

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590392  
 研究課題名（和文） 中皮腫分子標的診断治療へ向けての新しい抗原単離法による抗原の同定  
 研究課題名（英文） Identification of tumor specific antigens of mesothelioma for it's diagnosis and therapy  
 研究代表者  
 上中 明子（UENAKA AKIKO）  
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
 研究者番号：50273967

研究成果の概要：

- (1) 本研究では、悪性胸膜中皮腫（MPM）の早期診断のためのマーカーの同定と治療法の開発を目的として、中皮腫特異性がより明確な抗原の検索同定を目標とした。悪性中皮腫患者胸水から樹立した細胞株から cDNA ライブラリーを作成し、胸水中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子のスクリーニングを行い、2つの抗原をクローニングした。抗原遺伝子から組み換えタンパクを作成しELISA法による検査法の確立と免疫組織染色等に使用するモノクローナル抗体作成実験を継続進行中である。

- (2) 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：基礎免疫学，腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、細胞

## 1. 研究開始当初の背景

石綿線維の曝露歴と密接な関係があるとされる悪性胸膜中皮腫（MPM）は、過去のアスベスト使用に伴い日本において今後患者数の増加が懸念される。MPMは早期診断が難しく、確定診断がなされた時点で、すでに瀰漫性に広

がり、外科的切除の困難な例も多くみられる。治療抵抗性で予後不良であり、早期診断のための有用なマーカーの同定と治療法の開発が急務とされる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発したがん特異抗原および腫瘍傷害性T細胞認識抗原の同定的手法を用いて、悪性胸膜中皮腫特異的な抗原の検索同定を行う。とりわけ、中皮腫特異性がより明確で、宿主免疫系に対して強い抗原性を発揮する抗原の検索同定を行う。同定した抗原の詳細な発現解析、抗原に対する宿主免疫系の反応動態を解析し、早期診断可能な分子標的を選択し、検査法の確立とそれに対応する治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) 悪性中皮腫患者胸水、あるいは手術材料より培養細胞株を樹立する。現在までに胸水中皮腫、および腹水中皮腫の培養株化に成功している。さらに中皮腫および他のがん組織からサンプルを集め、培養細胞株を樹立する。
- (2) DNAライブラリーの作成、手術時の組織あるいは培養細胞株からmRNAを調整し、cDNAに変換後、発現ベクターに組み込み、ライブラリーを作成する。
- (3) 患者血清を用いて、発現クローニング法でクローニングする。
- (4) クローニングした遺伝子の塩基配列を解析する。クローン化した抗原遺伝子について組み換えタンパクを作成し、中皮腫患者血清あるいは胸水を用いて検査法を確立する。

## 4. 研究成果

- (1) 悪性中皮腫患者胸水および手術材料（インホームドコンセントが得られた材料である）より細胞株を樹立した。
- (2) 樹立細胞株よりmRNAを得て、cDNAライブラリーを作成し、患者血清あるいは胸水が反応する中皮腫特異的な抗原をクローニングした。
- (3)  $1.4 \times 10^5$ と $8 \times 10^4$ 個のクローンをスクリ

ーニングした結果、528bpの4a-1aと560bpの4c-1a二つの抗原遺伝子を得た。

- (4) 塩基配列解析とGeneBankデータベース解析の結果、4a-1aはヒト6番染色体の6p24.2に位置するPAK1 (interacting protein 1)の5'側1~528をコードする抗原遺伝子であることが判明した。一方、4c-1aは、5番染色体5q31-q33に位置するリボソーマルタンパクS14(RPS14)の5'側40~560をコードする遺伝子であることが判明した。
- (5) RPS14には3種のバリエーションが存在するが、その共通部分をコードする遺伝子であることが明らかとなった。
- (6) これらの遺伝子を発現ベクターpQEに組み換えコンストラクトを作成した。組み換えタンパクを用いて現在ELISA法による検査法の確立と免疫組織染色等に使用するモノクローナル抗体作成実験を継続進行中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, Saika T, Miyamura T, Chayama K, Nakamura Y, Wada H, Yamashita T, Morishima T, Old LJ and Nakayama E. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immunity*, (査読有) 8: 2008, 15.
2. Kikuchi E, Yamazaki K, Nakayama E, Sato S, Uenaka A, Oizumi S, Dosaka-Akita H and Nishimura M.

- Prolonged survival in patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens. *Cancer Immunity*, (査読有)8: 2008, 13.
3. Wada H, Sato E, Uenaka A, Isobe M, Kawabata R, Nakamura Y, Iwase S, Yonezawa K, Yamasaki M, Miyata H, Doki Y, Shiku H, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Monden M and Nakayama E. Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer*, (査読有) 123(10): 2008, 2362-2369.
  4. Kaya S, Uenaka A, Sato S, Ono T, Aji T and Nakayama E. Identification of a CD4 T-cell epitope in tumor rejection antigen RLakt in BALB/c radiation-leukemia RL male 1. *Cancer Sci.* (査読有) 99(7): 2008, 1441-1447.
  5. Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Nakayama E and Iwatsuki K. Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient. *Cancer Immunol. Immunother.*, (査読有) 57(10): 2008, 1429-1437.
  6. Morisita Y, Uenaka A, Kaya S, Sato, S, Aji T and Nakayama E. HLA-DRB1\*0410-restricted recognition of XAGE-1b37-48 peptide by CD4 T cells. *Microbiol. Immunol.*, (査読有) 51(8): 2007, 755-762.
  7. Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y, Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H, Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ and Nakayama E. T-cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immunity*, (査読有) 7: 2007, 9-20.
  8. Sato S, Noguchi Y, Uenaka A, Ohara N, Shimono M, Nakagawa K, Koizumi F, Ishida T, Yoshino T, Shiratori Y and Nakayama E. Identification of translation products of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors. *Cancer Immunity*, (査読有) 7: 2007, 5
  9. Shimono M, Noguchi Y, Uenaka A, Sato S, Okumura H, Nakagawa K, Tanimoto M and Nakayama E. Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells. *Int. J. Oncol.*, (査読有) 30(4): 2007, 835-840.
  10. Kawabata R, Wada H, Idobe M, Saika T, Sato S, Uenaka A, Doki Y, Yasuda T, Kumon H, Tsuji K, Iwatsuki K, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Monden M and Nakayama E. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int. J. Cancer*, (査読有) 120: 2007, 2178-2184.
- [学会発表] (計 25 件)
1. ISHIDA Toshiaki (代表)、SEREX 法による前立腺癌関連抗原 HERV-K gag の同定

- と免疫原性 第 38 回日本免疫学会総会  
(2008 年、12 月 1-3 日、京都)
2. DMAE Shohei (代表)、SEREX 法によるがん・精巢 (CT) 抗原 CCDC62-2 の同定とがん患者の液性免疫応答 第 38 回日本免疫学会総会 (2008 年、12 月 1-3 日、京都)
  3. OKAZAKI Nami (代表)、肺癌患者の XAGE-1b に対する抗体および CD4 T 細胞の反応 第 38 回日本免疫学会総会 (2008 年、12 月 1-3 日、京都)
  4. MIZUNO Naoaki (代表)、CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチンによる患者末梢血中の特異的 CD4 T 細胞頻度の上昇 第 38 回日本免疫学会総会 (2008 年、12 月 1-3 日、京都)
  5. 和田 尚 (代表)、NY-ESO-1 蛋白を用いた癌ワクチン第一相臨床試験 第 67 回日本癌学会総会 (シンポジウム) (2008 年 10 月 28-30 日、名古屋)
  6. 銅前昇平 (代表)、SEREX 法により同定した CCDC62-2 に対する癌患者の液性免疫応答 第 67 回日本癌学会総会 (2008 年 10 月 28-30 日、名古屋)
  7. 菊地英毅 (代表)、XAGE-1b および HLA クラス I の両者が発現する非小細胞肺癌は予後良好である 第 67 回日本癌学会総会 (2008 年 10 月 28-30 日、名古屋)
  8. 岡崎菜美 (代表)、肺癌患者の XAGE-1b に対する抗体および CD4 T 細胞の反応 第 67 回日本癌学会総会 (2008 年 10 月 28-30 日、名古屋)
  9. 上中明子 (代表)、CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチンによる患者末梢血中の特異的 CD4 T 細胞頻度の上昇 第 67 回日本癌学会総会 (2008 年 10 月 28-30 日、名古屋)
  10. AKIKO UENAKA (代表)、Anti-NY-ESO-1 CD4 T Cell Frequencies in Patients Vaccinated with CHP-NY-ESO-1 Protein  
CANCER IMMUNOLOGY & IMMUNOTHERAPY  
2008 (2008 年 9 月 15-17 日、ニューヨーク)
  11. HISASHI WADA (代表)、Analysis of Peripheral and Local Anti-Tumor Immune Response in Esophageal Cancer Patients after NY-ESO-1 Protein Vaccination  
CANCER IMMUNOLOGY & IMMUNOTHERAPY 2008 (2008 年 9 月 15-17 日、ニューヨーク)
  12. Kaya Savas (代表)、Identification of a CD4 T-cell epitope on tumor rejection antigen RLakt in BALB/c radiation-leukemia RL male-1 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会 (2008 年 7 月 2-3 日、大宮)
  13. 銅前昇平 (代表)、SEREX 法により同定した CCDC62-2 に対する癌患者の液性免疫応答 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会 (2008 年 7 月 2-3 日、大宮)
  14. 石田敏章 (代表)、NGO-Pr-54 (ヒト内在性レトロウイルス HERV-K) モノクローナル抗体の作成と発現解析 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会 (2008 年 7 月 2-3 日、大宮)
  15. 水野直彬 (代表)、CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチンによる患者末梢血中の特異的 CD4 T 細胞頻度の上昇 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会 (2008 年 7 月 2-3 日、大宮)
  16. 上中明子 (代表)、NY-ESO-1 タンパクワクチンにおける T 細胞認識ドミナント領域 第 37 回日本免疫学会総会 (2007 年、11 月 20-22 日、東京)
  17. KAWABATA, Ryohei (代表)、CHP-NY-ESO-1 ワクチン投与患者における NY-ESO-1 第 37 回日本免疫学会総会 (2007 年、11 月 20-22 日、東京)

18. 和田 尚 (代表)、NY-ESO-1 蛋白を用いた進行食道癌患者に対する第一相癌ワクチン臨床試験 第 66 回日本癌学会総会 (2007 年、10 月 3-5 日、横浜)
19. 川端良平 (代表)、CHP-NY-ESO-1 ワクチン投与患者における NY-ESO-1 抗体反応 第 66 回日本癌学会総会 (2007 年、10 月 3-5 日、横浜)
20. 上中明子 (代表)、Determination of NY-ESO-1 peptide regions recognized by CD4 and CD8 T cells in CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients、第 66 回日本癌学会総会 (2007 年、10 月 3-5 日、横浜)
21. 磯辺みどり (代表)、Strong anti-NY-ESO-1 immune response in a lung cancer patient showing spontaneous regression of pleural metastasis 第 66 回日本癌学会総会 (2007 年、10 月 3-5 日、横浜)
22. 田中 圭 (代表)、DRB1\*0803 restricted recognition of NY-ESO-1123-134 by CD4 T-cells in a sero-positive patient 第 66 回日本癌学会総会 (2007 年、10 月 3-5 日、横浜)
23. 田中 圭 (代表)、患者 CD4 T-cell に認識される HLA DRB1\*0803 拘束性 NY-ESO-1 エプトープペプチドの同定 第 11 回基盤的癌免疫研究会総会 (2007 年、7 月 11-12 日、東京)
24. 和田 尚 (代表)、NY-ESO-1 癌ワクチン療法第一相臨床試験におけるモニタリング結果と臨床反応 第 11 回基盤的癌免疫研究会総会 (2007 年、7 月 11-12 日、東京)
25. 上中明子 (代表)、Determination of NY-ESO-1 peptide regions recognized by CD4 and CD8 T cells in

CHP-NY-ESO-1-vaccinated patients、第 11 回基盤的癌免疫研究会総会 (2007 年、7 月 11-12 日、東京)

[図書] (計 2 件)

1. 上中明子、中山睿一、羊土社、抗体実験マニュアル、高津聖志、三宅健介、山元弘、瀧伸介編、2008 年、全 256 ページ (100-110 ページ担当)
2. 和田 尚、土岐祐一郎、門田守人、上中明子、中山睿一、NY-ESO-1 蛋白を用いたがんワクチン療法第一相臨床試験、細胞 The CELL、ニューサイエンス社、39(6): 18-21, 2007.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上中 明子 (UENAKA AKIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号: 50273967

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし