

機関番号：37116
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890298
 研究課題名（和文） 癌精巣抗原KK-LC-1の新規エピトープの同定と養子免疫療法への応用
 研究課題名（英文） Identification of a new epitope of Cancer/Testis antigen KK-LC-1 and develop new adoptive immunotherapy
 研究代表者
 重松 義紀 (SHIGEMATSU YOSHIKI)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10546469

研究成果の概要（和文）：KK-LC-1 のペプチドを用いた、腫瘍抗原に対する血清抗体価の検出法を ELISA 法にて構築した。また血清抗体価の高い症例にて、Reverse Immunology 法にて HLA-A2 や HLA-A24 拘束性のエピトープ同定を試みたが、CTL 誘導が出来なかった。そこで自己の症例のリンパ節リンパ球を用いて、樹状細胞にペプチドパルスする方法にて HLA-A2 拘束性の CTL を誘導することが出来、新規エピトープを同定した。

研究成果の概要（英文）：Method of antibody titer against KK-LC-1 by ELISA using peptide of KK-LC-1 is established. Two patients showed high antibody titer against KK-LC-1 antigen. In these cases, we tried to identify a new epitope in the context of HLA-A2 or HLA-A24 restriction by the Reverse Immunology method, but it was not possible. Therefore, using the lymph node lymphocytes of an autologous patient, the CTL restricted HLA-A2 could be induced by a method of a peptide pulse to dendritic cells, and the new epitope could be identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：非小細胞肺癌、癌精巣抗原、免疫療法、CTL

1. 研究開始当初の背景

近年、悪性黒色腫や固形癌において、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) や抗体を用いてさまざまな腫瘍抗原が同定され、その一部は臨床応用されその効果も報告されてきている。当科においても、悪性黒色腫から同定された癌精巣抗原である MAGE-3 ペプチドを用いた癌ワクチンを

行い有効例も経験した。しかしながら、MAGE 抗原を用いたワクチン療法も、これまでの報告においては治療効果としてはまだ充分とはいえない。効果的（強力かつ持続的）免疫反応の誘導のためには、腫瘍拒絶抗原としてより免疫原性の高いエピトープを見つけだす努力が必要である。CTL に認識される腫瘍抗原を同定する

方法としては主に2つの方法が用いられている。1) cDNA expression cloning 法: 癌細胞より cDNA library 作製、HLA class I を単離し、これらを recipient cell に transfection し、CTL clone をプローブとしてスクリーニングすることにより抗原遺伝子を単離する方法であるが、大量の CTL clone を必要とし、増殖のよい CTL でなければ腫瘍抗原の同定まで到れない。2) Reverse immunology 法: ある抗原に着目し、HLA binding prediction から、その遺伝子蛋白の中で特定の HLA に親和性のある抗原ペプチドを検索する。実際にそのペプチドを認識する CTL が存在するか、患者リンパ球よりペプチド特異的 CTL を誘導し、癌細胞に対し細胞障害活性を有していればそのペプチドが腫瘍抗原ペプチドとして推定する方法である。しかし、ペプチド特異的 CTL precursor が、もしくは腫瘍がそのペプチドを提示しない可能性など、解決すべきハードルも多い。

2. 研究の目的

当科ではこれまでに主に cDNA expression cloning 法を用いて9つの抗原遺伝子を同定した。そのうちの一つは癌精巣抗原であり、Kitakyushu Lung cancer antigen-1 (KK-LC-1) と命名した。この KK-LC-1 を認識する CTL clone は HLA-B15 拘束性であり、この T 細胞受容体 (TCR) を移入したエフェクター細胞を作製し養子免疫療法に応用しても、日本人における HLA-B15 の頻度が約 10% であることから、10% 程度の患者にしか利用できないこととなる。KK-LC-1 の HLA-A24、A2 など日本人

において頻度の高い HLA に bind するエピトープペプチドを探索することは、より多くの肺癌患者への癌免疫療法を行う際に有力となる可能性が高い。

そこで KK-LC-1 の全アミノ酸配列から、HLA-A24 および HLA-A2 に binding するモチーフを SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) や Marsh2000 (<http://www.immuneepitope.org/>) から検索し、候補ペプチドとして HLA-A24 は VYDLSRDIL、FYLLASSI の2つを HLA-A2 は KLVELEHTL、YLLASSIL、RILVNLSMV、ILNFPHSI の4種類を選択し、合成して reverse immunology 法にて目的とするペプチドを決定する。

3. 研究の方法

1) KK-LC-1 陽性の非小細胞肺癌患者における液性免疫応答の解析と血清抗体価の高い患者検索

当科ではこれまで非小細胞肺癌の230例の手術検体から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて KK-LC-1 の発現の有無を判断してきた。この KK-LC-1 発現の陽性の患者血清も凍結保存できているため、この患者血清を用いて、ELISA 法を用いて、抗体価の検出を行う。

KK-LC-1 の Overlapping peptide を作成する。20mer の overlapping peptide を10本作製し、KK-LC-1 遺伝子の ORF 部位をすべてカバーできる準備をする。作製できた Overlapping peptide を ELISA プレートに 4°C overnight でコーティングする。3回 wash し、1時間 1%BSA にてブロッキングしたのち、血清サンプルを濃度希釈をふり、プレートにいれ 4°C overnight にて peptide との抗体を反応させる。Wash 後 2次抗体を加えた後再度 wash し、発色酵素を用いて発

色させ吸光度を測定する。吸光度の高かった症例を選び、その症例から HLA-A2 や HLA-A24 陽性の症例を選定する。

2) Reverse immunology 法による CTL の誘導

HLA-A2 または HLA-A24 陽性でかつ KK-LC-1 陽性の症例の所属リンパ節リンパ球を解凍し、HLA-A24 や HLA-A2 に binding する候補ペプチドを用いてリンパ球の刺激を行い IL-2 25 単位添加メディウムで培養を行う。1 週間に 1 回のペプチド刺激を行い、3 回目からはリンパ球を PHA にて刺激して作製した CD4 リンパ球に peptide をパルスすることで CTL の誘導を試みる。細胞障害活性試験にて CTL の誘導ができており、peptide との反応の確認を行う。さらに 96 穴プレートに 100cells/well から 0.3cell/well の濃度で CTL の限外希釈を行い、さらに週 1 回の peptide 刺激を続け、CTL クローンの誘導を行う。

4. 研究成果

KK-LC-1 陽性の非小細胞肺癌患者における液性免疫応答の解析と血清抗体価の高い患者検索のために、これまで非小細胞肺癌の 230 例の手術検体から mRNA を抽出し、RT-PCR 法にて KK-LC-1 の発現の有無を判断した。KK-LC-1 発現の陽性が確認できた患者血清の凍結保存より、2003～2005 年の KK-LC-1 陽性患者血清 30 例および KK-LC-1 陰性患者血清 30 例を対象に、ELISA 法にて、KK-LC-1 に対する抗体価の検出を行い、2 例において KK-LC-1 陽性肺癌患者血清有意に高い抗体価を示した。

この 2 症例を検討したところ、2 症例とも

HLA-A2 陽性であり、さらに 1 例は HLA-A24 陽性であることがわかった。この 2 症例はそれぞれ、手術中に採取したリンパ節リンパ球が凍結保存されている (3×10^7 、 8×10^7)。現在 Reverse immunology 法による CTL の誘導の準備を開始した。2 回 MLTC を施行したが、腫瘍特性を持つ Bulk CTL の誘導は出来なかった。そこで、新たな方法として、KK-LC-1 を同定した、自己の F1121 症例の所属リンパ節リンパ球を用いて、F1121 の樹状細胞にペプチドをパルスする方式の MLTC にて、CTL の誘導を試みた。A2 拘束性の Bulk CTL の誘導が出来、新規エピトープペプチドが同定できた。

現在限界希釈法にて CTL clone の同定を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K: Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer 68:105-110. 2010 査読有
- ② 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

〔学会発表〕（計 16 件）

- ① 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 mesothelioma: Serum antibody against antigens recognized by antibodies produced from tumor infiltrating B cells. The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group Kyoto, Japan. 2010 年 8 月 31 日-9 月 3 日
- ② 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 γ δ 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熊本. 2010 年 7 月 22-23 日
- ③ 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: T細胞受容体移入 γ δ T細胞による治療効果の検討. 第31回癌免疫外科研究会 大阪. 2010 年 5 月 20-21 日
- ④ 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, 菅谷将一, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 安元公正: 局所進行期乳癌に対する術後補助療法としてのHER2 蛋白ワクチンの検討. 第31回癌免疫外科研究会 大阪. 2010 年 5 月 20-21 日
- ⑤ 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. 2010 年 5 月 13-14 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. 2010 年 5 月 13-14 日
- ⑦ 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: 癌精巢抗原KK-LC-1 を認識するT細胞受容体移入 γ δ 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. 2010 年 4 月 8-10 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: T細胞受容体移入 γ δ T細胞を用いた特異的癌免疫療法の開発. 第63回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会 北九州. 2009 年 11 月 26-27 日
- ⑨ 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・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会 北九州. 2009 年 11 月 26-27 日
- ⑩ 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・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会 北九州. 2009 年 11 月 26-27 日

⑪ 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 Medical Biotech Forum Dalian, China. 2009年8月8-10日

⑫ 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 San Francisco, USA. 2009年7月31日-8月4日

⑬ 重松義紀, 塩田広宣, 黒田耕志, 馬場哲郎, 宗哲哉, 市来嘉伸, 小野憲司, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 花桐武志, 安元公正: T細胞受容体移入 γ δ T細胞を用いた特異的癌免疫療法の開発. 第13回日本がん免疫学会総会 北九州. 2009年6月24-25日

⑭ 竹之山光広, 重松義紀, 塩田広宣, 黒田耕志, 馬場哲郎, 市来嘉伸, 花桐武志, 安元公正: 腫瘍抗原特異的T細胞受容体 (TCR) 遺伝子移入による抗腫瘍エフェクター細胞の誘導 (第2報). 第62回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部春季学術講演会 那覇. 2009年5月23日

⑮ 重松義紀, 塩田広宣, 黒田耕志, 馬場哲郎, 宗哲哉, 市来嘉伸, 安田学, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 花桐武志, 杉尾賢二, 安元公正: T細胞受容体移入 γ δ T細胞を用いた特異的癌免疫療法の開発. 第30回癌免疫外科研究会 久留米. 2009年5月21-22日

⑯ 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. 2009年4月2-4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 義紀 (SHIGEMATSU YOSHIKI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10546469