

平成22年5月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591653

研究課題名（和文） 肺癌の転移進展に伴う細胞性免疫および液性免疫応答の解析

研究課題名（英文） Analysis of tumor-specific immune response during progression and metastasis in lung cancer

研究代表者

竹之山 光広 (TAKENOYAMA MITSUHIRO)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10309966

研究成果の概要（和文）：

肺癌は未だ予後不良の悪性腫瘍であり、新たな治療法の開発のためには癌の進展・転移過程における宿主免疫反応の解析が、がんの新たな診断・治療を開発する上で重要な基盤的知見になりうると考えられる。本研究では、自己原発巣由来細胞株-転移巣由来細胞株-自己リンパ球の系を用いて、原発巣と転移巣に対する複数の細胞障害性Tリンパ球(CTL)の誘導・樹立が可能となり、その中でCTLが認識する新規の肺癌関連抗原を同定した。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of developing immunotherapy as new modalities against lung cancer patients with poor prognosis, it is necessary to elucidate tumor-specific immune responses during progression and metastasis of tumors. In this study, we succeeded in detecting several tumor-specific cytotoxic T lymphocytes against primary and metastatic lung cancer. Among them, ribosomal protein L19 was identified as a novel over-expressed tumor antigen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科

キーワード：肺癌、免疫応答、転移、腫瘍抗原

## 1. 研究開始当初の背景

固形癌のなかで肺癌発生は増加の一途をたどっており、手術療法・化学療法・放射線療法をもってしても未だ予後不良の悪性腫瘍である。特に、診断時に転移を伴い根治手術が不能な例や治療後の再発例に対して、既存の治療法による集学的治療を行っても未だ十分な成果が得られておらず、様々な角度から新たな治療法の開発が望まれている。癌治療の成績を向上させるためには癌の転移をコントロールすることが、必要不可欠であると考えられる。癌の転移には、さまざまな要因が関わっているものの、大きく分けると、癌細胞側の性質と宿主側の要因に分けられる。特に後者では宿主免疫能が重要と考えられている。しかしながら、実際は宿主の抗腫瘍免疫応答が存在しても癌の進展・転移により死に至ってしまう。ヒト固形癌において転移形成の過程における宿主免疫応答の解析やその癌特異的免疫反応に関わる分子レベルでの解析は難しく、そのためわれわれは、癌細胞株樹立と同一症例のリンパ球を用いて自己腫瘍-自己リンパ球の実験システムを構築し、これら autologous の実験系を用いて、肺癌患者生体内に自家肺癌特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を腫瘍内浸潤リンパ球・所属リンパ節リンパ球から誘導可能なことを見いだしてきた。さらにこの CTL を clone 化し、自己肺癌細胞株から作成した cDNA library を用いて CTL をプローブとした cDNA 発現クローニング法により CTL の認識する腫瘍関連抗原を同定してきた。これらの autologous の実験系を用いて、癌の転移・進展過程における宿主免疫応答の解析を行うことにより、癌の新たな診断・治療を開発する上で重要な基盤的知見になりうると考えられる。

## 2. 研究の目的

われわれはこれまで手術検体などから肺

癌、悪性中皮腫、乳癌、メラノーマなどの多くの癌細胞株を樹立してきた。その中には、同一症例において原発巣の癌細胞株と転移巣の癌細胞株を異なった時期に樹立し得た貴重な症例も複数存在する。本研究では今まで蓄積してきた、自己原発巣由来細胞株-転移巣由来細胞株-自己リンパ球の系を用いて、実際に転移の過程で惹起されたと考えられる免疫応答を検出するとともに、その免疫反応をプローブとして利用し、実際に癌患者生体内で生じた腫瘍特異的免疫細胞が認識する腫瘍抗原を同定・解析し、実際のヒト固形癌の転移の過程で生じている腫瘍細胞の生物学的特性の変化、癌特異的免疫応答を解明することにより、癌の転移・進展過程をコントロールできる新たな治療法の開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺癌患者からの癌細胞株の樹立

本研究に以下の症例から肺癌細胞株を樹立し用いた。

- ①原発巣と皮下転移巣の癌細胞株を樹立した大細胞内分泌癌 (J206 症例)
- ②原発巣と副腎転移巣の癌細胞株を樹立した肺多形癌症例 (G603 症例)
- ③原発巣の癌細胞株を樹立し、リンパ節転移を来した肺腺癌症例 (H1224 症例)
- ④原発巣と癌性胸膜炎から癌細胞株を樹立した肺腺癌症例 (K420 症例)

### (2) 原発巣・転移巣の生物学的特性の相違の解析

樹立した原発巣由来細胞株と転移巣由来細胞株での HLA class I をはじめとする細胞表面分子の相違をフローサイトメトリーで解析する。

### (3) 癌の転移に伴う免疫応答の検出

原発巣由来癌細胞株とリンパ球を共培養することで CTL を誘導し、その CTL の自己腫瘍に対する認識と腫瘍特異性を解析する。

他科肺癌細胞株に対する反応性により HLA 拘束性を決定する。これをプローブとして cDNA expression cloning 法により抗原遺伝子を同定する。CTL clone の数に限りがあるものは、TCRa 鎖、b 鎖をクローニングし TCR 移入エフェクター細胞を作成する。

(4) 腫瘍関連抗原の各種癌組織での発現およびその機能解析

同定した抗原遺伝子発現を当科で保存している切除標本を用いて、RT-PCR、免疫組織化学染色にて解析する。また抗原遺伝子の機能解析のために、In vitro での siRNA を用いた腫瘍細胞株の機能抑制試験を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 原発巣・転移巣の生物学的特性の相違の解析

肺大細胞内分泌癌の原発巣および皮下転移巣から樹立した細胞株 J206L、J206SC を用いた。細胞表面マーカーの解析を行ったところ、HLA class I genotype, LFA-3, FasL, HLA-class I の発現に差異はなかった。ICAM-1 の発現は原発巣で 74.8%, 転移巣で 15.2%、Fas の発現は原発巣で 57.3%, 転移巣で 1.6% と有意に発現低下を認めた。J206L に CD80 を移入し、凍結保存していた自己所属リンパ節リンパ球と共培養を行い、J206L 特異的 Bulk CTL を誘導しえたが、CTL clone は樹立できなかった。

(2) 癌の転移に伴う免疫応答の検出

K420PL は肺腺癌術後の経過観察中に発症した癌性胸水から樹立した HLA haplotype loss を認める癌細胞株であり、HLA-class I および HLA-class II はともに陽性であった。K420PL に CD80 を移入し、手術時に採取保存していたリンパ節リンパ球と共培養し、自己腫瘍を特異的に障害する Bulk CTL を誘導し、限界希釈法で T cell clone を得た。得られたクローンには CD8 陽性細胞はなく、自己腫瘍に反応を示した clone は CD4 陽性であり、自己腫瘍に対し HLA-DR 拘束性に IFN- $\gamma$  を産生した。

さらに、他科肺癌細胞株を HLA-DR1502 拘束性に認識することより、CD4+ T cell に認識される HLA-DR15 拘束性の共通抗原の可能性が示唆された。

肺腺癌患者の原発巣から樹立した細胞株 H1224L に CD80 を移入し、リンパ節リンパ球と共培養することにより、HLA-class I 拘束性自己腫瘍特異的 CTL clone (CD8 陽性) を樹立した。この CTL clone は、HLA-A31 拘束性に他家肺癌細胞株を認識した。cDNA expression cloning 法にて、CTL clone の認識する抗原遺伝子を単離した。この遺伝子は Ribosomal protein L19 (RPL19) を code していた。さらに CTL の認識する 9-mer の epitope peptide を同定した。

肺多形癌の原発巣 (G603L) と転移巣 (G603L-AD) から樹立した腫瘍細胞株に対し、原発巣由来細胞株を認識して転移巣由来細胞株を認識しない CTL clone の腫瘍認識機構の解析を進めるために、細胞数に限りのある CTL clone から TCR 遺伝子をクローニングし、今後の安定した実験形に応用する目的で、T 細胞受容体遺伝子 (Va34, Vb5.1) の a 鎖、b 鎖の full length のクローニングを行い、翻訳効率の高い linker である 2A で TCRa 鎖と TCRb 鎖つなぎ、PMX レトロウイルスベクターに組み込んだ。さらに、G603L より cDNA library を作成し、cDNA 発現クローニング法によるスクリーニングをおこなっている。

(3) 腫瘍関連抗原の各種癌組織での発現およびその機能解析

HLA-A31 拘束性腫瘍関連抗原 RPL19 は、real time PCR の解析により正常肺と比べ肺癌細胞に高発現し、腫瘍細胞での抗原発現量と CTL の反応性が正の相関を示していたことより、新規の過剰発現抗原の可能性が示唆された。免疫組織化学染色による解析では、非小細胞肺癌 40 例中 12 例 (40%) に癌組織での RPL19 の高発現を認め、その他の癌組織では、乳癌 10%、食道癌 20%、

大腸癌 60%で過剰発現を認めた。RPL19 の機能解析のため siRNA を作成し、肺癌細胞株に作用させた結果、肺癌細胞の増殖抑制効果がみられ、cyclinD1, D3 の抑制と p27 kip1, p16 INK4A の増強が認められ、さらに G1 期の割合の増加, S 期の割合の減少が観察されたことより、cell cycle に関与することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Kuroda, K. · Takenoyama, M. · Baba, T. · Shigematsu, Y. · Shiota, H. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · Uramoto, H. · Hanagiri, T. · Yasumoto, K. : Identification of ribosomal protein L19 as a novel tumor antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 101:46-53, 2010(査読有)
- ② Shigematsu, Y. · Hanagiri, T. · Shiota, H. · Kuroda, K. · Baba, T. · Mizukami, M. · So, T. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · So, T. · Takenoyama, M. · Yasumoto, K. : Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 68:105-110, 2010(査読有)
- ③ Hanagiri, T. · Takenoyama, M. · Yasumoto, K. : Current status and perspectives on immunotherapy for lung cancer. *Curr Res in Cancer*, 3:75-87. 2009(査読無)
- ④ 花桐武志 · 竹之山光広 · 安元公正: 肺癌の免疫療法の現況と展望. *呼吸器科*, 15(2):132-138. 2009(査読無)
- ⑤ Nagata, Y. · Hanagiri, T. · Mizukami, M. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · So, T. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Nagashima, A. · Yasumoto, K. : Clinical significance of HLA class I alleles on postoperative prognosis of lung cancer patients in Japan. *Lung Cancer*, 65(1):91-97. 2009(査読有)
- ⑥ Shigematsu, Y. · Hanagiri, T. · Kuroda, K. · Baba, T. · Mizukami, M. · Ichiki, Y. · Yasuda, M. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Malignant mesothelioma-associated antigens recognized by tumor-infiltrating B cells and the clinical significance of the antibody titers. *Cancer Sci*, 100(7):1326-1334. 2009(査読有)

- ⑦ Yasumoto, K. · Hanagiri, T. · Takenoyama, M. : Lung cancer-associated tumor antigens and the present status of immunotherapy against non-small-cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 57(9):449-457. 2009(査読有)
- ⑧ 花桐武志 · 竹之山光広 · 安元公正: 癌免疫療法—最近の話題から—, *Biotherapy*, 23(6):401-407. 2009(査読無)
- ⑨ Baba, T. · Hanagiri, T. · Ichiki, Y. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Mizukami, M. · Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci*, 98(11):1795-1802, 2007(査読有)
- ⑩ Mizukami, M. · Hanagiri, T. · Yasuda, M. · Kuroda, K. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Fukuyama, T. · Nagata, Y. · So, T. · Ichiki, Y. · Sugaya, M. · So, T. · Takenoyama, M. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Antitumor Effect of Antibody against a SEREX-Defined Antigen (UOEH-LC-1) on Lung Cancer Xenotransplanted into Severe Combined Immunodeficiency Mice. *Cancer Res*, 67(17):8351-8357, 2007(査読有)
- ⑪ Fukuyama, T. · Ichiki, Y. · Yamada, S. · Shigematsu, Y. · Baba, T. · Nagata, Y. · Mizukami, M. · Sugaya, M. · Takenoyama, M. · Hanagiri, T. · Sugio, K. · Yasumoto, K. : Cytokine production of lung cancer cell lines: Correlation between their production and the inflammatory/immunological responses both in vivo and in vitro. *Cancer Sci*, 98(7):1048-1054, 2007(査読有)
- ⑫ 竹之山光広 · 花桐武志 · 安元公正: 肺癌に対する免疫応答と免疫療法. *細胞* 39(6):260-263, 2007(査読無)

[学会発表] (計 30 件)

- ① 黒田耕志 · 竹之山光広 · 宗知子 · 塩田広宣 · 馬場哲郎 · 重松義紀 · 永田好香 · 宗哲哉 · 市来嘉伸 · 安田学 · 小野憲司 · 浦本秀隆 · 花桐武志 · 安元公正: 新規腫瘍抗原 Ribosomal protein L19 の発現と機能の解明, 第 63 回日本呼吸器学会 · 日本結核病学会九州支部秋季学術講演会, 北九州, 2009 年 11 月 26-27 日
- ② 重松義紀 · 塩田広宣 · 黒田耕志 · 馬場哲郎 · 宗哲哉 · 小野憲司 · 浦本秀隆 · 宗知子 · 竹之山光広 · 花桐武志 · 安元公正: T

- 細胞受容体移入  $\gamma$   $\delta$  T細胞を用いた特異的癌免疫療法の開発, 第 63 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会, 北九州, 2009 年 11 月 26-27 日
- ③ 竹之山光広・花桐武志・宗知子・安田学・市来嘉伸・宗哲哉・永田好香・馬場哲郎・重松義紀・黒田耕志・小野憲司・浦本秀隆・安元公正: 肺癌における細胞障害性 T 細胞が認識する腫瘍抗原の同定, 第 62 回日本胸部外科学会定期学術集会, 横浜 2009 年 10 月 11-14 日
- ④ Hanagiri, T.・Yasuda, M.・Kuroda, K.・Shigematsu, Y.・Baba, T.・So, T.・Ono, K.・Uramoto, H.・So, T.・Takenoyama, M.・Yasumoto, K.: The identification of tumor antigens associated with asbestos-related lung cancer. 13th World Conference on Lung Cancer, San Francisco, USA, 2009 年 7 月 31-8 月 4 日
- ⑤ 重松義紀・塩田広宣・黒田耕志・馬場哲郎・宗哲哉・市来嘉伸・小野憲司・浦本秀隆・宗知子・竹之山光広・花桐武志・安元公正: T細胞受容体移入  $\gamma$   $\delta$  T細胞を用いた特異的癌免疫療法の開発. 第 13 回日本がん免疫学会総会, 北九州, 2009 年 6 月 24-25 日
- ⑥ 黒田耕志・竹之山光広・馬場哲郎・重松義紀・宗哲哉・市来嘉伸・小野憲司・安田学・浦本秀隆・宗知子・花桐武志・安元公正: HLA 発現異常を有する肺癌に対する腫瘍特異的 T リンパ球の解析. 第 13 回日本がん免疫学会総会, 北九州, 2009 年 6 月 24-25 日
- ⑦ 安田学・花桐武志・黒田耕志・鬼塚貴光・重松義紀・馬場哲郎・永田好香・宗哲哉・小野憲司・浦本秀隆・宗知子・竹之山光広・安元公正: 石綿関連肺癌に対する液性免疫応答の解析. 第 13 回日本がん免疫学会総会, 北九州, 2009 年 6 月 24-25 日
- ⑧ 竹之山光広・重松義紀・塩田広宣・黒田耕志・馬場哲郎・市来嘉伸・花桐武志・安元公正: 腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子移入による抗腫瘍エフェクター細胞の誘導 (第 2 報). 第 62 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部春季学術講演会, 那覇, 2009 年 5 月 23 日
- ⑨ 黒田耕志・馬場哲郎・竹之山光広・重松義紀・宗哲哉・市来嘉伸・安田学・宗知子・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: HLA class I 発現陰性肺癌細胞に対する腫瘍特異的細胞性免疫応答の解析. 第 30 回癌免疫外科研究会, 久留米, 2009 年 5 月 21-22 日
- ⑩ 黒田耕志・塩田広宣・重松義紀・馬場哲郎・水上真紀子・市来嘉伸・安田学・大賀丈史・竹之山光広・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: 非小細胞肺癌における HLA 発現と免疫応答の解析. 第 26 回日本呼吸器外科学会総会, 北九州, 2009 年 5 月 14-15 日
- ⑪ 安田学・花桐武志・水上真紀子・塩田広宣・黒田耕志・重松義紀・馬場哲郎・永田好香・宗哲哉・市来嘉伸・菅谷将一・浦本秀隆・宗知子・大賀丈史・竹之山光広・杉尾賢二・安元公正: 肺癌に対する新規抗体療法の開発. 第 26 回日本呼吸器外科学会総会, 北九州, 2009 年 5 月 14-15 日
- ⑫ 黒田耕志・竹之山光広・馬場哲郎・塩田広宣・重松義紀・水上真紀子・市来嘉伸・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: 肺癌における HLA class I 分子の発現と細胞性免疫応答. 第 21 回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 東京, 2008 年 11 月 18-19 日
- ⑬ 黒田耕志・竹之山光広・馬場哲郎・塩田広宣・重松義紀・永田好香・水上真紀子・市来嘉伸・安田学・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: 肺癌症例における腫瘍特異的 CD4 + T 細胞の免疫応答. 第 49 回日本肺癌学会総会, 北九州, 2008 年 11 月 14-15 日
- ⑭ 馬場哲郎・塩田広宣・黒田耕志・重松義紀・水上真紀子・市来嘉伸・竹之山光広・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: HLA class I 発現を欠失した肺癌症例での新規癌関連抗原の同定. 第 49 回日本肺癌学会総会, 北九州, 2008 年 11 月 14-15 日
- ⑮ 竹之山光広・塩田広宣・黒田耕志・重松義紀・馬場哲郎・水上真紀子・市来嘉伸・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: 腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子移入による抗腫瘍エフェクター細胞の誘導. 第 61 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会, 宜野湾, 2008 年 11 月 6-7 日
- ⑯ 黒田耕志・竹之山光広・塩田広宣・重松義紀・馬場哲郎・水上真紀子・市来嘉伸・花桐武志・杉尾賢二・安元公正: 肺腺癌における CTL の認識する新規腫瘍抗原 Ribosomal Protein L19 の同定. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008 年 10 月 28-30 日
- ⑰ Kuroda, K.・Takenoyama, M.・Baba, T.・Shiota, H.・Shigematsu, Y.・Mizukami, M.・Ichiki, Y.・Yasuda, M.・Hanagiri, T.・Sugio, K.・Yasumoto, K.: Identification of human ribosomal protein L19 as a novel overexpressed tumour antigen recognized by autologous CTL in human lung adenocarcinoma. 2008 World Cancer Congress, Geneva, Switzerland, 2008 年 8 月 27-31 日
- ⑱ 塩田広宣・黒田耕志・重松義紀・馬場哲郎・水上真紀子・市来嘉伸・竹之山光広・

花桐武志・杉尾賢二・安元公正:T細胞受容体移入細胞を用いた抗腫瘍エフェクターの作成. 第 29 回癌免疫外科研究会, 東京, 2008 年 6 月 19-20 日

- ①9 黒田耕志・竹之山光広・宗知子・塩田広宣・重松義紀・馬場哲郎・永田好香・水上真紀子・市来嘉伸・安田学・野添忠浩・花桐武志・杉尾賢二・安元公正:細胞障害性Tリンパ球が認識する過剰発現肺癌抗原Ribosomal protein L19 の同定と発現解析. 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 長崎, 2008 年 5 月 15-17 日
- ②0 竹之山光広・黒田耕志・塩田広宣・馬場哲郎・重松義紀・永田好香・水上真紀子・市来嘉伸・安田学・野添忠浩・花桐武志・杉尾賢二・安元公正:癌精巢抗原KK-LC-1 mRNAを移入したPHA blastを用いた新たなreverse immunology法の確立, 第 60 回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台, 2007 年 10 月 17-20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹之山 光弘 (TAKENOYAMA MITSUHIRO)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 1 0 3 0 9 9 6 6

### (2) 研究分担者

安元 公正 (YASUMOTO KOSEI)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 3 0 1 5 0 4 5 2  
花桐 武志 (HANAGIRI TAKESHI)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 3 0 2 9 9 6 1 4  
安田 学 (YASUDA MANABU)  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 5 0 3 5 2 3 0 7  
(H19→H20: 連携研究者)