

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591635
 研究課題名（和文） 細胞周期を標的とした癌の免疫学的制御の試み
 研究課題名（英文） The establishment of novel cancer immunotherapy targeting to the cell cycle regulatory molecule.

研究代表者

鈴木 弘行（SUZUKI HIROYUKI）
 公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30322340

研究成果の概要：

本研究の目的は細胞周期制御分子のひとつサイクリンB1の臨床的意義の解析と本分子を標的とした新たな免疫療法の開発である。本研究によりサイクリンB1を含む各種の細胞周期関連分子の癌における発現解析により、臨床的に術後の再発を予測しうる可能性が明らかとなった。さらに肺癌患者において明かな抗体の産生を確認し、また血清中の抗体価が術後再発との関連を示唆するという知見が得られた。その免疫学的有効性についてさらに検討を行っている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：細胞周期，サイクリン B1，免疫療法，DNA ワクチン

1. 研究開始当初の背景

これまで、免疫療法として各種の癌抗原ペプチドを用いたワクチン療法、樹状細胞や活性化リンパ球を用いた細胞療法が試みられ一定の評価がなされている。しかし、いまだその効果はごく一部の悪性腫瘍に限られている。免疫療法を効率よく施行するうえでは、治療によって細胞障害性T細胞を効率よく活性化し、また、癌細胞に障害的に働く抗体産生を誘導しうる癌抗原の抽出とその投与方法が鍵である。さらにこれらの重要課題の解決

とともに、免疫療法においてはいくつかのプラクティカルな問題点も指摘され、さらなる改善の余地がある。ひとつはペプチドワクチンに特徴的である HLA 拘束性の問題、さらには経済的側面、細胞療法における治療の汎用性といった問題点である。そこで、我々は、これまでの検討によって非小細胞肺癌をはじめとした多くの癌でその発現異常が示されている細胞周期制御に関わる G2 期サイクリンのひとつであるサイクリン B1 をターゲットにし、DNA ワクチンを構築し、臨床応用に

に向けた新たな免疫療法の開発を計画した。

サイクリン B1 を標的とすることの科学的根拠として、本分子は細胞増殖に必須であり、特に悪性度の高い腫瘍でより発現が高いことがよく知られていることが挙げられ、臨床的な価値が高いことが期待されること。また我々の Preliminary な検討により、すでに多くの癌患者において本分子に対する免疫反応が確認され、免疫療法の対象として有望であることの 2 点がある。さらに DNA ワクチンが有用と考えられる根拠は、蛋白レベルでは癌部に特異的に過剰発現し、正常組織での発現は見られないこと、これまでサイクリン B1 をコードする CCNB1 遺伝子に変異の報告はないこと。正常組織と癌においてタンパクの修飾の違いを指摘する報告も皆無であること。そして複数の抗原エピトープの存在が示唆されること等が挙げられるためである。上記により本研究は基礎的知見に基づいて、その有効性が期待される。

2. 研究の目的

本研究の主たる目的は細胞周期における key molecule のひとつサイクリン B1 を標的とした新たな免疫療法の開発である。具体的には癌におけるサイクリン B1 の発現解析とその臨床的意義の解析、癌患者におけるサイクリン B1 に対する免疫反応の有無についての確認、さらには多価ワクチンとしての DNA ワクチンを作成し、その免疫学的効果、腫瘍学的効果を *in vitro*, *in vivo* にて確認することである。

3. 研究の方法

(1) Tissue Arrayを用いた統合データベースの作成

当科で完全切除を施行した肺癌症例を対象として全臨床データと対比させうる組織サンプルを採取し統合データベースを作成。

(2) Tissue Arrayを用いた肺癌組織におけるサイクリンB1蛋白の発現解析

抗サイクリンB1モノクローナル抗体により免疫

組織学的にその発現を解析。

(3) パキユロウイルス発現系を用いたヒト型リコンビナントサイクリンB1の精製

パキユロウイルス発現系を用いた蛋白の精製においては抗サイクリンB1抗体を含有するアフィニティカラムを用いてリコンビナントサイクリンB1蛋白を抽出する。

(4) リコンビナント蛋白を用いた自己抗体アッセイ系の確立

ELISAを用いた自己抗体の定量的アッセイ系の構築

(5) サイクリンB1遺伝子のクローニング

サイクリンB1遺伝子高発現ヒト癌細胞株を用いてサイクリンB1遺伝子の抽出を行う。

(6) サイクリンB1, DNAワクチンの作成

クローニングしたサイクリンB1遺伝子をDNAワクチン開発用のベクターにクローニングする。

(7) 樹状細胞 (DC) の誘導

常人ボランティアから比重遠心法により採取した末梢血単核球を用いIL-4, GM-CSFの存在下に約4-6日間培養し、未熟樹状細胞を *in vitro* で誘導する。

(8) DNAワクチンによる特異免疫誘導効果の検討

DNAワクチンと誘導したDCと共培養、もしくはtransfectし抗原提示。また、このDCによって刺激したCD8陽性T細胞を用い各種HLAタイプを有するサイクリンB1高発現ヒトがん細胞株に対する細胞障害性をCTLアッセイ (LDH releasing assay などによる) にて確認する。

(9) CpG非メチル化配列遺伝子によるDNAワクチンとの相乗効果の検討

CpG非メチル化配列遺伝子の添加による免疫反応の強化作用について検討する

(10) In vivo でのDNAワクチンの免疫反応誘導効果の検討

マウスのサイクリンB1をクローニングし、マウスサイクリンB1に対するDNAワクチンを作成する。

DNAワクチンを数回皮下に接種し、vaccinationとし、特異免疫誘導効果について検討する。

(11) In vivoでのDNAワクチンの抗腫瘍活性検討

CTL アッセイ等によりワクチンの有効性を確認する。同時に各組織における有害事象の発生の可能性の検討のため、正常組織の障害程度を組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 統合データベースによる肺癌組織におけるサイクリン B1 の発現とその臨床的有用性

158 例の非小細胞肺癌切除例について免疫組織学的にサイクリン B1 の発現を検討し、臨床病理学的因子との関連を検討した結果 サイクリン B1 の過剰発現は 76 例 (49.4%) で確認された(図 1)。サイクリン B1 の発現は腫瘍径や病理病期、分化度などとは関連しなかったが、生存解析において有意な予後因子であった(5 年生存率; CB1 陽性 25.7% vs CB1 陰性 49.3%, $p=0.04$, 図 2)。この傾向は I 期症例で顕著であった(CB1 陽性 36.8% vs CB1 陰性 72.6%, $p=0.03$, 図 3)。さらに多変量解析でもリンパ節転移や病期 腫瘍径などと共に独立した予後因子であった(HR; 1.886, 95% CI : 1.026 - 3.469, $p=0.0412$)

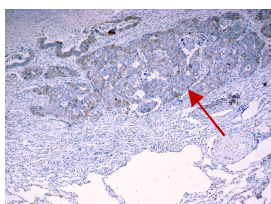


図 1
非小細胞肺癌における
サイクリン B1 の発現

図 2 サイクリン B1 発現別生存率

-全症例-

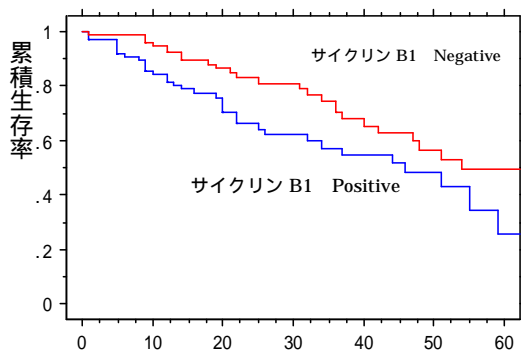
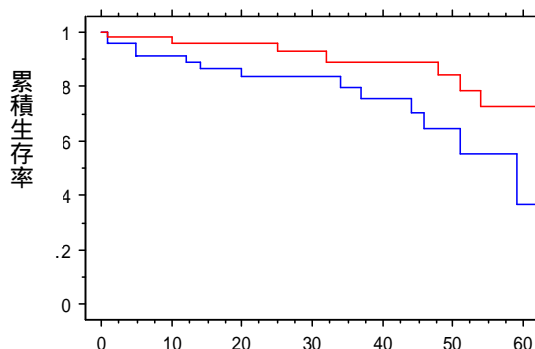


図 3 サイクリン B1 発現別生存率

-Stage I-



(2) リコンビナントサイクリン B1 の作成

ヒト CCNB1 遺伝子 (サイクリン B1 をコードする遺伝子名) の全長の cDNA をバキュロウイルスに遺伝子導入し、遺伝子導入後のウイルスを特異的に感染する Insect Cell に感染させる。さらにバキュロウイルス感染細胞の Lysate を作成し、抗サイクリン B1 抗体を含有するアフィニティカラムを用いてリコンビナントサイクリン B1 蛋白を抽出した。抽出したリコンビナント蛋白の純度を電気泳動とウェスタンブロット法にて確認した(図 4A・B)。

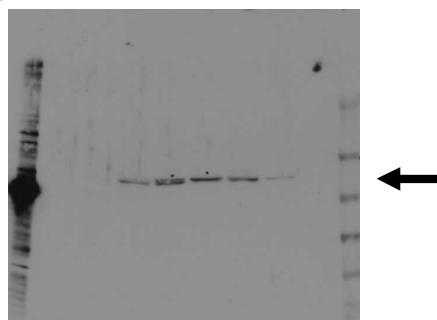
図 4 A

純化したサイクリン B1 蛋白



抽出したサンプルの蛋白電気泳動

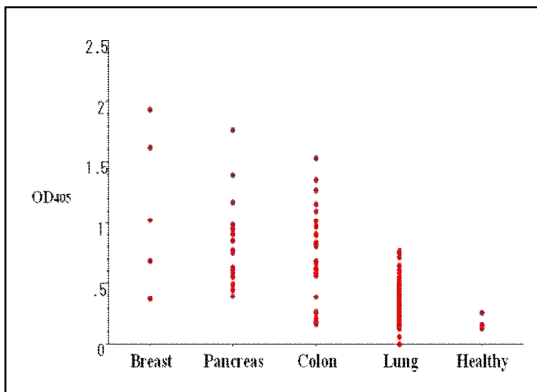
図 4 B 抗サイクリン B1 抗体を用いたウェスタン解析



(3) リコンビナントサイクリン B1 を用いた癌患者血清中の自己抗体のアクセイおよびリコンビナントサイクリン B1 を用いた患者末梢血中の特異的 T 細胞の誘導

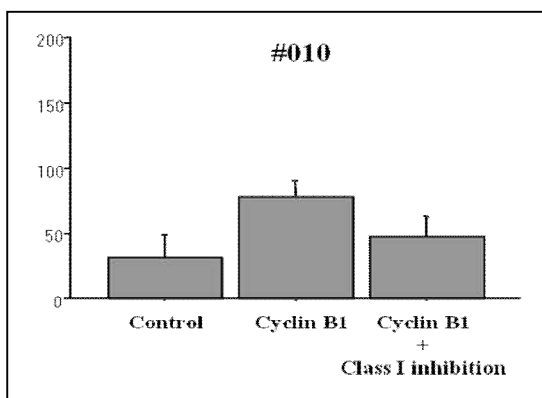
リコンビナントサイクリン B1 を用いて、ELISA による患者血清中の自己抗体の有無について検討した。図 5 に示すとおり健康人には抗体価は極めて低いレベルであったが、乳がん、膵がん、大腸がんおよび肺がんのいずれにおいても高いレベルの抗体価を確認した。

図 5. 各種がん患者末梢血血清中の抗サイクリン B1 自己抗体価の測定



さらにリコンビナントサイクリン B1 蛋白を用いて患者末梢血単核球から採取した T 細胞に抗原刺激を行ったところ、抗原特異的 T 細胞の反応を確認した (図 6)。

図 6 CD8 陽性 T 細胞に対するサイクリン B1 の反応性



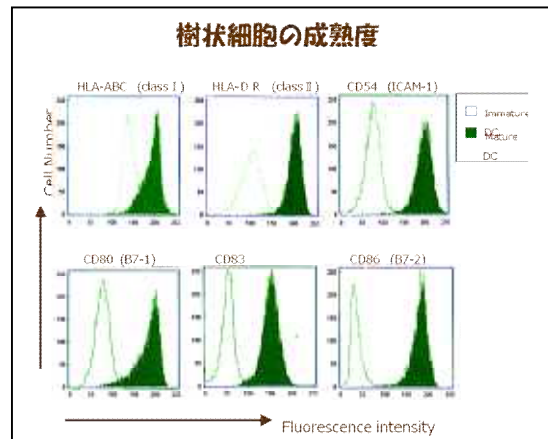
(4) サイクリン B1 のクローニングと DNA ワクチンの作成

マウスサイクリン B1 をクローニングし、遺伝子導入実験にて蛋白発現を確認した。

(5) 樹状細胞の誘導

比重遠心法により採取した末梢血単核球を用い IL - 4 ,GM - CSF の存在下に約 4 - 6 日間培養し、未熟樹状細胞を *in vitro* で誘導した。誘導した樹状細胞の Phenotype は FACS 解析にて各種表面マーカーの解析を行った (図 7)。OK432 を成熟刺激因子として用いると、誘導された樹状細胞はクラス II や B7 さらに CD83 といった成熟のマーカーが高いレベルで発現していることが確認された。

図 7



(6) DNA ワクチンの *in vitro* および *in vivo* における効果

現在検討中である。

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 12 件)

1. Satoh A, Saito T, Sato Y, Tsuchiya T, Kenjo A, Kimura T, Kanno R, Suzuki H, Kogure M, Hoshino Y, Gotoh M. Traffic of infused bone marrow cells after genetically-labeled syngeneic bone marrow transplantation following lethal

irradiation in mice. Fukushima J Med Sci.54(1):11-24,2008. 査読有り

2. 鈴木弘行, 長谷川剛生, 岡部直行, 柳沼裕嗣, 米地 敦, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 見城明, 後藤満一. 樹状細胞の分離誘導法と樹状細胞による CTL の誘導法. Surgery Frontier 15(2):187-191,2008 査読無し

3. 鈴木弘行, 木暮道彦, 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 後藤満一. 交通外傷によるびまん性軸索損傷に併発した出血性肺挫傷に対して肺摘除を施行し救命しえた一例. Therapeutic Research 29(8):1363-1368,2008 査読有り

4. 長谷川剛生, (角田卓也), 鈴木弘行, 樋口光徳, 星野実加, 後藤満一. ELISPOT 法. Surgery Frontier 15(1):85-87,2008 査読無し

5. 長谷川剛生, (角田卓也), 鈴木弘行, 樋口光徳, 星野実加, 後藤満一. intracellular staining を用いた制御性 T 細胞の FACS 解析. Surgery Frontier 15(1):88-92,2008 査読無し

6. 長谷川剛生, 鈴木弘行, 塩 豊, 樋口光徳, 星野実加, 米地 敦, 後藤満一. CTL クローンの樹立と大量培養法. Surgery Frontier 15(2):78-82,2008 査読無し

7. 樋口光徳, 鈴木弘行, 後藤満一. Richard N Pierson III, Bartley P Griffith 米国における肺移植事情. 福島医学雑誌 1:1-10,2008 査読有り

8. Shio Y, Suzuki H, (Kawaguchi T), Ohsugi J, Higuchi M, Fujii K, Kanno R, Ohishi A, Gotoh M. Carbohydrate status detecting by PNA is changeable through cancer prognosis from primary to metastatic nodal site: A possible

prognostic factor in patient with node-positive lung adenocarcinoma. Lung Cancer 57 : 187-192,2007 査読有り

9. 鈴木弘行. 細胞周期に対する免疫監視. 福島医学会雑誌 57(1):52-53,2007 査読有り

10. 鈴木弘行, 藤生浩一, 塩 豊, 山田文彦, 樋口光徳, 星野実加, 大杉 純, 米地 敦, 長谷川剛生, 菅野隆三, 大石明雄, 後藤満一. 細胞周期に対する免疫監視 - 癌診断及び治療への可能性 -. 福島医学会雑誌 57(3):165-173,2007 査読有り

11. 樋口光徳, 鈴木弘行, 塩 豊, 山田文彦, 星野実加, 大杉 純, 米地 敦, 斎藤隆晴, 長谷川剛生, 後藤満一. 肺癌再発巣に対しラジオ波焼灼術を施行し、効果判定に FDG-PET が有効であった 1 例. 日呼外会誌 21(4):560-564,2007 査読有り

12. 樋口光徳, 鈴木弘行, 塩 豊, 山田文彦, 星野実加, 大杉 純, 米地 敦, 斎藤隆晴, 長谷川剛生, 後藤満一. 気胸を契機に診断が得られた好酸球性肉芽腫症の 1 例. 日呼外会誌 21(4):581-584,2007 査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 鈴木弘行, 斎藤拓朗, 見城 明, 木村 隆, 佐藤佳宏, 塩 豊, 樋口光徳, 星野実加, 長谷川剛生, (角田卓也, 吉田浩二, 中村祐輔), 後藤満一. 当科における難治癌に対する免疫療法の現状と今後の展望. 第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2008.11.18-19 東京

2. 鈴木弘行, 岡部直行, 柳沼裕嗣, 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 藤生浩一, 後藤満一. 肺癌における Non-classical HLA class Ib 抗原 HLA-G の臨床的意義. 第 49 回日本肺癌学会総会 2008.11.13-14 北九州

3. Hoshino M, Suzuki H, Kanzaki N,

Kashimura S, Hasegawa T, Yonechi A, Higuchi M, Shio Y, (Ohto H), Gotoh M. BRM cocktail treatment using PSK and OK-432 significantly up-regulates the migration activity in human DCs without losing the effective CTL induction. The 10th International Symposium on Dendritic Cell 2008.10.1 Kobe, Japan

4. 鈴木弘行, 岡部直行, 佐藤直哉, 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 山田文彦, 後藤満一. 非小細胞肺癌における抗癌剤感受性関連分子の発現解析. 第 17 回日本癌病態治療研究会 2008.6.26-27 京都

5. 鈴木弘行, 岡部直行, 佐藤直哉, 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 山田文彦, 後藤満一. 当科での肺癌に対する樹状細胞療法の現状と評価法に関する検討. 第 29 回癌免疫外科研究会 2008.6.19-20 東京

6. 鈴木弘行, 岡部直行, 佐藤直哉, 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 山田文彦, 後藤満一. 非小細胞肺癌の補助化学療法における抗癌剤感受性に関わる遺伝子群の臨床的意義. 第 108 回日本外科学会定期学術集会 2008.5.15-17 長崎

7. Hasegawa T, Suzuki H, Ohsugi J, Shio Y, Higuchi M, Yonechi A, Hoshino M, and Gotoh M. The Tissue Array analysis of the aberrant expression of HLA class I molecules in human non-small cell lung cancer. The 12th World Conference on Lung Cancer 2007.9.2-6 Seoul, Korea

8. Suzuki H, Hasegawa T, Yonechi A, Ohsugi J, Hoshino M, Higuchi M, Shio Y, Gotoh M. Evaluation of radiofrequency ablation for thoracic malignancies using PDG-PET-CT scan.

The 12th World Conference on Lung Cancer 2007.9.2-6 Seoul, Korea

9. 鈴木弘行. 長谷川剛生, 米地 敦, 大杉 純, 星野実加, 樋口光徳, 塩 豊, 藤生浩一, 後藤満一. 細胞増殖関連分子の発現と FDG-PET 集積度を用いたクラスター解析による肺癌の悪性度診断の可能性: Tissue Microarray 法による検討. 第 107 回日本外科学会総会 2007.4.11-13 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 弘行 (SUZUKI HIROYUKI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30322340

(2) 研究分担者

後藤 満一 (GOTOH MITSUKAZU)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50162160

塩 豊 (SHIO YUTAKA)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90433151

樋口 光徳 (HIGUCHI MITSUNORI)
公立大学法人福島県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 50398343

(3) 連携研究者

なし