

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791510

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌に対する新規癌抗原の同定と臨床応用に向けての研究

研究課題名（英文）A study for identification of the new cancer antigen for oral squamous cell carcinoma and a study for the clinical application

研究代表者

小林淳一（KOBAYASHI JUNICHI）

札幌医科大学 医学部 研究員

研究者番号：80404739

研究成果の概要：

我々は、自家癌細胞株とその CTL のペアの樹立を行い、CTL による自家癌特異的破壊機構の解析を行った。その結果、HLA-A24 と HLA-A33 に各々拘束性を持つ CTL クローンの樹立に成功した。現在、これらの CTL クローンが認識している抗原について解析中である。また、樹立した HLA-A24 と HLA-A33 の CTL クローンと自家癌細胞株を共培養し、CTL クローンに認識されない自家癌細胞株を樹立した。これらについて DNA アレイを行ったところ、複数の遺伝子で違いが見られた。これら遺伝子の違いが腫瘍免疫における免疫逃避に関わっている可能性があるため現在解析中である。これらの解析が進むことで口腔癌における癌ワクチン療法の発展につながる可能性がある。そして癌ワクチン療法が口腔癌に対する新たな治療戦略を立てる上で重要な役割を果たし、口腔癌患者の QOL に寄与する可能性が高い

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,500,000	0	1,500,000
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

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：(1)口腔癌,(2)腫瘍免疫,(3)癌抗原

1. 研究開始当初の背景

癌に対する治療方法には、従来の外科療法、化学療法、放射線療法が単独もしくは併用されて行われてきたが、近年、癌遺伝子の解析が進み、分子標的療法が癌の新たな治療法として注目され各種分子標的薬が研究、開発され精力的に臨床試験が繰り返されている。それらの中で癌ワクチン療法は比較的早期から臨床試験が開始されていた。当初、悪性黒色種において CD8T 細胞で構成されるキ

ラーT細胞（CTL）の認識する癌抗原ペプチドの構造決定が行われ、欧米で癌特異的免疫療法としてのペプチドを用いた臨床試験が行われ一定の効果を上げた。その後、上皮性腫瘍でも、食道癌、大腸癌で癌抗原ペプチドが同定され、臨床試験が開始されていた。それらの抗原は HLA classI により提示され、それを CD8T 細胞が T 細胞受容体（TCR）を介して認識、活性化し、さらにパーフォリン、グランザイム B など細胞傷害顆粒や、

TNF-TNF 受容体・Fas-Fas リガンドを介した細胞死の機構により抗原を提示する癌細胞を破壊することが知られている。一方、HLA classII により提示され CD4T 細胞が認識する癌抗原ペプチドを明らかにすることでより応用範囲が広がり、治療効果の向上が期待できる。このためにも癌特異的で HLA classI,HLA classII によって提示される、癌抗原ペプチドを同定することは癌の免疫療法を具現化するために不可欠であると思われる。実際、これまで悪性黒色種を中心に様々な癌においても癌抗原がいくつも同定されている。

2. 研究の目的

癌に対する治療方法には、従来の外科療法、化学療法、放射線療法が単独もしくは併用されて行われてきたが、近年、癌遺伝子の解析が進み、分子標的療法が癌の新たな治療法として注目され各種分子標的薬が研究、開発され精力的に臨床試験が繰り返されている。それらの中で癌ワクチン療法は比較的早期から臨床試験が開始されている。当初、悪性黒色種で CD8T 細胞で構成されるキラーT細胞 (CTL) の認識する癌抗原ペプチドの構造決定が行われ、欧米で癌特異的免疫療法としてのペプチドを用いた臨床試験が行われ一定の効果を上げた。その後、上皮性腫瘍でも、食道癌、大腸癌で癌抗原ペプチドが同定され、臨床試験が開始されている。それらの抗原は HLA classI により提示され、それを CD8T 細胞が T 細胞受容体 (TCR) を介して認識、活性化し、さらにパーフォリン、グランザイム B など細胞傷害顆粒や、TNF-TNF 受容体・Fas-Fas リガンドを介した細胞死の機構により抗原を提示する癌細胞を破壊することが知られている。一方、HLA classII により提示され CD4T 細胞が認識する癌抗原ペプチドを明らかにすることでより応用範囲が広がり、治療効果の向上が期待できる。このためにも癌特異的で HLA classI,HLA classII によって提示される、癌抗原ペプチドを同定することは癌の免疫療法を具現化するために不可欠であると思われる。実際、これまで悪性黒色種を中心に様々な癌においても癌抗原がいくつも同定されている。舌扁平上皮癌細胞株 OSC-20 のシステムにおいて、CD4T 細胞に認識される癌抗原ペプチドの提示分子が HLA classII DR8 であり、Fas リガンドを活性化して癌細胞傷害機能を発揮することを頭頸部がんで初めて証明した。

(Jpn.J.CancerRes.88:191-197,1997)。現在、新たな下顎歯肉扁平上皮癌由来の細胞株の樹立に成功し、さらにその細胞株を認識し、高い傷害活性を示す 2 種類の自家 CTL clone の樹立に成功した。これまでの解析で樹立された自家 CTL clone は HLA A-24 拘束性の CTL clone と HLA A-33 拘束性の CTL clone

である事が同定された。抗原エピトープ同定に向けてさらに解析を進めているところである。ところで、現在まで明らかとなった癌抗原ペプチドは悪性黒色種が大多数である。しかし、頭頸部癌、食道癌、胃癌、乳癌など様々な上皮性腫瘍でも癌抗原ペプチドが報告され始めており、今後はそれらの癌抗原ペプチドを用いて癌免疫療法の臨床試験が望まれている。そのためには、癌抗原ペプチド同定の研究の基本となる自家癌とその CTL の樹立をいくつも作成し、CTL の標的のとなる癌抗原遺伝子を次々とクローニングする事が重要である。本研究では、現在までに当教室で樹立した口腔癌細胞株 7 株と新たに口腔扁平上皮癌組織より癌細胞株を樹立し、同一患者の末梢血リンパ球 (PBL) あるいは腫瘍局所浸潤リンパ球 (TIL) を用いて自家癌細胞株を特異的に破壊する。CTL を誘導し、CTL による癌ワクチン療法の原型となる癌抗原ペプチドを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1),すでに樹立された自家癌細胞株とその CTL clone を用いて抗原ペプチドの同定を行う

①、当科で樹立した HLA A24 拘束性自家口腔扁平上皮癌 CTL clone と HLA A33 拘束性自家口腔扁平上皮癌 CTL clone と自家口腔扁平上皮癌 cDNA ライブラリーを用いて抗原ペプチドの同定を行う。

②、得られたペプチドを用いて同じ HLA を有する健常人並びに口腔扁平上皮癌患者の末梢血から CTL の誘導を試みる。つまり、末梢血から樹状細胞を分離して、得られたペプチドをパルスし、さらに T 細胞を刺激してペプチドによる CTL の誘導を検討する。

③、上記のように得られた CTL をもとの癌細胞株に対して傷害することが示されると、同じ HLA を有する癌患者に対する治療効果が期待され、臨床試験が可能になると考えられる。

(2),新たな自家癌細胞株とその CTL のペアの樹立

①、札幌医科大学医学部口腔外科にて治療された口腔扁平上皮癌患者の生検組織あるいは手術材料より癌細胞株を樹立する。また、当科ですでに樹立した口腔癌培養細胞

株 7 株も使用する。

②、樹立した癌細胞株の患者の PBL あるいは TIL を分離し、rIL-2(50IU/ml)を加えた AIM-V^RMedium での培養を行う。

③、X 線照射した自家癌細胞株と PBL あるいは TIL との混合培養を繰り返し行い、CTL を誘導する。

(3),CTL による自家癌特異的破壊機構の解析

①、誘導された CTL の細胞表現型を各種単クローン抗体を用いて、FACS(fluorescence activated cell culture)calbur にて検討を行う。

②、自家癌細胞株並びに同種癌細胞株を用いて、⁵¹Cr release assay あるいは INF- γ assay により細胞傷害活性の測定を行い、自家癌特異的細胞傷害機構の解析を行う。いずれも NK 活性、LAK 活性は除外した条件で行う。

③、CTL の認識する抗原ペプチドの提示分子 (HLA 分子) の決定を各種単クローン抗体を用いた細胞傷害活性抑制試験で行う。

(4),抗原ペプチドの同定

①、cDNA クローニング法あるいは酸抽出法により癌拒絶抗原ペプチドの構造決定を行う。

②、得られたペプチドを用いて同じ HLA を有する健常人並びに口腔扁平上皮癌患者の末梢血から CTL の誘導を試みる。つまり、末梢血から樹状細胞を分離して、得られたペプチドをパルスし、さらに T 細胞を刺激してペプチドによる CTL の誘導を検討する。

③、上記のように得られた CTL がもとの癌細胞株に対して傷害することが示されると、同じ HLA を有する癌患者に対する治療効果が期待され、臨床試験が可能になると考えられる。

すでに樹立した癌細胞株とこれを傷害する

(5),CTL clone を用いて新たな変異癌細胞株を樹立し解析を行う

①、樹立した癌細胞株と CTL clone を共培養し、変異癌細胞株を樹立する。

②、変異癌細胞株とオリジナルの癌細胞株を DNA アレイにて解析をおこなう。

④、変異癌細胞株を用いて MLTC を行い新たな CTL の樹立を行い、癌抗原の同定を目指す。

4. 研究成果

(1),自家癌細胞株とその CTL のペアの樹立を行い。CTL による自家癌特異的破壊機構の解析を行った。その結果、HLA-A24 と HLA-A33 に各々拘束性を持つ CTL クローンの樹立に成功した。現在、これらの CTL クローンが認識している抗原について解析中である。

(2),樹立した HLA-A24 と HLA-A33 の CTL クローンと自家癌細胞株を共培養し、CTL クローンに認識されない自家癌細胞株を樹立した。

(3),(2)の癌細胞株の DNA アレイを行ったところ、複数の遺伝子で違いが見られた。

(4),(3)の結果よりこれら遺伝子の違いが腫瘍免疫における免疫逃避に関わっている可能性があるため現在解析中である。

(5),これらの解析が進むことで口腔癌における癌ワクチン療法の発展につながる可能性がある。そして癌ワクチン療法が口腔癌に対する新たな治療戦略を立てる上で重要な役割を果たし、口腔癌患者の QOL に寄与する可能性が高い。

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 2 件)

① Junichi Kobayashi, Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Satomi Idenoue, Akihiro Miyazaki, Akira Yamaguchi, Hiroyoshi Hiratsuka and Noriyuki Sato

Comparative study on the immunogenicity between an HLA-A24-restricted cytotoxic T-cell epitope derived from survivin and that from its splice variant survivin-2B in oral cancer patients.

Journal of Translational Medicine

査読あり

巻 7-1

2009 年ページなし

②Jun-Ichi Kobayashi, Yoshihiko Hirohashi, Toshihiko Torigoe, Yoshitaka Michifuri, Takashi Yamamoto, Yasuaki Tamura, Kenjiro Kamiguchi, Akihiro Miyazaki, Akira Yamaguchi, Hiroyuki Hariu, Hiroyoshi Hiratsuka and Noriyuki Sato

Clonal diversity of cytotoxic T lymphocytes that recognize autologous oral squamous cell carcinoma.

Human Immunology

査読あり

巻 70(2)

2009年 89-95

〔学会発表〕(計2件)

①小林 淳一

口腔癌患者における HLA class I と survivin の発現に関する免疫組織学的検討

日本口腔腫瘍学会学術総会

2008年1月24日 大分

②小林 淳一

口腔扁平上皮がんに対する survivin がんワクチン療法確立に向けた研究

日本口腔腫瘍学会学術総会

2007年2月2日 名古屋