

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463051

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) Identification of novel cancer antigens for oral squamous cell carcinoma and research towards clinical application

研究代表者

小林 淳一 (Kobayashi, Jun-ichi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80404739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規がん抗原同定のために自家がん細胞株とそのCTLのペアの樹立を目指し、札幌医科大学附属病院歯科口腔外科にて治療された頬部口腔扁平上皮がん患者の生検組織よりがん細胞株の樹立に成功し、樹立したがん細胞株の患者のPBLあるいはTILを分離し、rIL-2(50IU/ml)を加えたAIM-VRMediumでの培養を行い、X線照射した自家がん細胞株とPBLあるいはTILとの混合培養を繰り返し行い、CTLを誘導を行い、自家がん細胞株とそのCTLのペアの樹立に成功した。自家がん特異的細胞傷害機構の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Aiming at establishing a pair of autologous cancer cell line and its CTL for the identification of novel cancer antigen, Sapporo Medical University Hospital Dental Department of Oral Surgery than the biopsy tissue of cheek oral squamous cell carcinoma patient treated. In the establishment of a cell line successfully, PBL or TIL of a patient with established cancer cell line was isolated, cultured in AIM-VRMedium supplemented with rIL-2 (50 IU/ml), and irradiated with X rays. Mixed culture of autologous cancer cell line and PBL or TIL was repeated, induction of CTL succeeded in establishing pair of autologous cancer cell line and its CTL. Analysis of autologous cancer-specific cytotoxicity mechanism was carried out.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 腫瘍免疫

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 class I 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 class II 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 class I, HLA class II 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

1 口腔がんに対する治療方法には、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。近年、がん遺伝子の解析が進み、分子標的療法ががん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。それらの中でがんワクチン療法は比

較的早期から臨床試験が開始されてきた。当初、悪性黒色腫で CD8T 細胞で構成されるキラーT細胞 (CTL) の認識するがん抗原ペプチドの構造決定が行われ、欧米でがん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、食道がん、大腸がんががん抗原ペプチドが同定され臨床試験が行われてきた。申請者らも腫瘍に高率に発現し正常組織ではほとんど発現の認められない、IAP family (Inhibitor of Apoptosis Proteins) の一つである survivin (Clinical Cancer Res. Vol 8, 1731-1739, 2002.) に着目し、この分子から本学第一病理学講座にて同定された survivin2B ペプチドを用いてがんワクチン療法が口腔がんに対して有効かどうかの基礎的研究を重ねてきた (J Transal Med .2009 Jan 7; 1.)。その結果、survivin2B ペプチドを用いた免疫療法が有効であると示唆される結果が得られた。さらに、本学第一外科において大腸がん、乳がんを対象に survivin2B ペプチド (Clinical Cancer Res. Vol 11, 1474-1482, 2005) を用いてがんワクチン療法の第一相臨床試験が実施された (J Transal Med. 2004 Jun 13; 2(1):19)。これらをもとに申請者らも口腔がんに対する第一相臨床試験を実施したところ、副作用などの有害事象は認めらず、ワクチン投与の一部の患者において腫瘍の縮小や腫瘍の増大が停止し患者の QOL の向上につながった。しかし、当初期待した程の効果は認められなかった、この原因として患者により抗原提示されているがん抗原に発現の差があること、免疫逃避によるものが考えられた。これらを解決するためには新たな口腔がん特異的抗原を同定する事、免疫逃避の機序を解析し、免疫逃避に影響を受けないがん抗原を探索しかつ免疫逃避を解除する方法を見つけ出す事でがんワクチン療法の治療効果の増強につながると考えられる。

2 現在、新たな下顎歯肉扁平上皮がん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(Hum Immunol. 2009 Feb;70(2):89-95.)。抗原エピトープ同定に向けてさらに解析を進めていく。さらに樹立した2種類の自家CTL cloneが認識しない、新たな口腔扁平上皮がん細胞株を樹立した(Hum Immunol. 2009 Feb;70(2):89-95.)、この自家がん細胞株とCTL cloneを用いてがんワクチン療法で課題となる免疫寛容に関する仕組みや遺伝子の解析をおこなっていく。また、これを傷害するCTLのペアの樹立を目指す。さらに新規のがん細胞株と自家CTLを樹立し多くのがん抗原を同定し、がんワクチン療法に応用を目指す。有効ながん抗原を同定出来たならばそれらを腫瘍マーカーとして活用していく事を目指す。

3 がんワクチン療法の最大のメリットは機能障害がなく、副作用が起きにくい事である。現状で高い治療効果を長期間得るには免疫逃避の問題やどの抗原を標的にするかななどの課題がある。しかし、これらを克服出来ればQOL向上につながる可能性が非常に高くがんワクチン療法の研究を進めて行く意義はとても大きいと考えられる。また、将来的には術後にごがんワクチン療法を行う事で微小転移を制御し、生存率の向上に寄与する可能性もある。がんワクチン療法の研究を進める事で多くの新規がん抗原を同定し、腫瘍の増殖、転移にどのように関連しているか検討する事が、がんの生物学特性を明らかにし、がん治療に有益な情報をもたらす可能性もある。また、新規がん抗原を同定する事で腫瘍マーカーとして活用していく事も可能であると考えられる。

3. 研究の方法

(概要)

- ・すでに樹立された自家がん細胞株とそのCTL cloneを用いて抗原の同定を行う
- ・すでに樹立した自家CTL cloneに認識されないがん細胞株と自家CTL cloneに認識されないがん細胞株のDNAマイクロアレイを行い発現の違いを検討し、免疫逃避に関する遺伝子かどうか検討する。免疫逃避に関連する可能性がある遺伝子を同定し、遺伝子の発現を抑制して検討をおこなう
- ・すでに樹立した自家CTL cloneに認識されないがん細胞株を傷害するCTL cloneを新たに樹立し解析を行い、抗原の同定を行う
- ・新たな自家がん細胞株とそのCTLのペアの樹立
- ・CTLによる自家がん特異的破壊機構の解析
- ・新たながん抗原を同定し、それらを腫瘍マーカーとして利用するために、血清抗体価を測定し検討を行う

(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-VRMedium 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-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。

(6)頬粘膜扁平上皮癌由来の新規癌細胞株の樹立に成功し、さらにその CTL ペアの樹立に成功した。現在この解析も行なっている。

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4件)

・ Jun-ichi Kobayashi, Akihiro Miyazaki, Takashi Sekiguchi, Hiroyoshi Hiratsuka; Spontaneous complete remission of methotrexate-associated extranodal B-cell lymphoma of the buccal mucosa:

review of the literature and report of a case. J oral Maxillofac Surg Med Pathol, 27,2015,677-681

- ・ 荻和弘, 小林淳一, 竹田康佑, 井手隆, 宮崎晃亘, 平塚博義: 口蓋に発生した多形腺腫由来筋上皮癌の1例; 日本口腔外科学会雑誌 2015; 61(3)173-176
- ・ Suzuki N, Miyazaki A, Igarashi T, Dehari H, Kobayashi JI, Miki Y, Ogi K, Nagai I, Sonoda T, Yotsuyanagi T, Hiratsuka H. Relationship Between Mandibular Ramus Height and Masticatory Muscle Function in Patients With Unilateral Hemifacial Microsomia. Cleft Palate Craniofac J. 2017 Jan; 54(1):43-52. doi: 10.1597/14-329. Epub 2016 Jan 11.
- ・ Kaneko T, Dehari H, Sasaki T, Igarashi T, Ogi K, Okamoto JY, Kawata M, Kobayashi JI, Miyazaki A, Nakamori K, Hiratsuka H. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition is regulated by phosphorylation of GSK3- via PI3K/Akt signaling in oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2016 Dec; 122(6):719-730. doi: 10.1016/j.oooo.2016.06.008. Epub 2016 Jun 22.

〔学会発表〕(計7件)

- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 五十嵐友彦, 鈴木りな, 出張裕也, 荻和弘, 平塚博義; Stage III, IV 舌扁平上皮癌の治療成績の検討; 第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014年6月12日-2014年6月13日
- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 鈴木りな, 宮本昇, 五十嵐友彦, 荻和弘, 出張裕也, 平塚博義; FDG-PET/CTを用いた口腔癌頸部リンパ節転移の評価に関する検討; 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 千葉, 2014年10月17日-2014年10月19日
- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 出張裕也, 荻和弘, 宮本昇, 中垣貴文, 平塚博義; 進行・口腔癌頸部リンパ節転移診断におけるFDG-PET/CTの臨床的検討; 第33回日本

口腔腫瘍学会総会・学術大会, 奈良, 2015年1月29日-2015年1月30日

- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 出張裕也, 五十嵐友彦, 鈴木りな, 岡本準也, 平塚博義; 口腔癌に対するFDG-PET/CT検査の臨床的検討; 第39回日本頭頸部癌学会, 神戸, 2015年6月3日-2015年6月6日
- ・ Jun-ichi Kobayashi, Akihiro Miyazaki, Hironari Dehari, Tomohiro Igarashi, Rina Suzuki, Junya Okamoto, Hiroyoshi Hiratsuka: A clinical analysis of FDG-PET/CT examination in patients with oral cancer; The 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 2015, Melbourne, Australia; 2015年10月27日-2015年10月30日
- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 金子剛, 岡本準也, 出張裕也, 荻和弘, 宮本昇, 中垣貴文, 中井裕美, 平塚博義; 口腔癌に対するFDG-PET/CT検査と臨床病理学的因子との関連についての検討; 第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 横浜, 2016年1月21日-2016年1月22日
- ・ 小林淳一, 宮崎晃亘, 出張裕也, 荻和弘, 宮本昇, 岡本準也, 廣川直樹, 染谷正則, 坂田耕一, 平塚博義; 口腔癌に対するCDDPを用いた放射線併用選択的動注化学療法を施行し5年以上経過した症例の検討; 第40回日本頭頸部癌学会, 埼玉, 2016年6月9日-2016年6月10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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林淳一 (KOBAYASHI Jun-ichi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：80404739

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()