

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30日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659374

研究課題名（和文） 樹状細胞への自己抗原ミモトープの標的化によるがん特異的免疫反応の誘導

研究課題名（英文） Induction of the tumor immune response by the dendritic cell targeting of the autoantigen mimotope.

研究代表者

花房 直志 (HANAFUSA TADASHI)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教

研究者番号：00228511

研究成果の概要（和文）：

本研究では前立腺がん特異的に発現する PCDH11Y の CD8 T 細胞エピトープ、およびそのミモトープを樹状細胞にターゲティングする事によりがんに対する有効な免疫応答を誘導することを目的とし研究を進めてきた。エピトープの同定には成功していないが、ADCC の誘導が可能な PCDH11Y に対する細胞外ドメイン特異的 scFv 抗体の作成、およびそのヒト化に成功した。これにより PCDH11Y を発現する前立腺がんに対する特異的免疫応答の誘導が可能となると予想した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I tried to identify the CD8 T-cell epitopes and its mimotopes of PCDH11Y that is expressed on prostate cancer cells, and tried to induce tumor specific immune response by dendritic cell targeting of its sequence. I didn't succeed the isolation of epitopes, but I succeeded the construction of scFv antibody that recognizes the extracellular domain of PCDH11Y, and its humanization. I postulated that the induction of tumor specific immune response could be induced using this antibody by the ADCC mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	500,000	0	500,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,700,000	150,000	2,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：腫瘍学 ミモトープ

1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は有望ながん治療法として注目されており、多様なアプローチから研究されて

いる。しかし肉眼で検出可能なサイズのがんは既に多様な免疫回避機構を獲得しており免疫療法が有効に働かない場合が多い。このため効

果は一部の症例に限られるのが現状である (Ernststoff, Journal of Clinical Oncology, 23: 5875-5877, 2005)。国外ではRosenbergらのグループが先行しているが(Proc Natl Acad Sci USA., 100: 8372-8377, 2003)、国内でも臨床試験が始められており、我々が属する医歯薬学総合研究科中山睿一教授のグループではNY-ESO-1タンパク質を用いた食道がん、前立腺がん、悪性黒色腫に対する臨床試験を行っている。

がん抗原の多くは本来自己抗原であるため強い抗原性を持たない。このような細胞傷害性T細胞(CTL)誘導能の弱い自己(がん)抗原エピトープを認識するCTLの作製にはミモトープの使用が有効である。ミモトープとはエピトープとは異なるアミノ酸配列でありながら同じCTLクローンを誘導しうる配列を意味する。強いCTL誘導能を持つミモトープで誘導されたCTLは、自己抗原エピトープを提示する細胞にも同様の細胞傷害能を持つ場合が多い。我々は適切な抗原提示が可能ながん抗原ミモトープを用いる事により、有効ながん免疫の誘導が可能であると考えている。

我々は新規がん抗原探索の過程で、前立腺がん特異的に発現する遺伝子PCDH11Yb、HLXB9等の候補遺伝子を同定した(小野他、第64回日本癌学会、平成17年)。特にPCDH11Ybは前立腺がんのホルモン抵抗性がんへの分化転換に関与すること(Yang X, Chen MW. et al. Cancer Res. 2005: 65 5263-71)、多くの前立腺がんが発現が亢進している事から(小野他、同上)、新たながん抗原である可能性が高い。

自己(がん)抗原に対するCTLの誘導には樹状細胞(DC)への抗原の標的化が有効であるが、DC特異的な抗原リセプターDEC-205に対する抗体に抗原ペプチドを遺伝子工学的に結合させた融合抗体を用いると、ペプチド単独の場合に比べ効率的に免疫反応を誘導できる(Bonifaz

LC *et al.* J Exp Med. 2004: 199(6) 815-24.)。私は2004年5月からAlbert Einstein医科大学においてTP. DiLorenzo博士のもとで、共同研究としてRalph Steinman博士らと抗DEC-205融合抗体を用いた樹状細胞へのミモトープの標的化の共同研究を行ってきた(Mukhopadhyaya A, Hanafusa T, *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 105: 6374-9.)。本研究においてもミモトープを組み込んだ抗DEC-205融合抗体が効率的な免疫応答の誘導に最も有効であると予想した。

2. 研究の目的

本研究は前立腺がん特異的に発現する遺伝子PCDH11YのCD8 T細胞エピトープ、およびそのミモトープの同定を目的とした。さらに樹状細胞特異的な抗原リセプターDEC-205に対する抗体との融合タンパク質等を用い樹状細胞へのエピトープ、およびミモトープの効率的な標的化システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 前立腺がんの新規がん抗原 PCDH11Y の CD8 T 細胞エピトープおよびミモトープ配列の同定。

PCDH11Yには十数種のアイソフォームが存在する事が知られている。前立腺がんでは特異的に発現するPCDH11Yに特異的なアミノ酸配列の部分を用いて、HLA-A24 およびHLA-A2結合モチーフを持つペプチドを選択し合成する。次にこれらを用いてヒトHLAを発現するマウスより特異的CTLクローンを誘導する。次に得られたCTLクローンが認識するエピトープペプチドを改変し、より低濃度でCTL誘導能を示し、より強い細胞傷害能を持つミモトープ配列を同様に探索する。

(2) ミモトープを用いて誘導したCTLが強

い抗腫瘍効果を持つ事を示す。

前立腺がん抗原(PCDH11Yb)を発現するマウス癌細胞株を作製し、ミモトープを用いて誘導した CTL クローンが PCDH11Y に対し強い細胞傷害能を持つ事を in vivo および in vitro の実験によって証明する。

(3) CD8 T 細胞ミモトープを運ぶ 抗 DEC-205 融合抗体を構築する。

遺伝子工学的に同定した CD8 T 細胞エピトープおよびミモトープ配列を運ぶ融合抗体を作成し、樹状細胞への標的化を試みる。

(4) 細胞外ドメイン特異的 scFv 抗体の作成、およびそのヒト化。

前立腺がん細胞において細胞増殖シグナルを伝達する膜タンパク質である PCDH11Y は抗体療法、ADCC の標的として利用できる可能性があるため、細胞外ドメイン特異的 scFv 抗体の作成およびそのヒト化を行う。

4. 研究成果

これまでの研究から以下の成果を得た。

(1) 前立腺がんの新規がん抗原 PCDH11Yb の CD8 T 細胞エピトープおよびミモトープ配列同定

PCDH11Y には十数種のアイソフォームが存在する事が知られている。前立腺がんで特異的に発現する PCDH11Yb に特異的なアミノ酸配列の部分を用いて、HLA-A2 結合モチーフを持つペプチドを選択し合成した。これらを用いてヒト HLA を発現するマウスより特異的 CTL クローンを誘導する手法で実験を行った。現在まで有意な反応を示すクローンは得られていないが、今後も得られた CTL クローンが認識するエピトープペプチドを改変し、より低濃度で CTL 誘導能を示し、より強い細胞傷害能を持つミモトープ配列を同様に探索

していくことを予定している。

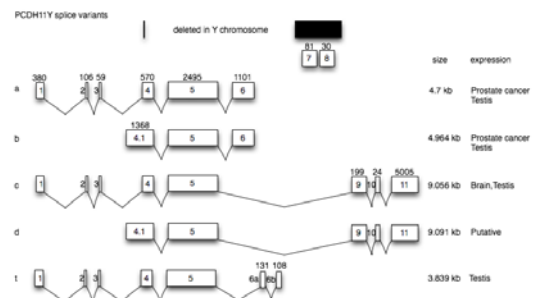


図1 PCDH11Yには多くのバリエーションがあるが、前立腺がんが発現するバリエーション、精巣特異的バリエーションを同定した。特異的配列はがん免疫の有効な標的となると予想される。

(2) CD8 T 細胞ミモトープを運ぶ 抗 DEC-205 融合抗体を構築する。遺伝子工学的に同定した CD8 T 細胞エピトープおよびミモトープ配列を運ぶ融合抗体を作成し、樹状細胞への標的化を試みる。ベクターの作成を終え、エピトープおよびミモトープ配列を組み込める段階までの準備が完了した。

(3) 細胞外ドメイン特異的 sc 抗体の作成とヒト化。前立腺がん細胞において細胞増殖シグナルを伝達する膜タンパク質である PCDH11Y は抗体療法の標的として利用できる可能性があるため、細胞外ドメイン特異的 scFv 抗体の作成を試みた。幾つかの細胞外ドメインに特異的な scFv 抗体の単離を行った (第70回日本癌学会学術総会 新規前立腺がん抗原プロトカドヘリン 11 に対する scFv 抗体の作成 花房直志他)。さらに得られた抗体のヒト化に成功した。

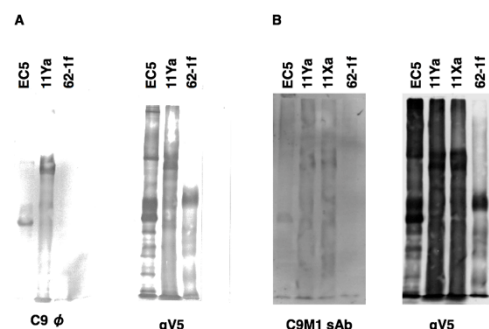


図2 PCDH11Yに対するscFv抗体C9は細胞外ドメインEC5に反応するが細胞内タグを持つコントロール62-1fには反応しない。ヒト化抗体C9M1 sAbでも同じ結果を得た。

作成済みの昆虫発現系を用いて大量産生を可能とした組換え PCDH 1 1 Y タンパク質と

PCDH11Y に対する特異的ヒト化抗体による抗原抗体複合体はがん特異的 CTL 反応の誘導に対して当初目的としていた抗原エピトープの樹状細胞へのターゲティングと同様の効果が得られるものと予想している。研究は予定した期間内に完了していないが、これまでの成果をもとにさらに研究を進めたい。

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 1 件)

- ① Hanafusa T, Mohamed AE, Kitaoka K, Ohue Y, Nakayama E, Ono T. Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies. Cancer Letters, 査読有、301、2011、57-62

[学会発表] (計 4 件)

- ① 花房直志、新規前立腺がん抗原プロトカドヘリン 11 に対する scFv 抗体の作成、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日～5 日、名古屋
- ② 花房直志、Isolation and characterization of human lung cancer antigens by serological screening with autologous antibodies、第 69 回日本癌学会総会、2010 年 9 月 22 日～9 月 24 日、大阪
- ③ 花房直志、SEREX 法による肺腺癌抗原の同定と発現解析、第 14 回がん免疫学会総会、2010 年 7 月 22 日～7 月 23 日、熊本
- ④ 花房直志、プロトカドヘリン 11 X/Y (PCDH11X/Y) バリエーションのがん細胞における発現様式、第 68 回日本癌学会学術総会、平成 21 年 10 月 2 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花房 直志 (HANAFUSA TADASHI)
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・助教
研究者番号：00228511

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者