

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791515

研究課題名(和文) 遺伝子不安定性陽性膵癌のフレームシフト変異由来ペプチドに対する免疫応答

研究課題名(英文) Immune response to frameshift mutation-derived peptides in microsatellite instability positive pancreatic cancer

研究代表者

岡田 恭穂 (Okada, Takaho)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10375074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：2010年12月を起点として2013年度までの通常型膵癌で膵切除症例(100例)を抽出した。23年度は40例、24、5年度は60例の膵癌症例に対して臨床病理学的所見をデータベースを構築して解析し、MSI解析を行った。文献によると5-10%にMSI陽性膵癌が含まれるとのことであったが結果は100例ともMSS(microsatellite stable)であるとの結果であった。

本研究における解析中早期膵癌(PanIN-3：上皮内癌に相当)の症例が1例抽出されたため、免疫染色や病変のマッピングを詳細に行いClinical Cancer Research誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：We extracted 100 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma from December 2010 to 2013. A dedicated database for the clinicopathological findings was constructed. Microsatellite instability (MSI) status was analyzed in 40 cases in 2011, and in 60 cases in 2012 and 2013. It is considered MSI-positive pancreatic cancer is included in 5-10% of all pancreatic cancer in general. However, all 100 cases were diagnosed as microsatellite stable (MSS). MSI-High could not be detected at all.

In this study, we found a case of early pancreatic cancer (PanIN-3; carcinoma in situ). Detailed pathological mapping and immunostaining for the resected specimen was performed. These findings were published in the journal of Clinical Cancer Research.

研究分野：医歯薬学 外科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：マイクロサテライト不安定性 通常型膵管癌 早期膵癌

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報を正確に保持複製し、次世代に伝えるには、精度の高い対遺伝子変異防御機構が必要である。複製の異常と組換えによって発生したミスマッチ塩基対 (microsatellite instability、以下 MSI) を修復して遺伝情報を高精度に保持する機構として DNA ミスマッチ修復機構が発見された。DNA ミスマッチ修復機構に関与する遺伝子の先天性異常としては遺伝性非腺腫性大腸癌 (HNPCC: hereditary nonpolyposis colorectal cancer) が報告され大きな話題となった。また、体細胞性に MSI を伴う癌が主に胃癌・大腸癌・子宮体癌・膵癌・胆管癌において、低分化型腺癌が多い浸潤型増殖を示すことが多い syncytical growth を示す、などの現象が知られている。DNA ミスマッチ修復遺伝子の異常から TGF 受容体 2 型 (TGFBR)、Insulin-like growth factor 2 型受容体、BAX、PTEN 遺伝子などの塩基繰返し配列に欠失・挿入の異常が高頻度に生じ (遺伝子不安定性)、フレームシフト変異から遺伝子の不活性化が発生する。

近年膵癌においてもその疾患全体に含まれる MSI 陽性膵癌の存在が検討され以下の事実が判明してきている。

(1) 現在全膵癌の約 5-15% に MSI 陽性膵癌が

含まれている。これらの膵癌群は低分化型腺癌だが予後が極めて良く、K-ras、p53、SMAD4 といった膵癌関連癌・癌抑制遺伝子の変異が殆ど見られない。遺伝子不安定性出現の原因は約 40% が DNA ミスマッチ修復遺伝子 hMLH1 のプロモーター領域の hypermethylation であろうことも明らかにされた。(Yamamoto H et al. Cancer Res. 2001)。

(2) 更には MSI 陽性膵癌中に腫瘍浸潤 T リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes: TIL) の浸潤が増加していることが示された (Nakata B et al. Clin Cancer Res. 2002)。

(3) 主に大腸癌に於いてミスマッチ修復異常によるフレームシフト変異由来ペプチドが担癌患者の免疫応答を惹起し、腫瘍本体の増殖を抑制し予後を良好にしている可能性が盛んに報告されて来た (Frank MS et al. Int J Cancer. 2008, Michael L et al. J Biomed Biotech. 2010 など、図 1 も参照)。しかし、膵癌では現時点で明らかではない。

筆者らは、担癌患者血清中の癌抗原に対する IgG 抗体の反応を同定する SEREX (serological identification of tumor antigens by cDNA expression cloning) 法の手技を用いて DNA ミスマッチ修復遺伝子産物のうち hMSH2 と hPMS1 の 2 種類に対する抗体が膵癌患者血清中に増加していることをつ

きとめた。加えてそれらが非担癌患者には存在しないことを証明し膵癌を含む癌の特異的抗原になる可能性について論じた(Okada T et al. Int J Cancer. 2005)。

MSI 膵癌を抽出してその特徴的臨床病態データを詳細に集積し、特に未だ十分明らかになっていない化学療法・放射線療法・免疫療法において治療効果との相関を検討することは、治療が極めて困難な膵管癌の治療においては病態解明全体に大きく寄与するものと思われる。更にフレームシフト変異によって発生した異常ペプチドが大腸癌と同様に細胞障害性Tリンパ球を主とする腫瘍免疫を惹起する抗原となり得ることを証明すれば、根拠に基づいた膵癌ペプチドワクチン療法の一翼を担えると考え、本研究を企画立案することとなった。

2 . 研究の目的

膵癌患者全体から遺伝子不安定性(microsatellite instability: MSI)陽性膵癌を抽出分類し、筆者が行ってきたミスマッチ修復遺伝子産物の免疫学的研究を踏まえ、MSI という観点で本当」に実臨床に展開可能な膵癌個別化医療のための基礎データを構築することを目的とする。

(1)臨床病態、未解明の手術・化学療法において治療効果との相関を検討する

(2)免疫応答が強い MSI 陽性癌の特性から、フレームシフト変異由来ペプチドの抗原性を追求し免疫療法への基盤を確立する。

(3)(1)・(2)を統合し MSI 膵癌個別化医療・ペプチドワクチン治療を提案する。

(4)解析中、特殊な膵癌症例が抽出されれば、個々のレベルで詳細な臨床病理学的検討対象とする。

3 . 研究の方法

以下は研究当初の予定も含む。

(1)膵癌切除症例の臨床・病理学的データの集積と MSI 解析

集積目標数は3年間で100例とする。

膵癌患者組織検体の集積

当科で切除手術を受けた膵癌患者より同意を得た上で、microsatellite 解析に必要なと思われる癌部分・健常(膵)組織部分、血液を採取し、検体は凍結・パラフィン切片として保存する。

DNA 抽出と microsatellite 解析

パラフィン切片を薄切し膵癌細胞領域を他の正常組織細胞と分離し切り出す。分離した癌細胞及び正常細胞は市販の DNA 抽出キットを使用して DNA を抽出し精製する。

microsatellite 領域 MSI マーカー:BAT25, BAT26, D17S250, D2S123, D5S346, TGFBR , D18S58, MSH3, MSH6) のプライマーを作成し

上記で得られた DNA を鋳型として PCR 法で増幅する。それらをオートシーケンサーで解析し MSI の陽陰性を判定する。MSI の陽性・陰性の判断は、正常に比して癌部分における異常ピークの発現にて陽性と判断する。

hMLH1 のプロモーター領域の hypermethylation の解析と治療効果の比較解析

MSI 陽性膵癌患者に多いとされているミスマッチ修復遺伝子のうち hMLH1 のプロモーター領域の hypermethylation を測定し MSI 陽性膵癌群の中における hMLH1 のメチル化の有無と各治療効果の差を検討する。

全症例の臨床病理学的データの集積
膵癌根治切除全症例は臨床検査・画像所見・病理所見・病期臨床病期ごと、及び病理学的所見ごとに分類する。

(2)腫瘍免疫学的応答解析

MSI 陽性膵癌組織での免疫担当細胞の反応性、及びフレームシフト変異由来ペプチドに対する細胞障害性 T 細胞の誘導を試みる。

膵癌組織に対する TIL の評価
パラフィン切片のスライス及び加熱法による antigen retrieval を施行する。プレパラートを抗 CD3 マウスモノクローナル抗体で染色し T 細胞の計測、MSI 陽性膵癌群と同陰性膵癌群の両者で比較

し腫瘍組織における T 細胞浸潤レベルの差異を検証する。

MSI 陽性・陰性膵癌患者からの血清と末梢血単核球(PBMC)の採取
膵癌患者より採取した末梢血を Ficoll 比重勾配分離法にて PBMC 分離し、数の算出、及び血清量測定をして患者樹状細胞の FACS 解析による表面抗原の同定を行う。

コンピュータソフトによるフレームシフト変異由来エピトープペプチドの予測と合成

TGF 受容体 2 型、IGF 受容体、BAX、PTEN 遺伝子など、MSI 陽性癌で多いとされるの塩基繰り返し配列 (Microsatellite 領域) にて人為的に 1 塩基あるいは 2 塩基フレームシフト変異 (挿入・欠失の両方) させた HLA-A2, A24 に特異的なコンセンサス配列をコンピュータにて予測する。

細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T lymphocytes: CTL) の誘導

分離 PBMC を上記合成フレームシフト変異由来合成ペプチドで刺激後、IL-7 存在下で培養し responder 細胞とする。同様にペプチド刺激した自己 PBMC に放射線照射を行いこれを stimulator 細胞として IL-7 及び IL-2 存在下に responder 細胞と共培養する。その後、stimulator 細胞で刺激を繰り返し IL-2 存在

下に培養し CTL を誘導する。

4. 研究成果

(1) 膵癌手術検体の集積

2010年12月以降の膵切除症例を起点に通常型膵癌症例を抽出した。検体は全て匿名化され識別番号が割り振られた。平成23年度は40例のMSI解析を行った。平成24,25年度は引き続き研究母集団を拡大、更に60例の解析を進めた。合計で100例となり当初の目標数は達成された。これら当科で切除された通常型膵癌患者検体は、マイクロサテライト解析に必要と思われる癌部分・正常(膵)組織部分について病理診断に使用した以外のパラフィン包埋組織を入手して薄切切片を作成した。癌細胞及び正常細胞それぞれの切片からDNA抽出キットを使用してDNAを抽出し精製した。過去の文献から推奨される解析のための5種類のマイクロサテライト領域(MSIマーカー: BAT25, BAT26, D17S250, D2S123, D5S346)プライマーを作成し上記で得られたDNAを胃型としてPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法で増幅した。それらをオートシーケンサーで解析して遺伝子配列の同定と、ピークパターンを比較してマイクロサテライト不安定性の陽陰性を判定した(例: 図1)。判定基準は陽性マーカー数によって区分し、MSS(MS stable)が0、MSI-L(MSI-Low)

が1、MSI-H(MSI-High)が2以上と定義した。結果は合計100例の解析で全ての膵癌検体が安定(MSS)であり、マイクロサテライト不安定性を示す例はこの中には存在しなかった(表1)。MSI陽性膵癌は全体の5-10%存在するとされるが、終了時点まででMSI陽性膵癌は検出されていない。

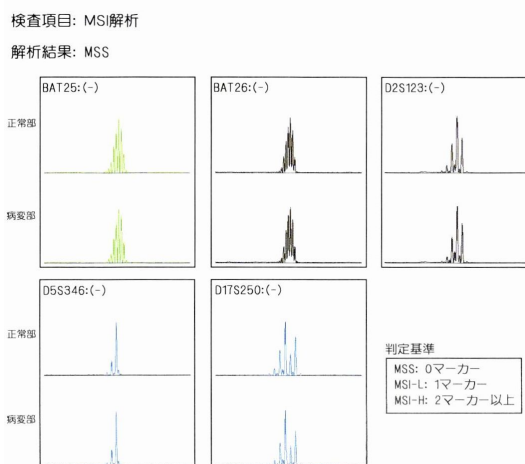


図1. MSI解析の結果の1例(本例はMSSと診断された検体 識別番号P63)

| MSI Status | MSS | MSI-L | MSI-H | 合計 |
|------------|-----|-------|-------|-----|
| 判定検体数 | 100 | 0 | 0 | 100 |

表1. MSI解析の結果

(2) 研究対象症例のデータベース

本研究に於いては、解析に使用した症例の病歴、検査所見、画像所見、病理所見などを汎用データベース化する作業も進めた。現在同時進行している腹水洗浄細胞診陽性症例の検討など、関連した研究にも応用していく予定である。

(3) 早期膵癌症例の解析

平成24年度から25年度にかけて、本研究における症例、標本解析中に早期膵癌

(PanIN-3：上皮内癌に相当)の症例が抽出された。早期膵癌の症例については、データベースに基づいて画像所見・臨床所見を詳細に検討し直し、主膵管の狭窄病変と尾側膵炎の原因がPanIN-3によるものであることを解明した。切除標本における詳細なマッピングと各種免疫染色・病理組織学的検討を施行した。結果は症例報告の形でClinical journal of gastroenterology 誌に発表した(CJG 2013, Vol16, 164-168)。

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)Okada T, Motoi F, Kanno A, Masamune A, Ishida K, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia-3 with localized acute pancreatitis in the main pancreatic duct. Clinical Journal of Gastroenterology. 2013. 6(2): 164-168. 査読有.
DOI 10.1007/s12328-013-0368-z

(2)Shima K, Mizuma M, Hayashi H, Nakagawa K, Okada T, et al. Potential Utility of NOG Mice with Ubiquitous eGFP Expression (NOG-EGFP) as a High Quality Cancer Sampling System. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2012. 6(31):55-63. 査読有.
doi:10.1186/1756-9966-31-55
<http://www.jeccr.com/content/31/1/55>

(3)岡田恭穂, 江川新一, 元井冬彦, 乙供 茂, 坂田直昭, 林 洋毅, 吉田 寛, 力山敏樹, 片寄 友, 海野倫明 膵癌における外科手術-適応・術式の動向-. 胆と膵; 22 (4) : 301 - 307 . 2011年 査読無

【学会発表】(計 2件)

(1)岡田恭穂, 元井冬彦, 乙供 茂, 水間正

道ほか. 膵癌根治手術術前検査としてのFDG-PET検査の重要性 第43回日本膵臓学会大会 2012年6月28日(山形)

(2)岡田恭穂, 元井冬彦, 乙供 茂, 坂田直昭ほか. 膵癌術前(進行度)診断ツールとしてのFDG-PET検査の有用性 第111回日本外科学会定期学術集会 2011年5月26日(東京予定 紙上開催)

【その他】

ホームページ等：なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 恭穂 (Okada Takaho)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：10375074