

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2012年度

課題番号：21792013

研究課題名（和文）

テーラーメイド型癌ワクチン療法の開発

研究課題名（英文）

Development of a tailor-made type of cancer vaccine treatment

研究代表者

熊丸 渉 (KUMAMARU WATARU)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90432947

研究成果の概要（和文）：

既存の癌抗原ペプチドを用いた癌細胞主導型のワクチン療法には限界があり、患者ごとに癌抗原ペプチドを同定するテーラーメイド医療の開発が望まれている。本研究は、癌細胞株を樹立せずとも癌患者の切除材料と末梢血単核球のみを利用して、効率よく、強力な細胞傷害活性を誘導する癌抗原ペプチドの同定を可能とした方法に取り組んでいる。

研究成果の概要（英文）：

The effect of cancer vaccine therapy using cancer antigen peptide existing has a limit, so the development of a tailor-made type cancer vaccine treatment for every patient is desired. The method doesn't use cancer cell line, but uses peripheral blood mononuclear cells and excision materials. This research is the development of experiment method to induce cancer antigen peptide with a strongest cytotoxicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌ワクチン療法、CTL、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまで発見されたさまざまな扁平上皮癌由来の癌抗原ペプチドを用いて、口腔扁平上皮癌患者の末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells; PBMC）より細胞傷害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocytes; CTL）の誘導を試みた。SART-1、SART-2、SART-3、CyB、Lck、ART4 の癌抗原より 13 種類の癌抗原ペプチドを用いて、日本

人に最も高頻度（68%）に発現している HLA (human leukocyte antigen)-A24 を有する口腔扁平上皮癌患者 35 名の PBMC よりペプチド特異的な CTL の誘導を試みた。21/35 名（60.0%）が、少なくとも 1 種類の癌抗原ペプチドに反応し、ペプチド特異的な CTL を誘導することができた。口腔扁平上皮癌患者 35 名中で、SART-1₆₉₀₋₆₉₈、SART-2₉₃₋₁₀₁、ART4₇₅₋₈₄ の癌抗原ペプチドがペプチド特異的な CTL の

誘導に最も有用であったが、いずれのペプチドも 20 数%の患者にしか反応しなかった（雑誌論文 1）。ペプチド特異的な CTL の誘導率が低かった理由は、患者ごとに CTL が反応する癌抗原ペプチドが異なるためである。よって、既存の抗原ペプチドを用いた癌細胞主導型のワクチン療法には限界があり、患者ごとに癌抗原（ペプチド）を同定するテーラーメイド医療の開発が望まれている。

2. 研究の目的

患者ごとに癌細胞株を樹立してから癌抗原を同定するには膨大な時間と費用がかかってしまう。また、癌細胞株は必ずしも樹立できるものではなく、樹立できない場合の方が圧倒的に多い。そこで、本研究の目的は、患者ごとにいかに効率よく癌抗原を同定し、強力な細胞傷害活性を発揮する癌抗原ペプチドを見つけ出すこと、つまり、テーラーメイド型癌ワクチン療法を開発することである。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌患者の切除物（癌組織、正常組織、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、転移リンパ節、線維芽細胞）と PBMC とで癌抗原の同定を可能とした方法を開発するために、申請者が樹立した口腔扁平上皮癌細胞株（自家癌細胞:WK2）と自家切除材料および自家 PBMC を用いて行った。

(1) 自家癌細胞と自家 PBMC を用いて、図 1 の方法で自家癌特異的な CTL を誘導した。自家癌特異的な CTL と標的細胞の割合 (E/T 比) を 10、5、2 として、96 穴平底プレート（トリプレット以上）で 18 時間培養した。CTL 活性の指標である IFN- γ 産生量を ELISA で、細胞傷害活性はトリパンプルー染色で評価した。

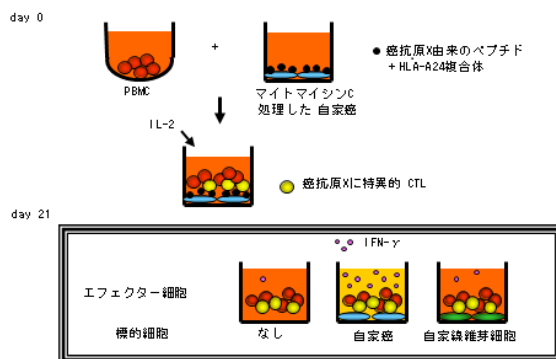


図 1. 自家癌特異的な CTL を誘導

CTL と TIL の T 細胞レセプター (TCR) の解析は、polymerase chain reaction (PCR) 法や single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法を用いて行った。

(2) 切除材料と採血のみで効率よく癌抗原を同定するために、cDNA 発現クローニング法を改良した。癌組織の cDNA と正常組織の mRNA とハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイゼーションしなかった癌特異的な cDNA を抽出した（サブトラクション法）。同様に自家癌細胞株の cDNA と自家線維芽細胞の mRNA から癌特異的な cDNA を抽出した。ベクターは、ターゲット細胞として COS-7 細胞を使用するため SV40 ori と哺乳類発現プロモーターを有したプラスミドを用いた。リポフェクション法で大腸菌に導入し増幅させ、cDNA ライブラリーを作製した。各プールからのプラスミドを COS-7 細胞または自家線維芽細胞に導入し、エフェクター細胞である自家癌誘導 CTL または TIL で細胞傷害活性や CTL 活性を検索した。

(3) 癌細胞に特異的に発現する cDNA を検出するには、候補となる遺伝子が多数存在するため困難を要している。このほど、同一患者の後発転移リンパ節から癌細胞株 (WK3F) を樹立することに成功したので、転移関連遺伝子に候補を絞ることとした。そのためにまずは、原発巣の細胞株と転移巣の細胞株の分子生物学的特性を検索した。

①増殖能は、MTT assay 法にて 24 時間ごとに細胞増殖を測定し、増殖曲線を描出し倍加時間を算出した。

②コロニー形成能は、軟寒天培養法基質非依存性)をおこない、2 週間後にコロニーの形成数を計測。30cell/colony を 1 としてカウントした。

③遊走能は Wound healing assay をおこない、3 時間ごとの間隙減少率を計測した。

④血管内皮細胞との接着率は、単層 conflent になったヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 上に、 2×10^6 cell/well の各種細胞を撒き、30 分後の接着率を測定した。

⑤上皮および間葉系遺伝子の検索は、Real Time PCR, Western blotting を用いた。

比較のため HSC-3 (舌 SCC 転移巣)、SAS (舌 SCC 転移巣)、VA13 (肺線維芽細胞株) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 自家癌特異的な CTL が自家癌細胞に及ぼす細胞傷害活性は、E/T 比 2 で 18%、E/T 比 5 で 37%、E/T 比 10 で 81%であった。well によって多少ばらつきはあったものの E/T 比が高くなるにつれて死細胞数の割合が増加した。図 2 は、E/T 比 10 で最も細胞傷害活性 (95%) を認めた時の写真である。

CTL 活性 (IFN- γ の産生) も同様の傾向であった。尚、自家線維芽細胞への細胞傷害活性はほとんどなかった。

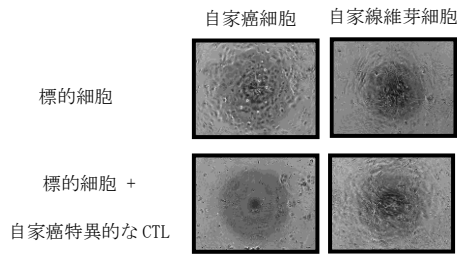


図 2. 自家癌特異的な CTL と自家癌との混合培養

これらの結果は、雑誌論文 1 で既存の癌抗原ペプチドを用いた時よりも細胞傷害性ははるかに高く、自家癌由来のペプチドが CTL を誘導するのに適していることが分かった。

自家癌特異的な CTL と TIL の TCR を PCR 法と SSCP 法で解析したところ Vβ7 遺伝子ファミリーの中に発現パターンが共通したクロナタイプの集積を認めた。これらはエフェクター細胞である可能性があり、癌抗原同定には重要な細胞といえる。

(2) 自家癌細胞と癌組織からの癌特異的な cDNA ライブラリーをそれぞれ作製した。DNA 導入 COS-7 細胞に対する自家癌誘導 CTL の細胞傷害活性は、E/T 比 5 で、0~20 数%程度とまだまだ低いものであった。候補となる cDNA ライブラリーが多く存在し、遺伝子導入効率も低いため、自家癌特異的な CTL の誘導率をもっと高めて、精度の高い実験を行わなければならない。自家線維芽細胞と TIL の細胞数には限りがあるため、実験系 (図 3) が確立するまで、現在保留している。

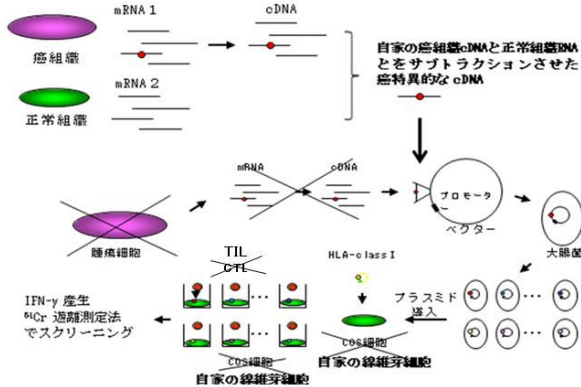


図 3. 改良型 cDNA 発現クローニング法

(3) 原発巣由来癌細胞 (WK2) と転移巣由来癌細胞 (WK3F) の分子生物学的特性は、
 ①増殖能の倍加時間は WK2 : 32 時間、WK3F : 24 時間、HSC3 : 20 時間、SAS : 33 時間、VA13 : 41 時間であった。
 ②コロニー形成能は、WK2 : 0.33%、WK3F : 0.67%、HSC3 : 1.22%、SAS : 0.56%、VA13 : 0%であった。
 ③遊走能は、図 4 のごとく WK3F がわずかに高かった。

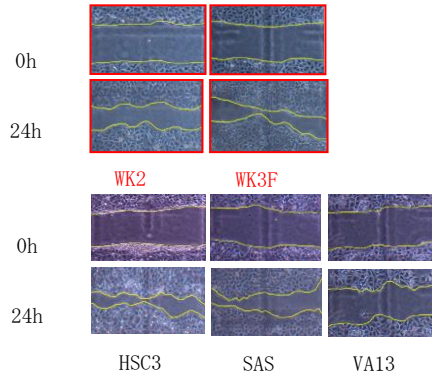


図 4. 細胞遊走能

④血管内皮細胞との接着率は、WK2 : 33.1%、WK3F : 63.5%、HSC3 : 75.4%、SAS : 50.1%、VA13 : 26.3%であった。

転移巣由来癌細胞は、原発巣由来癌細胞よりも増殖能、コロニー形成能、遊走能、血管内皮細胞への接着能が高かった。

⑤転移巣由来癌細胞は、原発巣由来癌細胞よりも E-cadherin、Desmoplakin、ZO-1 など上皮系関連遺伝子の発現が低く、Vimentin、N-cadherin、Fibronectin などの間葉系関連遺伝子では同程度の発現であった (図 5、6)。

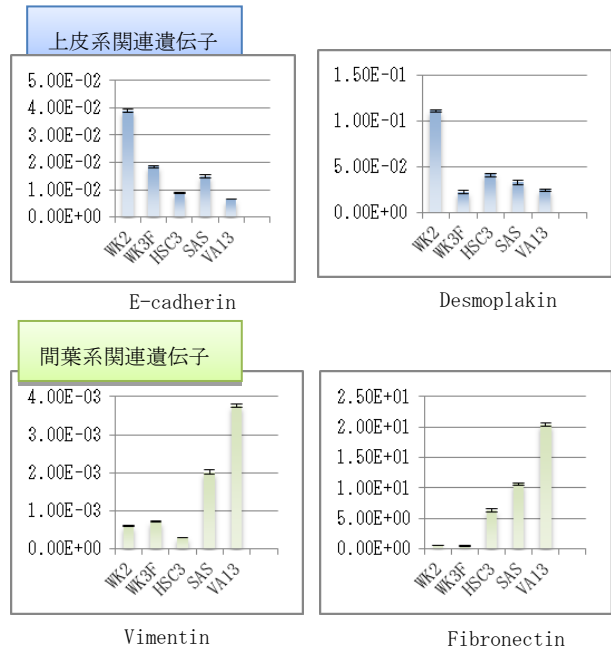


図 5. 上皮系/間葉系遺伝子の発現 (real time PCR)

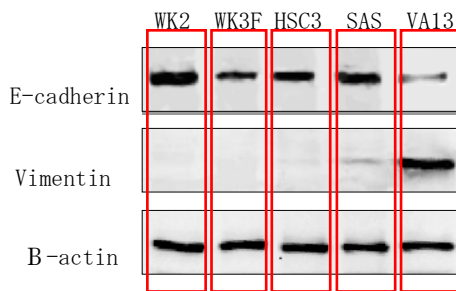


図 6. E-cadherin・Vimentin の発現 (western blotting)

現在、分子生物学的特性を考慮に入れながら転移巣由来癌細胞も実験系に取り入れ、より癌特異的な cDNA を作製し、自家癌特異的な CTL と標的細胞との混合培養で、細胞傷害活性を確認しながら、効率よく最も活性の高い癌抗原ペプチドの同定を検索中である。

この実験系を用いて、切除物（癌組織、正常組織、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、転移リンパ節、線維芽細胞）と PBMC のみでも同様の結果が得られれば、癌細胞株を用いずに効率よく癌抗原および癌抗原ペプチドの同定が可能となるであろう。

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 1 件）

Toyoshima T, Kumamaru W, Hayashida JN, Moriyama M, Kitamura R, Tanaka H, Yamada A, Itoh K, Nakamura S.

In vitro induction of specific CD8(+) T lymphocytes by tumor-associated antigenic peptides in patients with oral squamous cell carcinoma.

Cancer letters 02/2012; 322(1):86-91.

査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊丸 渉 (KUMAMARU WATARU)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90432947

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし