

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18591449
 研究課題名（和文） 腫瘍マーカーSCCAを標的とした癌免疫療法の研究
 研究課題名（英文） Study on anti-cancer immunotherapy targeting a tumor marker, SCCA
 研究代表者
 原田 守 (HARADA MAMORU)
 島根大学・医学部・教授
 研究者番号：50260716

研究成果の概要：

上皮性癌の腫瘍マーカーとして知られている扁平上皮癌抗原(SCCA)を標的とした癌ペプチドワクチン療法を確立するために、日本人の6割が発現するHLA-A24分子と日本人の4割が発現するHLA-A2分子陽性癌患者に対する癌ワクチン療法に応用できるSCCA由来ペプチドの同定を試みた。その結果、HLA-A24分子陽性癌患者に利用できるSCCAペプチドを2個同定でき、上皮性癌患者に対するSCCAを標的とした癌ワクチン療法の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：癌、抗原、免疫学、ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、新たな癌治療として癌免疫療法が注目されている。癌ワクチンの方法としては、癌ペプチド、樹状細胞、プラスミドDNA、ウイルスベクターを用いるものがあるが、これらはすべて、癌抗原蛋白やペプチドを癌患者の生体内に発現・免疫することにより癌抗原特異的T細胞を増加させることを目的としている。申請者も、癌患者内に癌細胞反応性キラーT細胞を誘導できる癌抗原由来抗原ペプチドを多数同定し、臨床研

究を進めてきた。その結果、HLAクラスI結合性癌抗原由来ペプチドを癌患者にワクチンすることによりペプチド反応性かつ癌細胞反応性T細胞を誘導することができると同時に抗原ペプチド反応性IgGが高頻度に誘導されることを観察した。これらの結果は、可溶性癌抗原と見なすことができる腫瘍マーカーに対するIgG抗体が誘導できれば、癌患者内に抗腫瘍免疫応答を惹起できる可能性を示唆している。腫瘍マーカーを液性・細胞性免疫の標的分子抗原と考え

た癌免疫療法の研究はほとんど行なわれておらず、極めて独創性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

上皮性癌の腫瘍マーカーとしていくつかの分子が知られている。セルピンファミリーに属する扁平上皮癌抗原 (SCCA) は、本邦における上皮性癌の約半数を占める扁平上皮性癌の腫瘍マーカーに汎用されている。SCCAを標的とした癌免疫療法が確立できれば、多種類の臓器の癌患者に広く応用することができる。本研究では、1) 多種類の扁平上皮癌 (食道癌、肺癌、子宮頸癌) 患者において癌細胞反応性キラーT細胞を誘導できるSCCA由来抗原ペプチドを同定する。2) 多種類の扁平上皮癌患者においてSCCAペプチドやSCCA蛋白反応性IgGの有無を検討する。これらの結果の基づき、腫瘍マーカーSCCAを分子標的とした有効な癌免疫療法の基盤を確立することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 上皮性癌細胞株でのSCCAの発現の解析：扁平上皮性癌でのSCCAのmRNAレベルの発現をRT-PCR法でスクリーニングする。扁平上皮性癌として食道癌、肺癌、子宮頸癌、頭頸部癌を対象とする。これらの癌細胞株よりtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した後に、RT-PCR法によって、SCCA のmRNA の発現を検討する。さらに、リアルタイムPCR法によりmRNAの発現量を定量化する。また、SCCA 蛋白が発現しているかをWestern blot 法で確認する。

(2) 上皮性癌組織でのSCCAの発現の解析：SCCAの発現を種々な上皮性癌 (扁平上皮癌と腺癌) 組織について、組織免疫染色法で検討する。また、扁平上皮癌以外の腺癌での発現も検討する。

(3) SCCA 由来ペプチドのHLA-A24またはHLA-A2拘束性CTL誘導の検討：日本人での発現頻度が高いHLA-A24またはHLA-A2に注目し、これらのHLAクラス I 分子への結合モチーフに基づいてSCCA蛋白由来の抗原ペプチドを準備する。癌患者の末梢血リンパ球を個々のSCCA抗原ペプチドでサイトカインの存在下で繰り返し刺激し、刺激したSCCA抗原ペプチドに対する特異的反応性を培養上清中のサイトカインレベルで評価する。

(4) SCCA ペプチドで誘導したCTLの癌細胞に対する細胞傷害活性の検討：SCCAペプチドで刺激・誘導した癌患者の末梢

血リンパ球由来の細胞傷害性Tリンパ球のSCCAを発現する癌細胞に対する細胞傷害活性をクロニウム放出試験で検討する。さらに、その細胞傷害活性が刺激ペプチド特異的であるか、HLAクラス I 拘束性であるか、また、CD8陽性T細胞が担っているかを抗体による阻害試験で確認する。

(5) 癌抗原由来SCCAペプチド特異的IgG抗体の測定：癌患者の血漿中にSCCA蛋白由来抗原ペプチド候補に対するIgG抗体が存在するかELISA法で検討する。さらに、ペプチド特異的IgG抗体の存在が確認された場合、血漿中のペプチド特異的IgG抗体が、対応するペプチドをコートしたウエルで血漿を培養した場合に、ペプチド特異的に吸収されることを確認する。

4. 研究成果

多種類の上皮性癌細胞株 (扁平上皮癌と腺癌) でのSCCA蛋白の発現をWestern blot法で検討したところ、扁平上皮癌では大部分の細胞株に認められたが、腺癌での発現は稀であった。さらに、SCCA蛋白の発現を種々な上皮性癌組織について組織免疫染色法で検討したところ、大部分の上皮性癌の組織で陽性であった。特に、食道癌、子宮頸癌、肺癌では80%以上で陽性であった。その後、HLA-A24ペプチドに関しては9種類のSCCA由来抗原ペプチドを準備し、個々のペプチドに対するIgG抗体が癌患者の血漿中に存在するかを検討したところ、2種類のペプチド (SCCA112-120, SCCA215-224) について、癌患者の血漿中に50%以上の頻度でIgG抗体が存在することが確認された。これら2種類のSCCAペプチドによる刺激で、癌患者の末梢血リンパ球を繰り返し刺激し、SCCAペプチド特異的T細胞の誘導の有無をIFN-gamma ELISA法で検討した。その結果、これらのSCCAペプチドはペプチド特異的T細胞を誘導できることが判明した。さらに、これらのSCCA候補ペプチドで誘導した細胞傷害性T細胞が、HLA-A24陽性SCCA陽性扁平上皮癌に対して細胞傷害活性を示すか検討したところ、CD8陽性T細胞がHLAクラス I 拘束性に細胞傷害活性を示すことが確認できた。一方、HLA-A2分子結合性SCCA由来抗原ペプチドを5種類準備して、同様の方法でスクリーニングしたが、ペプチド特異的IgG抗体の存在は確認できたが、それらのSCCAペプチドで誘導したペプチド特異的T細胞はSCCAを発現したHLA-A2陽性癌細胞に対して細胞傷害活性を示さなかった。以上の結果より、本研究により、腫瘍マーカーをして

広く知られているSCCAを標的とした癌ワクチン療法が、日本人の約6割を占めるHLA-A24陽性の扁平上皮癌患者に対して応用できる可能性が明らかとなった。本研究で同定したSCCAペプチドによるワクチン療法により、SCCAを発現する癌細胞に対するT細胞による細胞性免疫とともに可溶性SCCAに対するIgGによる液性免疫が共同して作用する可能性も示唆され、今後の臨床応用が期待される。

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24件)

- 1) Hamaguchi M, Harada M., et al.. (10人中8番目) Allogeneic cell therapy from immunized donors with tumor antigen peptide enhances the antitumor effect after cyclophosphamide-using nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in mice. **Cancer Science**, 100: 138-143, 2009. 査読 (有)
- 2) Kondo M, Harada M., et al. (6人中6番目) Roles of proinflammatory cytokines and the Fas/FasL interaction in pathogenesis of Inflammatory myopathies. **Immunology**, 2009. in press 査読 (有)
- 3) Eto M, Harada M., et al. (12人中6番目) Posttransplant administration of cyclophosphamide and donor lymphocyte infusion induces potent antitumor immunity to solid tumor. **Clinical Cancer Research**, 14: 2833-2840, 2008. 査読 (有)
- 4) Jin M, Harada M., et al. (9人中4番目) Identification of Eph6 variant-derived epitope peptides recognized by cytotoxic T-lymphocytes from HLA-A24+ malignant glioma patients. **Oncology Reports**, 19: 1277-1283, 2008. 査読 (有)
- 5) Komatsu N, Harada M., et al. (8人中2番目) A correlation between symptom severity and unbalanced reactive IgA production in Japanese cedar pollinosis patients. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, 26: 97-104, 2008. 査読 (有)
- 6) Harada M., et al. (4人中1番目) Kinesin superfamily protein-derived peptides with the ability to induce glioma-reactive cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ glioma patients. **Oncology Reports**, 17: 629-636, 2007. 査読 (有)
- 7) Eto M, Harada M., et al. (10人中4番目) Cyclophosphamide-using nonmyeloablative

allogeneic cell therapy against renal cancer with a reduced risk of graft-versus-host disease.

Clinical Cancer Research, 13: 1029-1035, 2007. 査読 (有)

- 8) Komohara Y, Harada M., et al. (8人中2番目) Identification of target antigens in specific immunotherapy for renal cell carcinoma. **Journal of Urology**, 177: 1157-1162, 2007. 査読 (有)
- 9) Minami T, Harada M., et al. (8人中8番目) Identification of SART3-derived peptides having the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 56: 689-698, 2007. 査読 (有)
- 10) Matsueda S, Harada M., et al. (8人中8番目) New peptide vaccine candidates for epithelial cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. **Journal of Immunotherapy**, 30: 274-281, 2007. 査読 (有)
- 11) Noguchi M, Harada M., et al. (10人中7番目) Combination therapy of personalized peptide vaccination and low-dose estramustine phosphate for metastatic hormone refractory prostate cancer patients: An analysis of prognostic factors in the treatment. **Oncology Research**, 16: 341-349, 2007. 査読 (有)
- 12) Noguchi M, Harada M., et al. (6人中3番目) Immunological evaluation of neoadjuvant peptide vaccination before radical prostatectomy for patients with localized prostate cancer. **Prostate**, 67: 933-942, 2007. 査読 (有)
- 13) Sato Y, Harada M., et al. (14人中13番目) Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with a 5-fluorouracil derivative (TS-1) for advanced gastric or colorectal carcinoma patients. **Cancer Science**, 98: 1113-1119, 2007. 査読 (有)
- 14) Homma S, Harada M., et al. (7人中3番目) Differential levels of human leukocyte antigen-class I, multidrug-resistance 1 and androgen receptor expressions in untreated prostate cancer cells: The robustness of prostate cancer. **Oncology Reports**, 18: 343-346, 2007. 査読 (有)
- 15) Itoh Y, Harada M., et al. (8人中8番目) New peptides of the polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) with the potential to induce cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes in HLA-A2+ prostate cancer patients. **Oncology Reports**, 18: 1231-1237, 2007. 査読 (有)
- 16) Komohara Y, Harada M., et al. (8人中2番目) HLA-G as a target molecule in specific

immunotherapy against renal cell carcinoma.

Oncology Reports, 18: 1463-1468, 2007. 査読 (有)

17) Naito M, Harada M. et al. (9人中9番目) Identification of Lck-derived peptides applicable to anti-cancer vaccine for patients with human leukocyte antigen-A3 supertype alleles. **British Journal of Cancer**, 97: 1648-1654, 2007. 査読 (有)

18) Wang Y, Harada M. et al. (7人中2番目) Prostate-specific antigen-reactive cytotoxic T lymphocyte precursors in colon cancer patients. **Oncology Reports**, 15: 317-321, 2006. 査読 (有)

19) Ono T, Harada M. et al. (10人中2番目) Anti-tumor effect of systemic and local immunization with a cytotoxic T lymphocyte-directed peptide in combination with a local injection of OK-432. **Clinical Cancer Research**, 12: 1325-1332, 2006. 査読 (有)

20) Ichikura H, Harada M. et al. (8人中4番目) *In vivo* growth of transitional and renal carcinoma cell lines can be suppressed by adenovirus-mediated expression of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor. **Oncology Reports**, 15: 1333-1337, 2006. 査読 (有)

21) Homma, Harada M. et al. (2人中12番目) Identification of squamous cell carcinoma antigen-derived peptides having the capacity of inducing cancer-reactive CTLs in HLA-A24⁺ cancer patients. **International Journal of Oncology**, 29: 577-587, 2006. 査読 (有)

22) Wang Y, Harada M. et al. (3人中8番目) Identification of Hepatitis C virus (HCV) 2a-derived epitope peptides having the capacity to induce cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A24⁺ and HCV2a-infected patients. **Cellular Immunology**, 241: 38-46, 2006. 査読 (有)

23) Komohara Y, Harada M. et al. (2人中8番目) Anti-cancer vaccine candidates in specific immunotherapy for bladder carcinoma. **International Journal of Oncology**, 29:1555-60, 2006. 査読 (有)

24) Wang Y, Harada M. et al. (8人中3番目) new epitope peptides derived from Hepatitis C virus (HCV) 2a which have the capacity to induce cytotoxic T lymphocytes in HLA- A2⁺ HCV-infected patients. **Microbiol. Immunol.**, 50: 857-865, 2006. 査読 (有)

[学会発表] (計10件)

1) 原田守: 同種造血幹細胞移植後の腎細胞癌患者由来T細胞が認識する新規腫瘍抗原の同定とその発現。第12回基盤的癌免疫研究会総会 2008 7/2-7/3 埼玉

2) 原田守: Cyclophosphamide と adriacycin による抗がん免疫応答の増強。第67回日本癌学会学術総会 2008 10/28-10/30 名古屋

3) HARADA Mamoru: Roles of pro-inflammatory cytokines and Fas in the pathogenesis of inflammatory myopathies. 第38回日本免疫学会総会 2008 12/1-12/3 京都

4) HARADA Mamoru: Vaccination of donors with tumor antigen peptides enhances antitumor effects in nonmyeloablative allogeneic cell therapy. 第66回日本癌学会総会 2007 10/3-10/5 横浜

5) HARADA Mamoru: TRP2 を認識する low avidity CD8⁺ T 細胞の胸腺外分化/Evidence of the extrathymic development of tyrosinase-related protein (TRP)2-recognizing CD8⁺ T cells with low avidity. 第37回日本免疫学会総会 2007 11/20-11/22 東京

6) 原田守: 未治療前立腺癌組織での HLA クラス I, MR P 1 とアンドロゲンレセプター発現の検討。第65回日本癌学会学術集総会 2006 9/28-9/30 横浜

7) 原田守: 腎癌・膀胱癌に対するワクチン療法に有用な抗原ペプチドの検討。第65回日本癌学会学術集総会 2006 9/28-9/30 横浜

8) 原田守: 前立腺癌患者再燃早期におけるテーラーメイドペプチドワクチン療法の可能性。第65回日本癌学会学術集総会 2006 9/28-9/30 横浜

9) HARADA mamoru.: Kinesin superfamily protein-derived peptides with the ability to induce glioma-reactive CTLs in HLA-A24⁺ glioma patients. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006 12/11-12/13 大阪

10) HARADA Mamoru.: Identification of SART3- derived peptides having the potential to induce cancer-reactive CTLs from prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006 12/11-12/13 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 守 (HARADA MAMORU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 50260716