

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501334

研究課題名(和文) 腫瘍組織標本からの腫瘍抗原ペプチドの定量解析とがん免疫療法バイオマーカーへの応用

研究課題名(英文) Quantitative analysis on antigenic peptides from the tumor antigen and its application to a biomarker for cancer immunotherapy

研究代表者

本間 定 (HOMMA, SADAMU)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50192323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がんワクチン療法においては、がん細胞における腫瘍抗原ペプチドのHLA class I分子上の発現が必須の要素となる。そこで、質量解析技術を用いて腫瘍組織から腫瘍抗原Wilms' Tumor-1 (WT1)の抗原性ペプチドの検出と定量を試みた。

WT1とHLA-A24を発現するヒト膵癌細胞株のxenograft腫瘍組織を作成した。腫瘍組織からHLA class I分子に結合した抗原性ペプチドを分離しLC/MS/MSで解析したところ、WT1の抗原性ペプチドのイオンピークが検出され定量も可能であった。また、Mass Imaging法によりWT1抗原性ペプチドの存在を示すスポットが検出された。

研究成果の概要(英文)：Presentation of antigenic peptide of the tumor antigen on the HLA class I molecule is an essential factor for effective antigen-specific cancer vaccine. Using mass spectrometric analyses, identification and quantification of the HLA-A24 restricted antigenic peptide of Wilms' Tumor-1 (WT1) were tried in human pancreatic cancer xenograft tissue. Antigenic peptides binding to HLA class I molecules were obtained from the tumor cells by acid-elution method and analyzed for detection of WT1 antigenic peptide using LC/MS/MS. WT1 antigenic peptide (CMTWNQMNL) was identified as a single ion peak and a standard curve for quantification could be generated. Furthermore, spots of WT1 antigenic peptide were observed in the tumor tissue by mass imaging analysis. Presentation of antigenic peptide of the tumor antigen on MHC class I molecules in tumor tissue could be defined by mass spectrometric examination.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がんワクチン WT1 質量解析 膵癌 LC/MS/MS Mass imaging 抗原性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞が介在したがんワクチン療法においては、がん細胞における腫瘍抗原ペプチドの HLA class I 分子上の発現が必須の要素となる。しかし、がん細胞における抗原プロセッシング機能の低下が報告されており、がん細胞が腫瘍抗原を蛋白として発現していても T 細胞受容体に認識される HLA class I 結合性ペプチドとしての発現量が十分であるかは不明である。従来までの腫瘍抗原発現の確認は主に免疫組織化学的手法や RT-PCR により行われてきたが、これらの方法では HLA class I 分子上の腫瘍抗原ペプチドの提示レベルは明らかではなく、仮に腫瘍抗原蛋白が高発現していても抗原ペプチドへの processing が不良であれば、その抗原を標的としたがんワクチン療法の効果は期待し難い。さらに、従来法では使用する抗体、primer などにより腫瘍抗原発現の結果が左右される危惧があった。

(2) がんワクチン療法を中心としたがん免疫療法においては治療効果を予見する治療バイオマーカーの確立が急務である。これまでがんワクチン療法の効果予見バイオマーカーは担がん生体の各種検査値や免疫活性などを中心に検討されてきたが、確実な新規バイオマーカーの確立には至っていない。がんワクチンの効果が不十分である理由の説明として、上記(1)の要素が関与するとすれば、がんワクチン治療を予定する患者の腫瘍組織の HLA class I 上に腫瘍抗原の抗原性ペプチドが提示されているか否かは、奏功バイオマーカーとしての意義を有する可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的はがんワクチン療法対象症例の腫瘍組織の HLA class I 上に提示された腫瘍抗原ペプチド発現量を決定し、その発現量が同療法の治療効果を予見する奏効バイオマーカーとなりうるかを検証することであ

る。その技術を確立するために、Zenograft 系ヒト膀胱癌組織から HLA class I に結合した抗原性ペプチドを抽出し、その中からわれわれが進行膀胱癌に対して行っている Wilms' Tumor-1 (WT1) ワクチン療法の標的抗原である WT1 の抗原性ペプチドを検出し定量する方法の確立を試みる。

3. 研究の方法

HLA-A*2402 と WT1 を発現するヒト膀胱癌培養細胞株 MIAPaCa2 を NOD/SCID マウスの背部皮下に移植し、膀胱癌の zenograft 系腫瘍を作成する。この腫瘍組織を用いて下記の検討を行う。

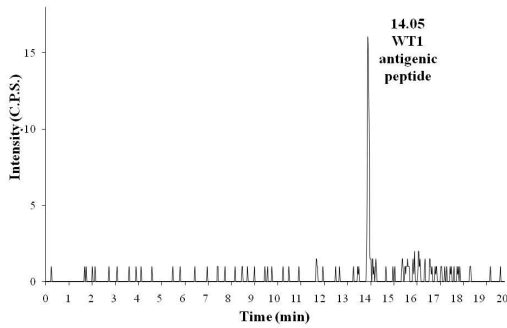
(1) 腫瘍組織を collagenase, dispase 処理して細胞を分散させ citrate-phosphate buffer (pH 3.3) 処理により HLA class I に結合した抗原性ペプチドを抽出し、LC/MS/MS を用いて WT1 抗原性ペプチドを検出、定量を試みた。

(2) 腫瘍のホルマリン固定腫瘍組織を HE 染色し、レーザーマイクロダイセクションにより間質を除いた腫瘍部分を採取して可溶化し、ハイブリッド型質量解析装置を用いた解析により HLA-A24 結合性 WT1 抗原ペプチドを検出し定量を試みた。

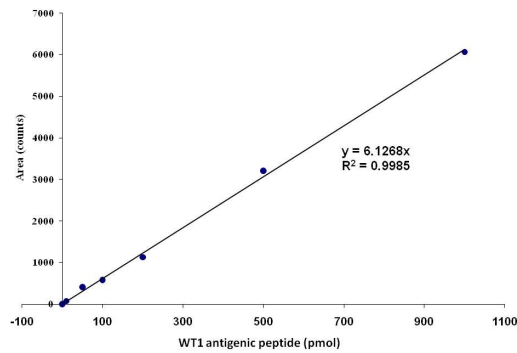
(3) 新鮮凍結腫瘍組織の切片を作成し、ImagePrep を使用してマトリックス噴霧を行った。Massimaging (MSI) 法は 10 μ m の空間解析能で Autoflex speed (BRUKER) を使用して FlexImaging を用いた自動測定によりデータを取得した。

4. 研究成果

(1) HLA class I 結合性ペプチドからの WT1 抗原性ペプチドの検出とその定量。MIAPaCa2 細胞から酸処理により分離した MHC class I 結合性ペプチドを LC/MS/MS により解析し、WT1 の HLA-A24 結合性 9 mer ペプチド CMTWNQMNL に相当する m/z を示すイオンピークを検出した (図 1)。



同ペプチドを人工合成し希釈系列で LC/MS で検出すると、定量可能な検量線の作成が可能であった (図 2)。



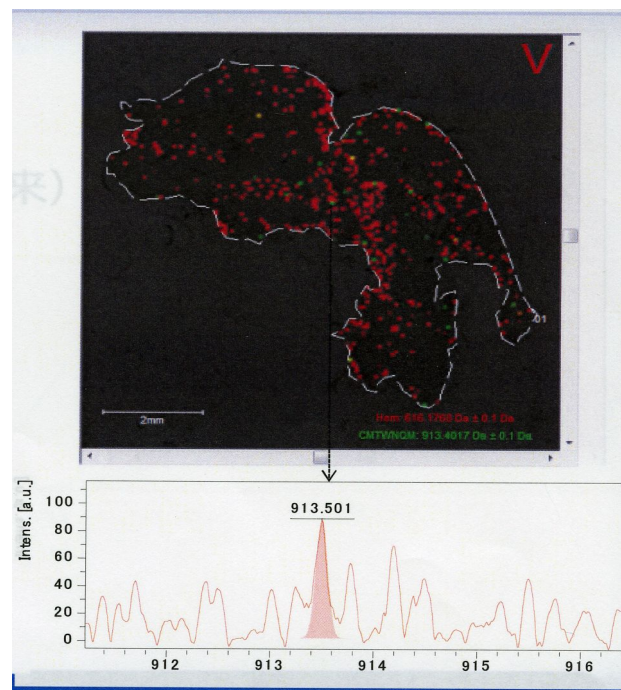
われわれは抗癌剤であるゲムシタピン (GEM) の治療により膀胱癌細胞の WT1 の発現量が増加し、WT1 ペプチドワクチンにより誘導・活性化された WT1 特異的細胞傷害性 T 細胞がより効率的に膀胱癌細胞を攻撃する可能性を示した。この現象の検証のために MIA PaCa2 移植マウスを GEM 処理し、そのマウスから採取した MIA PaCa2 細胞から WT1 抗原性ペプチドを定量解析すると、GEM 処理腫瘍細胞では無処置腫瘍細胞に比較してより多くの WT1 抗原性ペプチドが提示されていることが示された (表 1)。

Antigenic peptide of WT1 on MHC class I molecules of MIA PaCa2 cells	
PBS-treated MIA PaCa2 cells	GEM-treated MIA PaCa2 cells
6.49 pmol	8.78 pmol
細胞 10 ⁶ から検出された WT1 抗原性ペプチド量	

(2) レーザーマイクロダイセクションにより採取した腫瘍部分の HLA-A24 結合性 WT1 抗原ペプチドの定量。ホルマリン固定 zenograft 腫瘍組織をレーザーマイクロダイセクション法により腫瘍部分と間質部分を採取し、それぞれを可溶化して WT1 抗原性ペプチドの検出を試みた。しかし、ホルマリン固定標本からは WT1 抗原性ペプチドと思われるイオンピークを検出することは不可能であった。

(3) MSI 法による WT1 抗原性ペプチドの検出。新鮮 zenograft 腫瘍組織の凍結切片を作成し、MSI により WT1 抗原性ペプチドの発現を解析した。その結果、m/z 913.4 の WT1 抗原性ペプチド NH₂-CMTWVQMN-COOH の存在を示す緑色のスポットが、強く検出されていないものの、いくつかのピクセルで検出された (図 3)。赤いスポットは m/z 616.2 の Heme を示す。この方法により、これまで免疫染色や遺伝子解析に頼っていた腫瘍組織の腫瘍抗原の発現の解析を質量解析的手法により行う道筋がたてられた。今後、同手法を用いた各種腫瘍組織の解析により、抗原ペプチドレベルでの腫瘍抗原の発現の有無の解析が進むことが期待される。

(図 3)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Koido S, Homma S, Okamoto M, Takakura K, Mori M, Yoshizaki S, et al. (他 23 名) Treatment with chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor 1 (WT1)-specific MHC class I/II-restricted epitopes for pancreatic cancer. Clin Cancer Res. 2014;20(16):4228-39. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0314. (査読あり)
2. Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, Komita H, Takahara A, et al. (他 26 名) Wilms tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. J Immunother. 2014 ;37(2):105-14. doi: 10.1097/CJI.000000000000020. (査読あり)
3. Koido S, Ito M, Sagawa Y, Okamoto M, Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Komita H, Kamata Y, Homma S. Vaccination with vascular progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells elicits antitumor immunity targeting vascular and tumor cells. Cancer Immunol Immunother. 2014 ;63(5):459-68. doi: 10.1007/s00262-014-1531-1. (査読あり)
4. Takakura K, Koido S, Kan S, Yoshida K, Mori M, Hirano Y, Ito Z, Kobayashi H, Takami S, Matsumoto Y, Kajihara M, Misawa T, Okamoto M, Sugiyama H, Homma S, Ohkusa T, Tajiri H. Prognostic Markers for Patient Outcome Following Vaccination with Multiple MHC Class I/II-restricted WT1 Peptide-pulsed Dendritic Cells Plus Chemotherapy for Pancreatic Cancer. Anticancer Res. 2015;35(1):555-62. (査読あり)
5. Ito M, Hayashi K, Adachi E, Minamisawa T, Homma S, Koido S, Shiba K. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity. PLoS One. 2014;9(10):e110425. doi: 10.1371/journal.pone.0110425. eCollection 2014. (査読あり)
6. Komoike N, Kato T, Saijo H, Arihiro S, Hashimoto H, Okabe M, Ito M, Koido S, Homma S, Tajiri H. Photodynamic diagnosis of colitis-associated dysplasia in a mouse model after oral administration of 5-aminolevulinic acid. In Vivo. 2013;27(6):747-53(査読あり)..
7. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Takahara A, Odahara S, Tsukinaga S, et al. (他 18 名) Augmentation of antitumor immunity by fusions of ethanol-treated tumor cells and dendritic cells stimulated via dual TLRs through TGF- β 1 blockade and IL-12p70 production. PLoS One. 2013 May 24;8(5):e63498. doi: 10.1371/journal.pone.0063498. Print 2013. (査読あり)
8. Kamata Y, Kuhara A, Iwamoto T, Hayashi K, Koido S, Kimura T, Egawa S, Homma S. Anticancer Res. 2013 May;33(5):1853-9. Identification of HLA class I-binding peptides derived from unique cancer-associated proteins by mass spectrometric analysis. Anticancer Res. 2013; 33(5): 1855-9. (査読あり)
9. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Takahara A, et al. (他 17 名) Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. PLoS One. 2013;8(3):e59280. doi: 10.1371/journal.pone.0059280. Epub 2013 Mar 15. (査読あり)
10. Nakano M, Saeki C, Takahashi H, Homma S, Tajiri H, Zeniya M. Activated natural killer T cells producing interferon-gamma elicit promoting activity to murine dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. Clin Exp Immunol. 2012;170(3):274-82. (査読あり)
11. Kan S, Hazama S, Maeda K, Inoue Y, Homma S, Koido S, Okamoto M, Oka M. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. Anticancer Res. 2012;32(12):5363-9. (査読あり)
12. Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Kawakami Y, Hamakawa H. Prognostic impact of expression of bcl-2 and bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma. Neoplasia. 2013;15(3):305-14. (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. カン シン、小井戸薫雄、岡本正人、林 和美、伊藤正紀、鎌田裕子、込田英夫、永崎栄次郎、本間 定. ゲムシタピンの HER2 発現誘導効果を利用した HER2 低発現乳癌細胞に対するトラスツズマブエムタンシンの抗腫瘍効果増強作用. 第 27 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、平成 26 年 12 月 4 日、大阪
2. 込田英夫、小井戸薫雄、カン シン、林 和美、佐川由紀子、鎌田裕子、伊藤正紀、鈴木正章、田尻久雄、本間 定. 難治性消化管間葉系腫瘍 (GIST) に対する癌免疫療法の検討. 第 27 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、平成 26 年 12 月 4 日、大阪
3. 小井戸薫雄、本間定、田尻久雄. ウイルムス腫瘍遺伝子産物 (WT1) 由来のヘルパーとキラーペプチドをマルチプル・パルスした樹状細胞ワクチンと化学療法を併用した新規免疫化

- 学療法. JDDW 2014, 平成 26 年 10 月 23 日、神戸
4. カン シン、小井戸 薫雄、岡本 正人、林 和美、伊藤 正紀、鎌田 裕子、込田 英夫、永崎 栄次郎、本間 定. ゲムシタピンによる HER2 発現増強効果を利用した膵癌に対する新たな分子標的療法. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 平成 26 年 8 月 28 日、横浜
 5. Shigeo Koido, Sadamu Homma, Masato Okamoto, Shigetaka Shimodaira Haruo Sugiyama, Toshifumi Ohkusa, Hisao Tajiri. Combination treatment by chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor gene 1 (WT1)-specific MHC class I/II-restricted epitopes for pancreatic cancer. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 平成 26 年 8 月 28 日、横浜
 6. 伊藤正紀、林 和美、本間 定、小井戸薫雄、芝 清隆. Optimization of mpecular context of antigenic peptides in artificial protein for enhanced cellular immunogenicity. 第 17 回日本がん免疫学会学術総会、平成 26 年 7 月 4 日、宇部
 7. 小井戸 薫雄、西田 純幸、本間 定、ほか(他 8 名). 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンとゲムシタピンによる集学的治療法の選択基準. 第 55 回日本消化器病学会大会、平成 25 年 10 月 9 日、東京
 8. 鎌田 裕子、久原 映子、岩本 武雄、木村 高弘、林 和美、小井戸 薫雄、頼川 晋、本間 定. 前立腺癌細胞における HLA クラス II 分子結合ペプチドの探索. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 5 日、横浜、
 9. 伊藤正紀、林 和美、本間 定、小井戸薫雄、芝 清隆. 外来抗原エピトープの分子コンテキストを最適化した人工タンパク質は細胞性免疫を誘導する. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日、横浜、
 10. カン シン、小井戸薫雄、岡本正人、林 和美、伊藤正紀、鎌田裕子、込田英夫、永崎栄次郎、本間 定. 新規分子標的治療薬 Trastuzumab-Emtansine のヒト膵がん細胞に対する抗腫瘍効果. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日、横浜
 11. Yuko Kamata, Akiko Kuhara, Takeo Iwamoto, Takahiro Kimura, Kazumi Hayashi, Shigeo Koido, Shin Egawa, Sadamu Homma. Proteomic analysis of HLA Class I binding peptides from prostate cancer cell lines to seek for novel cancer vaccine and cancer biomarker. The 12th Human Proteome Organization World Congress (HUPO 2013), Sep 16 2013, Yokohama, Japan,
 12. 本間 定、佐川由紀子、伊藤正紀、永崎栄次郎、高原映崇、込田英夫、小井戸薫雄. iPS 細胞から腫瘍血管を標的としたがんワクチンの作製. 第 23 回日本樹状細胞研究会、平成 25 年 5 月 17 日、京都

〔その他〕
ホームページ
<http://www.jikei.ac.jp/academic/center.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 定 (HOMMA Sadamu)
東京慈恵会医科大学・悪性腫瘍治療研究部・教授
研究者番号：50192323

(2) 研究分担者

岩本武夫 (IWAMOTO Takeo)
東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・准教授
研究者番号：90568891

小井戸薫雄 (KOIDO Shigeo)
東京慈恵会医科大学・消化器・肝臓内科・准教授
研究者番号：70266617