

平成 21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18689035

研究課題名 (和文) 肺癌の免疫逃避機構の解明：HLA 発現異常の面から

研究課題名 (英文) Analysis of immune escape mechanism in lung cancer:

From a variant of abnormality of HLA expression on tumor cells

研究代表者 市来嘉伸 (ICHIKI YOSHINOBU)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号:80419837

研究成果の概要：

癌細胞は HLA クラス I 分子上に腫瘍抗原を提示することで、CTL から認識され攻撃を受ける。この攻撃から逃避するため、癌細胞は HLA クラス I 分子を欠失すると考えられる。

そこで、癌細胞に欠失した HLA クラス I 分子を再移入したところ、CTL からより強力に攻撃された。すなわち、欠失した HLA クラス I 分子に免疫原性の高い腫瘍抗原が提示されていたことが示唆された。この腫瘍抗原を用いたワクチン療法とともに癌細胞への HLA クラス I 分子移入療法の開発を行っていく。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：免疫学、癌、肺癌、HLA、細胞障害性 T リンパ球

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの腫瘍抗原が同定され、その一部は癌ワクチン療法として、臨床応用されている。しかし、いずれの報告を見ても治療効果としてはまだ充分とはいえないのが現状である。すなわち、癌ワクチンを行って免疫応答を誘導しても、癌細胞が免疫逃避機構を獲得し治療に抵抗性を示すと考えられてきている。より効果的な癌ワクチン療法の開発に、このような癌の免疫逃避機構の解明は必要不可欠なものとなってきている。

2. 研究の目的

癌細胞は HLA クラス I 分子上に腫瘍抗原を提示することで、CTL に認識され、攻撃を受ける。この CTL attack から逃れるため、癌細胞は HLA クラス I 分子を欠失する免疫逃避機構が存在すると考えられる。

そこで、今回癌細胞に欠失した HLA クラス I 分子を再構築し、再構築した癌細胞株を用いて CTL clone を樹立し、その CTL clone をプローブとして、HLA クラス I 分子欠失に

関与した腫瘍抗原を同定する。欠失した HLA クラス I 分子に提示されていた癌抗原は免疫原性が高いと考えられ、将来的にはこの癌抗原を用いたペプチドワクチン療法とともに癌細胞への HLA クラス I 分子移入療法の可能性について解析を行う。

3. 研究の方法

haplotype loss を有している細胞株に欠失した HLA を自己正常細胞より cloning し、癌細胞株に移入し、HLA 移入株を樹立する。自己所属リンパ節リンパ球より調整した CD8+ T 細胞を、それぞれの HLA 移入株を用いて刺激培養し、いずれの HLA 移入株特異的な CTL clone を樹立する。この HLA 移入株特異的な CTL clone をプローブとして、cDNA expression cloning 法を用いて、腫瘍抗原の同定を行う。HLA クラス I 分子欠失に関与した腫瘍抗原の免疫逃避機構について解析する。

また、癌組織切片を抗 HLA クラス I 抗体を用いて免疫組織学的な評価を行い、HLA クラス I 分子の発現異常と癌の悪性度等の相関についても解析する。

4. 研究成果

肺腺癌患者G821 (HLA-A24/A26, B52/51, Cw12/14) より樹立した肺癌細胞株G821L (HLA-A26, B51, Cw14) はHLA class I 分子のhaplotype lossを有していた。欠失した HLA-A24,B52,Cw12 を自己B細胞より cloningし、自己腫瘍細胞株G821Lに移入し、それぞれのHLA移入株を樹立した。自己所属リンパ節リンパ球より調整したCD8+ T細胞を、それぞれのHLA移入株を用いて刺激培養し、いずれのHLA移入株においてもHLA移入株をG821Lより認識するCTLを誘導可能であった。そのprecursor CTL frequency は、A24,B52,Cw12 移入株それぞれに対して $1/5 \times 10^5$, $1/1.5 \times 10^5$, $1/6 \times 10^5$ であった。G821L に対するfrequency $1/4 \times 10^5$ と比較し、HLA-B52 移入株に対するprecursor CTL frequencyがやや高い傾向を認めた(Table 1)。

Table 1-Precursor CTL frequency of tumor specific CTL

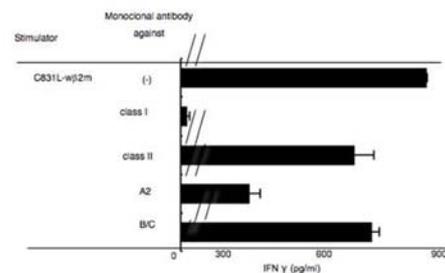
Tumor	Number of LNL (CD8+ Tcell)	Positive wells/tested wells	Frequency
G821L	1.9×10^6	5/96	$1/4 \times 10^5$
G821L-A24	4.8×10^5	1/24	$1/5 \times 10^5$
G821L-B52	6.4×10^5	4/32	$1/1.5 \times 10^5$
G821L-Cw12	6.0×10^5	1/30	$1/6 \times 10^5$

HLA haplotype lossを伴う肺癌症例にお

いて、欠失したHLAに提示される抗原を認識するCTLが存在した。G821L由来 1.5×10^5 cDNA libraryを作成し、HLA移入株特異的CTLをプローブとして、cDNA expression cloning法を用いた腫瘍抗原の同定を試みているが、同定には未だ至っていない。

また、肺大細胞癌患者 C831(HLA-A2/A26, B7/35, Cw7/8)より樹立した C831LはHLA total lossを認めた。HLA haplotype lossと同様 HLA 分子の発現を欠失する事で、免疫応答から逃避している可能性が考えられた。C831Lのβ2 microglobulin発現をRT-PCR法で確認したところ、β2 microglobulinのpoint mutationが確認され野生型β2 microglobulin遺伝子を移入することでHLA class I分子が細胞表面に発現することを確認した。C831L β2 microglobulin移入株を用いて、CTL cloneを誘導したところ、β2 microglobulin移入株特異的 HLA-A2 拘束性CTL cloneを樹立できた(Figure 1)。

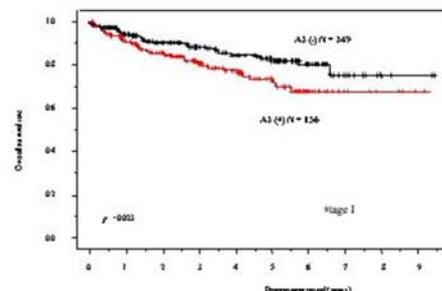
Figure 1

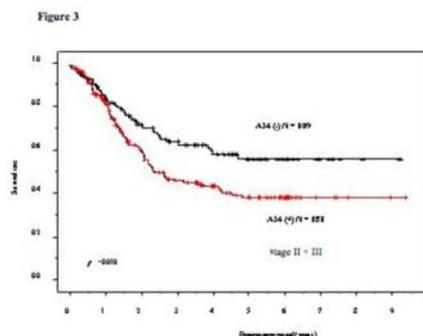


この CTL clone を用いて、cDNA expression cloning 法を行い、抗原遺伝子(機能未知の)を同定した。欠失した HLA に提示される腫瘍抗原を同定した。現在、同定した腫瘍抗原遺伝子のエピトープ解析および機能解析を行っている。

また、今回当科で非小細胞肺癌手術症例 695 例の HLA type と予後との関係を解析したところ、病期 I 期で HLA-A2(+)症例が、病期 II, III 期で HLA-A24(+)症例が、いずれも有意に予後が悪かった(Figure 2, 3)。HLA type により予後が異なることが明らかとなった。

Figure 2





しかし、当科で手術した 265 例の非小細胞肺癌症例の肺癌組織切片を抗 HLA クラス I 抗体を用いて、HLA クラス I 分子の発現と予後の関連を解析したが、有意差は認めなかった。すなわち、5 年生存率は HLA クラス I 分子の正常発現が 66.8%、低発現が 71.3%、重度低発現が 78.9%であり、予後に有意な差を認めなかった(p=0.17)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

全て査読有り

- ① Nagata Y, Hanagiri T, Mizukami M, Kuroda K, Shigematsu Y, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Sugio K, Nagashima A, Yasumoto K. Clinical significance of HLA class I alleles on postoperative prognosis of lung cancer patients in Japan. 2009 (inpress)
- ② Baba, T. · Hanagiri, T. · Ichiki, Y. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Mizukami, M. · Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci* 98(11):1795 - 1802. 2007
- ③ Mizukami, M. · Hanagiri, T. · Yasuda, M. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Fukuyama, T. · Nagata, Y. · So, T. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · So, T. · Takenoyama, M. ·

- Sugio, K. · Yasumoto, K. : Antitumor Effect of Antibody against a SEREX-Defined Antigen (UOEH-LC- 1) on Lung Cancer Xenotransplanted into Severe Combined Immunodeficiency Mice. *Cancer Res* 67(17):8351 - 8357. 2007
- ④ Fukuyama, T. · Ichiki, Y. · Yamada, S. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Nagata, Y. · Mizukami, M. · Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Hanagiri, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro. *Cancer Sci* 98(7):1048 - 1054. 2007
 - ⑤ Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Fukuyama, T. · Nagata, Y. · Mizukami, M. · So, T. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · So, T. · Hanagiri, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Identification of HLA-A24 restricted shared antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes from a patient with large cell carcinoma of the lung. *Int J Cancer* 120(5):1055 - 1062. 2007
 - ⑥ Yasuda, M. · Mizukami, M. · Hanagiri, T. · Shigematsu, Y. · Fukuyama, T. · Nagata, Y. · So, T. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Antigens recognized by IgG derived from tumor-infiltrating B lymphocytes in human lung cancer. *Anticancer Res* 25(5):3607 - 3612. 2006
 - ⑦ Fukuyama, T. · Hanagiri, T. · Takenoyama, M. · Ichiki, Y. · Mizukami, M. · So, T. · Sugaya, M. · So, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Identification of a new cancer/germline gene, KK-LC-1, encoding an antigen recognized by autologous CTL induced on human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 66(9):4922 - 4928. 2006
 - ⑧ Mizukami, M. · Hanagiri, T. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Fukuyama, T. · Nagata, Y. · So, T. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · Yasuda, M. · So, T. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Effect of IgG produced by tumor-infiltrating B lymphocytes on lung tumor growth. *Anticancer Res* 26(3):1827 - 1832. 2006
- [学会発表] (計 81 件)
- ① 花桐 武志 · 重松 義紀 · 黒田 耕志 · 馬場 哲郎 · 市来 嘉伸 · 浦本 秀隆 · 大賀 丈史 · 竹之山 光広 · 杉尾 賢二 · 安

- 元 公正: 腫瘍の免疫逃避機構の解明とその克服. 第21回 日本バイオセラピー学会学術集会総会. 東京. 2008. 11. 18-19
- ② 黒田 耕志・竹之山 光広・馬場 哲郎・塩田 広宣・重松 義紀・水上 真紀子・市来 嘉伸・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正: 肺癌におけるHLA class I分子の発現と細胞性免疫応答. 第21回 日本バイオセラピー学会学術集会総会. 東京. 2008. 11. 18-19
- ③ 馬場 哲郎・塩田 広宣・黒田 耕志・重松 義紀・水上 真紀子・市来 嘉伸・竹之山 光広・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正: HLA class I発現を欠失した肺癌症例での新規癌関連抗原の同定. 第49回 日本肺癌学会総会. 北九州. 2008. 11. 14-15
- ④ 黒田 耕志・竹之山 光広・塩田 広宣・重松 義紀・馬場 哲郎・水上 真紀子・市来 嘉伸・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正: 肺腺癌におけるCTLの認識する新規腫瘍抗原Ribosomal Protein L19の同定. 第67回 日本癌学会学術総会. 名古屋. 2008. 10. 28-30
- ⑤ Kuroda, K. ・Takenoyama, M. ・Baba, T. ・Shiota, H. ・Shigematsu, Y. ・Mizukami, M. ・Ichiki, Y. ・Yasuda, M. ・Hanagiri, T. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Identification of human ribosomal protein L19 as a novel overexpressed tumour antigen recognized by autologous CTL in human lung adenocarcinoma. 2008 World Cancer Congress. Geneva, Switzerland. 2008. 8. 27-31
- ⑥ 馬場 哲郎・塩田 広宣・黒田 耕志・重松 義紀・水上 真紀子・市来 嘉伸・安田 学・竹之山 光広・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正: 発現回復させたHLA class I分子に提示される新規肺癌抗原の同定. 第48回 日本呼吸器学会学術集会. 神戸. 2008. 6. 15-17
- ⑦ 黒田 耕志・竹之山 光広・宗 知子・塩田 広宣・重松 義紀・馬場 哲郎・永田 好香・水上 真紀子・市来 嘉伸・安田 学・野添 忠浩・花桐 武志・杉尾 賢二・安元 公正: 細胞障害性Tリンパ球が認識する過剰発現肺癌抗原Ribosomal protein L19の同定と発現解析. 第108回 日本外科学会定期学術集会. 長崎. 2008. 5. 15-17
- ⑧ Mizukami, M. ・Hanagiri, T. ・Yasuda, M. ・Baba, T. ・Nagata, Y. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・So, T. ・Takenoyama, M. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Antitumor effect of antibody against a novel (UOEH-LC-1) on lung cancer xenotransplanted into SCID mice. 12th World Conference on Lung Cancer. Seoul, Korea. 2007. 9. 2-6
- ⑨ Nagata, Y. ・Kuroda, K. ・Shigematsu, Y. ・Baba, T. ・Fukuyama, T. ・Mizukami, M. ・So, T. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・So, T. ・Takenoyama, M. ・Hanagiri, T. ・Sugio, K. ・Nagashima, A. ・Yasumoto, K. : Analysis of the correlation between HLA phenotype and prognosis of non-small cell lung cancer patients in Japan. 12th World Conference on Lung Cancer. Seoul, Korea. 2007. 9. 2-6
- ⑩ Hanagiri, T. ・Baba, T. ・Kuroda, K. ・Shigematsu, Y. ・Nagata, Y. ・Mizukami, M. ・So, T. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・Nozoe, T. ・Takenoyama, M. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Restoration of HLA-class I expression on lung cancer cells and successful induction of CTL against tumor cells. 98th AACR. Los Angeles, USA. 2007. 4. 14-18
- ⑪ Shigematsu, Y. ・Hanagiri, T. ・Baba, T. ・Kuroda, K. ・Nagata, Y. ・Mizukami, M. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・Nozoe, T. ・Takenoyama, M. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Analysis of humoral immunity of tumor infiltrating B lymphocyte in patients with malignant mesothelioma. 98th AACR. Los Angeles, USA. 2007. 4. 14-18
- ⑫ Takenoyama, M. ・Baba, T. ・Ichiki, Y. ・Mizukami, M. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・Hanagiri, T. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Evasion of lung cancer cells with HLA-class I abnormality from host defense and exploration of the immunotherapy-strategy against such cancer cells. Keystone Symposia. Banff, Canada. 2007. 3. 28-4. 2
- ⑬ Baba, T. ・Ichiki, Y. ・Mizukami, M. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・Takenoyama, M. ・Hanagiri, T. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Identification of the gene encoding a tumor associated antigen using immortalized T cells transduced with T cell receptor from the specific CTL clone in a lung cancer patient. Keystone Symposia. Banff, Canada. 2007. 3. 28-4. 2
- ⑭ Hanagiri, T. ・Fukuyama, T. ・Baba, T. ・Kuroda, K. ・Shigematsu, Y. ・Nagata, Y. ・Mizukami, M. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・Yasuda, M. ・Nozoe, T. ・Takenoyama, M. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K. : Identification of a new cancer/testis antigen and the expression in non-small cell lung cancer. First JCA-AACR

Special Joint Conference. Nagoya, Japan.
2007. 3. 12-14

- ⑮ 市来 嘉伸・花桐 武志・竹之山 光広・黒田 耕志・重松 義紀・馬場 哲郎・福山 隆・永田 好香・水上 真紀子・宗 哲哉・安田 学・菅谷 将一・宗 知子・小山 倫浩・杉尾 賢二・安元 公正: HLA haplotype lossを有する肺癌症例における細胞性免疫応答の解析. 第47回 日本肺癌学会総会. 京都. 2006.12. 14-15
- ⑯ Ichiki, Y. ・Baba, T. ・Hanagiri, T. ・Takenoyama, M. ・Shigematsu, Y. ・Fukuyama, T. ・Nagata, Y. ・Mizukami, M. ・So, T. ・Sugaya, M. ・So, T. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K.: Identification of a new tumor antigen by using an immortalized T cell receptor gene. 97th Annual Meeting AACR. Washington, DC, USA. 2006. 4-1
- ⑰ Fukuyama, T. ・Shigematsu, Y. ・Baba, T. ・Nagata, Y. ・Mizukami, M. ・So, T. ・Ichiki, Y. ・Sugaya, M. ・So, T. ・Takenoyama, M. ・Oyama, T. ・Hanagiri, T. ・Sugio, K. ・Yasumoto, K.: Identification of a new cancer/testis antigen recognized by autologous CTL induced in a patient with lung adenocarcinoma. 97th Annual Meeting AACR. Washington, DC, USA. 2006. 4-1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市来嘉伸 (ICHIKI YOSHINOBU)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80419837