

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790827

研究課題名(和文) 非小細胞肺癌における c - M E T を標的とした新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Identification of Met-derived peptides recognized by CTLs in HLA-A2+ non-small cell lung cancer patients

研究代表者

東 公一 (Azuma, Koichi)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：00368896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：METは非小細胞肺癌で過剰発現しており、この遺伝子の過剰発現が予後不良因子と報告されている。この遺伝子を標的とすることは進行非小細胞肺癌の予後を改善するのに有益と考えられる。本研究では、肺癌患者組織及び肺癌細胞株におけるMetの発現を検討し肺癌における重要性を確認した。さらに、HLA-A2と親和性のあるMet由来のペプチドを合成して、健常人及び肺癌患者末梢リンパ球よりHLA-A2拘束性Met由来の細胞障害性Tリンパ球(CTL)を誘導できる抗原ペプチドの同定を行った。今回の研究で非小細胞肺癌患者に対するMetを標的とした癌ペプチドワクチン療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Despite these advances, however, the prognosis of individuals with non-small cell lung cancer (NSCLC) who do not harbor an identifiable driver oncogene remains poor. The overexpression of Met is associated with poor prognosis in NSCLC. Therefore, targeting the Met protein is attractive treatment in NSCLC. This study aimed to identify immunogenic Met-derived peptides in HLA-A2 (+) NSCLC patients. In this study, we found that two Met-derived peptides could induce CD8+ peptide-specific CTLs reactive to tumor cells from HLA-A2 (+) NSCLC patients in a HLA class I-restricted manner. These results may provide a scientific basis for the development of Met-based immunotherapy in HLA-A2 (+) NSCLC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 呼吸器内科学

キーワード：Met 非小細胞肺癌 ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

最近の分子生物学の進歩により腫瘍発生の原因となる遺伝子変化も各個人のレベルで比較的容易に解析することが可能となり、癌遺伝子の機能を制御する分子標的治療薬を用いた個別化治療が一般化されつつある。進行非小細胞肺癌(NSCLC)における上皮成長因子(EGFR)遺伝子変異や EML4-ALK の発見は肺癌患者の予後を改善し分子標的治療薬の発展に大きく寄与している。c-MET は細胞分散因子ともよばれ肝細胞増殖因子(HGF)に高い親和性を示す受容体であり、リガンドである HGF が結合することにより、ダイマーを形成し複数のチロシン残基がリン酸化される。これにより様々な成長因子が活性化される。c-MET は非小細胞肺癌で過剰発現しており、この遺伝子の過剰発現が予後不良因子と報告されている(Qiao H, et al, J Cell Biochem 2002)。癌免疫療法は外科療法、化学療法、放射線療法に次ぐ、新世代癌治療法として注目を浴びてきた。現在まで国内外の多くの研究グループにより、癌抗原に対する特異的免疫の誘導を目指す癌ワクチンの臨床試験が試みられてきたが、その治療効果は癌種や患者によって限定的で、治療抵抗性獲得の問題もあり、残念ながら第4の癌治療法として公認されるには至っていない。我々は、今までに様々な癌腫から癌抗原ペプチドを同定し、それらのペプチドを用いて非小細胞肺癌をはじめとして、胃癌、前立腺癌、脳腫瘍、婦人科癌を対象として臨床試験をおこなってきた。現在も非小細胞肺癌を対象とした臨床試験がおこなわれているが満足のものではない。

## 2. 研究の目的

本研究は c-MET を標的とした癌抗原ペプチドの同定を行い(HLA-A2 拘束性 c-Met 由来の細胞障害性 T リンパ球(CTL)を誘導できる抗原ペプチド) c-MET 遺伝子の発現が認められる非小細胞肺癌患者の治療成績の改善を目標

とする。

## 3. 研究の方法

### 1: 非小細胞肺癌患者と肺癌細胞株における c-Met の発現の解析

当院にて手術を行った肺癌患者組織に対して免疫組織化学染色法を用いて Met の発現を検討し、さらに Kaplan-Meier 法を用いて生存期間との関係を解析する。なお、癌患者の組織検体および末梢血は、当科の協力により、倫理委員会の承認のもとで入手する。また、肺癌細胞株における Met の発現を免疫組織化学染色法、ウェスタンブロッティング法により蛋白発現を検討した。

### 2: c-MET の配列を含み、各 HLA 分子への結合が予測されるペプチドの選択と合成

c-Met 遺伝子モチーフ検索プログラムを用いて、白人に多く、日本人の 20%に発現している HLA-A2 に結合すると予測されるペプチド(9mer, 10mer)を選択する。なお、結合予測の精度を高めるために複数のモチーフ検索プログラム(IEDB ANN, NetMHC ANN, MHC-I (Multiple Matrix))を使用する。HLA-A24 への結合予測の不正確さも考慮し、各 HLA 型について 11 種のペプチドを選択、合成する。

### 3: HLA-A2 陽性の健常者の血液を用いて、各 HLA 分子への結合が確認された合成ペプチドの CTL 誘導能を検討

HLA-A2 陽性の健常者由来の末梢血 T 細胞を合成ペプチドで刺激を行い、各ペプチドに特異的な CTL 株が誘導できるか ELISA 法で IFN-g を測定して検討する。標的の細胞としては、合成ペプチドをパルスした HLA-A2 を発現した T2 細胞、c-MET を有する各種癌細胞株(HLA-A2 陽性および陰性癌細胞株)を用いる。なお、上記の検討には HLA-A2 陽性の健常者 3 名から提供された末梢血を利用する。

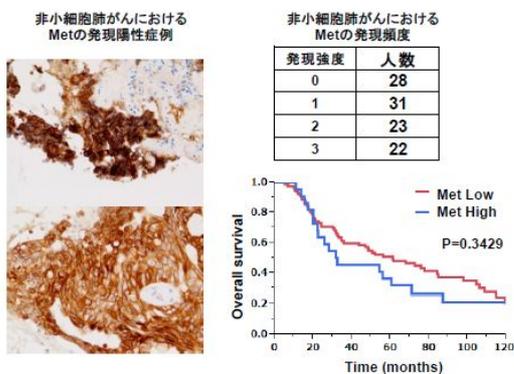
### 4: HLA-A2 陽性肺癌患者の血液を用いて、各 HLA 分子への結合が確認された合成ペプチ

## ドの CTL 誘導能を検討

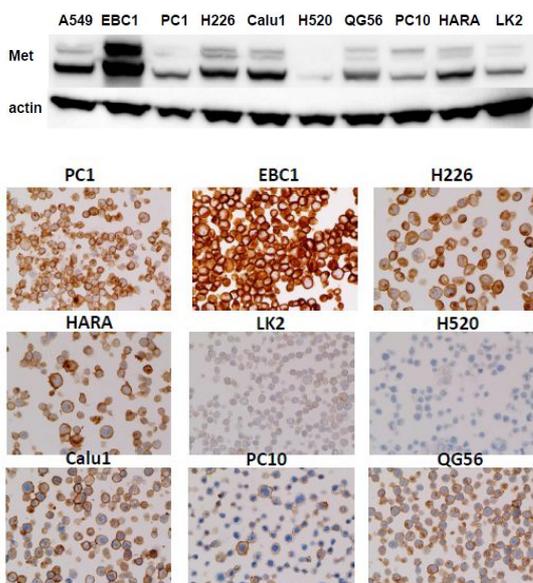
当科にて外来及び入院にて加療をおこなっている非小細胞肺癌患者の腫瘍組織における c-MET の発現を免疫染色にて検討する。Met 陽性 HLA-A2 陽性肺癌患者由来の末梢血 T 細胞を刺激する事なく直接に、あるいは、in vitro で短期間刺激をした後に、各種癌細胞株を標的とした機能解析 (cytokine 産生、<sup>51</sup>Cr 遊離試験) を行い、HLA-A2 拘束性 c-Met 由来の細胞障害性 T リンパ球 (CTL) を誘導できる抗原ペプチドを同定する。なお、癌患者の組織検体および末梢血は、当科の協力により、倫理委員会の承認のもとで入手する。

## 4. 研究成果

1: 非小細胞肺癌患者において Met 発現はみられ、陽性例は予後不良な傾向がみられる



肺癌細胞株における Met の発現の検討



以上より非小細胞肺癌患者において Met は発現しており、有意差はなかったが、Met 高発現群は予後が不良である傾向が見られた。肺癌細胞株におけるウェスタンブロッティングと免疫染色の結果から Met の発現も確認できた。これらの細胞のうち、HLA-A2 と Met の発現を確認できた、HARA と共に陰性の Calu1, PC10 を陰性コントロールとした。HLA の発現はフローサイトメトリーで検討を行った。

2: HLA-A2 と結合されると予想されるペプチドと陰性コントロール

1	LLLGFLLWL	MET
2	CMLDEKFTV	MET
3	LLLLLGFFL	MET
4	ILHEHHIFL	MET
5	RGEHYVHV	MET
6	TQYSTFSYV	MET
7	ILVLLFTLV	MET
8	SLIVHFNEV	MET
9	LLTSISTFI	MET
10	FMGQFSEVL	MET
11	YVDPVITSI	MET
12	SLYNTYATL	HIV

遺伝子モチーフ検索プログラムを用いて HLA-A2 と結合する可能性のあるペプチドを親和性の高い順番で合成を行った。

3: ペプチドによる健常人および肺癌患者末梢リンパ球の刺激

		健常人
1	LLLGFLLWL	○
2	CMLDEKFTV	X
3	LLLLLGFFL	X
4	ILHEHHIFL	X
5	RGEHYVHV	○
6	TQYSTFSYV	X
7	ILVLLFTLV	○
8	SLIVHFNEV	X
9	LLTSISTFI	○
10	FMGQFSEVL	X
11	YVDPVITSI	X

健常人 3 名で検討を行った結果、4 つのペプチドから CTL が誘導できることが確認できた。さらに、肺癌患者 3 名から 2 種類のペプチ

ドから CTL が誘導できることを確認した。Met が陰性の患者からも誘導されており、さらなる症例集積が必要と考えられる。

#### 5. 主な表論文等

(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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

東 公一 (Koichi Azuma)

久留米大・医学部・講師

研究者番号: 368896

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: