

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 5月 14日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591829

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫に対する特異的免疫療法の構築

研究課題名（英文） Identification of tumor-associated antigen in malignant pleural mesothelioma for establishment of tumor specific immunotherapy.

研究代表者

宗 哲哉 (SOU TETUYA)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：90412642

研究成果の概要（和文）：悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法として特異的免疫療法を確立することを目的とした。悪性胸膜中皮腫2症例より腫瘍細胞株(L324MSO、K921MSO)を樹立した。L324MSO症例では自己腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球(CTLクローン)を誘導し、cDNA発現スクリーニング法によりCTLに認識される新規腫瘍抗原を試みている。次に腫瘍浸潤Bリンパ球の産生する抗体を用いたSEREX法により、新規腫瘍抗原であるGene-XとThrombospondin 2 (THBS-2)を同定した。Gene X、THBS-2に対する抗体価を、悪性胸膜中皮腫患者と非悪性疾患患者を対象にELISA法で評価したところ、THBS-2において中皮腫患者で陽性率が72.2%であったが、非悪性疾患患者では4.5%であった。THBS-2に対する抗体価は、胸膜中皮腫に対する新たなバイオマーカーとしての可能性が示唆された

研究成果の概要（英文）：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is difficult to diagnose at an early stage. The present study attempted to identify tumor-associated antigen, which is applicable for surrogate biomarkers of diagnosis or for antigen-targeted therapy for MPM.

Bulk cytotoxic T lymphocytes (CTL) were induced successfully by co-culture of lymphocytes and the autologous MPM cell line L324MSO. Then, CTL clone was established by the limiting dilution method. CTL clone showed cytotoxic activity against L324MSO, but not autologous PHA blast or K562 in an HLA-restricted manner. Using the CTL clone, an antigen-coding gene has been screened using the cDNA expression cloning technique.

On the other hand, tumor-associated antigens were also identified by using antibody derived from tumor-infiltrating B lymphocytes in MPM. Immunoscreening of the cDNA libraries was carried out by serological identification of antigens by a recombinant expression cloning method (SEREX), and 2 antigens were identified as MPM-associated antigens (Gene-X and thrombospondin-2 (THBS-2)). Antibodies against Gene-X and THBS-2 in the sera were measured by ELISA method. A total of 124 sera were investigated; 97 patients were finally diagnosed with MPM and 27 were diagnosed as non-malignant diseases (NM). The serum antibody-titer against THBS-2 was significantly higher in MPM patients than in NM ($P < 0.01$), but there was no difference in the serum antibody-titer against Gene-X. The serum antibody-titer against THBS-2 was a useful non-invasive marker in the diagnosis

of MPM. Furthermore, the suppression of Gene-X and THBS-2 expression by transfection with small interfering RNA resulted in suppression of the cell cycle associated gene and apoptosis associated gene, and the growth inhibition of MPM cell lines. These results may indicate that Gene-X and THBS-2 are may be a useful candidate as a target for specific immunotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：悪性胸膜中皮腫、細胞障害性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球、SEREX法
Thrombosposquodin 2、腫瘍マーカー、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は石綿曝露に起因する予後不良の疾患であり、日本社会全体の環境問題となっている。1997年には中皮腫による死亡者数は597名であったのに対して、2007年では、1068名と増加している。中皮腫発症までの潜伏期間は平均30-50年と非常に長いこと、我が国での石綿の全面使用禁止が2004年であったこと、現時点から2040年にかけて建築物解体の時期を迎えること、地震などの災害時には建造物からのアスベスト飛散が指摘されていることなどから、さらに今後増加することが予想される。しかし、胸膜中皮腫は早期発見することは困難な上、有効な治療法が確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

悪性胸膜中皮腫患者生体内における抗腫瘍免疫応答を細胞性免疫・液性免疫両面から解析し、新規腫瘍抗原を同定すること、さらにその腫瘍抗原の機能や発現、抗腫瘍活性を確認することで、予後不良であり今後症例数の増加が予想される悪性胸膜中皮腫に対する新規治療法として特異的免疫療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞性免疫からのアプローチとして、当研究室で樹立した悪性胸膜中皮腫細胞株

と末梢血リンパ球 (autologous) を混合培養し、腫瘍刺激を1週毎に繰り返し、自己腫瘍特異的CTL誘導を行う。さらに限界希釈法によりCTLクローンの樹立を行う。

(2) 液性免疫からのアプローチとして、外科切除された腫瘍組織をSCIDマウスに移植後、経時的に血清採取する。さらに、悪性胸膜中皮腫細胞株のmRNAより、cDNAライブラリーを作製する。SEREX法により新規腫瘍抗原の同定を行う。さらにこれまでに、同定された、新規腫瘍抗原の機能の解析および胸膜中皮腫症例における血清マーカーとしての評価を行う。

4. 研究成果

悪性胸膜中皮腫2症例(L324症例、K921症例)より腫瘍細胞株(L324MSO、K921MSO)を樹立し、それぞれの自己リンパ球を分離保存した。細胞性免疫側からのアプローチとして、K921MSO症例では自己腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)を誘導し、さらにCTLクローンを樹立した。図1に自己腫瘍を特異的に認識するCTLクローンの細胞障害活性を示す。またL324MSO症例では現在CTLを誘導中である。さらに新たに悪性胸膜中皮腫N407症例からも腫瘍細胞株N407MSOを樹立し自己リンパ球を分離保存できたため、こちらもCTLを誘導中である。K921については、cDNA発現スクリーニング法によりCTLに認識される新規腫瘍抗原を同定する予定である。

一方、K921MSO、L324MSO、N407MSO の症例について腫瘍組織（悪性胸膜中皮腫組織）を移植した SCID マウスの血清を採取し凍結保存している。液性免疫側からのアプローチとして、当科で考案した modified SEREX 法（プローベ：SCID マウス血清中ヒト型 IgG、cDNA フェージライブラリー：腫瘍細胞株 mRNA より作成）により、腫瘍浸潤リンパ球に由来する抗体に認識される新規腫瘍抗原を試みた。これまでに 3 症例全てで SCID マウス血清中のヒト型 IgG を測定しプローベとなりうることを確認した。cDNA フェージライブラリーを作成し、SCID マウス血清（腫瘍浸潤リンパ球に由来する抗体）を用いて、新規腫瘍抗原のスクリーニングを行った。これまでに 4 種類（Gene-X、THBS-2、STUB-1、IFT-88）を同定した。このうち Gene-X と THBS-2 は定量的 RT-PCR により、正常組織に比べ腫瘍組織で過剰発現していた。また Gene X、Thrombospondin 2 に対する抗体価を、97 例の悪性胸膜中皮腫患者と 22 例の非悪性疾患患者（胸膜炎、胸膜プラーク）を対象に ELISA 法で測定した。健常者（27 名）で設定したカットオフ値をこえるものを陽性として判定したところ、Gene-X の陽性率は胸膜中皮腫患者で 97 例中 45 例（46.4%）、非悪性疾患患者は 22 名中 1 名（4.5%）であった（図 2）。THBS-2 は中皮腫患者 97 例中 70 例が陽性で陽性率が 72.2%、非悪性疾患患者では 22 例中 1 例で 4.5%であった。THBS-2 に対する抗体価は、胸膜中皮腫に対する新たなバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

次に small interfering RNA (siRNA) を用いて、Gene-X と THBS-2 の発現を抑制し機能解析を行った。K921MSO および N407MSO は Gene-X、THBS-2 の過剰発現を認める細胞株である。そこで Gene-X、THBS-2 をターゲットとする siRNA を作成した。siRNA にて Gene-X の発現を抑制したところ、コントロール群に比べ、胸膜中腫細胞株の増殖の抑制が認められた。同様に THBS-2 についても発現を抑制することで、細胞増殖の抑制が認められた（図 3）。さらに細胞増殖の抑制が、どのようなシグナルを介しておこなっているかの解明をするために、siRNA を用いて、Gene-X や THBS-2 を抑制した際に、アポトーシス関連遺伝子として Caspase3、Caspase9、PARP を、細胞周期関連遺伝子として CyclinD1、p27 の遺伝子発現の変化を、Real-time RT-PCR にて解析した。Gene-X を抑制することにより、Caspase 3 や Caspase9 などのアポトーシス関連遺伝子が増加しており、また THBS-2 を抑制することで、CyclinD1 が減少し、p27 が増加した。Gene-X と THBS-2 の発現と、アポトーシス抑制遺伝子、細胞周期を制御する遺伝子との関連が示唆された。

まとめ

- 1) 胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的細胞障害性 T リンパ球を誘導し、さらに CTL クローンを樹立した。cDNA 発現スクリーニング法により CTL に認識される新規腫瘍抗原を同定する予定である。
- 2) 胸膜中皮腫の mRNA より cDNA フェージライブラリーを作成し、SCID マウス血清（腫瘍浸潤リンパ球に由来する抗体）を用いて、新規腫瘍抗原のスクリーニングを行い、4 種類（Gene-X、THBS-2、STUB-1、IFT-88）を同定した。このうち、THBS-2 は中皮腫患者 97 例中 70 例が陽性で陽性率が 72.2%、非悪性疾患患者では 22 例中 1 例で 4.5%であった。THBS-2 に対する抗体価は、胸膜中皮腫に対する新たなバイオマーカーとしての可能性が示唆された。
- 3) 胸膜中皮腫細胞株の Gene-X および THBS-2 の発現を、siRNA にて抑制したところ、コントロールに比べ、細胞増殖の抑制が認められた。Gene-X に関しては、Caspase 3 や Caspase9 などのアポトーシス関連遺伝子が、また THBS-2 に関しては、CyclinD1、p27 などの細胞周期関連遺伝子との関係が示唆された。

図 1 CTL クローンの胸膜中皮腫に対する細胞障害活性

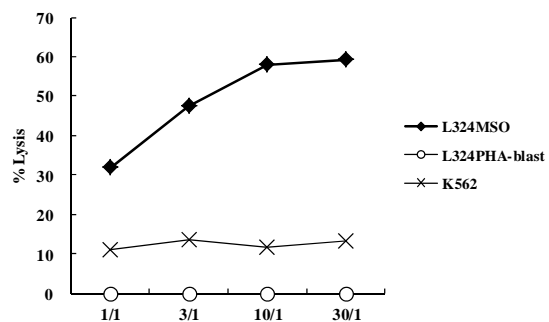


図2 悪性胸膜中皮腫患者と非悪性疾患患者（胸膜炎、胸膜プラーク）におけるGene X、Thrombospondin 2 に対する血清抗体価

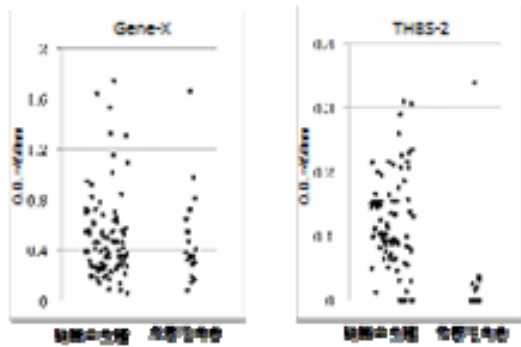
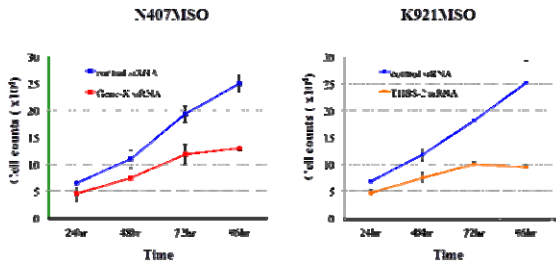


図3 siRNAによるGene-XおよびTHBS-2の発現抑制による胸膜中皮腫細胞株の増殖抑制



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8件)

① Yasuda M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Onitsuka T, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, Ichiki Y, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K: Identification of a tumour associated antigen in lung cancer patients with asbestos exposure. *Anticancer Res* 30: 2631-2639. 2010 査読有

② 浦本秀隆, 下川秀彦, 馬場哲郎, 重松義紀, 永田好香, 小野憲司, 竹之山光広, 花桐武志: 悪性胸膜中皮腫の治療経験. *JUOEH* 32: 257-264. 2010 査読有

③ Yasuda M, Hanagiri T, Takenoyama M, Yasumoto K: Tumor antigens and serological biomarkers for the diagnosis of asbestos-related malignancies. *Curr Res in Cancer* 4: 39-40. 2010 査読有

④ Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Hanagiri T: TS, DHFR and GARFT Expression in Non-squamous Cell Carcinoma of NSCLC and Malignant Pleural Mesothelioma Patients Treated with Pemetrexed. *Anticancer Res* 30: 4309-4316. 2010 査読有

⑤ Shigematsu Y, Hanagiri T, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, Ichiki Y, Yasuda M, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K: Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. *Cancer Sci* 100: 1326-1334. 2009 査読有
DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01181.x

⑥ 花桐武志, 杉尾賢二, 安元公正: 選択的ワクチン療法: 非特異的免疫療法からの脱出?: 現状と展望 MAGE抗原を用いた免疫療法の可能性. *Oncology* 6: 72-80. 2009 査読有

⑦ Hanagiri T, Sugio K, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, Uramoto H, Ohga T, Takenoyama M, Yasumoto K: Results of Surgical Treatment for Patients with Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 4: 964-968. 2009 査読有

⑧ Yasuda M, Hanagiri T, Ichiki Y, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K: Congenital tracheoesophageal fistula

in an elderly patient with thoracic empyema. Gen Thorac Cardiovasc Surg 57: 622-624. 2009 査読有
DOI: 10.1007/s11748-009-0450-0

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 竹中賢, 近石泰弘, 岡壮一, 中川誠, 下川秀彦, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓 : 新規悪性胸膜中皮腫関連抗原の機能解析と腫瘍マーカーとしての意義. 第 52 回日本肺癌学会総会 大阪国際会議場 大阪. 2011 年 11 月 3-4 日
- ② 竹之山光広, 重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓 : 悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的免疫応答の解析 (第 2 報). 第 29 回産業医科大学学会総会 産業医科大学ラマツィーホール 北九州. 2011 年 10 月 18 日
- ③ 竹之山光広 : 悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的免疫応答の解析. 第 28 回産業医科大学学会総会 産業医科大学ラマツィーホール 北九州. 2010 年 10 月 12 日
- ④ Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Ichiki Y, Ono K, Yasuda M, Uramoto H, So T, Takenoyama M, Hanagiri T, Yasumoto K : Diagnostic markers for malignant pleural mesothelinoma: Serum antibody against antigens recognized by antibodies produced from tumor infiltrating B cells. The 10th International Conference of the International Mesothelinoma Interest Group 国立京都国際会館 京都. 2010 年 8 月 31-9 月 3 日
- ⑤ 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 永田好香, 下川秀彦, 小野憲司, 浦本秀隆, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正 : T細胞受容体移入 $\gamma \delta$ T細胞による養子免疫療法への応用. 第 14 回日本がん免疫学会総会 KKR ホテル熊本 熊本. 2010 年 7 月 22-23 日
- ⑥ 黒田耕志, 竹之山光広, 塩田広宣, 馬場哲郎, 重松義紀, 宗哲哉, 水上真紀子, 市来嘉伸, 小野憲司, 安田学, 菅谷将一, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 安元公正 : 肺癌に高発現する新規腫瘍抗原 ribosomal protein L19 の機能解析. 第 27 回日本呼吸器外科学会総会 仙台国際センター 仙台. 2010 年 5 月 13-14 日
- ⑦ 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 宗哲哉, 安田学, 小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正 : 悪性胸膜中皮腫関連抗原の同定と機能解析. 第 27 回日本呼吸器外科学会総会 仙台国際センター 仙台. 2010 年 5 月 13-14 日
- ⑧ 重松義紀, 塩田広宣, 黒田耕志, 馬場哲郎, 宗哲哉, 小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正 : 癌精巣抗原 KK-LC-1 を認識する T細胞受容体移入 $\gamma \delta$ T細胞を用いた養子免疫療法への応用. 第 110 回日本外科学会定期学術集会 名古屋国際会議場 名古屋. 2010 年 4 月 8-10 日
- ⑨ 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 宗哲哉, 小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正 : 腫瘍浸潤 B細胞にて同定した悪性中皮腫関連抗原とその抗体価の臨床的意義. 第 63 回日本呼吸器学会 北九州市国際会議場 北九州. 2009 年 11 月 26-27 日
- ⑩ 安田学, 花桐武志, 重松義紀, 黒田耕志, 鬼塚貴光, 馬場哲郎, 宗哲哉, 小野憲司,

浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 安元公正 : 石綿関連悪性腫瘍 (胸膜中皮腫、肺癌) に対する新規バイオマーカー.

第 63 回日本呼吸器学会 北九州国際会議場 北九州. 2009 年 11 月 26-27 日

- ⑪ 竹之山光広, 花桐武志, 宗知子, 安田学, 市来嘉伸, 宗哲哉, 永田好香, 馬場哲郎, 重松義紀, 黒田耕志, 小野憲司, 浦本秀隆, 安元公正 : 肺癌における細胞障害性T細胞が認識する腫瘍抗原の同定.

第 62 回日本胸部外科学会定期学術集会 パシフィコ横浜 横浜. 2009 年 10 月 11-14 日

- ⑫ Yasumoto K : Immunotherapy for Lung Cancer. 11th Meeting of Chinese Lung Cancer Conference center of Wanli Taida Hotel Tianjin, China. 2009 年 8 月 28-30 日

- ⑬ Shigematsu Y, Yasumoto K : Diagnostic Markers for Malignant Pleural Mesothelioma: Serum Antibody against Antigens Recognized by Antibodies Produced from Tumor Infiltrating B cells. 2009 4th China Medica Biotech Forum New World Hotel Dalian, China. 2009 年 8 月 8-10 日

- ⑭ Hanagiri T, Yasuda M, Kuroda K, Shigematsu Y, Baba T, So T, Ono K, Uramoto H, So T, Takenoyama M, Yasumoto K : The identification of tumor antigens associated with asbestos-related lung cancer. 13th World Conference on Lung Cancer W Hotel San Francisco, USA 2009 年 7 月 31-8 月 4 日

- ⑮ 黒田耕志, 竹之山光広, 馬場哲郎, 重松義紀, 宗哲哉, 市来嘉伸, 小野憲司, 安田学, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 安元公正 : HLA発現異常を有する肺癌に対する腫瘍特異的Tリンパ球の解析.

第 13 回日本がん免疫学会総会 北九州国際会議場 北九州. 2009 年 6 月 24-25 日

- ⑯ 安田学, 花桐武志, 黒田耕志, 鬼塚貴光, 重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 宗哲哉, 小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 安元公正 : 石綿関連肺癌に対する液性免疫応答の解析. 第 13 回日本がん免疫学会総会 北九州国際会議場 北九州. 2009 年 6 月 24-25 日

- ⑰ 重松義紀, 塩田広宣, 黒田耕志, 馬場哲郎, 永田好香, 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 : 悪性胸膜中皮腫における腫瘍抗原の同定と新規腫瘍マーカーとしての意義. 第 109 回日本外科学会定期学術集会 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、福岡サンパレス 福岡. 2009 年 4 月 2-4 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 哲哉 (SOU TETUYA)
産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：9 0 4 1 2 6 4 2

(2) 研究分担者

花桐 武志 (HANAGIRI TAKESHI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：3 0 2 9 9 6 1 4
竹之山 光広 (TAKENOYAMA MITUHIRO)
産業医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：1 0 3 0 9 9 6 6
馬場 哲郎 (BABA TETUROU)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：1 0 5 0 6 3 4 8
(H21 →H22：連携研究者)