

平成22年3月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016048

研究課題名（和文） 腫瘍抗原の同定と宿主免疫応答の解析

研究課題名（英文） Analysis of human tumor antigens and immune responses in patients

研究代表者

中山 睿一 (NAKAYAMA EIICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60180428

研究成果の概要（和文）：がんワクチンとして用いるがん抗原は、がん特異的が高く、さらに免疫原性が強いことが必須である。われわれは、新しいがん抗原 CCDC62、HERV-K および XAGE-1b を見出し、特異性および免疫原性に優れていることを明らかにした。また、がん・精巣抗原 NY-ESO-1 の全長タンパクを用いて、がんワクチン臨床試験を実施し、がん患者には、免疫が誘導されることを明らかにした。さらに臨床効果も認めた。

研究成果の概要（英文）： For cancer vaccine, identification of cancer antigens which are highly specific to cancer and strongly immunogenic in cancer patients is necessary. We found that CCDC62, HERV-K and XAGE-1b are cancer antigens which can be used as vaccine. We also conducted a clinical trial of cancer vaccine using a complex of cholesterol hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. Immune response was elicited after vaccination in patients and some patients showed favorable clinical course.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,900,000	0	14,900,000
2006年度	14,900,000	0	14,900,000
2007年度	14,900,000	0	14,900,000
2008年度	14,900,000	0	14,900,000
2009年度	14,900,000	0	14,900,000
総計	74,500,000	0	74,500,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫、がん・精巣 (CT) 抗原、宿主免疫応答、免疫回避、がんワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

それまで約10年の間に、多くのヒトがん抗原が見いだされてきた。このような基礎的研究の成果をもとに、がん抗原ペプチドを用いたがん免疫療法の臨床試験が国内外のいくつかの施設で始められた。がん免疫療法の有用性の確立にはさまざまな関門があるが、特に重要なことはがん特異性が明らかで、そして抗原性の強いがん抗原を用いることである。この点から、さらに、新しいがん抗原の検索が必要である。ペプチドを用いた臨床試験は数多く行われている。われわれは、ペプチドではなく、がん抗原タンパクを用いた免疫療法を計画した。

## 2. 研究の目的

ヒト免疫系T細胞が認識するがん抗原ペプチドをがんワクチンとして用いたがん免疫療法が行われてきた。しかし、成果は限定的であり、がん免疫療法には新たな展開が必要である。がんと精巣のみに発現するCT抗原はその特異性からがんワクチンに最も有望な分子である。本研究は、がん・精巣 (CT) 抗原の解析を中心に新しいがん抗原を検索し、さらにタンパク抗原のがんワクチンとしての有用性を明らかにする。また、各種の腫瘍についてがん抗原の発現と宿主免疫応答、さらに、ワクチン投与患者の免疫誘導を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) SEREX 法

がんあるいは正常組織から得た mRNA から cDNA ライブラリーを作成する。これをプラスチックプレート上で大腸菌に発現させタンパクを作らせ、これにがん患者血清を加えて、反応陽性遺伝子クローンを得る。抗原性の強いことが明らかな遺伝子のクローニングが容易である。

### (2) PCR および IHC

がん遺伝子の発現は PCR 法によって検討した。がん抗原タンパク発現は、免疫組織染色

(IHC) によって検討した。

### (3) IFN $\gamma$ キャッチアッセイ

T細胞の反応は IFN $\gamma$  キャッチアッセイによって検討した。CD45 および IFN $\gamma$  の二重特異性を有する抗体を用いて T細胞表面上で IFN $\gamma$  を検出する方法である。

### (4) ELISA

96穴プレートにタンパクを付着させ、これに、血清を加えて抗体の反応を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 新しいがん抗原の検索と発現解析

がん抗原 CCDC62 および HERV-K gag の mRNA そしてタンパク発現を、正常組織および種々のがん組織について検討した。CCDC62 は、SEREX 法により正常精巣由来 cDNA ライブラリーを胃がん患者血清を用いてスクリーニングして得られた遺伝子で、正常では精巣のみに発現していた。がんでは種々のがんが発現し、肺がんでは 26% に発現が認められた。組換えタンパクを作成し、種々のがん患者の血清を用いて、ELISA 法で検討したところ、抗体陽性者が認められた。さらに、モノクローナル抗体を作成して発現を明らかにした。HERV-K も SEREX 法で見出されたが、組換えタンパク、モノクローナル抗体を作成して発現を検討した。この結果、特に、前立腺がんおよび卵巣がん、強く高頻度に発現していることがわかった。抗原の局在は、細胞質のみでなく細胞膜にも存在するユニークな抗原であることを明らかにした。いずれもがん特異性が高く、抗原性が強いがん抗原である。

### (2) がん患者免疫応答の解析

1) XAGE は肺がんの高い頻度で発現し、免疫原性が強い。XAGE タンパク発現と肺がん患者の予後との関係を検討し、XAGE と MHC クラス I の両者を発現するがん患者の生存期間は有意に長いことを明らかにした。また、多数の症例を解析し、抗体陽性頻度、また、CD4 および CD8 の反応を明らかにした。

2) NY-ESO-1 については、CHP-NY-ESO-1 複合体ワクチン投与患者の CD4 T細胞反応を詳しく検討し、3 症例について認識エピトープを同定した。さらに、これらのエピトープは

自然にプロセスされた抗原であることを明らかにした。

### (3) がんの免疫回避機構の解析

悪性黒色腫末期症例の腫瘍局所における免疫応答を解析した。患者は、CHP-NY-ESO-1 ワクチン投与を受けたが、ワクチン2回投与後に、皮膚浸潤、転移部位に発赤、水疱形成を示した。水疱の浸潤リンパ球を解析し、Foxp3 陽性制御性 T 細胞と IL-10, TGF beta などの免疫抑制性サイトカインの増加を認めた。また、肺癌患者長期生存例で、腫瘍増殖に伴う制御性 T 細胞の変化を検討した。患者は、無治療のまま胸膜転移腫瘍の消失をきたしたが、3年間の安定期間の後に、再発、増悪を示した。末梢血リンパ球を得て解析したところ、転移消失時期に一致して、NY-ESO-1 に対する強い免疫反応を示し、再発、増悪に伴い、制御性 T 細胞の増加を示した。これらの事実は、がん症例で、がんの免疫回避に、腫瘍局所あるいは末梢血中の制御性 T 細胞が深く関与していることを示唆している。

### (4) がんワクチン

がん・精巢抗原 NY-ESO-1 は免疫原性の強いがん抗原である。われわれは、コレステリルプルラン (CHP) と NY-ESO-1 タンパク複合体を用いたがんワクチン療法を 2004 年-2007 年に行った。タンパクは抗原提示細胞内に取り込まれ、プロセッシングを受けた後、自然のエピトープとして HLA クラス I およびクラス II 分子に提示される。このため HLA に関係なく複数の CD4 および CD8T 細胞を刺激できる多価ワクチンとして機能する。食道がん 8 例、前立腺がん 4 例、悪性黒色腫 1 例の 13 例に投与し、臨床的に有効な症例を多数経験した。末梢血を用いた NY-ESO-1 特異的 CD4 および CD8T 細胞のエピトープ解析では、ともに NY-ESO-1 分子の特定の領域 NY-ESO-1<sub>73-114</sub> および NY-ESO-1<sub>115-144</sub> を主に認識していることを明らかにした。

これらの結果は、180個のアミノ酸からなる NY-ESO-1 タンパクのうち、一部分のみの免疫で有効な CD4 および CD8T 細胞の反応を誘導することが可能であることを示唆しており、こ

れに基づき、現在2種類の長鎖ペプチドを用いて、臨床試験を行っている。一つは、20個のアミノ酸からなる NY-ESO-1f ペプチドで、もう一つは、約30個のアミノ酸のペプチド4本からなる重複ペプチド (NY-ESO-1 OLP) である。いずれも、OK-432, モンタナイドをアジュバントに用いて皮下投与している。NY-ESO-1f ペプチドを用いた臨床試験は、食道がん6例、肺癌がん3例、胃がん1例の計10例が、また NY-ESO-1 OLP を用いた臨床試験は、食道がん4例、肺癌がん2例、悪性黒色腫1例の計7例が試験を完遂している。両臨床試験において、免疫学的モニタリングで NY-ESO-1 特異的な液性および細胞性免疫の誘導を確認した。また、良好な臨床経過を示した症例を経験した。これらの事実は、長鎖ペプチドのがんワクチンにおける有用性を示すと考えられる。

### 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 27 件)

1. Isobe M, Eikawa S, Uenaka A, Nakamura Y, Kanda T, Kohno S, Kuzushima K and Nakayama E. Correlation of high and decreased NY-ESO-1 immunity to spontaneous regression and subsequent recurrence in a lung cancer patient. *Cancer Immunity*, 査読有, 9: 8-17, 2009.
2. Aoki M, Ueda S, Nishikawa H, Kitano S, Hirayama M, Ikeda H, Toyoda H, Tanaka K, Kanai M, Takabayashi A, Imai H, Shiraishi T, Sato E, Wada H, Nakayama E, Takei Y, Katayama N, Shiku H and Kageyama S. Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine*, 査読有, 27: 6854-61, 2009.
3. Nakamura Y, Noguchi Y, Satoh E, Uenaka

- A, Sato S, Kitazaki T, Kanda T, Soda H, Nakayama E and Kohno S. Spontaneous remission of a non-small cell lung cancer possibly caused by anti-NY-ESO-1 immunity. *Lung Cancer*, 査読有, 65: 119-122, 2009.
4. Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, Saika T, Miyamura T, Chayama K, Nakamura Y, Wada H, Yamashita T, Morishima T, Old LJ and Nakayama E. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immunity*, 査読有, 8: 15, 2008.
  5. Kikuchi E, Yamazaki K, Nakayama E, Sato S, Uenaka A, Oizumi S, Dosaka-Akita H and Nishimura M. Prolonged survival in patients with lung adenocarcinoma expressing XAGE-1b and HLA class I antigens. *Cancer Immunity*, 査読有, 8: 13, 2008.
  6. Wada H, Sato E, Uenaka A, Isobe M, Kawabata R, Nakamura Y, Iwase S, Yonezawa K, Yamasaki M, Miyata H, Doki Y, Shiku H, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Monden M and Nakayama E. Analysis of peripheral and local anti-tumor immune response in esophageal cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer*, 査読有, 123(10): 2362-2369, 2008.
  7. Tsuji K, Hamada T, Uenaka A, Wada H, Sato E, Isobe M, Asagoe K, Yamasaki O, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Nakayama E and Iwatsuki K. Induction of immune response against NY-ESO-1 by CHP-NY-ESO-1 vaccination and immune regulation in a melanoma patient. *Cancer Immunol. Immunother.*, 査読有, 57(10): 1429-1437, 2008.
  8. Kaya S, Uenaka A, Sato S, Ono T, Aji T, Nakayama E. Identification of a CD4 T-cell epitope in tumor rejection antigen RLakt in BALB/c radiation-leukemia RL male 1. *Cancer Sci.*, 査読有, 99(7): 1441-1447, 2008.
  9. Morisita Y, Uenaka A, Kaya S, Sato S, Aji T and Nakayama E. HLA-DRB1\*0410-restricted recognition of XAGE-1b37-48 peptide by CD4 T cells. *Microbiol. Immunol.*, 査読有, 51(8): 755-762, 2007.
  10. Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y, Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H, Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ and Nakayama E. T-cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immunity*, 査読有, 7: 9-20, 2007.
  11. Shimono M, Noguchi Y, Uenaka A, Sato S, Okumura H, Nakagawa K, Tanimoto M and Nakayama E. Identification of DR9-restricted XAGE antigen on lung adenocarcinoma recognized by autologous CD4 T-cells. *Int. J. Oncol.*, 査読有, 30(4): 835-840, 2007.
  12. Sato S, Noguchi Y, Uenaka A, Ohara N, Shimono M, Nakagawa K, Koizumi F, Ishida T, Yoshino T, Shiratori Y and Nakayama E. Identification of translation products of XAGE-1 isoforms: predominant expression of XAGE-1b in testis and tumors. *Cancer Immunity*, 査読有, 7:5 (5 March), 2007.
  13. Kawabata R, Wada H, Idobe M, Saika T,

- Sato S, Uenaka A, Doki Y, Yasuda T, Kumon H, Tsuji K, Iwatsuki K, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Monden M and Nakayama E. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int. J. Cancer*, 査読有, 120: 2178-2184, 2007.
14. Tammela J, Uenaka A, Ono T, Noguchi Y, Jungbluth AA, Mhawech-Fauceglia P, Qian F, Schneider S, Sharma S, Driscoll D, Lele S, Old LJ, Nakayama E and Odunsi K. OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.*, 査読有, 29: 903-910, 2006.
  15. Nakamura S, Nouse K, Noguchi Y, Higashi T, Ono T, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ, Nakayama E and Shiratori Y. Expression and immunogenicity of NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 査読有, 21: 1281-1285, 2006.
  16. Hasegawa K, Noguchi Y, Koizumi F, Uenaka A, Tanaka M, Shimono M, Nakamura H, Shiku H, Gnjjatic S, Murphy R, Hiramatsu Y, Old LJ and Nakayama E. In vitro stimulation of CD8 and CD4 T-cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope. *Clin. Cancer Res.*, 査読有, 12: 1921-1927, 2006.
  17. Okumura H, Noguchi Y, Uenaka A, Aji T, Ono T, Nakagawa K, Aoe M, Shimizu N and Nakayama E. Identification of an HLA-A24-restricted OY-TES-1 epitope recognized by cytotoxic T cells. *Microbiol. Immunol.*, 査読有, 49: 1009-1016, 2005.
  18. Matsushita H, Uenaka A, Ono T, Hasegawa K, Sato S, Kozumi F, Nakagawa K, Toda M, Shingo T, Ichikawa T, Noguchi Y, Tamiya T, Furuta T, Kawase T, Date I and Nakayama E. Identification of glioma-specific RFX4-E and -F isoforms and humoral immune response in patients. *Cancer Sci.*, 査読有, 96: 801-809, 2005.
  19. Nakagawa K, Noguchi Y, Uenaka A, Sato S, Okumura H, Shimono M, Ali Mohamed Ali Eldib, Ono T, Ohara N, Yoshino T, Yamashita K, Tsunoda T, Shimizu N and Nakayama E. XAGE-1 expression in non-small cell lung cancer and antibody response in patients. *Clin. Cancer Res.*, 査読有, 11: 5496-5503, 2005.
  20. Koizumi F, Noguchi Y, Saika T, Nakagawa K, Sato S, Ali Mohamed Ali Eldib, Nasu Y, Kumon H and Nakayama E. XAGE-1 mRNA expression in prostate cancer and antibody responses in patients. *Microbiol. Immunol.*, 査読有, 49: 471-476, 2005.
  21. Sato S, Noguchi Y, Wada H, Fujita S, Nakamura S, Tanaka R, Nakada T, Hasegawa K, Nakagawa K, Koizumi H, Ono T, Noso K, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ, Shiratori Y and Nakayama E. Quantitative real-time RT-PCR analysis of *NY-ESO-1* and *LAGE-1a* mRNA expression in normal tissues and tumors, and correlation of the protein expression with the mRNA copy number. *Int. J. Oncol.*, 査読有, 26: 57-63, 2005.
  22. 中山睿一, 和田 尚, CT抗原を用いた特異的免疫療法, *Skin Cancer*, 臨床医薬研究協会, 査読無, 2009, in press.
  23. 中山睿一, 多価性タンパクワクチン, 最

新医学 がんワクチンの展望、最新医学社、査読無、64 卷 11 号、2009.

24. 和田 尚、土岐祐一郎、中山睿一、新規ワクチンの開発状況と期待「癌ワクチン」、日本臨床、日本臨床社、査読無、66(10)：2004-2007, 2008.
25. 和田 尚、土岐祐一郎、門田守人、上中明子、中山睿一、NY-ESO-1 蛋白を用いたがんワクチン療法第一相臨床試験、細胞 The CELL、ニューサイエンス社、査読無、39(6)：18-21, 2007.
26. 和田 尚、土岐祐一郎、門田守人、珠玖洋、上中明子、中山睿一、がん・精巢抗原NY-ESO-1 蛋白・癌ワクチン、Surgery Frontier ; 特集 癌ワクチン療法の現状と展望、メディカルレビュー社、査読無、13(3) :35-39, 2006.
27. 和田 尚、門田守人、中山睿一、がんワクチン療法—最近の知見、日本医事新報、査読無、4304 : 57-59、2006.

[学会発表] (計 83 件)

1. 第 25 回 日本皮膚悪性腫瘍学会 (岡山 2010 年 5 月 22-23 日)  
CT 抗原を用いた特異的免疫療法 : 中山睿一 : シンポジウム

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称 : 癌診断方法および癌診断キット  
発明者 : 小野俊朗、中山睿一  
権利者 : 国立大学法人 岡山大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2006-240787  
取得年月日 : 2006 年 9 月 5 日
2. 名称 : XAGE-1b 特異的免疫反応誘導するペプチドおよびその利用  
発明者 : 大植祥弘、中山睿一  
権利者 : 国立大学法人 岡山大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2009-142266

出願年月日 : 2009 年 6 月 15 日

3. 名称 : 癌診断キットおよび癌診断方法

発明者 : 小野俊朗、中山睿一

権利者 : 国立大学法人 岡山大学

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2008/063002

取得年月日 : 2008 年 7 月 18 日

日本

出願番号 : 特願 2009-532105

移行日 : 2010 年 3 月 10 日

中国

出願番号 : 未定

移行日 : 2010 年 3 月 11 日

欧州 (英・仏・独)

出願番号 : 08791311.7

移行日 : 2010 年 3 月 10 日

米国

出願番号 : 未定

移行日 : 2010 年 3 月 10 日

[その他]

報道関連情報 (計8件)

1. がん精巢抗原XAGE-1bを標的抗原としたがんワクチンを開発中 Medical Tribune 2009.12.24, 31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 睿一 (NAKAYAMA EIICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 60180428

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小野 俊朗 (ONO TOSHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 50185641

上中 明子 (UENAKA AKIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号 : 50273967