

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24年4月5日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590424

研究課題名（和文）ユニバーサル癌抗原 Aurora-A キナーゼと FAK を標的とした免疫治療の開発

研究課題名（英文）Developing T-cell based immunotherapy using ubiquitously expressing tumor-associated antigen, Aurora-A kinase and FAK

研究代表者

小林 博也 (KOBAYASHI HIROYA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90280867

研究成果の概要（和文）：Focal adhesion kinase (FAK) ならびに Aurora kinase A (Aurora-A) は、様々な固形癌に高発現し、その高発現は癌の進展や不良な予後に関連する。これらのキナーゼ蛋白質が免疫系、特に CD4 ヘルパー T 細胞に認識されるかどうかを検討したところ、腫瘍細胞やそのライセートを認識可能なこれらキナーゼ抗原特異的 CD4 ヘルパー T 細胞が樹立され、そのエピトープペプチドを明らかにした。癌患者末梢血 T 細胞にも認識されるエピトープでもあることも明らかにされ、ペプチドワクチン治療にも利用されうるエピトープである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Focal adhesion kinase (FAK) and Aurora kinase A (Aurora-A) are ubiquitously expressed kinase involved in cancer progression and with poor prognosis that are found overexpressed in various types of cancer. To validate FAK and Aurora-A as a TAA recognized by CD4 helper T lymphocytes (HTL), we have combined the use of predictive peptide/MHC class II binding algorithms with *in vitro* vaccination of CD4 T lymphocytes from healthy individuals and cancer patients. Synthetic peptides correspond to potential HTL epitopes induced HTL responses that directly recognized FAK/Aurora-A-expressing tumor cells and autologous dendritic cells pulsed with these TAA-expressing tumor cell lysates in an HLA class II-restricted manner. Moreover, since the FAK/Aurora-A peptides were recognized by cancer patient's CD4 T cells, the T helper peptide epitopes might be used for designing T cell-based immunotherapy for FAK/Aurora-A-expressing cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：基礎医学・実験病理学

キーワード：CD4 ヘルパー T 細胞、腫瘍抗原、ペプチド、HLA

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡者数は年々増加し、国民の3人に1人が癌で死亡する時代に突入した。癌治療における基本選択は、切除できうる範囲内の外科手術による“癌の減量”であり、固形癌治療には最も望ましい選択肢であると

考えられる。しかしながら、外科的切除でも治療成績が向上しない膵癌などの難治癌や再発・全身転移症例に対しては、今のところ効果的な治療法が確立されていない。このため難治、再発癌の治療法の一つに近年免疫治療が着目され、欧米や本邦で癌抗原ペプチド

を用いたペプチドワクチン療法の開発が進められてきた。最近、数カ所の施設から治験成績が発表され、一部の患者群において原発、転移巣の縮小や血清腫瘍マーカー値の低下等その有用性が認識され、QOLの改善した症例も報告されはじめた。癌ペプチドワクチン療法は副作用のほとんどない、体に優しい新たな癌治療法で、今後の発展が期待されている治療分野の一つである。

癌免疫治療において、生体内で癌を傷害する主要な効果細胞はMHCクラスI結合ペプチドを認識するCD8陽性細胞傷害性T細胞(CTL)であるが、最近の研究によりCTLの腫瘍拒絶反応にはMHCクラスII結合抗原ペプチドで惹起されるCD4陽性ヘルパーT細胞(HTL)の作用の重要性が認識されてきた。それは、1)特異的CTLの誘導に必須の樹状細胞(DC)の成熟、2)長期にわたる有効な癌特異的CTLの維持(メモリーCTLの誘導)、3)直接的に癌抗原特異的HTLが腫瘍を認識し破壊するとともに、他の免疫細胞を活性化することなどである。一方、最近では腫瘍特異的免疫反応を抑制する制御性T細胞(Treg)の存在が明らかとなり、これらを惹起しないMHCクラスII結合癌抗原ペプチドを明らかにする必要性が生じてきた。これらの観点から、有効な腫瘍特異的ヘルパーT細胞の誘導を可能とするMHCクラスII拘束性癌抗原ペプチドを新たに探索し特定することは、これらをCTLが認識するMHCクラスI結合癌抗原ペプチドと併用することで、癌ペプチドワクチン療法の効果を更に向上させることが期待される。

近年、様々なタイプのキナーゼ蛋白の高発現が悪性腫瘍の増殖や腫瘍内血管新生、転移能獲得に重要な役割を果たしていることがわかってきた。特にFocal-adhesion kinase (FAK)とAurora-A kinase (Aurora-A)は様々な悪性腫瘍で発現増強が認められている。FAKは分子量125kDaの非受容体型チロシンキナーゼで、成長因子シグナルや細胞増殖、細胞の生存、細胞の移動(転移能の増強)等の重要な調節因子である。細胞の癌化、その進行には、これらの過程の不具合で生じることが多く、その原因の一つとして腫瘍細胞におけるFAKの発現増加によるものが挙げられる。一方、Aurora-Aはserine/threonine kinaseの一つで、正常細胞において細胞分裂の制御に直接関与する蛋白であるが、様々な悪性腫瘍で遺伝子増幅や過剰発現が認められている。このことにより、細胞分裂においてcentrosomeの増幅、染色体の分離異常、細胞の変形等を引き起こすことから、腫瘍細胞の増殖に関与していることが知られている。このため、これらのキナーゼタンパク質は近年、分子標的治療薬開発のターゲットとしても注目されている。FAK、Aurora-Aとも、上皮性悪性腫瘍(前立腺癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、大腸癌など)及び、白血病や悪性リンパ腫に過剰発現(多くの腫瘍に高発現するので、ユニバーサル腫瘍抗原と呼称される)が報告さ

れており、進行期や転移、予後等との関連も報告されている。

2. 研究の目的

上記の背景のもとに、本研究ではこれら癌関連キナーゼタンパク質の、制御性T細胞を誘導しない日本人に効果的なヘルパーT細胞エピトープペプチドの同定を主目的とする。特に、一つのペプチドシークエンスであるのに、複数のHLAクラスII抗原分子に結合してヘルパーT細胞を惹起することが可能なpromiscuous peptide-epitopeの同定に重点を置く。また、日本人に多くみられるHLA-DR9、HLA-DR53分子に結合して有効なHTLを惹起しうるエピトープペプチドの同定も重要である。

3. 研究の方法

(1) Promiscuous T helper Peptideの選定

Promiscuousに結合可能なペプチドシークエンスを選び出すアルゴリズム解析ソフトを用いて、FAKとAurora-Aのアミノ酸配列を基に最も結合しやすいものを選定し、15残基長のペプチドを合成、精製した。

(2) 抗原ペプチド特異的ヘルパーT細胞クローンの樹立

合成したペプチドを健康成人あるいは癌患者の樹状細胞(DC)にパルスし、これらDCと磁気ビーズで単離したCD4陽性T細胞とを共培養し、1週おきに抗原ペプチドをパルスした末梢血単核球を抗原提示細胞として数回刺激し、抗原ペプチド特異的ヘルパーT細胞株を樹立した。更に限界希釈法により、T細胞クローンを樹立し抗原ペプチドの拘束提示分子を同定した。

(3) 機能抗原エピトープペプチドの証明

同定されたTヘルパーエピトープが、実際にnaturally processed antigenとして機能しうるかどうかを確認するため、1)DCに可溶性腫瘍細胞ライセート、2)HLAクラスII抗原を発現し該当する癌抗原を有する腫瘍細胞を直接APCとして、T細胞クローンと共培養しその反応をサイトカインELISA法により定量した。

(4) 癌患者末梢血中リンパ球のFAK, Aurora-Aペプチドに対する反応性の検討

メラノーマ患者及び膀胱癌患者末梢血単核球を分離しペプチドに対する反応性をELISAで定量した。

4. 研究成果

(1) FAKを認識するCD4ヘルパーT細胞エピトープペプチドの同定

幅広い癌腫に高発現しているFocal adhesion kinase (FAK)の全アミノ酸配列を基に、個人間のHLA class II抗原に制約を受けずに多数のHLA class II抗原分子(HLA-DR1, DR4, DR7, DR9)に結合可能なことが予測された15残基のペプチドを

2種類合成した。健康人末梢血から分離した CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞をペプチドの存在下で共培養し、その後複数回の刺激を行って FAK ペプチド特異的ヘルパー T 細胞クローンを 4 名の健康成人から樹立した。詳細なエピトープ解析から FAK₁₄₃₋₁₅₇ ペプチドは HLA-DR4, DR9, DR53 拘束性に、FAK₁₀₀₀₋₁₀₁₄ ペプチドは HLA-DR4, DR53 拘束性にヘルパー T 細胞を活性化させ、IFN-ガンマあるいは GM-CSF などの TH1 サイトカインを分泌させた。またこれらのペプチドは複数の HLA-DR 分子に結合してヘルパー T 細胞を誘導したことから、promiscuous エピトープペプチドであることが示された。樹立されたヘルパー T 細胞クローンは、いずれも FAK を高発現する前立腺癌細胞株、メラノーマ細胞株や大腸癌細胞株、T 細胞リンパ腫株を HLA-DR 分子を介して認識しサイトカインを分泌した。更に、自己の樹状細胞に、FAK を高発現している腫瘍細胞の可溶化物を取り込ませ、ペプチド特異的 T 細胞クローンと共培養すると、T 細胞クローンはこれを認識してサイトカインを分泌した。これらの結果は、今回明らかにされた FAK エピトープペプチドは、生体内で自然な形態で発生しうる naturally processed antigenic peptide であり、これらの分子を標的とする癌ペプチドワクチンの設計に寄与するものと考えられた。

(2) Aurora-A を認識する CD4 ヘルパー T 細胞エピトープペプチドの同定

FAK の検討と同様に 15 残基のペプチドを 2 種類合成した。健康人末梢血から分離した CD4 陽性 T 細胞と樹状細胞をペプチドの存在下で共培養し、その後複数回の刺激を行って Aurora-A ペプチド特異的ヘルパー T 細胞クローンを 6 名の健康成人から樹立した。詳細なエピトープ解析から Aurora-A₁₆₁₋₁₇₅ ペプチドは HLA-DR9, DR53 拘束性に、Aurora-A₂₃₃₋₂₄₇ ペプチドは HLA-DR15, DR53, DQ6 拘束性にヘルパー T 細胞を活性化させ、IFN-ガンマあるいは GM-CSF などの TH1 サイトカインを分泌させた。そしてこれらのペプチドは複数の HLA-DR 分子に結合してヘルパー T 細胞を誘導したことから、promiscuous エピトープペプチドであることが示された。樹立されたヘルパー T 細胞クローンは、いずれも Aurora-A を高発現する前立腺癌細胞株、腎癌細胞株や乳癌細胞株を HLA-DR 分子を介して認識しサイトカインを分泌した。更に、自己の樹状細胞に、Aurora-A を高発現している腫瘍細胞の可溶化物を取り込ませ、ペプチド特異的 T 細胞クローンと共培養すると、T 細胞クローンはこれを認識してサイトカインを分泌した。また、一部の T 細胞クローンは、腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を示した。これらの結果から、今回明らかにされた Aurora-A エピトープペプチドは、生体内で自然な形態で発生しうる naturally processed antigenic peptide であり、これらの分子を標的とする癌ペプチドワクチンの設計に寄与するものと考えられた。

(3) 癌患者末梢血リンパ球の FAK, Aurora-A

ペプチドに対する反応性

- ① メラノーマ切除材料パラフィン包埋切片を用いて、FAK の免疫組織染色を行った。3 名の患者組織に FAK が高発現していた。
- ② この 3 名のメラノーマ患者末梢血から、単核球を分離し FAK₁₄₃₋₁₅₇, FAK₁₀₀₀₋₁₀₁₄ ペプチドで刺激し、更に 1 週後に同ペプチドと自己の単核球で再刺激したところ、いずれも培養上清中に Th-1 サイトカインである IFN ガンマと GM-CSF の産生が認められた。このことは、これらのエピトープペプチドに反応する前駆 T 細胞が患者末梢血中に存在することを示すものである。
- ③ Aurora-A ペプチド反応性 T 細胞の頻度を、5 名の尿路上皮癌患者（膀胱癌）で検討したところ、Aurora-A₁₆₁₋₁₇₅ と Aurora-A₂₃₃₋₂₄₇ の 2 種類のペプチドに反応する前駆 T 細胞の分画を 5 名全ての患者で検出可能であった。

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 3 件)

- ① Hayashi S, Kumai T, Matsuda Y, Aoki N, Sato K, Kimura S, Kitada M, Tateno M, Celis E, Kobayashi H. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate and enhancer of zeste homolog 2 as immunotherapeutic targets for lung cancer. *J Transl Med*. 2011 Nov 5;9:191
doi:10.1186/1479-5876-9-191
- ② Kobayashi H, Azumi M, Hayashi S, Sato K, Aoki N, Kimura S, Kakizaki H, Nagato T, Harabuchi Y, Tateno M, Celis E. Characterization of human CD4 helper T cell responses against Aurora kinase A. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(7):1029-39.
DOI: 10.1007/s00262-010-0826-0
- ③ Kobayashi H, Azumi M, Kimura Y, Sato K, Aoki N, Kimura S, Honma M, Iizuka H, Tateno M, Celis E. Focal adhesion kinase as an immunotherapeutic target. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(6):931-40.
doi: 10.1007/s00262-008-0608-0

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小林博也 (代表者): 癌免疫、アレルギー制御に関わる HLA クラス II 分子結合性ペプチド抗原の分子病理学的解析: 第 56 回日本病理学会秋期特別総会; 2010 年 11 月北九州市
- ② 小林博也 (代表者): T ヘルパー応答から考察した癌抗原タンパク質としての Aurora-A kinase の有用性: 第 99 回日本病理学会総会; 2010 年 4 月横浜市
- ③ 小林博也 (代表者): T ヘルパー応答から考察した免疫標的分子としての FAK の可能性: 第 68 回日本癌学会総会; 2009 年 10 月横浜市

- ④ 小林博也（代表者）：免疫標的分子としての Focal adhesion kinase(FAK)の可能性：第 98 回日本病理学会総会；2009 年 5 月京都市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 博也 (KOBAYASHI HIROYA)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90280867

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

