

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592080

研究課題名(和文)呼吸器悪性腫瘍における自家がん特異的免疫応答を利用した新規腫瘍抗原の同定

研究課題名(英文) Identification of novel tumor antigen by using autologous-tumor specific immune responses in thoracic malignancies

研究代表者

竹之山 光広 (Takenoyama, Mitsuhiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：10309966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：予後不良の呼吸器悪性腫瘍に対する新たな治療法としての免疫療法の開発には、実際に癌患者に生じている自家がん特異的免疫応答を解析していくことが重要と考えられる。本研究では、肺癌患者の自家リンパ球を用いたautologousの実験系により、新たに複数のCTLを得た。そのうち大細胞癌患者から樹立したCTL cloneは、自家がん細胞株、腺癌株、扁平上皮癌株をHLA-A24拘束性に認識した。cDNA発現クローニング法によりCTLの認識する抗原をコードするcDNAを単離した。このように実際に癌患者生体内で生じた癌特異的免疫応答の解析は、今後の新たな診断や治療を開発する上で有用な情報となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to developing immunotherapy as new modalities against thoracic malignancies with poor prognosis, it is important to analyze autologous tumor-specific immune responses. In this study, we induced several CTLs from patients with lung cancer, which are HLA-A2 or HLA-A24-restricted. Among them, CTL Clone 1 recognized the autologous large cell carcinoma cell line as well as allogenic lung cancer cell lines including adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung in an HLA-A24-restricted manner. cDNA clone coding antigen recognized by the CTL was isolated by cDNA expression cloning using cDNA library made from autologous tumor cells. These approaches will help us to develop new modalities for diagnosis and therapy for thoracic malignancies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：呼吸器悪性腫瘍 腫瘍抗原 CTL 特異的免疫応答

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、診断時には進行期であることが多く、手術適応となるのは半数以下である。進行期の症例に対しては放射線療法、抗癌剤療法などの標準治療でも治療効果は満足いくものではなく、わずかに生存期間を延長できているにすぎない。悪性胸膜中皮腫も予後不良な悪性腫瘍で、アスベスト暴露からのその潜伏期間から今後ますます増加すると予測されている。外科切除・化学療法等の集学的治療をもってしても、2年生存率は約30%、5年生存率は5%未満に過ぎない。

1991年、Boonらによって悪性黒色腫より癌抗原 MAGE が同定され、癌抗原を標的とした細胞障害性 T 細胞(CTL)を用いた癌特異的免疫療法の研究が進歩した。しかしながら、ヒト固形癌における宿主免疫応答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、その主な理由はヒト検体の研究材料の availability の困難さによる。すなわち、ヒトの腫瘍特異的免疫反応の研究では、個々の癌患者で起きている自家がん特異的免疫反応を検出するための autologous の実験系の確立が必要である。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、CTL を clone 化し、自己肺癌細胞株から作成した cDNA library cDNA 発現クローニング法により CTL の認識する腫瘍抗原を同定するシステムを構築し、現在までに 2 つの変異抗原と、1 つの癌精巢抗原および 4 つの過剰発現抗原を同定してきた。本研究では、自己リンパ球-自己腫瘍細胞システムを用いた研究を行うことで、マウスモデルではない実際のヒト固形癌に起きている腫瘍特異的免疫応答を利用した新規の腫瘍抗原を同定解析することにより、呼吸器悪性腫瘍に対する新たな診断、治療の標的となる分子の開発につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

呼吸器悪性腫瘍の中で、肺癌、悪性胸膜中皮腫は、難治性の癌腫として知られている。特に肺癌では、診断時には進行期であることが多く、手術適応となるのは、半数以下である。これらの治療抵抗性の呼吸器悪性腫瘍に対する新たな治療法の開発を目指し、これまでに癌の生物学特性を解析することにより、分子標的治療、免疫学的治療の基礎研究、臨床研究を行ってきた。本研究では、肺癌、悪性胸膜中皮腫の生物学的特性の解析として、自家がん特異的免疫応答を利用した新規腫瘍抗原の同定・解析を行うことにより新たな診断、治療の標的となる分

子の探索を行う。本研究では、特に自家がん特異的免疫応答を利用した解析を行うため、実際に癌患者生体内で生じた免疫源を検索・同定することができるとも癌患者で生じている本来の生体防御機能の解明にもつながると考えられる。さらに、腫瘍特異的免疫反応の target の同定により、今後の新たな診断や治療を開発する上での有用な情報となり得ることが予想される。

## 3. 研究の方法

### 1)呼吸器悪性腫瘍患者における自家がん特異的 CTL クローンの樹立および解析

当科で樹立した呼吸器悪性腫瘍細胞株と手術時に採取・凍結しておいた自己リンパ球を共培養することにより、CTL ラインを誘導し、これから限界希釈法を用いて腫瘍特異的 CTL クローンを樹立する。現在 CTL line が得られている症例で CTL のクローニングを行いクローン樹立後は、その細胞表面分子の分析や抗腫瘍活性の確認、および T 細胞受容体(T cell receptor:TCR)のシーケンス解析も行う。

### 2)自家がん特異的 CTL clone の認識する腫瘍抗原の同定および機能解析

CTL が誘導できた自己腫瘍から作成した cDNA library を用いて、cDNA 発現クローニング法により CTL clone のサイトカイン産生 (TNF or IFN- $\gamma$ ) で新規腫瘍抗原のスクリーニングを行い、抗原遺伝子をコードする cDNA clone を単離する。さらに cDNA のコードするアミノ酸配列からペプチドを合成し、CTL クローンが認識する抗原エピトープを検索する。

### 3)既知腫瘍抗原の自家がん特異的免疫応答を利用した新規抗原ペプチドの同定

われわれが同定した癌精巢抗原 KK-LC1 は HLA-B15 拘束性で、HLA-B15 は日本人の頻度としては約 10% 程度であるため、頻度の高い HLA-A2, A24 拘束性の新規ペプチドの同定を行う。しかしながら癌精巢抗原の CTL 前駆細胞は、末梢血中に非常に少ないため、KK-LC1 を同定した腺癌患者の凍結保存しておいたリンパ節リンパ球を responder として、かつ同患者の末梢血リンパ球から誘導した樹状細胞を自己の抗原提示細胞として用いて binding score の高い HLA-A2 ペプチドと HLA-A24 を reverse immunology 法で CTL を誘導し、新規エピトープを探索する。

#### 4. 研究成果

##### 呼吸器悪性腫瘍患者における自家がん特異的 CTL クローンの樹立および解析

新たな肺大細胞癌の自己リンパ球-自己腫瘍細胞システムを用いて、リンパ球-腫瘍細胞混合培養を繰り返し、自家がん特異的細胞障害性 T 細胞の line を誘導した。この bulk CTL から限界希釈法で 5 個の CTL clone を得た。増殖の良い Clone 1 を用いて、抗腫瘍活性を検討したところ、自己肺癌細胞に特異的に細胞障害性を示し、また他家の肺腺癌、肺扁平上皮癌を認識し、これらの活性はいずれも抗 HLA-A24 抗体で阻害された。Clone 2-4 も同様に自己肺癌特異的細胞障害性を示した。Clone 1 の TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  を解析し、単一の T 細胞クローンであることを確認した。

##### 自家がん特異的 CTL clone の認識する腫瘍抗原の同定および機能解析

HLA class I 欠失肺癌細胞株 C831L に  $\beta$ 2-microglobulin gene を移入して作成した HLA-class I 発現陽性 C831L-w $\beta$ 2m 株を用いて、新たに HLA-A2 拘束性 bulk CTL を誘導した。限界希釈法で得られた HLA-A2 拘束性 CTL clone および C831L から作成した cDNA library を用いて cDNA expression cloning を継続している。

Clone 1 を用いて自己腫瘍細胞株から作成した cDNA library を用いて cDNA 発現クローニングを行ったところ、陽性反応を示す cDNA clone を単離し、1600bp であった。

CTL clone は本 cDNA clone と HLA-A24 cDNA を transfection したときに、CTL clone の反応が得られた。cDNA clone のアミノ酸配列から、HLA-A2402 拘束性 binding motif を有する 9-mer ペプチドを score の高いものから 5 種類合成し、CTL との反応性を検討した。Peptide1 に反応性の上昇を認めしたが、反応が弱いため、腫瘍細胞との反応と同程度の反応を示す peptide は現時点では認められないため、minigene からのアミノ酸配列絞り込みを進めている。

##### 既知腫瘍抗原の自家がん特異的免疫応答を利用した新規抗原ペプチドの同定

肺腺癌からわれわれが同定した癌精巢抗原である、KK-LC1 の新規エプトープの探索のために、日本人に頻度の高い HLA-A2, A24 に binding score の高い 4 種の HLA-A2 ペプチドと 2 種の HLA-A24 ペプチドを合成し、同患者の自己の凍結保存していた末梢血単核球から誘導した樹状細胞に pulse し、凍結保存しておいたリンパ節リンパ球を responder として、共培養を繰り返したところ HLA-A2 拘束性の bulk CTL が誘導された。この bulk CTL は HLA-A2 ペプチ

ド 1 に反応しサイトカイン産生を示した。

#### 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 16 件)

1. Toyokawa G, Taguchi K, Ohba T, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Takenoyama M, Sugio K, Ichinose Y: First case of combined small-cell lung cancer with adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion and an exon 19 EGFR mutation in each histological component. J Thorac Oncol. 査読有 7: e39-41. 2012.
2. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K, Tanaka F: Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. Oncol Lett. 査読有 4: 625-30. 2012.
3. Ichiki Y, Hanagiri T, Takenoyama M, Baba T, Nagata Y, Mizukami M, So T, Sugaya M, Yasuda M, Uramoro H, Yasumoto K: Differences in sensitivity to tumor-specific CTLs between primary and metastatic esophageal cancer cell lines derived from the same patient. Surg Today. 査読有 42: 272-9. 2012.
4. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K, Tanaka F: Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. Oncology letters. 査読有 4: 625-30. 2012.
5. Takenoyama M, Ichinose Y: [IV.Clinical trial of immunotherapy for lung cancer]. Gan To Kagaku Ryoho. 査読無 40: 1018-20. 2013.
6. Toyokawa G, Takenoyama M, Taguchi K, Arakaki K, Inamasu E, Toyozawa R, Kojo M, Shiraishi Y, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Leone A, Graziano P, Ichinose Y: The first case of lung carcinosarcoma harboring in-frame deletions at exon19 in the EGFR gene. Lung Cancer. 査読有 81: 491-4. 2013.
7. Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Shiota H, Ichiki Y, Nagata Y, Yasuda M, Uramoto H, So T, Takenoyama M, Tanaka F: Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients

- who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. 査読有 181: e57-63. 2013.
8. Ichinose Y, Takeoyama M: Invited commentary on comparison of three measurements on computed tomography for the prediction of less invasiveness in patients with clinical stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 査読有 95: 1884. 2013.
  9. Yamaguchi M, Toyokawa G, Ohba T, Sasaki T, Kometani T, Hamatake M, Hirai F, Taguchi K, Yamanaka T, Seto T, Takeoyama M, Sugio K, Ichinose Y: Preoperative concurrent chemoradiotherapy of S-1/cisplatin for stage III non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 査読有 96: 1783-9. 2013.
  10. Toyokawa G, Takeoyama M, Taguchi K, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Shiraishi Y, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Shimokawa M, Ichinose Y: An extremely rare case of small-cell lung cancer harboring variant 2 of the EML4-ALK fusion gene. *Lung Cancer*. 査読有 81: 487-90. 2013.
  11. Toyokawa G, Takeoyama M, Hirai F, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Morodomi Y, Shiraishi Y, Takenaka T, Yamaguchi M, Shimokawa M, Seto T, Ichinose Y: Gemcitabine and vinorelbine as second-line or beyond treatment in patients with malignant pleural mesothelioma pretreated with platinum plus pemetrexed chemotherapy. 査読有 *Int J Clin Oncol*. 2013.
  12. Toyokawa G, Takeoyama M, Watanabe S, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Shiraishi Y, Morodomi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Ichinose Y: Dramatic response to crizotinib in an ALK-positive adenocarcinoma patient with disseminated intravascular coagulation. *J Thorac Oncol*. 査読有 8: e96-8. 2013.
  13. Toyokawa G, Takeoyama M, Ichinose Y: Do mutations of the enhancer of zeste homolog 2 gene exist in small-cell lung cancer? *J Thorac Oncol*. 査読有 8: e103. 2013.
  14. Hanagiri T, Shigematsu Y, Shinohara S, Takeoyama M, Oka S, Chikaishi Y, Nagata Y, Baba T, Uramoto H, So T, Yamada S: Clinical significance of expression of cancer/testis antigen and down-regulation of HLA class-I in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Anticancer research*. 査読有 33: 2123-8. 2013.
  15. Hanagiri T, Shigematsu Y, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Nagata Y, Iwata T, Uramoto H, So T, Tanaka F: Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 査読有 81: 475-9. 2013.
  16. Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Shiota H, Ichiki Y, Nagata Y, Yasuda M, Uramoto H, So T, Takeoyama M, Tanaka F: Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer. *The Journal of surgical research*. 査読有 181: e57-63. 2013.
- [学会発表](計 11 件)
1. 花桐武志, 重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 安元公正, 田中文啓, 影山慎一, 珠玖洋: CHP-MAGE-A4 vaccine for patients with advanced lung cancer (Phase I study). 第 70 回日本癌学会総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3 日 - 5 日.
  2. 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 竹中賢, 近石泰弘, 岡壮一, 中川誠, 下川秀彦, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓: 新規悪性胸膜中皮腫関連抗原の機能解析と腫瘍マーカーとしての意義. 第 52 回日本肺癌学会総会, 大阪, 2011 年 11 月 3 日 - 4 日.
  3. 重松義紀, 竹中賢, 岡壮一, 近石泰弘, 馬場哲郎, 下川秀彦, 中川誠, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓: 非小細胞肺癌における癌精巢抗原発現とワクチン療法への応用. 第 112 回 日本外科学会定期学術集会, 千葉, 2012 年 4 月 12 日 - 14 日.
  4. 花桐武志, 重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 塩田広宣, 市来嘉伸, 永田好香, 安田学, 浦本秀隆, 宗知子, 竹之山光広, 田中文啓: Prognostic implications of HLA-class I expression in patients who underwent surgery for non-small cell lung cancer. 第 71 回日本癌学会総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日 - 21 日.
  5. 花桐武志, 重松義紀, 竹中賢, 岡壮一, 近石泰弘, 下川秀彦, 中川誠, 永田好香, 浦本秀隆, 宗知子, 田中文啓: 肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞および微小リンパ節転移の解析. 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2012 年 10 月 25 日 - 27 日.
  6. 花桐武志, 重松義紀, 竹中賢, 岡壮一, 近石泰弘, 下川秀彦, 中川誠, 永田好香, 岩田輝男, 浦本秀隆, 宗知子, 田中文啓: 肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞

胞の臨床病理学的意義. 第 53 回日本肺癌学会総会, 岡山, 2012 年 11 月 8 日 - 9 日.

7. 竹之山光広, 重松義紀, 馬場哲郎, 永田好香, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓: 悪性胸膜中皮腫に対する腫瘍特異的免疫応答の解析(第 2 報). 産業医科大学雑誌. 34: 140. 2012.
8. 竹之山光広, 豊澤亮, 稲益英子, 古城都, 豊川剛二, 白石祥理, 諸富洋介, 竹中朋祐, 山口正史, 瀬戸貴司, 一瀬幸人: 肺癌集学的治療の新たな展開 III 期局所進行非小細胞肺癌に対するシスプラチン+S-1 を用いた術前化学放射線同時併用療法の治療成績. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2013 年 4 月 11 日 - 13 日.
9. 山口正史, 豊川剛二, 諸富洋介, 豊澤亮, 稲益英子, 古城都, 白石祥理, 平井文彦, 竹中朋祐, 瀬戸貴司, 竹之山光広, 一瀬幸人: 手術可能な肺癌は全て手術しなくてもよい肺癌はあるか Pure GGO を呈する肺野小結節の切除に対する検討. 第 30 回日本呼吸器外科学会総会, 名古屋, 2013 年 5 月 9 日 - 10 日.
10. Takenaka T, Takenoyama M, Yamaguchi M, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Toyokawa G, Yoshida T, Shiraishi Y, Morodomi Y, Hirai F, Taguchi K, Shimokawa M, Seto T, Ichinose Y: Impact of the epidermal growth factor receptor mutation status on the post-recurrence survival of patients with surgically resected non-small-cell lung cancer. The European Cancer Congress 2013, Amsterdam, 2013 年 9 月 27 日 - 10 月 1 日.
11. 竹中朋祐, 豊澤亮, 稲益英子, 豊川剛二, 白石祥理, 諸富洋介, 平井文彦, 山口正史, 瀬戸貴司, 竹之山光広, 一瀬幸人: 非小細胞肺癌術後再発症例における EGFR 遺伝子変異、EML4-ALK 融合遺伝子検索の意義. 第 66 回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台, 2013 年 10 月 16 日 - 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹之山光広 (Takenoyama Mitsuhiro)  
国立病院機構九州がんセンター 臨床研究センター  
研究者番号: 10309966

(2) 研究分担者

花桐 武志 (Hanagiri Takeshi)  
産業医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30299614

浦本 秀隆 (Uramoto Hidetaka)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 90389445

重松 義紀 (Shigematsu Yoshiki)  
研究者番号: 10546469