

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390518

 研究課題名（和文） 癌ペプチドを用いた口腔癌の早期診断法およびオーダーメイド
免疫療法の開発

 研究課題名（英文） Development of early-diagnosis and made-to-order immunotherapy for
oral cancers by using cancer-specific peptides

研究代表者

中村 誠司（NAKAMURA SEIJI）

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60189040

研究成果の概要（和文）：癌ペプチドを用いたオーダーメイド免疫療法と早期診断法の開発のためには、癌に対する免疫監視機構やその調節機構を十分に理解しなければならない。本研究では、口腔癌の癌ペプチドの中では SART-1 が最も抗原性が強く、免疫監視機構における中心的役割を果たしており、それゆえに口腔癌の治療ならびに診断に応用可能な癌ペプチドであることが判った。しかしその一方で、口腔癌が腫瘍関連抗原である RCAS1 を発現・分泌し、活性化 T 細胞のアポトーシスを誘導して免疫監視機構を制御していることが判った。免疫監視機構を賦活するためには癌ペプチドを用いるだけでは不十分であり、この RCAS1 の作用を制御する必要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Fully understanding of immune surveillance and regulation against cancers is needed to develop early-diagnosis and made-to-order immunotherapy for cancers by using cancer-specific peptides. In this study, SART-1 was identified to have strongest antigenicity among various cancer-specific peptides expressed on oral cancers and to play a central part in immune surveillance against oral cancers, indicating that SART-1 is most promisingly applicable to the treatment and diagnosis of oral cancers. In contrast, it was revealed that a tumor-associated antigen, RCAS1, was expressed on and secreted from oral cancers, induced apoptosis of activated T cells, and thus suppressed immune surveillance against oral cancers. To augment immune surveillance against oral cancers, it was strongly suggested that functional regulation of RCAS1, as well as inoculation of SART-1, should be achieved.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌、口腔癌、免疫療法、T細胞、ペプチド、治療、診断、臨床

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の従来の研究では、口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍T細胞が発現するT細胞レセプター (T cell receptor: TCR) を解析し、その認識抗原である癌ペプチドの同定を行い、さらに、それぞれの癌ペプチドの抗原性を検討してきた。その一方で、癌細胞はT細胞の活性化に関わる分子の発現が亢進したり低下したりして、免疫監視機構を調節することも判ってきた。さらに、各種癌関連抗原の機能解析を行ったところ、抗腫瘍T細胞を活性化するだけではなく、T細胞のアポトーシスを引き起こして不活化するものもあることが判ってきた。このように、癌に対する免疫監視機構やその調節機構はまだ十分に解析されていないのが現状である。すでに多くの癌に対して癌ペプチドを用いた特異的免疫療法が試みられているとはいえ、癌に対する免疫監視機構やその調節機構を理解せずには有効な治療になるはずもなく、多くの解決すべき問題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では癌細胞による免疫調節機構についても考慮した癌ペプチドを用いたオーダーメイド免疫療法と早期診断法の開発を目指した。全体構想としては、口腔扁平上皮癌に対する宿主の免疫監視機構および口腔扁平上皮癌による免疫監視機構の調節機能を十分に理解し、その上で有効な特異的免疫療法を確立することを考え、以下の2つを目的として研究を進めた。

(1) 癌細胞に対する免疫監視機構の解析

従来の研究を継続し、個々の口腔扁平上皮癌患者における癌ペプチドの発現およびそれに反応する抗腫瘍T細胞の同定を行う。癌ペプチドの同定方法としては、最新の分子生物学的手法を駆使した、1) SSCPを用いる方法、2) West-Western法、3) TCR transfectant法を用いる。その癌ペプチドを発現する癌細胞や、それを認識する抗腫瘍T細胞の同定には、臨床応用を睨んで、簡便かつ高感度なフローサイトメトリーあるいは免疫組織化学染色による新規の検出方法を用いる。

(2) 癌細胞による免疫監視機構調節分子および癌ペプチドの発現の解析

個々の口腔扁平上皮癌患者における免疫調節分子および癌ペプチドの発現、さらにはその発現調節機構を解析し(図1)、可能であれば免疫監視を増強するような対処方法を検討する。

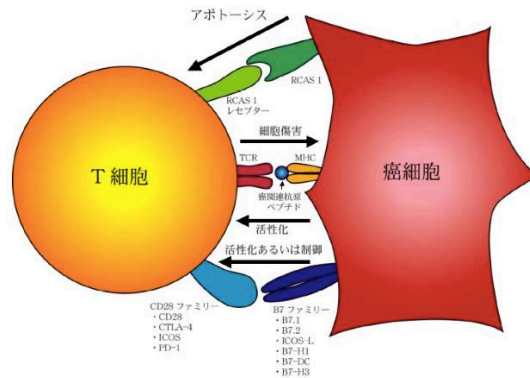


図1 癌細胞と免疫監視機構との相互作用

そして、最終的には以下の2つの研究に引き継ぎ、5年間のうちには臨床応用の準備を整えるために、癌ペプチドを用いたオーダーメイド免疫療法および口腔癌の早期診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 癌細胞に対する免疫監視機構の解析

① 癌ペプチドの同定：従来の研究で同定した HLA-A24 拘束性抗腫瘍T細胞が発現する TCR 遺伝子の塩基配列をもとに、腫瘍組織から培養したT細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングして TCR 遺伝子の cDNA をクローニングした。次に、そのクローンを用いて、1) SSCPを用いる方法、2) West-Western法、3) TCR transfectant法の3つの手法で癌ペプチドを同定した。さらに、その結果をもとに、癌関連抗原遺伝子の cDNA クローニングを行い、その塩基配列から推定されるアミノ酸配列をもとにクロスする 12mer の合成ペプチドを作製し、T細胞が認識する癌ペプチドを選択した。癌ペプチドの選択方法としては、HLA-A24 陽性患者の末梢血単核球に IL-2 とともに加えて培養し、増殖活性およびサイトカイン産生が強さを指標にした。

② 個々の患者における癌ペプチドに反応するT細胞の同定：個々の患者における癌ペプチドに反応するT細胞を同定する方法としては、1) in vitroでのCTL誘導能による同定、2) HLA-A24と癌ペプチド抗原のテトラマーによるT細胞の同定、3) DNAプローブによるT細胞の同定を行った。検討する癌ペプチド抗原としては、①の研究で同定されたものに加えて、すでに報告されている SART-1、SART-2、SART-3、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、Ick、cyclophilin B、ART4の抗原ペプチドを用いた。

(2) 癌細胞による免疫監視機構調節分子および癌ペプチドの発現の解析

① 癌細胞による免疫監視機構調節分子の発現：癌細胞が発現している可能性のあるT細胞調節分子としては、HLAクラスIおよびII抗原、B7ファミリー（B7.1、B7.2、ICOS-L、B7-H1、B7-DC、B7-H3）、接着分子（ICAM-1、VCAM-1、E-selectin）、癌関連抗原であるRCAS1（receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells）があるが、免疫組織学的染色、in situ hybridization法とRT-PCR法によりそれらの発現量を検討した。さらに、RCAS1については、細胞表面に発現される膜方の検出をflow cytometry法により、培養上清中の分泌型の検出をdot blot法とELISA法にて行い、アポトーシス誘導能は赤血球由来細胞株であるK562を標的細胞とし、Annexin V染色によるflow cytometry法により解析した。

② 癌細胞による癌ペプチドの発現：癌細胞が発現する癌ペプチドの検出には、前述のWest-Western法で作成したTCRプローブを用いた。つまり、抗腫瘍T細胞のTCR遺伝子のCDR3領域蛋白とGSTとの融合蛋白を作製し、癌細胞に結合したTCRプローブを抗GST抗体で検出することにより癌ペプチドを検出した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞に対する免疫監視機構の解析

① 癌ペプチドの同定：1) SSCPを用いる方法、2) West-Western法、3) TCR transfectant法の3つの手法により、5種のT細胞が認識する癌ペプチドを同定したところ、HLA-A24陽性患者の末梢血単核球に対して弱いながらも有意な増殖活性およびサイトカイン産生を誘導できた。

② 個々の患者における癌ペプチドに反応するT細胞の同定：35名の口腔扁平上皮癌患者から採取した末梢血単核球から18種類の癌ペプチドを添加して培養し、末梢血単核球中の細胞傷害性T細胞(CTL)前駆体からCD8陽性CTLを誘導し、抗原特異的CD8陽性CTLの誘導の程度をIFN- γ の産生量によって判断した。その結果、この抗原特異的CD8陽性CTLの誘導能は組織学的なリンパ球浸潤程度と正の相関を認めた。さらに60% (21/35例)の患者では、少なくとも1種類の癌ペプチドに対する抗原特異的CD8陽性CTLが誘導された。抗原特異的CD8陽性CTLを誘導した癌ペプチドで頻度が高かったのは、SART-1₆₉₀が25.7% (9/35例)、SART-2₉₃およびART4₇₅が20.0% (7/35例)であった。SART-1₆₉₀に活性が強かった9例の患者では、他の26例の患者と比較して、多くの他の癌ペプチドでも抗原特異的CD8陽性CTLが誘導された。さらに

その中の7例の患者では、SART-1₆₉₀に活性がない16例の患者と比較して、組織学的なリンパ球浸潤程度が有意に強く、CD3陽性T細胞数も多かった。これらの結果より、SART-1₆₉₀、SART-2₉₃、およびART4₇₅は、癌ペプチドを用いた特異的免疫療法の候補ペプチドとして、今後の臨床応用が十分に期待されることが示唆された。

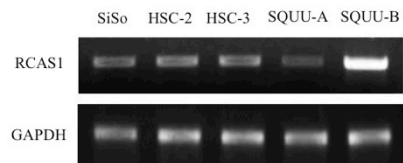
なお、①で得られた新たな5種の癌ペプチドに関しては発現様式などを精査中なので、雑誌論文②にはそれらを除いた合計13種類の癌ペプチドの結果を掲載した。また、癌ペプチドを認識する抗腫瘍T細胞の新たな同定法は十分な成果が得られず、抗腫瘍T細胞の増殖能とIFN- γ の産生量を指標にして同定せざるを得なかった。

(2) 癌細胞による免疫監視機構調節分子および癌ペプチドの発現の解析

① 癌細胞による免疫監視機構調節分子の発現：個々の口腔扁平上皮癌患者における免疫調節分子の発現を免疫組織学的染色およびin situ hybridization法で解析したところ、HLAクラスIおよびII、B7ファミリー（CD28、CD80、CTLA-4、ICOS、B7h）、接着分子（ICAM-1、PD-1）、RCAS1の異常発現がみられた。

癌関連抗原であるRCAS1については、活性化T細胞のアポトーシスを誘導することが示唆されたため、特に注目して検討を加えたところ、口腔癌周囲のリンパ球浸潤程度と強い関連があり、口腔癌がRCAS1を発現していると周囲に浸潤したリンパ球がアポトーシスを起こしていること、高転移口腔癌細胞株SQUU-BでRCAS1の発現が強いこと、口腔癌細胞では膜型と分泌型のRCAS1があること、RCAS1を発現する高転移口腔癌細胞株SQUU-BとK562を共に培養するとK562がアポトーシスを起こすことなどが判った（図2-5）。

RT-PCR法 (mRNAの発現)



免疫細胞化学的染色法 (proteinの発現)

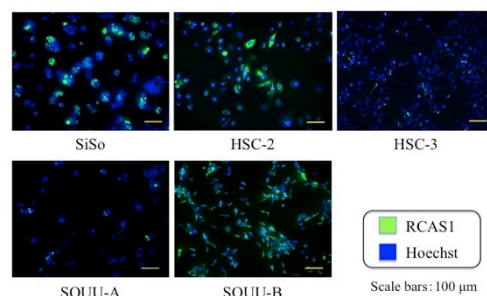


図2 口腔癌細胞によるRCAS1の発現

Flow cytometry 法

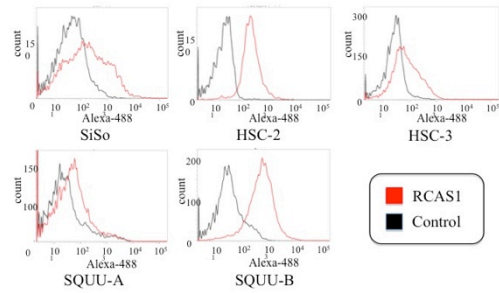
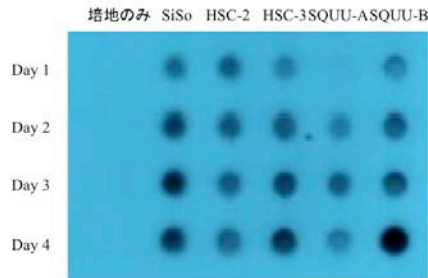


図3 口腔癌細胞による膜型 RCAS1 の発現

Dot blot 法



ELISA 法

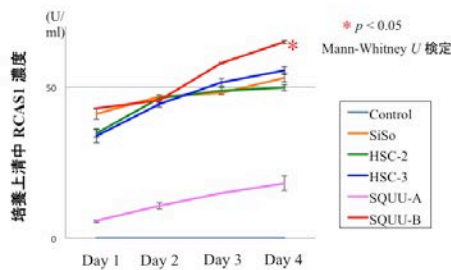


図4 口腔癌細胞による分泌型 RCAS1 の発現

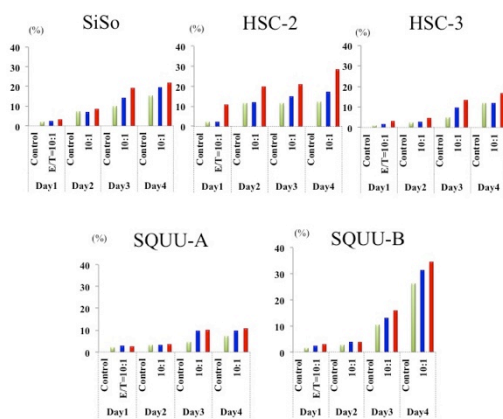


図5 口腔癌細胞によるアポトーシスの誘導

さらに、CTLA-4 の発現が口腔癌周囲のリンパ球浸潤程度と強い関連があることから、CTLA-4 の single nucleotide polymorphism を検索したところ、関連のある遺伝子多型が

見つかり、さらなる解析を進めている。

② 癌細胞による癌ペプチドの発現：癌ペプチドを発現する癌細胞の同定方法については十分な成果が得られず、癌ペプチドの発現量を解析する手法は確立できなかった。

<研究成果の総括>

新旧 18 種類の口腔癌が発現する癌ペプチドを比較検討したところ、SART-1 の抗原性が最も強く、免疫監視機構における中心的役割を果たしており、それゆえに口腔癌の治療ならびに診断に応用可能な癌ペプチドであることが判った。しかしその一方で、口腔癌が腫瘍関連抗原である RCAS1 を発現・分泌し、活性化 T 細胞のアポトーシスを誘導して免疫監視機構を制御していることが判った。

本研究の当初の目的である癌ペプチドを用いたオーダーメイド免疫療法と早期診断法の開発にはまだ至っていない。有効な免疫療法の開発には十分な免疫監視機構を賦活が必要であり、そのためには癌ペプチドを単に接種するだけでは不十分と考え、研究計画を若干変更して癌細胞が発現する RCAS1 による免疫監視機構の制御に焦点をあてた。この癌細胞による免疫監視機構の制御を克服できれば、免疫療法の展開が有望になると思われるので、必要な計画変更であったと考える。また、鋭敏かつ正確な早期診断法の確立には、抗腫瘍 T 細胞の新たな同定の方法を見出さないといけないが、本研究では十分な成果が得られなかった。本研究では T 細胞の増殖活性やサイトカイン産生を指標としたが、手技の煩雑さと検査に要する時間を考えると、臨床応用に耐えうる方法ではない。本研究の当初の目的であった癌ペプチドを用いたオーダーメイド免疫療法と早期診断法の開発には確実に近づいているとはいえ、今後のさらなる研究の積み重ねが必要と考える。

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 2 件)

① Toyoshima, T., Kumamaru, W., Hayashida, J.-N., Moriyama, M., Kitamura, R., Tanaka, H., Yamada, A., Itoh, K., and Nakamura, S.: *In vitro* induction of specific CD8(+) T lymphocytes by tumor-associated antigenic peptides in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 322:86-91, 2012

DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.016

② Matsubara, R., Kawano, S., Kiyosue, T., Goto, Y., Hirano, M., Jinno, T.,

Toyoshima, T., Kitamura, R., Oobu, K., and Nakamura S.: Increased Δ Np63 expression is predictive of malignant transformation in oral epithelial dysplasia and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 39:1391-9, 2011
DOI: 10.3892/ijco.2011.1151.

〔学会発表〕(計7件)

- ① 田中秀明、豊嶋健史、園田顕三、北村亮二、川野真太郎、平野充広、神野哲平、笹栗正明、大部一成、中村誠司：口腔扁平上皮癌由来細胞株における腫瘍関連抗原 RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) の発現と機能についての検討 第31回日本口腔腫瘍学会学術大会、2013年1月24日、東京
- ② 豊嶋健史、北村亮二、川野真太郎、新井伸作、清末崇裕、松原良太、後藤雄一、久保慶朗、田中秀明、大部一成、中村誠司：口腔扁平上皮癌における CTLA-4 遺伝子多型の発現 第29回日本口腔腫瘍学会学術大会、2011年1月27日、熊本
- ③ 中村誠司：口腔癌に対する癌ワクチン療法の現状と展望(シンポジウム) 第29回日本口腔腫瘍学会学術大会、2011年1月27日、熊本
- ④ 松原良太、川野真太郎、清末崇裕、後藤雄一、中尾 祐、豊嶋健史、梯 裕恵、吉賀大午、北村亮二、大部一成、中村誠司：口腔扁平上皮癌における Δ Np63 の発現と機能 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会、2010年10月16日、千葉
- ⑤ Matsubara, R., Kawano, S., Kiyosue, T., Goto, Y., Nakao, Y., Yoshiga, D., Oobu, K., and Nakamura S.: Possible involvement of Δ Np63 in proliferation and differentiation of OSCC. 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2010.9.23, London
- ⑥ 松原良太、川野真太郎、清末崇裕、後藤雄一、中尾祐、豊嶋健史、梯 裕恵、吉賀大午、北村亮二、大部一成、中村誠司：口腔扁平上皮癌における Δ Np63 の発現と機能 第64回日本口腔科学会・学術集会、2010年6月25日、札幌
- ⑦ 松原良太、川野真太郎、清末崇裕、後藤雄一、吉賀大午、豊嶋健史、梯 裕恵、大部一成、中村誠司：口腔扁平上皮癌における上皮幹細胞マーカー (p63、p75NTR) に関する研究 第54回日本口腔外科学会総会・学術大会、2009年10月9日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 誠司 (NAKAMURA SEIJI)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：60189040

(2) 研究分担者

吉田 裕樹 (YOSHIDA HIROKI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：40260715
山田 亮 (YAMADA AKIRA)
久留米大学・先端癌治療センター・教授
研究者番号：50158177