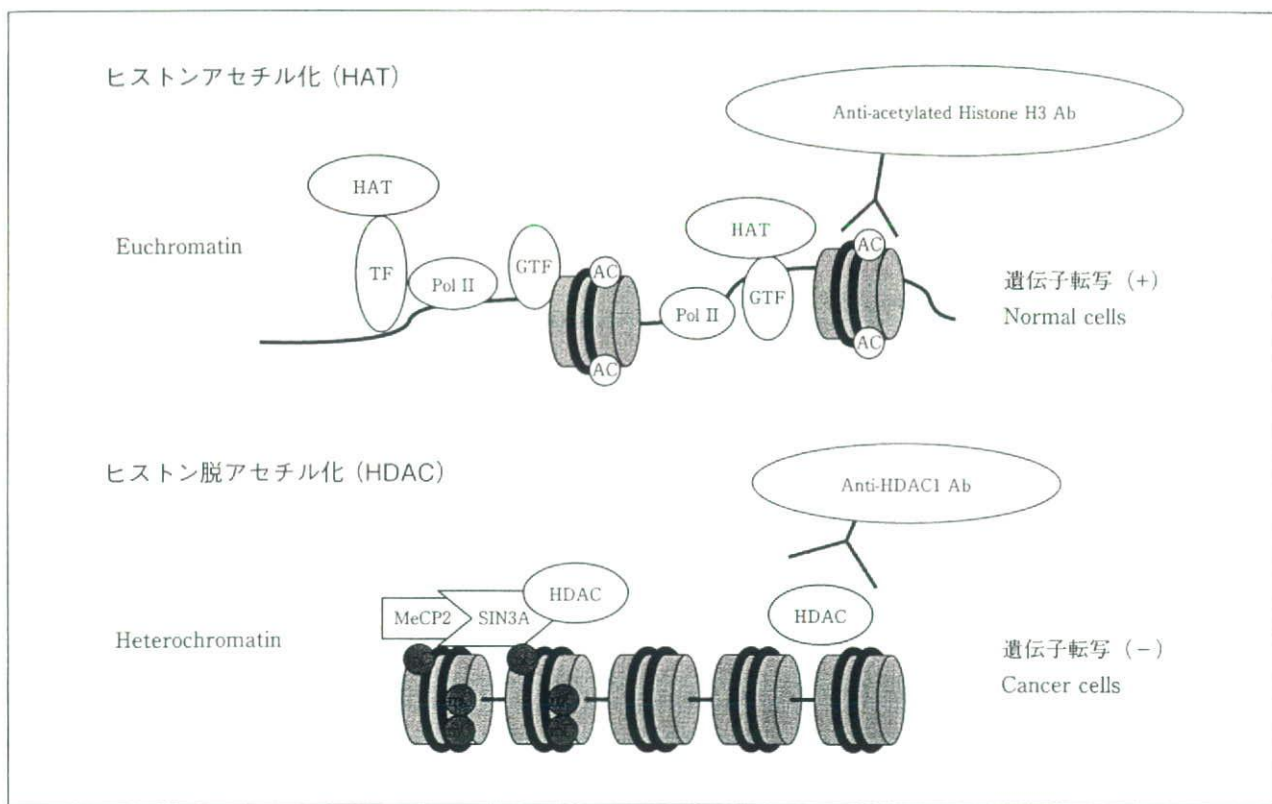


図 7 ヒストン修飾と遺伝子転写活性

表 4 抗原提示分子の発現低下と発現回復を目的とした薬剤(文献7, 表2の一部を紹介)

発現抑制遺伝子	研究対象癌腫	発現回復薬剤	
		<DNMT 阻害剤>	<HDAC 阻害剤>
I. MHC クラス I	神経芽細胞腫 <sup>8)</sup> 前立腺癌 <sup>4)</sup> 巨核球性白血病 <sup>10)</sup> メラノーマ <sup>11)</sup>	5-AZA・DC	TSA
			TSA
II. MHC クラス II	神経芽細胞腫 <sup>8)</sup> HeLa 細胞 <sup>12)</sup> 骨髄単球性白血病 <sup>10)</sup> B 細胞リンパ腫 <sup>13)</sup>	SB	SB
			TSA
III. $\beta_2$ -microglobulin	前立腺癌 <sup>4)</sup>		TSA
IV. CIITA	扁平上皮癌 <sup>9)</sup>		TSA

### エピジェネティクス制御による免疫逃避機構の解除は可能か

前述したようなエピジェネティクス免疫逃避機構が証明されると、一つは癌抗原遺伝子の増幅や HLA クラス I 発現機構の修飾化, すなわ

ち癌細胞における DNA メチ化現象あるいはヒストン脱アセチル化現象の阻害, そして細胞性免疫の CTL 賦活化, などが治療法の一つとして想定される。

本項では HLA クラス I におけるエスケープ機構にのみ焦点を当てて記載するよう依頼され

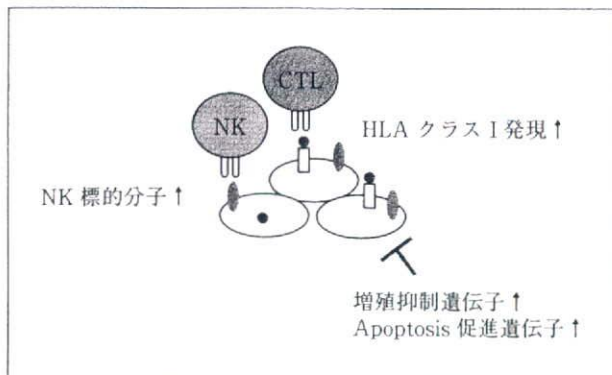


図 8 期待される HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果

ていることより、DNA メチル化酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を取り上げその有用性を想定し、かつ臨床試験・基礎研究の一部を紹介したい。すでに今日までに DMNT 阻害剤として 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA/DC), HDAC 阻害剤として valproic acid (VPA), trichostatin A (TSA), sodium butyrate (SB) が、適応疾患を異にして市販されている。HDAC の作用として考えられている箇所は図 7 を参照されたい。他に標的分子の特徴とその特異的選択性を目指した阻害作用を示す薬剤開発についての研究も行われており、それらの臨床応用に期待が寄せられている。これまでに明らかにされた抗原提示関連分子の発現抑制遺伝子と発現回復薬剤を表 4 に要約した。これら薬剤の作用は図 8 に示したような抗腫瘍効果を期待できる。

### 他のエピジェネティクス免疫逃避機序と関連知見

抗原直接提示あるいは HLA クラス I 分子が直接関与する抗原提示関連分子とは別に、T 細胞へのシグナル伝達に参与する adhesion-costimulatory molecules (例: CD80, C86) の発現抑制によって免疫逃避を生じることが知られている。これらについても HDAC 阻害剤の有用性が報告されている<sup>10)</sup>。また、NK 細胞活性化分

子として知られる MICA/MICB の HDAC 阻害剤による発現回復が確認されている<sup>14,15)</sup>。このことは、HDAC 阻害剤が関与する分子については、標的抗原以外にも存在しうることを示したものである。このことはさらに細胞内アポトーシスシグナル伝達分子に研究が進んでおり、そのエピジェネティクスな免疫エスケープ機序を生じていることが報告されている<sup>16-19)</sup>。

### おわりに

腫瘍免疫の作用発現の腫瘍細胞側因子の必須条件として、①抗原エピトープの発現、②MHC (クラス I およびクラス II) の発現、を挙げることができる。しかし、診断時に腫瘍抗原の発現が認められないか HLA クラス I の発現低下・消失した症例数が多いことも知られていた。札幌医科大学病理学第一講座で HLA クラス I に対する適切な抗体を提案するに至り、このような免疫逃避機構の解析にさらなる進展がみられ、エピジェネティクスの知見の融合が図られているといえる。これらの知見は、今後の癌ワクチン療法の発展のための新しい扉を開いたといえる。

### 文 献

- 1) Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, *et al.*: Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; **74**: 181-273.
- 2) Ogino T, Bandoh N, Hayashi T, *et al.*: Association of tapasin and HLA class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesion with reduced survival of patients. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 4043-4051.
- 3) Tsuruma (in press)
- 4) Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, *et al.*: Down-regulation of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol* 2007; **178**: 692-696.
- 5) 池田英之: 腫瘍エスケープにおけるキラー細胞抑制性受容体の意義. *細胞工学* 1998; **17**: 1239-

- 1244.
- 6) 河上 裕: 免疫制御のための戦略. 実験医学 2001; **19**: 2577-2584.
  - 7) 中津川宗秀, 鳥越俊彦: エピジェネティクスにより制御される腫瘍の免疫逃避機構. Annual Review 免疫 2008: 203-209. 2008.
  - 8) Magrer WJ, Kazirn AL, Stewart C, *et al.*: Activation of MHC class I, II and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol* 2000; **165**: 7017-7024.
  - 9) Kanesaki T, Ikeda H, Takamura Y, *et al.*: Histone deacetylase, but not hypermethylase, modifies class II transactivator and MHC class II gene expression in squamous cell carcinomas. *J Immunol* 2003; **170**: 4980-4985.
  - 10) Maeda T, Towatari M, Kosugi H, *et al.*: Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2000; **96**: 3847-3856.
  - 11) Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, *et al.*: Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in myeloma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 2001; **94**: 243-251.
  - 12) Zika E, Greer SF, Zhu X-S, *et al.*: Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhancosome formation. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 3091-3102.
  - 13) Gialitakis M, Kretsovali A, Spilianakis C, *et al.*: Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by Trichostatin A. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 765-773.
  - 14) Skov S, Pedersen MT, Andresen L, *et al.*: Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I related chain A and B. *Cancer Res* 2005; **65**: 11136-11145.
  - 15) Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, *et al.*: Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res* 2005; **65**: 6321-6329.
  - 16) Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, *et al.*: Inhibitors of histone deacetylases induce tumor selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005; **11**: 71-76.
  - 17) Eramo A, Pallini R, Lotti F, *et al.*: Inhibition on DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res* 2005; **65**: 11469-11477.
  - 18) Horak P, Plis D, Haller G, *et al.*: Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2005; **3**: 335-343.
  - 19) Fulda S, Debatin K-M: 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-Oncogene. 2006; **25**: 5125-5133.

# 41

## IFN, サイトカイン-1

### がん治療の分子標的となるデス受容体のシグナル伝達分子

藤倉大輔 岩井 淳 佐藤昇志 宮崎忠昭

#### 要 旨

最近、化学療法剤、内分泌療法剤、サイトカインに加えて、トラスツズマブ(ハーセプチン<sup>®</sup>)やゲフィチニブ(イレッサ<sup>®</sup>)などの分子標的薬剤ががんの治療効果を示している。これらはHER2の抗体およびEGFRのチロシンキナーゼ阻害剤であり、細胞増殖シグナルを伝達するシグナル分子の機能を抑制する。そこで、本章では、新たながん治療の分子標的であるデス受容体を介したアポトーシスシグナルにおいて重要な分子に焦点を当て、これらの機能と役割などについて紹介する。

#### キーワード

- デス受容体ファミリー
- アポトーシス
- DAP3 (Death-associated protein-3)
- LKB
- アノイキス

#### 41-1・デス受容体ファミリー

アポトーシスを誘導するサイトカインは、腫瘍壊死因子tumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属するタンパク質であり、TNF $\alpha$ 、Fasリガンド (FasL)、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) およびTL1A (TNF like ligand 1A) が同定されている(図41-1)。これらのリガンドが結合しアポトーシスシグナルを細胞内に伝達するデス受容体death receptor (DR) ファミリー分子にはI型TNF受容体、Fas、DR3、I型およびII型TRAIL受容体 (DR4, DR5) に加えてDR6が含まれる。ただし、DR6に関してはそのリガンドは同定されていない。これらDR分子は、細胞外領域にそれぞれの特異的リガンドとの結合およびその認識に重要なシステインリッチ領域を有し、細胞内領域にはデスドメインdeath domain (DD) と呼ばれる共通構造をもつI型膜貫通タンパク質である(図41-1)。DR分子のシステインリッチ領域はTNF受容体スーパーファミリーに特徴的な構造であるため、DR分子はこのファミリーのうち特にアポトーシスを誘導するサブファミリーとして位置づけられる。

これらDR分子は定常状態では細胞膜上に単量体として存在しているが、液性因子としてあるいは隣接する細胞の細胞膜上に三量体として存在するデスリガンドdeath ligandとの結合によりDR分子の三量体が形成され、以降の細胞内シグナル伝達経路の活性化が誘導される。これまでにDR分子はさまざまな細胞内シグナル伝達経路を活性化することが報告されており、そのなかでも特にカスパーゼcaspaseの活性化経路がそのアポトーシス誘導に必須であると理解されている。現在、TRAILの組換えタンパク質やDR4、DR5に対する抗体についての原発性慢性リンパ球性白血病や肺がんなどの患者に対する臨床試験が行われているが、今後、カスパーゼ活性化に至るシグナル分子も抗がん剤の標的分子となるものと考えられる。一方、DR分子は転写因子であるNF- $\kappa$ B経路やMAPKファミリーの一因であるJNKの活性化を誘導し、サイトカインなどさまざまな遺伝子発現を誘導する免疫システムの制御因子としての役割を担うことも明らかにされている。また、後に詳述するがこれらのシグナル伝達経路もまたアポトーシスの誘導制

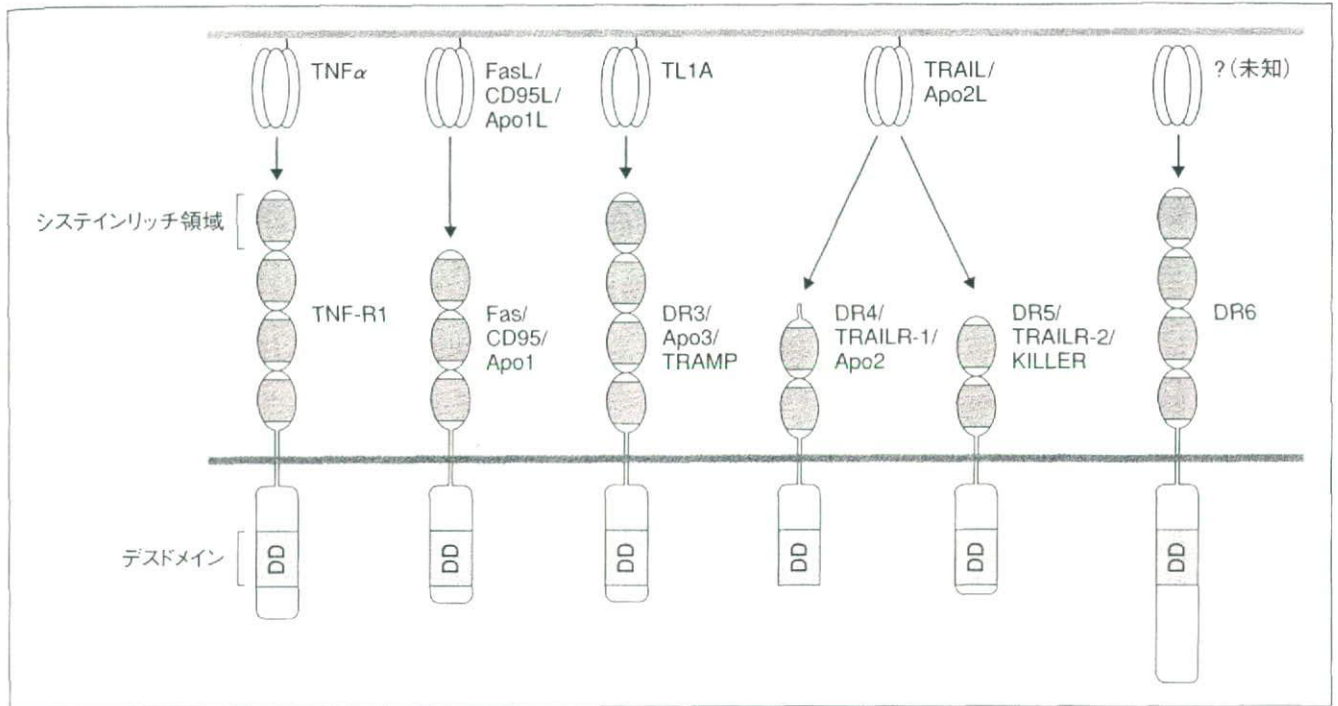


図41-1 デス受容体ファミリー分子とそのリガンド

御に参与することが示唆されており、DRを介したアポトーシス誘導経路は多段階的に厳密に制御されていることが明らかにされている。

## 41-2・デス受容体を介したアポトーシス誘導制御メカニズム

### 1. アポトーシス促進経路

S. Yoneharaら<sup>1)</sup>により、最初のDRであるFasの存在が明らかにされ、その後、そのアポトーシス誘導メカニズムの詳細について多くの研究者により精力的に研究されてきている。これまでに、既知の

分子に会合するタンパク質を同定する方法として急速に普及した酵母ツーハイブリッド法による解析の結果、Fasの細胞内領域に結合するタンパク質としてFADD (Fas associated protein with death domain) が同定された。FADDはFasと同様、そのカルボキシ末端領域に存在するDDを介して、FasのDDに結合する。一方、同様の方法を用いてFADDに結合するタンパク質としてFLICE (FADD-like ICE) が同定された。FLICEはアミノ末端領域に、FADDのアミノ末端構造と相同性の高い領域DED (death effector domain) をもち、DEDを介してFADD

### キーワード解説

- **デス受容体ファミリー**：アポトーシスを誘導するサイトカイン受容体群。Fas、I型TNF受容体、DR3、I型TRAIL受容体、II型TRAIL受容体およびDR6が含まれる。
- **アポトーシス**：生体の恒常性を維持するために必要な遺伝子レベルでプログラムされた細胞死。アポトーシス誘導の異常は、がん、自己免疫疾患などさまざまな疾患の発症や重症化に参与することが示されている。
- **DAP3 (Death-associated protein-3)**：TNF $\alpha$ 、Fas、TRAILのアポトーシス誘導に重要な分子であり、ミトコンドリアの恒常性の維持にも関与する。
- **LKB**：小腸を中心とした消化管に多発性のポリープが生じる遺伝性疾患ポイツ・イエーガー症候群(PJS)の原因遺伝子として知られるがん抑制遺伝子。
- **アノイクス anoikis**：細胞間接着喪失により誘導されるアポトーシスであり、アノイクスの制御はがん細胞の転移、増悪の抑制に重要である。

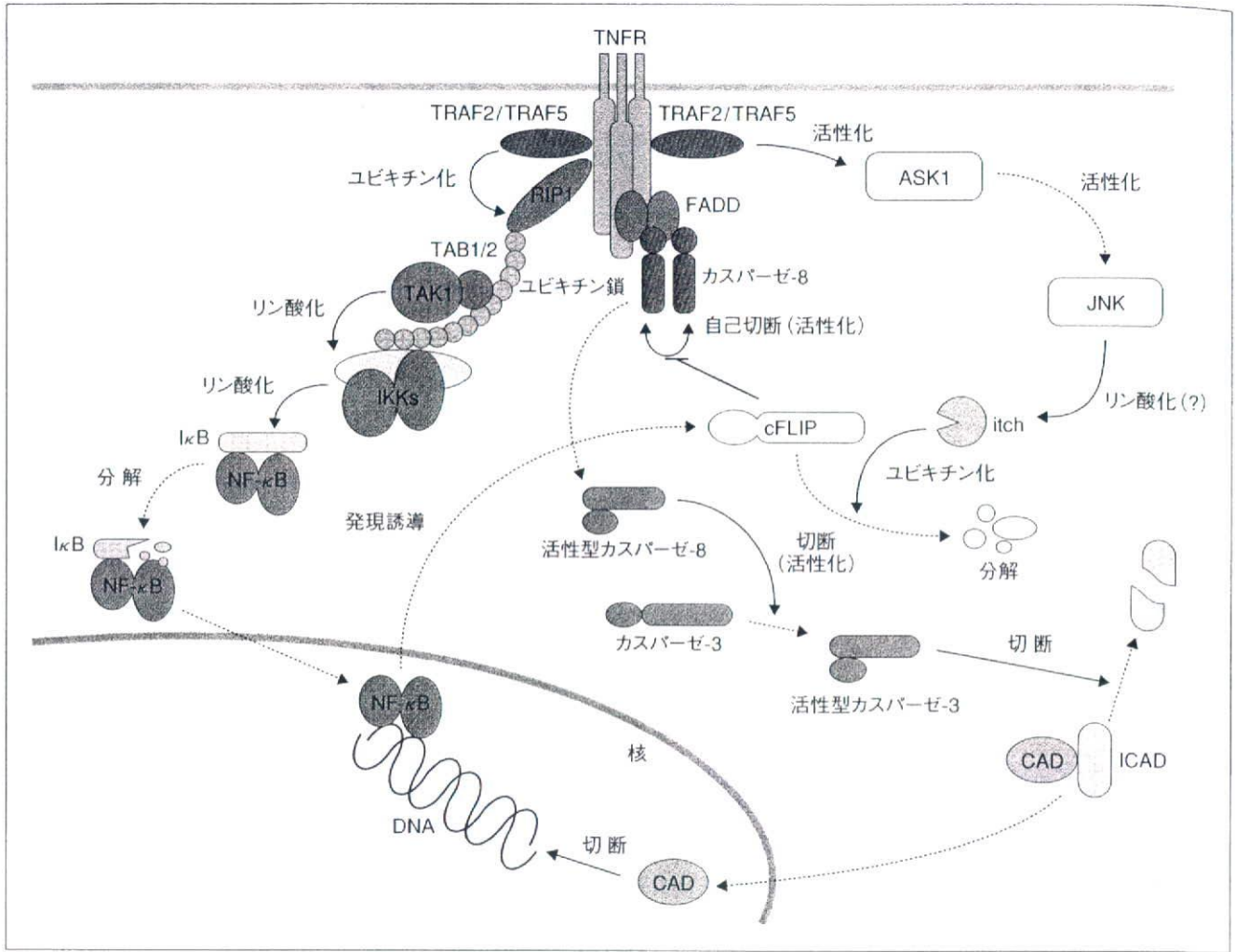


図41-2 TNFRを介するアポトーシス誘導機構

のDEDと結合する。また、FLICEのカルボキシ末端領域には、活性部位にシステイン残基を有し認識配列のアスパラギン酸残基の直後を切断する酵素カスパーゼの活性化領域をもつ。このことからFLICEはカスパーゼ-8とも呼ばれる。カスパーゼ-8は定常状態では不活性な前駆体として細胞内に存在するが、この分子自身に認識および切断される配列をもつため、ひとたび活性化すると自己切断、あるいは近傍のカスパーゼ-8分子間で切断が起こり活性化型フォームとなる。このモデルは、DR分子がリガンド刺激により三量体を形成し、これに伴いDR分子の細胞内領域に会合したFADDおよびカスパーゼ-8が細胞膜近傍の微小領域に集族する考えるとリーズナブルである。一方、活性化されたカスパーゼ-8はその基質としてカスパーゼ-3を認識および切断し、活性化を誘導する。活性化されたカスパーゼ-3はICAD [inhibitor of CAD (caspase-activated DNase)]の切断を介したCADの活性化を

誘導する。このようにカスパーゼ-3はICADを含むさまざまな細胞内タンパク質を基質として認識・切断し、これらタンパク質の不活性化あるいは活性化の誘導を介してDNAの断片化を促進しアポトーシス誘導の実行因子として働く。

## 2. アポトーシス調節経路

DR分子は前述したようにカスパーゼの活性化経路のみならず、さまざまな細胞内シグナル伝達経路を活性化する(図41-2)。これらを自動車にたとえるとカスパーゼ活性化経路はいわばアポトーシス誘導へのエンジンと位置づけられ、その他の経路はアクセルあるいはブレーキの役割を果たすと考えられる。免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子の発現調節因子として同定されたNF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa B)は同じRelファミリー分子 (RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p105/p50, NF- $\kappa$ B2/p100/p52の5種類)とのホモあるいはヘテロ二量体を形成す

る転写因子である。その後の解析からNF- $\kappa$ Bはさまざまな炎症性サイトカインなどの遺伝子発現に重要であることが明らかにされている。他のサイトカインによる刺激と同様、DRを介したシグナルもまたNF- $\kappa$ Bの活性化を誘導する。DRシグナルにおけるNF- $\kappa$ Bの役割については、その構成因子であるRelAの欠損細胞がTNF刺激によるアポトーシスに感受性であることからアポトーシスの抑制に働くと考えられている。DR分子によるNF- $\kappa$ B経路の活性化の詳細については依然として不明な点が多いが、現在DR分子の細胞内領域に直接的に結合するTRAF (TNF receptor associated factor)ファミリー分子 (TRAF1~6の6つの分子を含む) により活性化されることが示されている。なかでもTRAF2およびTRAF5は、これらの遺伝子のダブルノックアウトマウスの解析からTNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化に必須であることが示された。さらにTRAFタンパク質はRIP1 (receptor interacting protein kinase 1) のユビキチン化を行い、TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1) 複合体 [TAB (TAK1 binding protein) 1/2 およびTAK1の複合体] をRIP1へリクルートする (図41-2)。シグナル伝達経路においてTAK1はIKK複合体 (IKK $\alpha/\beta/\gamma$ の複合体) の上位に位置するキナーゼであり、リン酸化によりこれらIKK複合体の活性化を誘導する。NF- $\kappa$ Bは定常状態ではI $\kappa$ Bと細胞質内で結合しており、細胞核内への移行が阻害されている。活性化されたIKKはI $\kappa$ Bのリン酸化および分解を誘導する。I $\kappa$ Bより遊離したNF- $\kappa$ Bは細胞核内へ移行し、遺伝子の発現を誘導する。NF- $\kappa$ Bによるアポトーシスの抑制機構については、NF- $\kappa$ Bが転写因子であることから直接的にカスパーゼの活性化経路に関与するよりは新たなタンパク質の発現を誘導することによるものと考えられる。現在、NF- $\kappa$ Bを分子標的とした抗がん剤に関する創薬開発が進められている。これまでにNF- $\kappa$ Bにより発現誘導される因子のうち、アポトーシスを抑制する最も重要な因子についてはいまだ明確な結論が示されていないが、近年、ある種の細胞において、NF- $\kappa$ B活性化を介してTNF $\alpha$ 刺激により発現誘導される因子、cFLIP (FLICE inhibitory protein) が有力視されている。cFLIPはカスパーゼ-8

と似た構造をもち、アミノ末端領域にDEDを、カルボキシ末端領域にシステインプロテアーゼドメイン様構造を有するが、活性中心であるシステインがチロシンに変異しており、プロテアーゼ活性をもたない。cFLIPはカスパーゼ-8と結合し、その活性化を阻害することによりDRを介したアポトーシス誘導を抑制すると考えられている。

一方、TNF $\alpha$ を含むデスリガンドによる刺激はMAPKの1つであるJNKの活性化を誘導する。TNF $\alpha$ 刺激下におけるJNK経路の活性化が、アポトーシス誘導に対して抑制的であるのか促進的であるのかについては依然として多くの議論がなされているが、近年の報告では促進的に働くとする見解が優勢のようである。TNF $\alpha$ 刺激下において、JNKの活性化は刺激後10~30分において強く誘導され、刺激後60分までに速やかに消失する。一方、NF- $\kappa$ Bを介した遺伝子発現が遮断された条件下、たとえばNF- $\kappa$ Bの構成因子であるRelA遺伝子欠損やタンパク質産生阻害剤であるシクロヘキシミド存在下においては、TNF $\alpha$ 刺激後60分以降においてもJNKの活性化が認められる。また、前者の条件下ではTNF $\alpha$ 刺激による細胞死誘導は認められないが、後者の条件下では認められることから、TNF $\alpha$ 刺激による細胞死誘導と刺激後60分以降のJNKの活性化には密接な関係が存在することが示唆される<sup>2,3)</sup>。実際、TNFシグナルにおけるJNKの活性化に重要なASK1の遺伝子欠損細胞は、TNF $\alpha$ によるアポトーシス誘導に対して抵抗性であることが報告されている<sup>4)</sup>。TNFシグナルにおけるJNK経路のアポトーシス促進機構の詳細については依然として不明な点が多いが、近年、M. KarinらのグループはJNKが、cFLIPに対してE3ユビキチンリガーゼとして機能するitchタンパク質の活性を制御して、cFLIPのプロテオソーム依存的なタンパク質分解を誘導すること、また、この経路がTNF $\alpha$ による細胞死誘導に必須であることを示した<sup>5)</sup>。また、cFLIPはTNFシグナルにおいてJNK経路の活性化を抑制することも報告されており<sup>6)</sup>、cFLIPの発現制御はNF- $\kappa$ BやJNKによるカスパーゼ活性化経路の制御メカニズムの重要な作用点の1つと考えられる。これらのアポトーシス制御に働くシグナル分



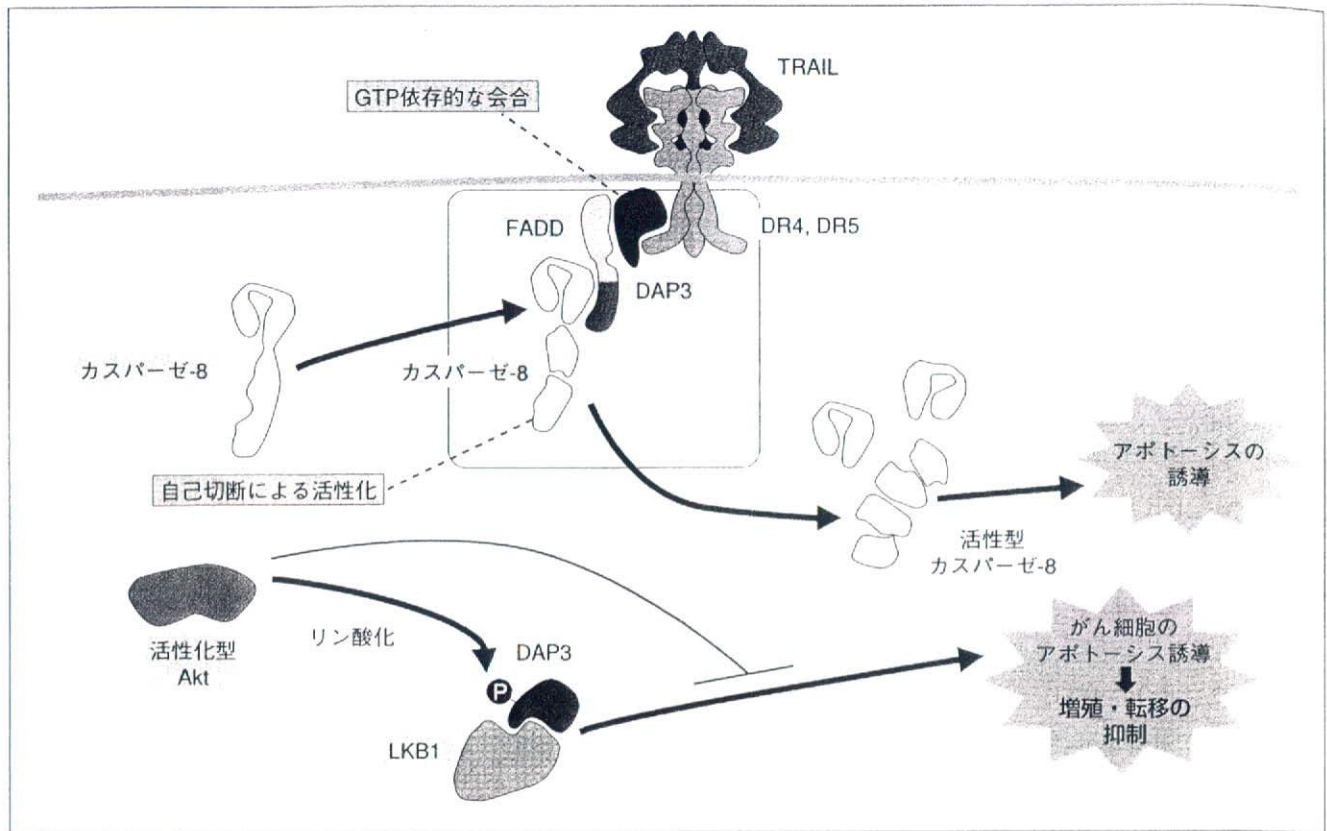


図41-3 DR4, DR5を介するDAP3およびLKB1のアポトーシス誘導機構

子は抗がん剤の標的分子として、今後、創薬開発への応用研究が期待される。

### 3. その他のデス受容体シグナルの制御分子

DAP3 (death-associated protein-3) はFas,  $TNF\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ およびDR4, DR5を介したアポトーシスのシグナル伝達に重要なGTP結合タンパク質である<sup>7-9</sup>). DAP3はFADDおよびカスパーゼ-8と複合体を形成し、カスパーゼ-8の活性化を介してアポトーシス誘導に働く(図41-3). また、DAP3はミトコンドリアにも多く存在し、アポトーシスシグナルが伝達される際、ミトコンドリアの分断化および恒常性の維持に参与する<sup>10</sup>).

また、DAP3は細胞間接着の喪失により誘導されるアポトーシスとして知られるアノイキスanoikisの誘導にも重要であることが示されており、がんの転移抑制に働くことが示唆されている<sup>11</sup>). DAP3のアノイキス誘導能はセリン-トレオニンキナーゼの1つであるAkt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog-1)によって制御されており、活性化されたAktによりDAP3がリン酸化されるとアノイキス誘導能が抑制される(図41-3). またAktは

DAP3のほかにもミトコンドリア膜電位の喪失によるアポトーシス誘導に参与するBad (Bcl2-antagonist of cell death)のリン酸化と機能を抑制し、アポトーシスの阻害機能を有している<sup>12</sup>). Aktはその活性化に働くPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), および抑制的に働くPTEN (phosphatase and tensin homolog)とともにがん組織において高頻度とその機能制御の喪失が認められており<sup>13</sup>), 発がんとの相関性が示されている. DAP3の遺伝子変異と発がんとの相関はまだ報告されていないが、デス受容体のシグナル伝達に参与し、その機能制御にAktが参与していることから、発がんあるいはがん細胞の増殖にDAP3が参与していることが推定される.

骨肉腫細胞では、TRAILによるアポトーシス誘導が起こりにくいため、筆者らはTRAIL感受性の調節に参与するDAP3会合分子のスクリーニングを行った. その結果、得られた分子の1つはLIP1 (LKB1 interacting protein 1)であり、この分子はがん抑制遺伝子LKB1 (STK11)の機能調節因子であった. LKB1はLIP1とともにDAP3と会合し、TRAIL刺激によるアポトーシス誘導シグナル伝達経路にかかわることが示され、骨肉腫治療の標的分子となる可能

性が示唆された(図41-3)<sup>14)</sup>。また、LKB1は口唇、口腔内、指などの色素沈着と小腸を中心とした消化管に多発性のポリープが生じる遺伝性疾患ポイツ・イェーガー症候群Peutz-Jeghers syndrome (PJS)の原因遺伝子として知られているセリントレオニンキナーゼである<sup>15)</sup>。PJSは優性遺伝の先天性遺伝子疾患として知られ、常染色体上の19p13.3に位置するLKB1遺伝子の変異により発症する。また、その遺伝子変異はLKB1のキナーゼ活性にかかわる部位に集中している。PJS患者では腸管で多発

するポリープががん化するリスクは低いとされるが、その一方で膵臓がん、乳がん、肺がん、卵巣がんおよび子宮がんを発症するリスクが高いことから、LKB1はがん抑制遺伝子と考えられている。実際、K-ras [Kirsten rat sarcoma-2 viral (v-Ki-ras2) oncogene homolog]の変異を有するマウス肺がんモデルではLKB1の遺伝子欠損は他のがん抑制遺伝子であるp53やInk4a/Arf (Cdkn2a)の遺伝子欠損に比べ、腫瘍転移の著しい増大が認められており<sup>16)</sup>、がん抑制遺伝子としての重要性が示されている。

#### //// 文 献 ////

- 1) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 169: 1747-1756, 1989.
- 2) De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G: Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*, 414: 308-313, 2001.
- 3) Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A: Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, 414: 313-317, 2001.
- 4) Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H: ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2: 222-228, 2001.
- 5) Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M: The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF alpha-induced cell death by inducing c-FLIP (L) turnover. *Cell*, 124: 601-613, 2006.
- 6) Nakajima A, Komazawa-Sakon S, Takekawa M, Sasazuki T, Yeh WC, Yagita H, Okumura K, Nakano H: An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J*, 25: 5549-5559, 2006.
- 7) Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, Raveh T, Khaspekov G, Kimchi A: Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J Biol Chem*, 270: 27932-27936, 1995.
- 8) Kissil JL, Cohen O, Raveh T, Kimchi A: Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *EMBO J*, 18: 353-362, 1999.
- 9) Miyazaki T, Reed JC: A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol*, 2: 493-500, 2001.
- 10) Kim HR, Chae HJ, Thomas M, Miyazaki T, Monosov A, Monosov E, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC: Mammalian dap3 is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis. *FASEB J*, 21: 188-196, 2007.
- 11) Miyazaki T, Shen M, Fujikura D, Tosa N, Kim HR, Kon S, Uede T, Reed JC: Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem*, 279: 44667-44672, 2004.
- 12) del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 278: 687-689, 1997.
- 13) Castellino RC, Durden DL: Mechanisms of Disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node-an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol*, 3: 682-693, 2007.
- 14) Takeda S, Iwai A, Nakashima M, Fujikura D, Chiba S, Li HM, Uehara J, Kawaguchi S, Kaya M, Nagoya S, Wada T, Yuan J, Rayter S, Ashworth A, Reed JC, Yamashita T, Uede T, Miyazaki T: LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res*, 27: 761-768, 2007.
- 15) Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA: A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391: 184-187, 1998.
- 16) Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai D, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li D, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin X, Shapiro GI, Jänne PA, Johnson BE, Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH, Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK: LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*, 448: 807-810, 2007.

# 41

## IFN, サイトカイン-2

### がん治療の分子標的となるIFN-IRF系のシグナル伝達分子

高岡晃教 佐藤昇志 宮崎忠昭

#### 要旨

I型インターフェロンは特異的な受容体を介して、主にJakキナーゼとStat転写因子、IRF転写因子という細胞内シグナル伝達経路を活性化させることで、さまざまな誘導遺伝子を発現誘導し、多彩な作用をひき起こす。その代表的な生物学的活性の抗ウイルス作用をもつサイトカインであるI型IFNは、腫瘍に対して直接および間接的な抑制効果を示すことが知られている。また定常状態から微量に発現するI型IFNによるシグナルが免疫系を介する腫瘍監視機構にも関与していることも示されてきた。一方、当初、ウイルス感染によるI型IFN遺伝子の産生誘導に関与する転写因子として発見されたIFN調節因子(IRFs)は現在9つのメンバーが同定されているが、このメンバーの中には、IFN産生とは無関係にがん化のプロセスに対する正および負の制御に関係していることが明らかとなってきた。このようなIFN-IRF系のがんとの関連性を考慮すると、IFNシグナル伝達に関わる分子のみならず、がんに関わるIRFファミリーメンバーをターゲットとした治療の有用性が示唆される。

#### キーワード

- I型インターフェロン
- インターフェロンによる“弱いシグナル”
- IRF転写因子
- Toll様受容体(TLR)

#### 41-3・I型インターフェロンシグナル

典型的なI型インターフェロンinterferon (IFN)によるシグナル伝達経路は、2種類の受容体サブユニットであるIFNAR-1およびIFNAR-2の各々に会合しているTyk2とJak1の活性化から始まる。次にStat1, Stat2, さらにIFN調節因子interferon-regulatory factor (IRF)ファミリーメンバーであるIRF-9が加わったヘテロ三量体から構成されるISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) 転写因子複合体が形成される(図41-4)。この主要な経路のほかに、Stat1ホモ二量体であるAAF (IFN- $\alpha$ -activated factor)も形成され(図41-4)、これらの2種類の転写因子複合体が核内移行して各種IFN誘導遺伝子interferon-stimulated gene (ISG)の調節領域に結合し、転写が開始される。この場合のISGF3とAAFのコンセンサス結合配列は、各々ISREおよびGAS (IFN- $\gamma$ -activated site)と呼ばれる。I型IFNによる生物学

的活性は抗ウイルス作用をはじめ、抗腫瘍作用や免疫調節作用と少なくともこの3つの主要な作用で代表されるが、このような多彩な生物学的活性は、下流で発現されるさまざまなISGによる作用の総和と考えられる<sup>1)</sup>。

I型IFNに属するIFN- $\alpha/\beta$ は腎がんや脳腫瘍などの悪性腫瘍の治療に臨床応用され、一部のがんにおいてはその効果も確認されている<sup>2-5)</sup>。I型IFNシグナルによる抗腫瘍作用のメカニズムについては腫瘍細胞に直接的な作用と免疫賦活を介する間接的な作用の2つの局面から考えられる。IFN- $\alpha/\beta$ の直接的な抗腫瘍効果として、これまでTRAILなどを誘導する分子の発現誘導や逆にBcl-2などの因子の発現抑制といったアポトーシス制御のほか、増殖や細胞周期の制御、細胞分化誘導、腫瘍関連抗原やMHC (major histocompatibility complex) クラスI分子の発現増強などにかかわることが示され

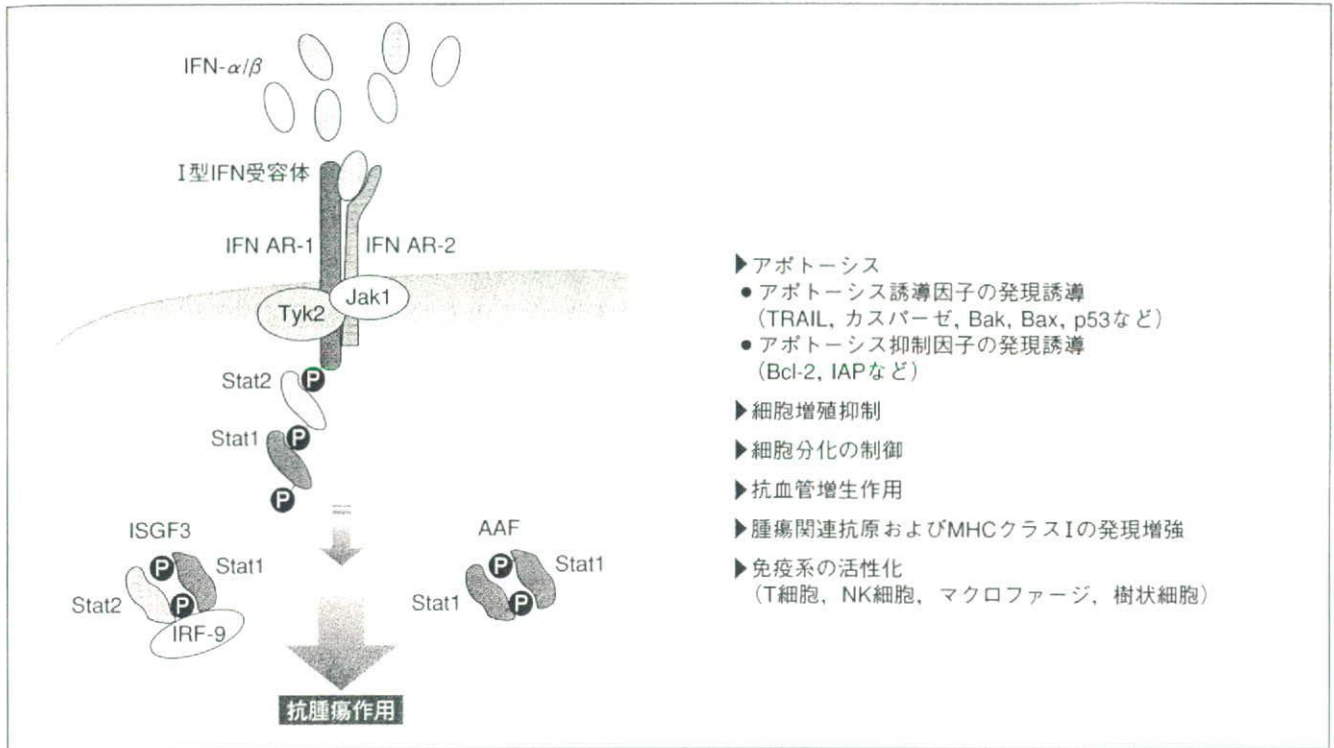


図41-4 I型IFN受容体とIFNシグナルによる抗腫瘍作用発現に関与するメカニズム

## キーワード解説

- **I型インターフェロン**：インターフェロン (IFN) は抗ウイルス作用を有するサイトカインとして知られ、その受容体の違いから、I型 (IFN- $\alpha/\beta$  など)、II型 (IFN- $\gamma$ )、そしてIII型 (IFN- $\lambda$ s) の3つに分類される。ウイルス感染時に宿主細胞においてウイルス由来の主に核酸を認識することでその下流でIFN- $\alpha/\beta$  遺伝子発現が誘導される。IFNsはさらに抗腫瘍作用や免疫賦活作用も有しており、なかでもIFN- $\alpha/\beta$  は肝がんや腎がん、脳腫瘍などのヒト悪性腫瘍に対し、多くの場合、化学療法との併用で臨床応用されている。
- **インターフェロンによる“弱いシグナル”**：I型IFNs (IFN- $\alpha/\beta$ ) はウイルス感染が存在しない状態でも微量に産生されていることが報告されていた。このような構成的に産生されている微量なIFN- $\alpha/\beta$  による“弱いシグナル”は一見、何も役割がないようにみえるが、重要なシグナル増幅作用の役目があることが明らかになってきた。IFN- $\alpha/\beta$  による“弱いシグナル”がIFN- $\gamma$  およびIL-6によるシグナル伝達系や、ウイルス感染によるI型IFN産生に対して増強作用があることが示されている。すなわち、このIFN- $\alpha/\beta$  による“弱いシグナル”は、迅速に効率良く、強力な細胞応答を発現するための重要な調節機構であると考えられる。このような仕組みは、自動車を勢いよく発進させるためには“エンジンをふかしているrevving up”の方が効率が良いという仕組みと類似し、細胞のエンジンを常にふかしておくことは生体防御の細胞応答において重要な役割を担っていると考え、このようなシステムを“revving-up system”と呼んでいる。このような構成的なIFN- $\alpha/\beta$  シグナルに、細胞のがん化を防ぐための役割があることも示されている。
- **IRF転写因子**：ウイルス感染によるI型IFN遺伝子の転写制御機構の研究過程においてIFN- $\beta$  遺伝子の発現調節領域に結合する転写因子IRF-1がT. Taniguchiのグループによって同定されたのが最初である。現在9つのファミリーメンバーが知られており、各々異なった役割を担っていることがわかってきた。I型IFNsの発現誘導に関与するのは主にIRF-3やIRF-7であり、IFNシグナル伝達に関与するのはIRF-2とIRF-9である。IRF-1やIRF-5はストレス応答によるアポトーシスや細胞周期の制御に関わっている。IRF-6は腫瘍抑制因子であるmaspin (mammary serine protease inhibitor) と会合し、乳がん細胞の浸潤と関連することが報告されている。
- **Toll様受容体 Toll-like receptor (TLR)**：ショウジョウバエの体軸形成に関わるToll分子の変異体が真菌感染に対する抵抗力が弱くなるということから感染制御に関与することが初めて見いだされた。そのヒトホモログがToll様受容体 (TLRs) である。現在少なくとも13近くのメンバーから構成されるファミリーを形成している。宿主細胞とは構造的に異なる微生物由来の核酸や脂質、タンパク質などの分子パターンの構造を認識する受容体である。抗原提示細胞などでは、侵入した病原体を感知し、受容体下流でIFNをはじめとするサイトカインやケモカイン、共刺激分子などの発現を誘導することで自然免疫系のみならず適応免疫系の活性化をひき起こす。腫瘍免疫においても関連性が示唆されている。

てきた<sup>6)</sup>(図41-4)。これに加え、IFN- $\alpha/\beta$ によってがん抑制因子であるp53の遺伝子発現誘導が行われることが報告されている<sup>7)</sup>。このp53の誘導はIFN- $\alpha/\beta$ シグナルの下流で、IRF-9を含むISGF3を介して行われる。IFN- $\alpha/\beta$ 自体にp53を活性化させる作用は認められないが、IFN- $\alpha/\beta$ 処理による細胞内のp53のタンパク質レベルの増加によって、DNA損傷時のp53を介する応答性が增強されることが示された。これはIFN- $\alpha/\beta$ 処理によって抗がん剤投与やX線照射の結果誘導されるアポトーシスの程度が增強されることが期待され、効果的なIFN- $\alpha/\beta$ 併用療法への1つのヒントを提示しているものと考えられる。おそらく生体内におけるIFNの効果は多様性に富んでおり、このような直接作用に加え、特にNK細胞をはじめとする免疫賦活を介する間接的な抗腫瘍作用も併せて発現されるものと考えられる。

一方で、I型IFNシグナルとがん化抑制との関連性についても興味深い知見が得られている。定常状態において、細胞ががん化を起こした場合に免疫システムにより、それを排除する機構が存在していることが知られている。このようなcancer immunoeditingという局面において、I型IFNシグナルが関与し、発がん過程において抑制的に働

いていることが報告されている<sup>8)</sup>。実際、ウイルス感染がない状況においても、発現レベルははかなり低いながらも構成的にI型インターフェロンが産生されていることが示されている<sup>9)</sup>。この微量なIFNによる“弱いシグナル”は、IFN- $\gamma$ やIL-6によるサイトカインシグナル応答やウイルス感染時のIFN- $\alpha/\beta$ 産生についてより強力な細胞応答を発現するための調節シグナルとしてその重要性が示されている<sup>7,9)</sup>。この場合の微量なIFN- $\alpha/\beta$ 産生のメカニズムは、ウイルス感染時にひき起こされる大量のIFN- $\alpha/\beta$ 産生機構とは異なっており、IRF-3やIRF-9には依存しないようであるが、詳細な産生メカニズムはまだ明らかにされていない。

#### 41-4・IRFファミリー転写因子

ウイルス感染によるIFN- $\alpha/\beta$ 遺伝子産生誘導機構の解明はIRFの発見により急速に進展した。IFN- $\beta$ 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子として一番はじめに発見されたのがIRF-1であり、マウスやヒトにおいては現在までに9つのメンバーが同定されている<sup>10)</sup>。N末端側にファミリーメンバー間で共通して保存された領域としてIRFドメインと呼ばれるDNA結合ドメインを有する(図41-5)。IRFは多くの場合ホモ二量体やヘテロ二量体

がんに関連するIRFファミリーメンバー	がんに対する作用	正常組織発現分布	がんとの関連性
DNA結合領域 IRF-1 (325 a.a.) 	suppressive	広く多臓器に分布	消化器がんや乳がん、白血病などで遺伝子異常や発現低下を認める
IRF-2 (349 a.a.) 	oncogenic	広く多臓器に分布	乳がんが発現増強を認める
IRF-4 (450 a.a.) 	oncogenic	血液系細胞	多発性骨髄腫の細胞で染色体転座t(6;14)(p25;q32)による過剰発現を認める
IRF-5 (504 a.a.) 	suppressive	広く多臓器に分布	ヒト血液系腫瘍や消化器がんが発現消失を認める
IRF-8 (424 a.a.) 	suppressive	血液系細胞	骨髄性白血病で発現低下を認める

図41-5 がんに関連性の深いIRFファミリーメンバー

N末端にはメンバー間で保存された5つのトリプトファン(W)反復配列が特徴のDNA結合領域が存在する。また、中央部分には、メンバー間での会合領域としてIAD(IRF-association domain)ドメインが存在する。括弧内はヒトIRF転写因子でのアミノ酸のサイズを示してある。通常での細胞内局在はIRF-5が細胞質に存在する以外は上記その他のメンバーは、核内に存在している。がん化のプロセスに対して抑制的な作用を示す場合を“suppressive”、ポジティブな作用を示す場合を“oncogenic”と分類した。

を形成することが知られており、その会合に関与する領域がIAD (IRF-association domain) と呼ばれる。これらIRFはIRF-E (IRF-responsive element) あるいはISRE (IFN-stimulated response element) と呼ばれるコンセンサスDNA配列に結合する。その後の遺伝子欠損マウスを用いた解析により、実際にウイルス感染による *IFN- $\alpha/\beta$*  遺伝子の発現誘導にかかわる主要な必須因子は現在のところIRF-3とIRF-7であると考えられている<sup>11)</sup>。さらに近年、Toll様受容体Toll-like receptor (TLR) などに代表される病原体認識受容体の下流でI型IFNの遺伝子のみならず、炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導に関与しているIRFファミリーメンバーが存在していることも明らかとなっている。一方で、IRFファミリーメンバーのなかでは、IFNとは無関係にがん化プロセスと関連性が示唆されているものが多く報告されている。さらに放射線や紫外線照射、あるいは薬剤投与によるDNA損傷時の細胞周期停止や細胞死の誘導に関与することも明らかになってきた<sup>12)</sup>。最もよく研究されているのがIRF-1の腫瘍抑制作用である。マウス線維芽細胞では、IRF-1はX線照射やエトポシドなどの薬剤によるDNA損傷時に、p53と同様にATM (ataxia telangiectasia mutated) を介して発現誘導され、p53と協調してp21<sup>WAF1/Cip1</sup>を発現することで、細胞周期の停止に関与する。しかしながら、IRF-1のがん化抑制への作用はp53とは必ずしも同等ではなく、IRF-1とp53の二重欠損マウスではp53欠損マウスとは異なった種類のがんを発生し、この二重欠損マウス由来の細胞ではシスプラチンなどのDNA損傷による変異が高率にみられるようになる。IRF-1単独欠損ではがんは発生しないことから tumor susceptibility geneとして認識されている。実際に、IRF-1に関しては、消化器がんや乳がん、白血病など、さまざまながんで欠失などの遺伝子異常や発現異常が認められたり、また、全白血病状態の骨髓異形成症候群ではIRF-1 mRNAのスプライシング異常が報告されている。一方で、IRF-2はNIH3T3細胞に強制発現させるとトランスフォーメーションをひき起こす。これはIRF-1を発現させることで抑制されることから、IRF-2とIRF-1はが

ん化に対して相反的に作用していることが考えられている。また、IRF-2が、がん遺伝子として知られているヒストンH4などの遺伝子発現を正に制御している場合も知られている<sup>13)</sup>。ヒト乳がん組織におけるIRF-2発現低下が報告されている<sup>14)</sup>。

多発性骨髄腫のある患者由来の細胞では特徴的な染色体転座t(6;14)(p25;q32)が見つかっており、この6p25のMUM1 (multiple myeloma 1) 座位がIRF-4であることが判明し、この結果IRF-4が過剰発現しているようだ<sup>15)</sup>。一方で、IRF-4をラットの線維芽細胞に強制発現させると細胞はトランスフォーメーションを起こすことが知られており、IRF-4の発現と骨髄腫の病因との関連性について報告されている。

IRF-5はその遺伝子の2番目のエクソン内にp53結合配列を認め、X線や紫外線照射、アドリアマイシン (ADR) 処理によりp53依存的に発現誘導され、p53標的遺伝子の1つと考えられている<sup>16)</sup>。また、*IFN- $\alpha/\beta$* によっても発現誘導されることも知られている<sup>17)</sup>。さらに、IRF-5を強制発現させたヒトB細胞リンパ腫や大腸がん細胞株においてはp53非依存性にG2/M期停止やアポトーシスを誘導するが、この場合IRF-5下流では、BakやBax、カスパーゼ-8、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>などアポトーシスや細胞周期に関する調節因子の発現が増強していることも報告されている。一方、IRF-5欠損マウスの解析では、DNA損傷による細胞周期の停止には関与しないが、アポトーシス誘導に関与しており、この場合、p53経路とは異なった経路を介することが示されている<sup>18)</sup>。実際、ヒト血液系腫瘍ではIRF-5遺伝子が欠失し、IRF-5の発現が消失しているものも報告されている。実際、ヒト血液系腫瘍や消化器がんではIRF-5の発現が消失しているものも報告されている<sup>17,19)</sup>。

血球系に特異的に発現しているIRF-8の遺伝子欠損マウスでは、ヒトの慢性骨髄性白血病 chronic myelogenous leukemia (CML) に類似した病態を示すようになる。実際に骨髄性白血病の約7割の患者由来の細胞においてIRF-8 mRNAの発現レベルの低下が認められており、一方で、CMLの慢性期の治療として用いられているIFN $\alpha$ の投与によって

IRF-8が発現誘導されることも報告されている<sup>20)</sup>。

このようにがん化の抑制機構の1つとしてIFNシグナルの重要性が示唆され、また、IRFファミリー転写因子はIFN産生のみならず、IFN系とは異なった経路でがん化のプロセスにも関与するなど、広

く生体防御系において重要な役割を担っていると考えられる。今後、IFN-IRFシステムの研究を推進することはがんに対するIFNの新しい治療ストラテジー構築への展開が期待されると同時に、IRF転写因子が治療の標的分子となることが想定される。

#### ////// 文 献 //////////////////////////////////

- 1) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67: 227-264, 1998.
- 2) Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM: Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 119-134, 2002.
- 3) Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 1198-1205, 1994.
- 4) Kirkwood J: Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol*, 29: 18-26, 2002.
- 5) Sakon M, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer*, 94: 435-442, 2002.
- 6) Clemens MJ: Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 23: 277-292, 2003.
- 7) Takaoka A, Taniguchi T: New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci*, 94: 405-411, 2003.
- 8) Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD: A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*, 6: 722-729, 2005.
- 9) Taniguchi T, Takaoka A: A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 378-386, 2001.
- 10) Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N: IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, 19: 623-655, 2001.
- 11) Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 13: 539-548, 2000.
- 12) Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T: Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*, 99: 467-478, 2008.
- 13) Vaughan PS, Aziz F, van Wijnen AJ, Wu S, Harada H, Taniguchi T, Soprano KJ, Stein JL, Stein GS: Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2. *Nature*, 377: 362-365, 1995.
- 14) Doherty GM, Boucher L, Sorenson K, Lowney J: Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Ann Surg*, 233: 623-629, 2001.
- 15) Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, Chaganti RS, Dalla-Favera R: Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet*, 17: 226-230, 1997.
- 16) Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H: Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, 21: 2914-2918, 2002.
- 17) Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM: Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*, 63: 6424-6431, 2003.
- 18) Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T: Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 3402-3407, 2007.
- 19) Hu G, Mancl ME, Barnes BJ: Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res*, 65: 7403-7412, 2005.
- 20) Ozato K, Taylor P, Kubota T: The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem*, 282: 20065-20069, 2007.

## 第30章 がんペプチド免疫治療

佐藤昇志\*<sup>1</sup>, 廣橋良彦\*<sup>2</sup>, 塚原智英\*<sup>3</sup>,  
田村保明\*<sup>4</sup>, 一宮慎吾\*<sup>5</sup>, 鳥越俊彦\*<sup>6</sup>

### 1 要旨

ヒト癌特異抗原の研究が大きく進展し、日常臨床の現場で世界的に臨床試験が行われてほぼ10年を経過した。その結果、創薬への移行が期待できる成果がみられつつあり、実際、国際レベルで認可をうけようとしているヒト癌ワクチンの候補もでてきている。世界的メガファーマも本格的にのりだし、わが国の製薬企業も本腰を入れだした。流れは出来た。恐らくいくつかは創薬として具現化されるであろう。さらにすぐれた創薬ワクチンになるには何が必要か、どのようなことをクリアすべきか、またどのような課題についてさらに基礎研究すべきかを概説した。

### 2 はじめに

免疫学が大きく進展し、ヒト癌に対する免疫応答も飛躍的な進歩をとげてきた。1980年代までの一時期はヒト癌に免疫応答などは存在しないのではないのか？ ヒト腫瘍抗原などは存在しないのではないのか？ ヒト癌免疫が成立しているのなら、なぜかくも癌が進行するのか？ 等々、癌免疫に関しては否定的、厭世的な空気が支配していた。実際1980年代末の米国癌学会(AACR)でも日本癌学会でもヒト癌免疫に関する発表は極めて少ない時代を迎えていた。しかし、1992年にベルギーブリュセルのブーン博士らによりCTLクローンが認識するヒトメラノーマ腫瘍抗原がはじめて発見され、サイエンス誌で発表された。この時点で状況は一変した。まさにエポックメイキング的な研究であり、多くの免疫学者、癌研究者を驚かせた。他方、我々ヒト

---

\* 1 Noriyuki Sato 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座 教授

\* 2 Yoshihiko Hirohashi 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 3 Tomohide Tsukahara 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 4 Yasuaki Tamura 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 5 Shingo Ichimiya 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 6 Toshihiko Torigoe 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座



癌免疫研究をずっと持続していた研究者はこの発見に必ずしも驚かなかった。なぜなら、多くのヒト癌免疫研究者がその時点では程度に強弱はあれ、患者リンパ球が自家腫瘍に明らかに特異的、HLA 拘束性に反応することを観察していたし、私どもの研究室ではCTLクローンレベルでそのような反応が多く患者でおこることをリコンビナントIL-2が入手可能となった80年代半ばには、みているからである。

以後図1に示すようなCTLの直接の標的であるHLAクラスI提示ヒト腫瘍抗原同定の研究が盛んに行われ、早い時期からこれらの抗原を用いた癌ワクチン臨床試験も全世界で様々な腫瘍抗原について行われるようになった<sup>1)</sup>。製薬企業やベンチャー企業との共同研究も近年は加速され、GSKや武田製薬など(表1)大きな製薬企業も開発に乗り出してきている。ハーセプチンなど抗体医薬がその発見から創薬具現化まで20年を要したが、T細胞癌ワクチンも2012年で発見から20年になる。恐らくは2012年までには世界のメガファーマがひとつあるいは複数の癌ワクチンを創薬化、市販化するであろう。抗体ワクチンと違い、CTLをドライブする癌ワクチンの基盤はとてつもなく広く大きく、すべての癌を対象とできる可能性があり、長年待望されていた治療型癌ワクチンが本当に日常臨床の癌治療のモダリティになると考えられる<sup>2)</sup>。

とはいえ、まだ本当に効力の優れた癌ワクチン開発には至っていない。ここしばらくはそれらの開発研究が大切である。ここではその現状を示し、我々の研究成果を中心にいくつかの点を解説し、一日も早い癌ワクチン創薬の具現化にはどのようなことが必要なのかを述べたい。

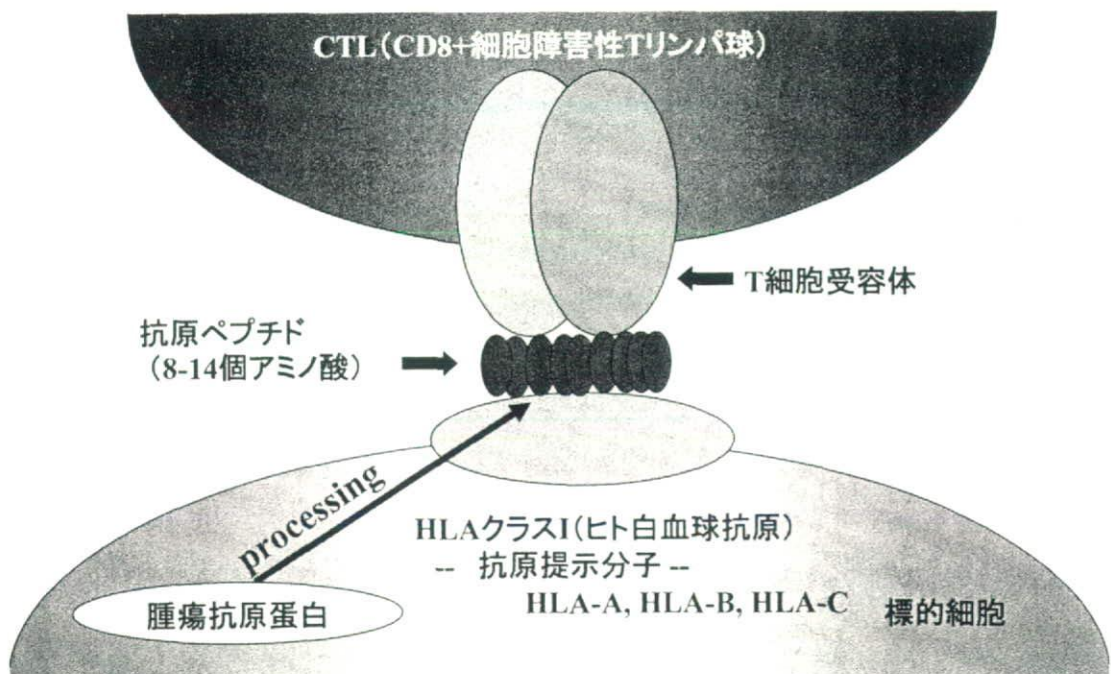


図1 CD8陽性CTL(細胞障害性T細胞; cytotoxic T lymphocyte)による標的細胞破壊

表1 札幌医大第1病棟で同定されたヒト癌ワクチン候補 (2008年8月)

腫瘍	ペプチド(ワクチン)	親蛋白	HLA	臨床試験	報告
A) 自家腫瘍					
胃癌	F 4.2 (YSWMDISCWI)	c 98	A 31		<i>J. Immunol.</i> ,(1998)
骨肉腫	PBFP (CTACRWKKACQR) (AYRPVSRNI)	PBF	B 55	予定	<i>Cancer Res.</i> ,(2004)
			A 24	予定	<i>Cancer Sci.</i> ,(2007)
			A 2	予定	<i>JTM</i> ,(2008)
B) リバースイミノロジー					
1) アポトーシス関連					
種々	2 B (AYACNTSTL)	survivin 2 B	A 24	進行中	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2002) <i>JTM</i> ,(2004), (2008)
	C 58 (FFCFKELEGW)	survivin	A 24	予定	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2004)
種々	L 7 (KWFPSSCQFLL)	livin	A 24	進行中	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2005)
2) 染色体転座					
滑膜肉腫	A (PYGYDQIMPK)	SYT-SSX	A 24		<i>J. Immunol.</i> ,(2002)
	B (GYDQIMPCK)	SYT-SSX	A 24	進行中	<i>J. Immunol.</i> ,(2002) <i>JTM</i> ,(2005)
	K 9 I (GYDQIMPKI)	SYT-SSX	A 24	進行中	<i>J. Immunol.</i> ,(2004)
C) バイオインフォマティクス					
種々	HIFPH 3-8 (RYAMTVWYF)	HIFPH 3	A 24	予定	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2008)
	Cep 55-10 (VYVKGLLAKI)	Cep 55 (C 10 orf 3)	A 2, A 24	予定	
	AMACR 2 (NMVEGTAYL)	AMACR	A 24	予定	
	STEAP-B (QYFYKIPL)	STEAP	A 24	予定	
	Lengsin (N. D.)	Lengsin	A 24		
D) SP テクノロジー (癌幹細胞抗原)					
種々	SOX-2-109 CT antigen A, INTS 1	SOX-2	A 24	予定	

### 3 ヒト腫瘍抗原同定

現時点でCTLが認識するヒト腫瘍抗原はメラノーマを中心に多数同定されている。解析は①オーソドックスであるが最も重要なシステムである自家腫瘍とCTLクローンをを用いたもの、②リバースイミノロジー的手法によるもの、③バイオインフォマティクスの方法によるもの、などがある。これらの様々な手法を用いて現時点で同定された腫瘍抗原は、正確な数はわからないが、メラノーマでは20～50抗原、上皮性腫瘍、肉腫などで50～70の抗原が少なくとも同定されていると思われる。これらについては他の総説<sup>1)</sup>、あるいはHPアドレス <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase>などを参照されたい。

ここでは我々が同定した腫瘍抗原について述べる。表1に示すように過去14,15年間にわたり

一貫して CTL が認識する腫瘍抗原の同定に我々は力を注いできた。すなわち、①自家腫瘍の解析系<sup>3-6)</sup>、②リバーシムノロジーの方法<sup>7-10)</sup>、③DNA マイクロアレイを利用したバイオインフォマティクスによる手法<sup>11)</sup>、そして④SP (side population) 手法を利用したヒト癌幹細胞の (cancer stem cell ; CSC) の分離による CSC 腫瘍抗原の同定、などにより研究を進めた。その結果いずれの手法、解析法でもヒト腫瘍抗原を同定し得た。ここでいう腫瘍抗原とはあくまで CTL が標的とする immunogenic epitope であるということが大事である。例えばリバーシムノロジーではいくつもの腫瘍抗原の候補は考えられるわけである。すなわち、正常で発現がないか、きわめて弱いもので、かつ、腫瘍で高発現をみせるものである。しかし、これらのすべてが CTL エピトープになるとは限らず、むしろそうならない場合が多い。バイオインフォマティクスによる状況も同様であり、実際我々は DNA マイクロアレイによるスクリーニングの結果、約 300 の腫瘍抗原分子を発現プロファイルの側面からとらえた。しかし、これらのうち 5 つのみ (HIFPH 3, Cep 55, AMACR, STEAP, Lengsin) が CTL の標的になるという事実が判明し<sup>11)</sup>、実に残り 295 の蛋白分子は CTL に non-immunogenic であり、免疫学的にトレラントな可能性が考えられたのである。SP テクノロジーによる CSC 腫瘍抗原については後述する<sup>11)</sup>。

#### 4 癌ワクチン臨床試験

2002 年に我々が HLA-A 24 提示抗原ペプチドとして同定した IAP (inhibitor of apoptosis protein) 由来の survivin 2 B ペプチド (surv 2 B) は 2003 年 12 月から第一相臨床試験に入った。5 年計画で主に大腸癌を対象として臨床試験を行った<sup>1, 12-15)</sup>が、3 つのプロトコールを準備した。①surv 2 B のみ、②surv 2 B + IFA (モンタニド)、そして③DC の分化、活性化に最も重要なサイトカインと考えられる IFN $\alpha$  を併用した surv 2 B + IFA + IFN $\alpha$  の合剤である。その結果、特記すべき副作用はみられず、興味深い臨床効果、および免疫応答の結果が得られた。すなわち、surv 2 B ペプチド単独でも症例により臨床効果あるいは免疫応答を惹起、誘導しえること、+ IFA とは大差ないこと、他方、+ IFN $\alpha$  のプロトコールではより高い頻度で明らかな臨床効果、免疫応答を得られること、が判明した。この③のプロトコールでは 4/6 例に CEA の上昇の停止あるいは低下がみられ、また CT 上で PR あるいは SD をみせたのが 4/6 例、そしてテトラマー、ELISPOT で明らかな反応を示したのが 3/6 例であったのである。そのうちの 1 例の経過を図 2 に示す。ここでは surv 2 B ペプチド + IFA + IFN $\alpha$  の投与後の CEA の値の変動を示しているが、回数を経るごとに CEA が低下し、正常化している。テトラマー、ELISPOT も pre と post vaccination で明らかに CTL の数の増加をみた。さらに 3rd vaccination のテトラマー陽性 CTL をソーティングしたものが図 3 であるが、ほとんどすべての well の T 細胞が surv 2

※手術時腫瘍組織: HLA-Class I強陽性、Survivin強陽性

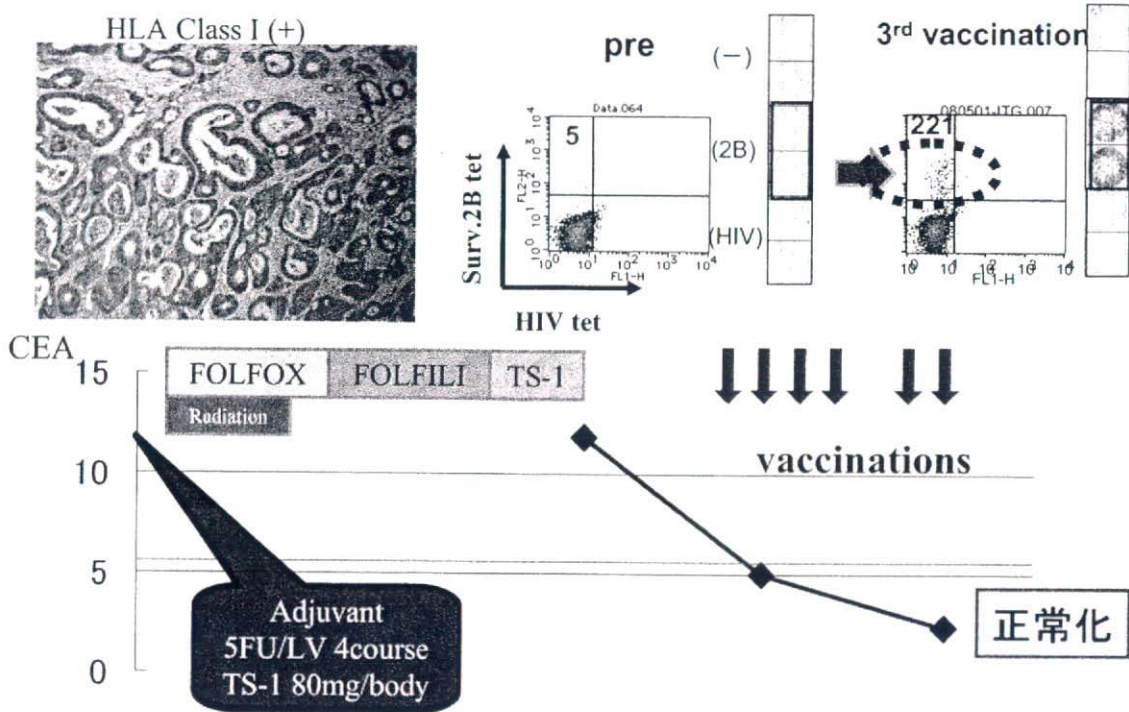


図2 症例 (3)-6 (直腸癌; stage IV) 免疫応答と腫瘍マーカー推移  
vaccination: Survivin-2 B peptide + IFA + IFN- $\alpha$

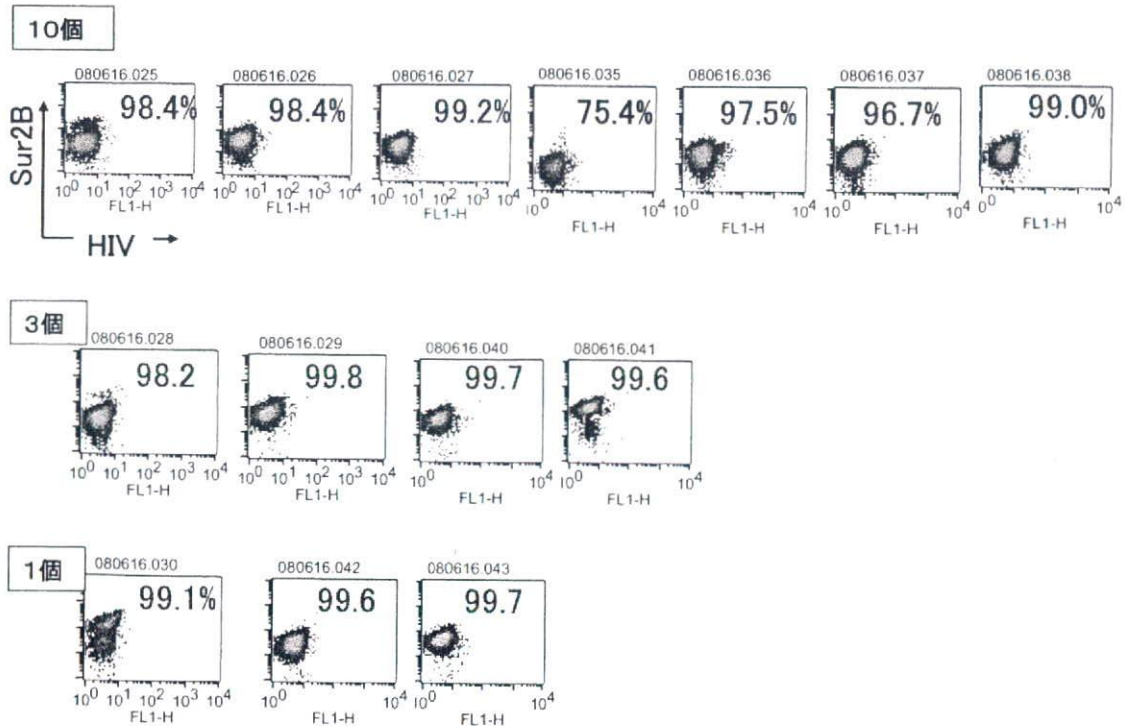


図3 大腸癌患者 (3)-6 CTL の single cell sorting と tetramer analysis