

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790136
 研究課題名（和文）新規癌抗 OFA-iLRP を標的とした肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の検討
 研究課題名（英文）Investigation of OFA-iLRP targeted cancer immunotherapy against lung cancer

研究代表者

阿部 真治 (ABE SHINJI)
 徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：00403717

研究成果の概要（和文）：新規癌抗原である OFA-iLRP は腫瘍特異的免疫療法の有望な標的であると考えられている。本研究では OFA-iLRP を標的とした肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の臨床応用の可能性について検討を行った。その結果、OFA-iLRP がヒト肺癌組織において発現すること、OFA-iLRP 由来ペプチドで刺激した樹状細胞により細胞障害性 T リンパ球が誘導されることを明らかにした。以上の結果は進行性肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の確立につながる有益な結果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I have investigated whether OFA-iLRP is expressed on human lung cancer tissues and whether OFA-iLRP peptides treated dendritic cells induce OFA-iLRP specific CTLs. Our results show that most human lung cancer tissues express OFA-iLRP and dendritic cells treated by OFA-iLRP peptides induce CTLs. Considering these results, OFA-iLRP may represent a suitable target against advanced lung cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	99,000	4,290,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ、癌、免疫療法、癌抗原

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国における最も多い死因は悪性腫瘍であり、その中でも肺癌は罹患率、死亡率ともに一位である。肺癌の治療法としては、一般的に外科的切除、化学療法、放射線療法などが行われているが、既存の治療法で十分な臨床効果をあげる事は非常に困難である。

そのため、臨床現場では新規機序の治療法開発が切望されている。

1991年、Boonらは細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が認識する腫瘍抗原を同定し、癌に対する特異的免疫応答の存在を証明した (Science 254:1643, 1991)。また、高い抗原提示能を持つ樹状細胞の培養方法が確立さ

れ、癌抗原提示樹状細胞を用いて抗腫瘍効果を誘導する腫瘍特異的免疫療法の検討が始まった。現在では、末梢血単球から誘導した樹状細胞に癌抗原ペプチドをパルスし、癌患者に免役する手法を用いた癌免疫療法が欧米を中心として試みられている。申請者が所属する徳島大学病院においてもトランスレーショナルリサーチとして「肺癌に対する癌抗原ペプチドパルス樹状細胞を用いた腫瘍特異的ワクチン療法」の医師主導第1相臨床試験が実施されていた。

腫瘍特異的免疫療法では、対象患者の癌組織に発現している癌抗原を標的とする事が必須の条件である。しかし、癌抗原の種類によって発現頻度や治療効果が異なるため、腫瘍特異的免疫療法を確立するためには標的とする癌抗原の選択が最も重要である。Oncofetal antigen immature laminin receptor protein (OFA-iLRP) は種々の癌細胞に特異的に発現する事が知られている (Anticancer Res 19:5535-5542, 1999)。また近年の研究では、OFA-iLRP は抗原性タンパク質であり、腫瘍特異的免疫療法への応用が可能であると考えられている (Blood 102:4416-4423, 2003)。しかし、これまでに肺癌における OFA-iLRP 発現と腫瘍特異的免疫療法への応用についての検討は報告されていない。

2. 研究の目的

現在、進行性肺癌に対して長期的な治癒を期待できる治療法は確立されていないため、臨床現場では従来の治療法とは作用機序の異なる新規治療法の開発が切望されている。そのため、腫瘍特異的免疫療法の検討が積極的に行われているが、標的となる癌抗原の種類によってその臨床効果は大きく異なる。これまでに肺癌における OFA-iLRP 発現と腫瘍特異的免疫療法への応用についての検討は報告されていないが、特異的抗体を用いて実験したところ、多くのヒト肺癌細胞株において OFA-iLRP が高発現することが認められた。また、コンピューターシミュレーションを用いた解析より、OFA-iLRP 抗原ペプチドの主要組織適合抗原 (HLA) への結合能は他の癌抗原ペプチドより高いと予想されており、癌抗原提示樹状細胞による CTL 誘導能も優れていると考えられる。以上のように OFA-iLRP は肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の標的として非常に有望であり、OFA-iLRP 抗原ペプチドを用いた腫瘍特異的免疫療法は、我が国における肺癌の治療成績を改善する大きな可能性を秘めていると考えられる。そこで本研究では腫瘍特異的免疫療法における標的抗原として OFA-iLRP が応用可能であるか評価することを目的とし、ヒト肺癌組織における OFA-iLRP 発現頻度

について検討を行った。また、抗 OFA-iLRP 抗体を用い、抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity ; ADCC)、ならびに補体依存性細胞障害 (complement-dependent cytotoxicity ; CDC) について検討を行った。さらに OFA-iLRP 抗原ペプチドをパルスした樹状細胞による CTL 誘導とその細胞障害活性の検討を行い、腫瘍特異的免疫療法への臨床応用の可能性について評価を行った。

3. 研究の方法

本研究ではヒト肺癌組織アレイを用い、免疫染色法によって肺癌組織における OFA-iLRP 発現の検出を行った。この実験で OFA-iLRP を検出するためには、使用する抗 OFA-iLRP 抗体の特異性が最も重要であると考えられるが、OFA-iLRP の検出が可能である事をヒト肺癌細胞株における検討で確認できた抗 OFA-iLRP 抗体の提供を海外共同研究者より受けており、これを用いて検討を行った。

次に抗 OFA-iLRP 抗体の ADCC 活性ならびに CDC 活性の評価を行った。ADCC 活性はマウス脾細胞、もしくは健常成人の末梢血より単離した単核球をエフェクター細胞として用いた。採取されたエフェクター細胞と抗 OFA-iLRP 抗体を ^{51}Cr にて標識した OFA-iLRP 抗原を発現するヒト肺癌細胞と一定時間共培養し、上清中に放出された ^{51}Cr の測定を行った。また、CDC 活性はラビット血清由来補体と抗 OFA-iLRP 抗体を ^{51}Cr にて標識した OFA-iLRP 抗原陽性ヒト肺癌細胞と共培養し、ADCC 活性と同様の測定を行った。

さらに OFA-iLRP 抗原ペプチドパルス樹状細胞による CTL 誘導とその細胞障害性の評価を行った。樹状細胞の誘導は健常成人の末梢血より単離した単球を用いて行った。細胞培養には培地として 10% のウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地を用い、5% CO_2 インキュベーター内で培養した。まず、単球に GM-CSF と IL-4 を処置し、6日間培養を行うことにより、未熟樹状細胞を誘導した。こうして誘導された未熟樹状細胞に TNF- α を2日間処置すると成熟樹状細胞が誘導されるが、この過程で OFA-iLRP 抗原ペプチドをパルスする事により、OFA-iLRP に対する抗原提示能を有する成熟樹状細胞を得る事ができると考えられる。この成熟樹状細胞を CD8 陽性 T リンパ球と共培養をすることで CTL を誘導した。この共培養操作を3回繰り返し、最終的に誘導された CTL 活性を ^{51}Cr にて標識した標的細胞を用いて測定した。ただし、CTL 活性については、HLA のタイプをフローサイトメトリー法にて確認し、HLA-A2401 の検体についてのみ検討を行った。

4. 研究成果

ヒト肺癌組織における OFA-iLRP 発現について検討したところ、非小細胞肺癌組織、小細胞肺癌組織ともに OFA-iLRP の発現が認められた。これまでに肺癌細胞に発現する癌抗原として、MAGE、LAGE、NY-ESO-1、SSX、Her-2/neu、WT-1、CDCA1、HM1.24 などが報告されているが、OFA-iLRP もこれらの癌抗原と同様に腫瘍特異的免疫療法のターゲットとして有用である可能性が高いことが示唆された。

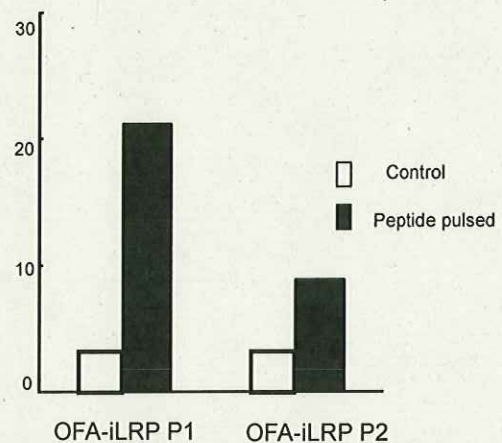
次に OFA-iLRP を標的とした抗体療法の可能性について検討するため、抗 OFA-iLRP 抗体を用い、肺癌細胞株に対する ADCC 活性の誘導について測定した。しかし、今回使用した抗 OFA-iLRP 抗体では ADCC 活性の誘導は認められなかった。また、CDC 活性や直接的な細胞障害活性も認められなかったことから、今回使用した抗 OFA-iLRP 抗体は、抗体療法に用いるには不適であることが示唆された。

抗 OFA-iLRP 抗体による ADCC 活性が認められなかったため、次に OFA-iLRP 由来ペプチドを処置した樹状細胞を用いて OFA-iLRP 特異的 CTL の誘導を検討した。一般的に日本人の約 60% が HLA-A2402* であることから、本研究では HLA-A24 親和性の高いペプチドを使用し、CTL 誘導を行った。健康人の単球に GM-CSF と IL-4 を処置し誘導した樹状細胞に OFA-iLRP 由来ペプチドを処置した。本検討はこれまでに報告されている HM1.24 や WT-1 など他の抗原由来ペプチドにおける検討と同様の手法を用いて行った。本研究ではこれまでに悪性腫瘍に対する特異的な CTL 誘導が認められている HM1.24 由来ペプチドや WT-1 由来ペプチドと比較して HLA-A24 への親和性が高いと考えられる配列をコンピューターシミュレーションで解析し、作成した 2 種類の OFA-iLRP 由来ペプチドを用いた。その結果、OFA-iLRP 由来ペプチドを処置した樹状細胞を CD8 陽性 T 細胞と共培養することにより、OFA-iLRP 特異的な細胞障害活性を示す CTL の誘導が認められた (図)。また、症例数は少ないが、誘導された特異的細胞傷害活性は処置した OFA-iLRP 由来ペプチドの HLA-A24 親和性に比例する傾向が認められた。この結果より HLA-A24 低親和性ペプチド処置と比較し、高親和性ペプチド処置によって、より強力な OFA-iLRP 特異的 CTL 誘導が可能であることが示唆された。

以上のように、本研究では OFA-iLRP が肺癌に対する癌免疫療法の標的として有用であるか検討を行った。まず、OFA-iLRP がヒト臨床肺癌組織において非小細胞肺癌、小細胞肺癌ともに発現する事を確認した。この結

果より、OFA-iLRP は肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の標的抗原として良好な条件を備えていることが明らかとなった。また、本研究で用いた抗 OFA-iLRP 抗体では ADCC 活性が認められず、この抗体を用いた抗体療法の実現は困難であると考えられた。その一方、2 種類の OFA-iLRP 由来ペプチドを処置した樹状細胞を CD8 陽性 T 細胞と共培養することにより OFA-iLRP 特異的な細胞障害活性を有する CTL の誘導が認められた。このことより、本研究で検討を行った OFA-iLRP 由来ペプチドは、進行性肺癌に対する癌ワクチンや樹状細胞療法へ臨床応用できる可能性が示唆された。本研究で得られた結果をさらに発展させることにより、進行性肺癌に対する腫瘍特異的免疫療法の確立に大きく寄与できると考える。

Cytotoxicity (%)



(図) OFA-iLRP 由来ペプチドパルス樹状細胞による CTL の誘導

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

中野 沙織、阿部真治、森田結貴、木宿昌俊、西岡安彦、川添和義、曾根三郎、水口和生、新規癌抗原 OFA-iLRP を標的とした肺癌に対する免疫療法の開発、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2009 年 11 月 7~8 日、アスティとくしま (徳島県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 真治 (Abe Shinji)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00403717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし