

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790962

研究課題名（和文）SPARC を標的分子としたスキルス胃癌に対する診断、治療法の開発

研究課題名（英文）Identification of a novel tumor-associated antigen, SPARC, as a possible target for diagnosis and therapy of scirrhous gastric cancers

研究代表者

生田 義明（IKUTA YOSHIAKI）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70452894

研究成果の概要（和文）：

新規腫瘍関連抗原 SPARC の HLA-A24 (A*2402) 拘束性 CTL エピトープを同定した。さらに、健康人および癌患者の末梢血から、このペプチドを用いて誘導した SPARC 特異的 CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、抗原特異的な細胞傷害活性を示した。また、マウスを用いた動物実験にて、抗腫瘍効果を発現した。以上より、SPARC を標的とした抗腫瘍免疫療法の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：

We identified HLA-A24-restricted and SPARC-derived CTL epitope peptides. By using these peptides, we tried to induce HLA-A24 (A*2402) -restricted and SPARC-reactive human CTLs, and demonstrate an antitumor immune response. The SPARC peptides-reactive CTLs were successfully induced from PBMCs of positive healthy donors and cancer patients by *in vitro* stimulation, and these CTLs exhibited cytotoxicity specific to cancer cells expressing both SPARC and HLA-A24. The adoptive transfer of the SPARC-specific CTLs could inhibit the tumor growth in NOD/SCID mice bearing human cancer cells expressing both HLA-A24 and SPARC. These findings suggest that SPARC is a potentially useful target candidate for cancer immunotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
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・消化器外科学

キーワード：cDNA マイクロアレイ，SPARC，分子標的療法，免疫療法

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、cDNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現の組織特異性から、食道癌の抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原 PP-RP の同定と、その抗原性の解析、およびメラノーマに高発現する Glypican-3 を用いた癌の診断法について報告した (Yoshitake Y., et al, Clin. Cancer Res. 10: 6437-6448, 2004) (Nakatsura, T. et al. Clin. Cancer Res. 10: 6612-6621, 2004)。

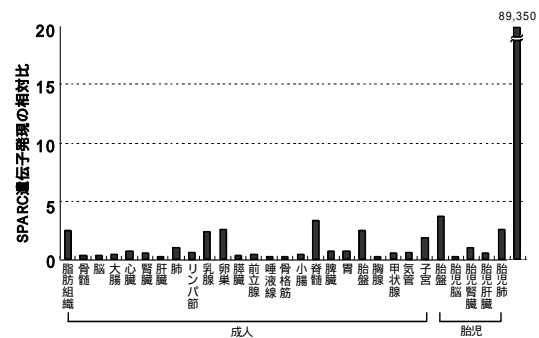
胃癌組織および正常組織における、23,040 種の遺伝子の発現をゲノムワイドの cDNA マイクロアレイを用いて解析した結果、難治性癌としてまだ十分な治療法の確立されていないびまん性浸潤性 (スキルス) 胃癌の患者 13 例中 11 例で、正常胃粘膜と比較して胃癌組織において 5 倍以上 (平均 13 万倍) 高発現する遺伝子として、Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) を同定した (Fig.1)。SPARC 遺伝子は、脂肪組織、乳腺、卵巣、脊髄、精巣、子宮、胎盤などに軽度の発現を認めたが、正常胃粘膜と比較し、いずれも 5 倍以下の低い発現であった (Fig.2)。

SPARC は、スキルス胃癌に高発現しているだけでなく、メラノーマにも高発現しており、メラノーマ細胞株培養上清中に SPARC が分泌されていた。また、実際にメラノーマ患者の 33% において、血清中の SPARC 値が増加し、メラノーマの検出に有用であることをすでに報告した (Ikuta Y., et al, Clin. Cancer Res. 11: 8079-8088, 2005)。

(Fig.1) cDNA マイクロアレイ解析より同定したスキルス胃癌に高発現する遺伝子群

(Fig.2) cDNA マイクロアレイ解析による正常組織における SPARC の発現

Up-regulated gene in diffuse gastric cancer	Relative expression rate (Cancer/Normal tissue)					Average
	0	5	10	100	1,000	
COL4A1		•••••	•••••	•••••	•••••	22.9
COL4A2	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	23.2
SERPING1	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	29,731
SPARC	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	133,359
MSLN			•••••	•••••	•••••	121,529
MGC27165		•••••	•••••	•••••	•••••	16.3
COL3A1	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	8.79
COL1A1	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	7.6
IFITM2	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	5.6
MMP7	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	93,279
TGFBI	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	28.2
CLDN7	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	6.7



SPARC は多様な機能をもつ細胞-細胞間質糖蛋白質であり、コラーゲンなどの細胞外基質蛋白を結合することにより、細胞間質と細胞との相互作用を調節している。また、細胞の接着阻止や増殖抑制、様々な増殖因子・増殖抑制因子の調節などに関与している。多くの腫瘍で、腫瘍内部の間質細胞を中心に高発現しており、癌細胞が分泌する SPARC が好中球の抗腫瘍作用を抑制し、エスケーブ機構様の働きをするとの報告もある (Alvarez. MJ et al, Cancer Res, 65: 5123-5132, 2005)。最近では、膀胱癌周囲の線維芽細胞における SPARC の発現が強い症例ほど予後が悪いとの報告 (Jeffrey RI et al, J Clin Oncology, 25: 319-325, 2007) や、SPARC を高発現する細胞ほど化学療法の感受性が高いとの報告 (Tai. IT et al, J Clin Invest, 115: 1492-1502, 2005) (Michelle JT. et al, J Biol Chem, in press, 2007) もあり、その多様な機能に注目が集まっている。

スキルス胃癌の cDNA マイクロアレイ解析により新たな腫瘍関連抗原 SPARC を同定した。SPARC は腫瘍のみならず、腫瘍の間質にも高発現している。本研究は、SPARC の機能解析、それを用いた癌の診断および分子標的療法のターゲットとして抗体療法、免疫療法などの治療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

また、マウスの乳癌の間質細胞から分泌される SPARC が、腫瘍間質を増生させ、腫瘍の増殖を促進させるとの報告も行われている (Sangaletti S et al, J Exp Med, 198: 1475-1485, 2003)。

SPARC は様々な癌腫で、局所の浸潤度、リンパ節転移、肝転移、予後などとの関連が報告されている。また、多くの癌では、SPARC は、主に癌の間質細胞に発現しており、間質を増生し、癌の進行を促す分子ではないかと

考えられている。以上のことから、SPARC は、多様な癌の分子標的治療における有効な標的抗原となる可能性があると考えられる。

スキルス胃癌は、他の胃癌と比較して、若年者に発生し、癌の浸潤、転移、腹膜播種の傾向が強く、予後が不良である。これらの癌は、診断時にすでに外科的切除不能であることも多く、たとえ切除可能であっても、治療後の再発例が多く、早急に新たな治療法を確立する必要がある。スキルス胃癌に高発現する SPARC を標的とした早期診断や治療法が確立できれば、臨床意義は極めて大きいと考えられる。

2. 研究の目的

スキルス胃癌の cDNA マイクロアレイ解析により同定した新たな腫瘍関連抗原 SPARC は、腫瘍のみならず、腫瘍の間質にも高発現している。また、スキルス胃癌のみならず、膀胱癌やメラノーマなど多くの癌で高発現することが報告されている。スキルス胃癌は、他の胃癌と比較して、若年者に発生し、癌の浸潤、転移、腹膜播種の傾向が強く、予後が不良である。これらの癌は、診断時にすでに外科的切除不能であることも多く、たとえ切除可能であっても、治療後の再発例が多く、早急に新たな治療法を確立する必要がある。本研究では、SPARC の機能解析を行い、それを用いたスキルス胃癌の診断および分子標的療法のターゲットとして抗体療法、免疫療法などの治療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スキルス胃癌の診断における血清 SPARC 蛋白測定の意義についての検討

スキルス胃癌、通常型胃癌をはじめとした各種癌患者の血清サンプルを収集し、ELISA 法により、血清 SPARC 値の測定に、様々な癌の診断的意義があるか否かについて検討を行う。

(2) スキルス胃癌の切除組織における間質および癌細胞の SPARC 蛋白の発現を検討し、それが予後因子となるか否かを検討する。

スキルス胃癌の切除組織を対象として、抗ヒト SPARC 抗体を用いた SPARC の免疫組織学的染色を行い、各症例の癌細胞および間質の線維芽細胞における SPARC 蛋白の発現を詳細に検討する。癌細胞および線維芽細胞における SPARC の発現の程度により、SPARC 高発現群、SPARC 中等度発現群、SPARC 未発現群に対象群を分け、癌の進行度、生存率、無再発率や治療効果と相関が認められるかを検討する。

(3) SPARC ペプチドを用いたがん免疫療法についての検討

ヒト HLA-A24 およびマウス H2-K^d に共通した結合モチーフを持つ SPARC ペプチドを合成し、これらを負荷した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を、BALB/c マウスの腹腔内に 2 回免疫後に脾細胞を回収し、各ペプチド特異的 CTL 誘導の有無を IFN- γ -ELISPOT 法にて検討し、HLA 拘束性に SPARC 陽性細胞株を傷害する SPARC ペプチド特異的 CTL がマウスにおいて誘導できるか否かを検討する。また、実際にそれらのペプチドを免疫することで、マウスに移植した癌細胞の増殖が抑制され、生存期間の延長を誘導することができるか検討する。

さらに、実際に健康人ならびに癌患者の末梢血単核細胞 (PBMC) から分離した CD14 陽性細胞から GM-CSF を用いて誘導した DC および PHA プラスト細胞に負荷し、CD8 陽性細胞を 3 回刺激して CTL を誘導し、IFN- γ -ELISPOT 法と Cr 放出試験により抗原特異的 CTL が誘導されるか否かを検討する。

さらに NOD/SCID マウスに SPARC を発現しているヒト腫瘍細胞株を接種し、健康人由来の SPARC 特異的 CTL の静注による、抗腫瘍効果を検討する。また、これらのペプチドを負荷した健康人由来 CD14 陽性細胞から誘導した DC に SPARC ペプチドを負荷して、CD8 陽性細胞と共に NOG マウスの腹腔内に注入した。7 日後に再度ペプチド負荷 DC を腹腔内投与し、NOG マウス体内における SPARC 特異的なヒト CTL を、NOG マウス脾臓細胞より、ヒト CD8 陽性細胞を分離して、IFN- γ -ELISPOT 法により検出する。

4. 研究成果

(1) スキルス胃癌の診断における血清 SPARC 蛋白測定の意義についての検討

スキルス胃癌、通常型胃癌、スキルス乳癌、その他の乳癌患者の血清サンプルを収集し、ELISA 法にて血清 SPARC 値を測定したが、血清 SPARC 値の有意な差は認めなかった。

(2) スキルス胃癌の切除組織における間質および癌細胞の SPARC 蛋白の発現を検討し、それが予後因子となるか否かを検討する。

多様な癌細胞株における RT-PCR により SPARC mRNA の発現が確認されたが、正常組織の RT-PCR では脊髄、小腸、肺などに軽度に発現を認めたが、癌細胞と比較すると低かった。また免疫組織化学的染色において胃癌、大腸癌、膀胱癌の組織において、SPARC が癌および癌周囲の間質に発現していたが、正常組

織では精巢のみに発現していた。SPARC の発現と予後との相関は明らかではなかった。

(3) SPARC ペプチドを用いたがん免疫療法についての検討

BALB/c マウスにおいて、自己免疫現象を伴うことなく、K^d拘束性に SPARC 陽性細胞株を傷害する SPARC ペプチド特異的 CTL を誘導できた。さらに、*in vivo* 実験においては、移植した腫瘍の生着を拒絶でき、生存期間の延長を誘導できた。

HLA-A24 に結合しうると推定された 2 種類の SPARC ペプチドを用いて、健常人および癌患者の PBMC から、抗原特異的な HLA-A24 拘束性 CTL を誘導することができた。これらの CTL は、*in vitro* で抗原特異的かつ HLA-A24 拘束性の細胞傷害活性を示すのみでなく、SPARC を発現するヒト腫瘍細胞株を接種した NOD/SCID マウスに、SPARC 特異的ヒト CTL を静注することにより抗腫瘍効果が観察された。また NOG マウスを用いて SPARC ペプチドを負荷したヒト DC を、ヒト CD8 陽性細胞と共にマウスの腹腔内に移入することにより、マウス体内で SPARC 特異的 CTL が誘導された。

以上より、SPARC を標的とした抗腫瘍免疫の有用性が示された。

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 8 件)

Yokomine K : The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy, *Int J Cancer*. 126(9)2153-63, 2010, 査読有

Inoue M : Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers., *Int J Cancer*, 2010, 査読有 Epub ahead of print

Fukushima S : Multiple antigen-targeted immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunother*, 32(3)219-31, 2009, 査読有

Ikuta Y : Identification of the H2-K^d-restricted cytotoxic T lymphocyte

epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice., *Cancer Science* 100(1), 132-137, 2009, 査読有

Koga Y : ORP5 (oxysterol-binding protein-related protein-5) is related to invasion and poor prognosis in pancreatic cancer, *Cancer Science* 99, 2387-94, 2008, 査読有

Motomura Y : HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: preclinical study using mice., *International Journal of Oncology* 32(5), 985-990, 2008, 査読有

Harao M : HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL., *International Journal of Cancer* 123(11), 2616-2625., 2008, 査読有

Imai K : Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin 3 /P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers., *Clinical Cancer Research* 14(20), 6487-6495, 2008, 査読有

[学会発表](計 5 件)

井上 光弘 : 新規癌関連抗原 SPARC を標的とした癌免疫療法の開発, 第30回 癌免疫外科学会, 2009年5月21日, 福岡・萃香園ホテル

井上 光弘 : 新規癌抗原 SPARC を用いた癌免疫療法の開発, 第109回日本外科学会, 2009年4月4日, 福岡サンパレス

今井 克憲 : 膵癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 RAB6/KIFL KIF20A の同定, 第109回日本外科学会, 2009年4月4日, 福岡サンパレス

林田 裕希 : 癌抗原 SPARC を標的としたマウス癌免疫療法モデルの構築, 第67回日本癌学会総会, 2008年10月29日, 名古屋国際会議場

井上 光弘 : 新規癌特異的抗原 SPARC を用いた癌免疫療法モデルの確立, 第63回日本消化器外科学会総会, 2008年7月16日ロイトン札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

生田 義明 (IKUTA YOSHIAKI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70452894

(2)研究分担者

(3)連携研究者