

学位論文

Doctor's Thesis

cDNA マイクロアレイ解析により同定された免疫療法に有用な新規肺癌
抗原 CDCA1(cell division cycle associated 1)
(Cell division cycle associated 1, an ideal lung cancer antigen for
immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis)

原尾 美智子

Michiko Harao

熊本大学大学院医学教育部博士課程・臨床医科学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻・消化器外科学

西村 泰治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻・免疫識別学

2008年3月

目次

1	要旨	4
	SUMMARY	5
2	発表論文リスト	6
3	謝辞	7
4	略語一覧	8
5	研究の背景と目的	9
5-1)	HLA 分子による T 細胞への抗原提示	9
	図 1. MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの CD8+細胞傷害性 T 細胞(CTL)への提示	9
	図 2. MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4+ヘルパー T 細胞への提示	12
5-2)	抗腫瘍免疫のあらまし	13
	図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化	14
5-3)	腫瘍拒絶抗原の同定	15
5-4)	cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定	16
	図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要	18
5-5)	CANCER-TESTIS (CT) 抗原	19
5-6)	樹状細胞を用いた癌の免疫療法	19
5-7)	本研究の目的	20
6	実験方法	21
6-1)	マウス	21
6-2)	ノザンプロット解析と REVERSE TRANSCRIPTION-PCR (RT-PCR)	21
6-3)	CDCA1 の免疫組織化学的解析	21
6-4)	使用した血液サンプルと細胞	22
6-5)	レンチウイルスベクターを利用した遺伝子導入	22
6-6)	HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定	22
	図 5 HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定	24
	図 6 CDCA1 ペプチド特異的ヒト CTL の樹立法	26
7	実験結果	27

7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍特異抗原候補遺伝子の選出	27
図 7 cDNA マイクロアレイ解析による癌部と正常組織における CDCA1 遺伝子の発現	28
7-2) RT-PCR とノザンブロット解析による癌細胞株、癌組織および正常組織における CDCA1 遺伝子の発現解析	29
図 8 RT-PCR とノザンブロットによる正常組織における CDCA1 遺伝子の発現解析 ..	29
図 9 RT-PCR による癌細胞株および肺癌組織における CDCA1 遺伝子の発現解析 ...	30
図 10 各種癌組織における CDCA1 mRNA を高発現する症例の頻度に関する cDNA マイクロアレイ解析結果	31
7-3) CDCA1 タンパク質の免疫組織化学的解析	32
図 11 CDCA1 タンパク質の免疫組織化学的染色	32
7-4) HLA-A2 TgM を用いたヒト CDCA1 における HLA-A2 拘束性マウス CTL エピトープの同定	33
表 1 ヒト CDCA1 由来で HLA-A2 に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト ..	34
図 12 HLA-A2 拘束性マウス CTL エピトープの同定	35
7-5) HLA-A2 陽性の健常人あるいは非小細胞肺癌患者の PBMC からの CDCA1 特異的 CTL の誘導	36
図 13. CDCA1 ペプチドで誘導した CTL のペプチド特異的な細胞傷害活性	36
図 14 CTL 応答のペプチド濃度依存性の検討	37
図 15 CDCA1 遺伝子強制発現細胞に対する CTL の免疫応答	38
図 16 CDCA1 陽性癌細胞株に対する CTL の細胞傷害活性の検討	40
図 17 HLA-A2-CDCA1 351-359 ペプチドテトラマーによる HLA-A2 拘束性かつ CDCA1 特異的 CTL の検出	41
8 考察	42
9 結論	44
10 参考文献	45

1 要旨

【背景】 肺癌、特に非小細胞肺癌は全世界で罹患率の高い疾患であり、特に高齢者の癌の死亡者数では高率をしめる。手術、化学療法、放射線療法を中心とした治療が行われるが、進行した肺癌に対する治療が困難な症例も多く、免疫療法を含めた新しい治療法の確立が望まれている。

【目的】 本研究では、肺癌と正常組織における cDNA マイクロアレイ解析結果をもとに、肺癌の免疫療法に理想的な新規癌抗原を同定するとともに、その抗腫瘍免疫応答を誘導する能力を検討して、癌免疫療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

【方法】 非小細胞肺癌 37 症例の腫瘍組織から Laser Microbeam Microdissection 法を用いて癌組織と正常肺組織を分離した。これらの組織を用いて 27,648 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行い、癌部と非癌部での発現を比較した。正常組織と比較して癌部で 5 倍以上高発現する遺伝子を同定し、これらの遺伝子の 24 種類の成人正常組織および 4 種類の正常胎児組織における遺伝子発現を、cDNA マイクロアレイ解析により検討した。同定した腫瘍特異抗原のアミノ酸配列を、BIMAS 解析ソフトウェアを用いて解析し、HLA-A2(A*0201)に結合する構造モチーフを有する 40 種類のペプチドを選んだ。これらのペプチドを数種類ずつ混合して、あらかじめ HLA-A2 (HHD)トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm)の骨髄細胞より誘導した樹状細胞(DC)にパルスした後に腹腔内に免疫し、これを 1 週間おきに 2 回行った。その後、脾細胞を採取し in vitro で一週間培養し、IFN γ ELISPOT 法でペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の免疫応答を観察し、2 種類の CTL エピトープ候補を決定した。これらのペプチドを健常人ならびに肺癌患者の PBMC から分離した CD8 陰性細胞から誘導した DC にパルスして、CD8 陽性細胞を 3 回刺激して CTL を誘導し、IFN γ ELISPOT 法と Cr 放出試験で抗原特異的 CTL 応答の評価を行った。

【結果と考察】 cDNA マイクロアレイ解析により、検討できた患者の全てで正常肺組織より癌部で 5 倍以上の高発現を認め、正常組織では免疫から隔離された精巢のみに発現している、新規癌精巢(CT)抗原である CDCA1 (cell division cycle associated 1 gene) を同定した。CDCA1 は、非小細胞肺癌のみならず小細胞肺癌、胆管癌、膀胱癌および腎臓癌にも高発現していた。HLA-A2 Tgm において自己免疫病を誘導することなく、HLA-A2 拘束性のマウス CTL を誘導できるヒト CDCA1 ペプチドを 2 種類同定した。これら 2 種類のペプチドは、健常人および肺癌患者由来の PBMC から、ヒト CDCA1 に特異的な HLA-A2 拘束性 CTL を誘導できた。これらの CTL は、CDCA1 と HLA-A2 を同時に発現する癌細胞株に対して、抗原特異的な細胞傷害活性を示した。

【結論】 肺癌ほかの数種類の癌に高発現する新規癌精巢(CT)抗原として、CDCA1 (cell division cycle associated 1 gene) を同定した。HLA-A2により提示される CDCA1由来のCTLエピトープを2種類同定し、これらのペプチドを用いて、健常人および肺癌患者のPBMCからHLA-A2とCDCA1を発現する癌細胞を傷害するCTLを誘導できた。これらのペプチドは、HLA-A2陽性肺癌患者に対する免疫療法に有用であると考えられた。

Summary

Purpose : Toward the development of a novel cancer immune therapy, we have previously identified several tumor-associated antigens (TAAs) and the HLA-A2/A24-restricted cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes. In this study, we tried to identify a TAA of lung cancer (LC) and its HLA-A2 restricted CTL epitopes to provide a target antigen useful for cancer immunotherapy of LC.

Experimental Design : We identified a novel cancer testis antigen, cell division cycle associated gene 1 (CDCA1), over-expressed in non small cell lung cancer (NSCLC) using cDNA microarray analysis. The expression levels of CDCA1 were also increased in the majority of small cell lung cancer, cholangiocellular cancer, urinary bladder cancer and renal cell cancers. We used HLA-A2.1 transgenic mice, to identify the HLA-A2 (*A*0201*)-restricted CDCA1 epitopes recognized by mouse CTL and we investigated whether these peptides could induce CDCA1-reactive CTLs from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A2-positive healthy donors.

Results : We found that the CDCA1₆₅₋₇₃ (YMMPVNSEV) peptide and CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ (KLATAQFKI) peptide could induce peptide-reactive CTLs in HLA-A2.1 transgenic mice. In HLA-A2⁺ healthy donors, in vitro stimulation of PBMC with these peptides could induce peptide-reactive CTLs which killed tumor cell lines endogenously expressing both HLA-A2 and CDCA1.

Conclusions : As a result, CDCA1 is a novel cancer-testis antigen overexpressed in LC, cholangiocellular cancer, urinary bladder cancer and renal cell cancers, and CDCA1 may be an ideal TAA useful for diagnosis and immunotherapy of these cancers.

2 発表論文リスト

1. Michiko Harao, Shinya Hirata, Atsushi Irie, Satoru Senju, Tetsuya Nakatsura, Hiroyuki Komori, Yoshiaki Ikuta, Kazunori Yokomine, Katsunori Imai, Mitsuhiro Inoue, Kumiko Harada, Takeshi Mori, Takuya Tsunoda, Shuichi Nakatsuru, Yataro Daigo, Hiroaki Nomori, Yusuke Nakamura, Hideo Baba, and Yasuharu Nishimura. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer* in press
2. Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Ikuta Y., Fukuma D., Yokomine K., Harao M., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*12: 2689-2697, 2006.
3. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y.: Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res* in press

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部 感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授ならびに消化器外科分野の馬場秀夫教授に深く感謝いたします。また cDNA マイクロアレイ解析データを御恵与いただいた、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの醍醐弥太郎先生および中村祐輔教授に深謝いたします。肺癌患者の検体を御恵与いただいた、呼吸器外科分野の森毅助教および野守裕明教授に深く感謝いたします。さらに、研究方法に関して直接御指導を頂いた国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部中面哲也室長、免疫識別学分野平田真哉助教および入江厚講師に深く感謝いたします。組織の免疫染色に御協力いただきました分子病理学分野の山本哲郎教授、久保多津子さんに深く感謝いたします。検体の提供に御協力いただきました肺癌患者の皆様はじめ諸先生方に深く感謝いたします。また HLA-A2Tgm を御提供いただきました、埼玉医科大学の松井政則教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

ADC; adenocarcinoma,

BM-DC; bone marrow cell-derived dendritic cell

CDCA1; cell division cycle associated 1

cDNA; complementary DNA

CTL; cytotoxic T lymphocyte

DC; dendritic cell

DNA; deoxyribonucleic acid

ELISPOT; enzyme-linked Immunospot

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HCC; hepatocellular carcinoma

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

HLA-A2 Tgm; HLA-A2 transgenic mouse

IFN; interferon

IL; interleukin

LC; lung cancer

MHC; major histocompatibility complex

mAb; monoclonal antibody

mRNA; messenger ribonucleic acid

NSCLC; non-small cell lung cancer

PBMC; peripheral blood mononuclear cell

RT-PCR; reverse transcription-PCR

SqCC; squamous cell carcinoma

TAAs; tumor-associated antigen

TAP; transporter associated with antigen processing

TCR; T cell receptor

Tgm; transgenic mouse

TIL; tumor infiltrating lymphocyte

TNF; tumor necrosis factor

5 研究の背景と目的

5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) によりコードされる MHC 分子は、細胞内で抗原が分解されてできたペプチドを分子の先端に結合して細胞表面に発現する。T 細胞は抗原を直接認識することはできず、細胞表面に発現する抗原ペプチドと MHC 分子を複合体として認識する。MHC 分子にはクラス I とクラス II の 2 種類があり、それぞれ細胞内での局在が異なる抗原に由来するペプチドを機能の異なる T 細胞に提示して活性化を促す(1)。ヒトの MHC は白血球の血液型として発見されたために、ヒト組織適合白血球抗原 (human histocompatibility leukocyte antigen; HLA) 系と呼ばれる。

$\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプター (TCR) を発現する T 細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HLA クラス I 分子に結合する性質を持つ CD8 分子を発現する。HLA クラス I 分子は主に核や細胞質の蛋白質に由来するペプチドを結合して、すべての有核細胞と血小板の表面に発現する。CTL は TCR を介して自己の HLA クラス I 分子に結合した、ウイルスあるいは細菌などの非自己蛋白質に由来するペプチドを認識して感染細胞を破壊する。さらに、腫瘍細胞の表面に発現する HLA クラス I 分子に結合した自己あるいは非自己ペプチドを認識した CTL は腫瘍細胞を破壊する(2)。また HLA クラス I 分子は、特定のウイルスあるいは細菌に感染した細胞、あるいは腫瘍細胞を破壊する性質をもつ ナチュラルキラー (NK) 細胞のレセプター (killer-cell inhibitory receptor; KIR) に結合し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する(図 1C) (3)。

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム (proteasome) あるいは LMP (large multifunctional protease) と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体によりエネルギー

(ATP) 依存性に分解されてできたものである(4, 5)。最近、細胞質内で mRNA が翻訳されてできたばかりの蛋白質のうち 30% にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing) 分子により、エネルギー (ATP) 依存性に小胞体

図 1

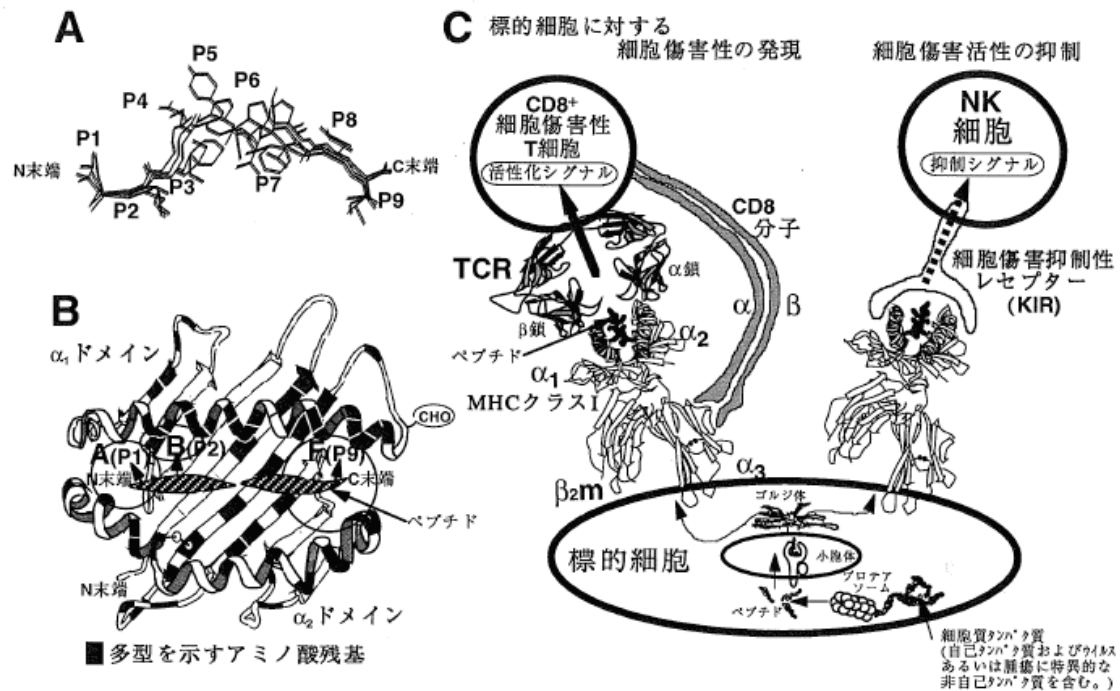


図 1. MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの CD8+細胞傷害性 T 細胞 (CTL) への提示

A. MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1~P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基 (P3~P7) の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの α ヘリックス (右巻きらせん) 構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、() 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス I (ヒトの HLA クラス I) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。C. MHC クラス I により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。 α 1, α 2, α 3 および β 2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび β 2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター (killer-cell inhibitory receptor) を表す。

の内腔へと導かれ、そこでHLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する (図 1) (6)。このペプチド収容溝には、A~F ポケットと呼ばれる 6 個のポケットが存在する。MHCクラス I 結合ペプチドは9個のアミノ酸 (N末端側よりposition-1 (P1) ~P9と呼ばれる。) により構成されていることが多く、ペプチドは溝の両端からはみ出すことなく納まっている (図1A, B)(7-9)。MHCクラス I 分子で多型を示すアミノ酸残基の多くは、分子の先端にあるペプチドを収容する溝を構成する $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインに集中している。このような多型によりペプチド収容溝の形状が変化するため、MHCクラス I 分子に結合可能なペプチドの構造もMHCクラス I 分子ごとに、ペプチドのNあるいはC末端寄りのアミノ酸には一定の傾向 (MHCクラス I 結合モチーフ) が認められる(10)。各々A(P1)、B(P2)あるいはF(P9)ポケットに収容される(図1B) (6, 11)。これらのポケットとカッコ内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性 (親水性あるいは疎水性) および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドはMHCクラス I に結合する。MHCクラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖がTCRにより認識される。この状況は特にアミノ酸の数が10個以上のペプチドで顕著である。

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つCD4分子を発現するT細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に限定して発現するHLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインはB細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する。抗原提示細胞はHLA クラス I 結合性ペプチドの提示のみならず、HLA クラス II 分子により提示される抗原のプロセッシングと提示という重要な機能を担っている。

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドはMIIC (MHC class II compartments) やCIIV (class II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHCクラス II 分子のペプチド収容溝には、MHCクラス I 結合ペプチドと比較して長い10~30数個 (多くは15個前後) のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している(12, 13)。MHCクラス I ではペプチ

ドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の（通常 4~5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4~5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス II 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する(13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い（図 2A, B）。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジーの状態になるなどして免疫寛容（トレランス）の状態にあり、応答を示すことはない。しかし、細胞表面に数千~数万個発現している HLA クラス I 分子のうちの数個~数十個が非自己抗原ペプチドを結合していると、CTL はこれを認識して細胞傷害活性を発現する。一方、抗原提示細胞表面の HLA クラス II 分子のうち数十~数百個が非自己抗原をペプチドを結合すると、CD4 陽性ヘルパー T 細胞がこれを認識して免疫応答を開始する。

Figure 2

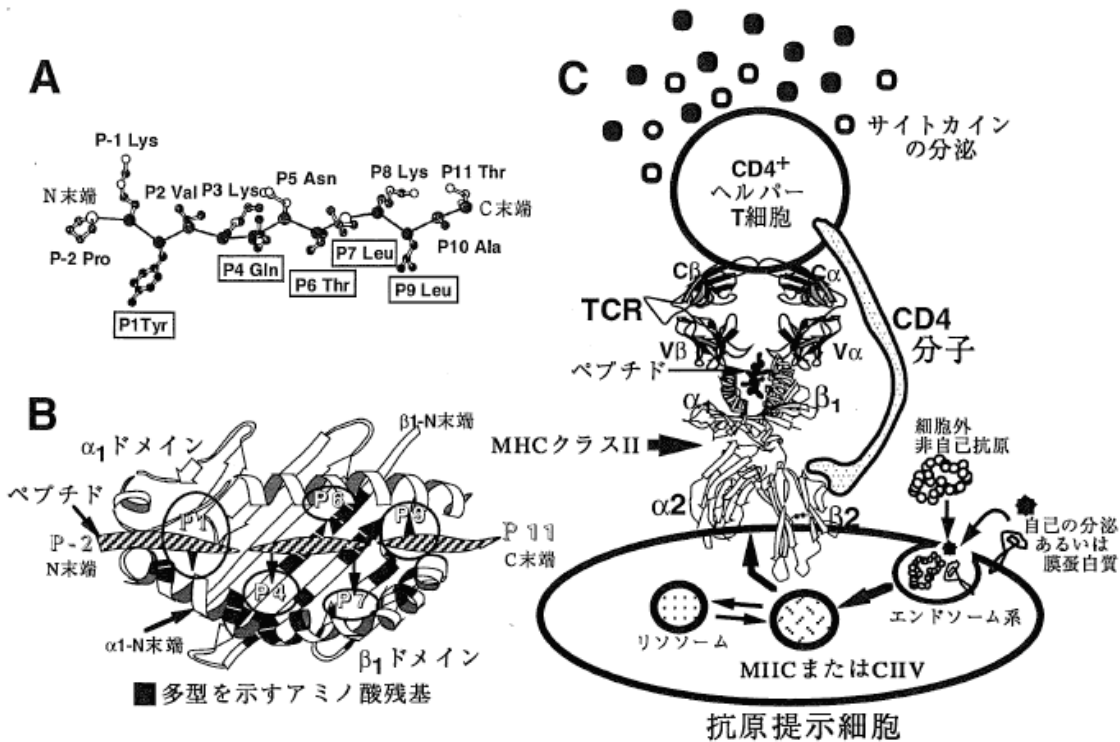


図 2. MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4+ヘルパー T 細胞への提示

A. MHC クラス II 分子 (HLA-DR1) により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子はMHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子はMHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。B. HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上 (TCR 側) より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C. 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺T細胞に提示される様子を示す。α1, α2, β1 および β2 は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分の α, β は TCR の α 鎖と β 鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし

「悪性腫瘍に対して免疫系の応答は有効か」という疑問に対する、現時点での答えは以下のとおりであろう。腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)中に腫瘍に反応性の T 細胞が多いこと、癌患者の末梢血に腫瘍抗原に対する免疫応答が検出されることなどから、免疫系は腫瘍と戦っているが、腫瘍を排除するには至っていない。

従来の免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答のなかに抗腫瘍効果を期待したものであった。これに対し近年は、腫瘍に特異的な免疫応答をいかに増強するかが研究の焦点となっている。この分野では 1) HLA により提示される腫瘍拒絶抗原ならびにペプチドの同定、および 2) これを認識する T 細胞の活性化方法の開発、が重要な問題となっている。近年の基礎免疫学の進歩により多くの腫瘍拒絶抗原が発見され、T 細胞活性化のメカニズムも次第に明らかとなり、腫瘍免疫学は新しい局面を迎えつつある。

前述したように腫瘍拒絶抗原が細胞内でペプチドへと分解され HLA クラス I 分子により腫瘍細胞の表面に発現されると、主に CTL がこれを認識し腫瘍細胞を傷害する。ただし、多くの腫瘍細胞は抗原を一度も認識したことのないナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80(B7-1)/CD86(B7-2)などの共刺激分子を発現しておらず、直接 CTL を活性化することは出来ない。図 3 に示したように CD80/86 分子を発現する最もすぐれた抗原提示細胞である樹状細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパー T 細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブ T 細胞が活性化されてエフェクター T 細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくても T 細胞レセプター (TCR) が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、T 細胞はこれを認識して免疫応答を示す (14)。この際に CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する (図 3)。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

[illegible]

腫瘍細胞それ自体は、ナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80/86 などの分子を発現していないことが多い。腫瘍抗原を貪食した樹状細胞は、これらをペプチドに分解し、HLA クラス I あるいは HLA クラス II 分子と結合した形で細胞表面に提示する。この HLA とペプチドの複合体を CD8 陽性ナイーブキラー T 細胞あるいは CD4 陽性ナイーブヘルパー T 細胞が T 細胞レセプターを介して認識するとともに、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞上の CD80/86 分子と結合して活性化される。一旦活性化されたエフェクター T 細胞は CD80/86 を発現していない腫瘍細胞に対しても免疫応答を示すことができる。CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定

科学的基盤に立った癌の免疫療法を確立するための第一のステップは、ターゲットとなる腫瘍抗原を同定することである。このために、20世紀初めよりヒトや実験動物に発生した種々の癌を用いて多大な努力がなされてきた。しかし、腫瘍抗原の存在をヒトの癌で実証することはむずかしく、長いあいだその存在すら疑われていた。地道な研究が実を結び、ヒトの腫瘍抗原が分子レベルで明らかにされたのは、1991年であった。Ludwig 癌研究所 (Brussels Branch) の Boon らのグループ (15)は、メラノーマ患者の細胞傷害性 T 細胞が認識する腫瘍抗原、MAGE の遺伝子クローニングに成功した。彼らの論文が、ヒトの腫瘍抗原に科学的根拠を与え、また腫瘍抗原の同定方法も確立させた最初の報告であった。インターロイキン(IL)-2 使用による CTL のクローン化と長期培養と遺伝子の発現クローニング法という二つのよく確立された技術を組み合わせたことと、T 細胞による抗原認識の分子機構の解明という学問的進展がこれを可能ならしめた。CTL は抗原丸ごとを認識するのではなく、抗原蛋白質由来の 8~12 個のアミノ酸から成るペプチドと、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) の遺伝子産物である MHC クラス I 分子とが結合した複合体を認識する (2)。MHC 分子の役割は、ペプチド (抗原) を T 細胞に提示することである。したがって、抗原蛋白そのものが細胞表面に存在する必要はなく、核や細胞質に存在する分子も適切にペプチドに分解され MHC 分子に結合すれば、細胞表面に移動して T 細胞に認識される。この画期的な発見は、それまで主に抗体を用いて検出することにより細胞表面分子に限定して考えられていた腫瘍抗原の概念を大きく変え、腫瘍抗原となりうる分子の種類と数を飛躍的に拡大させた。

Boon らの発表後、癌患者由来の CTL が認識するメラノーマやほかの癌の腫瘍抗原が、分子生物学的方法、もしくは生化学的方法を用いて同定されている (16-20)。最近、抗腫瘍免疫における CD4⁺ヘルパー T 細胞の重要性が指摘され、これが認識する腫瘍抗原も分子生物学的方法や生化学的方法を用いて同定されるようになってきた (21, 22)。同定された抗原をターゲットにした癌の免疫療法の臨床試験が、欧米でもわが国でもすでに開始されている (23-26)。しかし、T 細胞の活性化を指標にした癌抗原の遺伝子発現クローニングによる同定には技術的な制約が多く、これまで同定された腫瘍抗原はメラノーマに関連するものが主であり、他の種々の癌における腫瘍抗原の同定にまでは普及しなかった。

抗体を用いた腫瘍抗原同定の試みは、CTL による試みより長い歴史をもつ。特に腫瘍特異的モノクローナル抗体は大きな期待をもって迎えられた。しかし、作製された抗体の多くは分化抗原に対するもので、”癌特異的”な抗原は同定されず、しかも癌免疫療法での抗体の有用性は特定の抗原を発現する癌に限定されたものとなっている。しかし、1995年にドイツ・Saarland 大学の Pfreundschuh ら (27)により、

癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が認識する腫瘍抗原を、遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)が確立された。SEREX 法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでに SEREX 法により同定された多数の腫瘍抗原 (28-31)がデータベース化されている(<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB>)。

また、我々が世界に先駆けて行った cDNA microarray analysis を用いて腫瘍特異抗原の探索を行う方法も有用であることが判明してきている。さらにこれらの方法で同定された抗原の一部をターゲットにした抗腫瘍免疫療法の臨床試験も開始されている。

5-4) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に使えるという共通性（発現頻度）、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、抗原消失性、自己免疫などの副作用、などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。すなわち、理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として以下の3つが考えられる。1) 癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原；癌細胞の拒絶までは至らないとしても、癌患者の血液中に抗原特異的な抗体やT細胞の存在が検出できるもの。2) 発現の組織特異性が優れた抗原；癌細胞での発現は強いが、正常組織にはほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないもの。たとえば、胎児期組織および癌組織のみに発現する癌胎児性抗原や、癌細胞と免疫系から隔離された組織のみに発現する癌精巣抗原（CT 抗原）など。3) 免疫系からの逃避が起これにくい抗原；癌細胞の悪性形質転換、組織浸潤や転移に重要な役割を担っている分子で、癌細胞がその発現を欠落すると、癌の悪性形質を失うもの。

また、現在までに同定されているヒト癌抗原を分類すると、①cancer-testis 抗原、②組織特異抗原、③変異ペプチド抗原、④癌遺伝子、癌抑制遺伝子産物、⑤癌胎児性抗原、⑥癌細胞で発現が増強している抗原などがあげられるが、T細胞によって認識されるヒト腫瘍抗原の同定法として以下の4つがあげられる。①癌化に関連した腫瘍抗原の候補に対するT細胞応答の解析；細胞の癌化に関連した癌遺伝子や癌抑制遺伝子産物の突然変異部分、融合蛋白質の境界部分、あるいはウィルス抗原に由来するペプチドを特異的に認識するT細胞の証明(変異Ras、変異p53、BCR/ABL、TEL/AML1 ほか)。②癌細胞に特異的に反応するT細胞株(クローン)を利用した、癌細胞由来のcDNAライブラリーのスクリーニング(MAGE-1/3、チロシナーゼ、gp100、Melan-A/MART-1、SART-1 ほか多数)。③癌患者血清中の抗腫瘍抗原IgGを利用した、癌細胞由来のcDNAライブラリーのスクリーニング(SEREX 法)(NY-ESO-1 ほか多数)。④cDNA microarray analysis による、遺伝子発現の組織特

異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定と、その抗原性の解析（PP-RP (32)、Glypican-3 (33)ほか）。

cDNA マイクロアレイ解析の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原候補の同定に cDNA マイクロアレイ解析を用いることの最大の利点は、一度に数千～数万種類の遺伝子の発現をスクリーニングできる点にある。そこでまず理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質のうちの 2) の条件を満たす遺伝子を選出することができる。場合によっては 3) の条件を満たす遺伝子を選出することもできる。さらに cDNA マイクロアレイ解析は患者毎に遺伝子発現を解析することができるため、当該癌組織について各遺伝子を高発現する症例の頻度も知ることができる。

我々はすでに cDNA マイクロアレイ解析を用いて、肝細胞癌で Glypican-3 (GPC3)(34)、食道癌で proliferation potential-related protein (PP-RP) (35)、膵癌で Cadherin 3/P-cadherin (CDH3)遺伝子(36)が特異的に高発現していることを報告している。GPC3 は癌胎児性抗原で胎盤と肝細胞癌組織に高発現する遺伝子であり、PP-RP は cancer-related autoantigen で胎盤にしか発現しない遺伝子で、CDH3 も胎盤にしか発現を認めなかった。これらの発現パターンから理想的な癌抗原であることを確認している。さらに、これらの抗原について、当該抗原を発現するがん細胞を傷害する CTL を誘導できるペプチドを同定し、GPC3 に関しては肝細胞癌の免疫療法に関する第 1 相臨床試験を開始している。

図 4

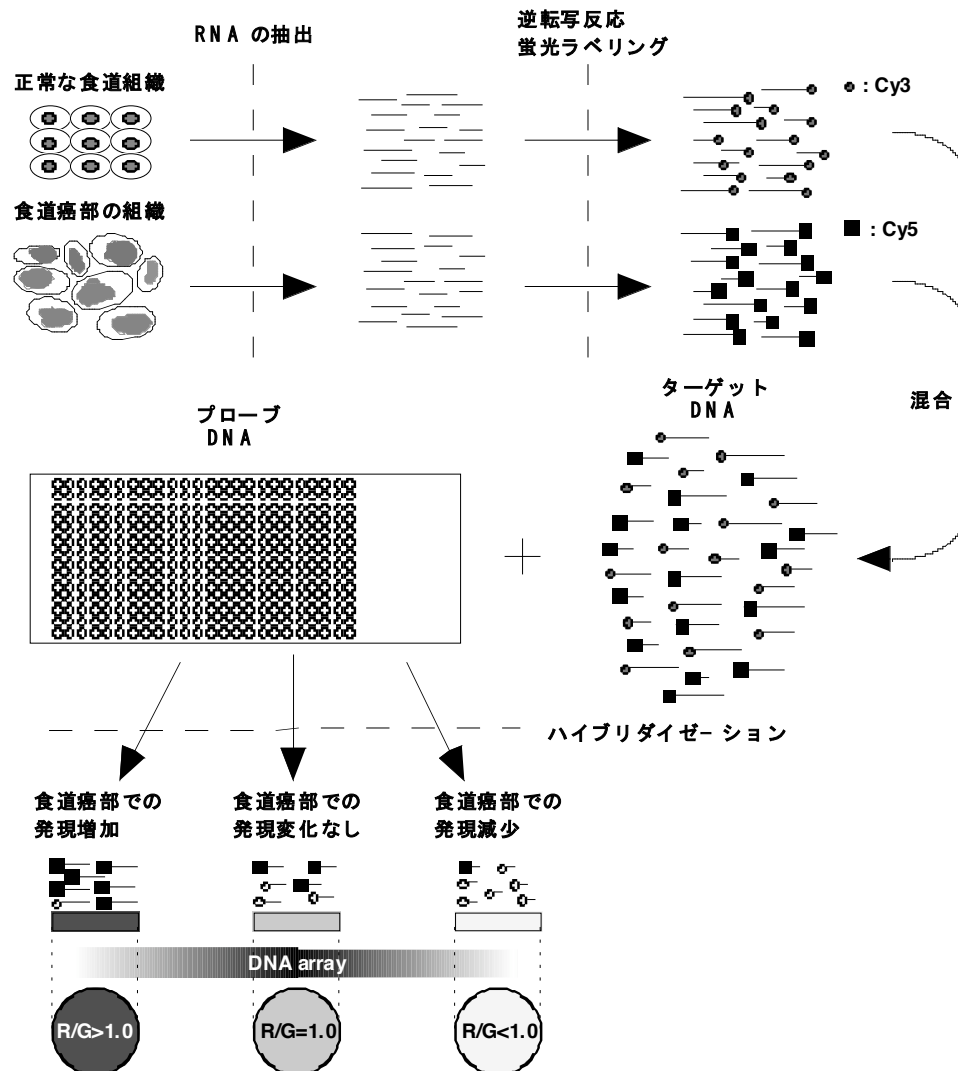


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

比較する2つの状態の細胞や組織からRNAを抽出する(今回の場合、食道癌部と非癌部組織を Laser capture microdissection にて回収し、それぞれの組織からRNAを抽出した)。逆転写反応により cDNA を合成する際に、2種類の蛍光色素をそれぞれ取込ませ標識する(今回の場合、肺癌癌部 DNA を Cy5 で、非癌部 DNA を Cy3 で標識した)。標識された cDNA を混合し、ターゲット DNA とする。プローブ DNA をアレイしたスライドガラス上でハイブリダイゼーションを行ったのち、非特異的な結合を洗浄し取り除き、CCD カメラあるいは蛍光スキャナーを用いてハイブリダイゼーション後の蛍光画像を取込み、疑似カラー(Cy3:赤、Cy5:緑)をつけて表示するとともに、それぞれの蛍光強度の比(R/G)を計算し、遺伝子発現プロファイルとして示す。

5-5) Cancer-testis (CT) 抗原

CT 抗原と総称される抗原は、名前が示すとおり種々の癌組織および正常組織では testis(睪丸)、卵巣、胎盤のみに発現する抗原群で、ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原 MAGE が CT 抗原の代表である (16)。発現パターンから免疫療法の理想的なターゲットと考えられており、同定された CT 抗原をターゲットとした抗腫瘍免疫療法の臨床試験がすでにおこなわれている (24,25)。

CT 抗原がなぜ癌患者の免疫系に認識され、またなぜ免疫治療の理想的なターゲットなのであろうか？生殖系の細胞には MHC 分子の発現がないか非常に少なく、T 細胞に抗原を提示する能力が小さい。結果として、生殖細胞は免疫系から”隔離”されている状態にあり、生殖系細胞のみに発現する分子は免疫系に認識されることもなく、トレランスも誘導されていない。しかし、生殖系細胞のみに発現する分子がいったん癌細胞に発現すると、そのペプチド断片が MHC 分子と結合して T 細胞に提示され、免疫反応を惹起すると考えられている。抗腫瘍免疫療法においては、CT 抗原に対する CTL は MHC 分子が存在しない生殖系細胞を攻撃することなく、癌細胞のみを選択的に攻撃すると考えられる (26)。

CT 抗原は、もともと同定された癌に限らず、さまざまな癌に発現する。食道癌より同定された NY-ESO-1 は、メラノーマの約 40% に、また乳癌の 30% にも発現する。また、メラノーマで同定された SSX-2 が乳癌にも発現していることも確認されている。この事実は、CT 抗原が抗腫瘍免疫の標的として多くの癌に応用できる可能性を示しており、その有用性を高めている。しかし、胃癌や、大腸癌などの消化器系癌では、CT 抗原の発現頻度はきわめて低く、CT 抗原のみをターゲットにしてすべての癌で免疫療法を実現するには至っていない。

5-6) 樹状細胞を用いた癌の免疫療法

前述のように癌特異抗原の同定が進むにつれて、特定の癌抗原を投与することによって癌特異的な免疫反応を誘導しようという方向に研究が発展していった。近年、強力な抗原提示細胞である樹状細胞(dendritic cell; DC) の研究が急速に進むにつれて、この細胞に癌抗原を加えて、提示させれば強力な抗腫瘍免疫反応を誘導できるのではないかと考えられるようになった (26,27)。

ナイーブ T 細胞を活性化するためには、DC からの T 細胞に対する MHC・ペプチド複合体の提示による TCR を介するシグナルとともに、共刺激と総称されるシグナルを送ることが必要である。DC は成熟してはじめて CD80、

CD86などの共刺激分子を強発現するため、有効な抗原特異的免疫反応を誘導するためには、DCを成熟させることが重要となる。この役割を担うのが自然免疫反応である。病原微生物がToll様受容体 (Toll-like receptor : TLR) などを介して自然免疫系を強く活性化することにより産生される炎症性サイトカインや、菌体成分そのものの刺激を受けてDCが成熟し、その結果、微生物に対する有効な獲得免疫反応が誘導されるわけである。これに対し、通常癌細胞は自然免疫系を強く活性化するような分子を発現していないことから、何もしなければDCは活性化されず有効な抗腫瘍免疫反応は起こりえない。このような癌細胞の免疫原性の欠如を補うために、癌抗原を加えたDCを*in vitro*で活性化し、自然免疫反応によってDCに生じる変化をあらかじめ人為的に起こしてから*in vivo*に戻すことにより、腫瘍特異的なT細胞を強く活性化しようとするのが、DCを用いた癌免疫療法の基本的な考え方である。

癌細胞を殺す最も重要なエフェクター細胞はCD8陽性の細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes ; CTL) であることから、DC療法でもCTLを活性化することに主眼が置かれている。しかしそれだけでなく、CD4陽性のヘルパーT細胞がDCを活性化したり種々のサイトカインを産生したりすることによって、CTLの誘導や活性維持に重要な役割を果たすとともに、マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー細胞といった自然免疫系の細胞も幅広く活性化することで効果をもたらす (28)。したがって、CTLのみならずCD4陽性T細胞も活性化することが、強力な免疫反応を誘導するうえで重要である。

効果的なDC療法を行う際に考慮すべきパラメーターがいくつか存在するが、DCにどのような抗原を加えるかということは重要な事項である。癌細胞は正常細胞にない分子や正常細胞より過剰に発現する分子を持っており、これらが癌特異的免疫療法の標的となりうる。これらの蛋白質に由来し、MHCクラスI分子に結合するペプチドをDCにパルスすることが行われているが、1種類のペプチドを用いるだけでは少数のCTLしか誘導できず、またCD4陽性T細胞のヘルパー作用も誘導できないため、十分な抗腫瘍効果が得られにくい。したがって、複数のペプチドや蛋白質抗原のような多価抗原を用いることが重要と考えられる。対象となる癌が、既知の腫瘍抗原を発現していない場合は、腫瘍細胞の溶解物や死んだ腫瘍細胞をDCに負荷して、未知の腫瘍抗原をすべて提示させるという方法もある。

5-7) 本研究の目的

本研究は、非小細胞肺癌組織に高発現する新規癌特異的抗原を同定し、その癌免疫療法への応用を目指すことを、目的とする。このため、HLA-A2トランスジェニックマウスを用いて、自己免疫現象を誘導しないHLA-A2拘束性の癌特異抗原由来のCTLエピトープを同定し、このようなペプチドを用いて、健常人および癌患者の末梢血単核細胞から、HLA-A2と癌抗原を発現する癌細胞を傷害するCTLを誘導できるか否か検討する。

6 実験方法

6-1) マウス

HLA-A2 (HHD) トランスジェニックマウス(HLA-A2 Tgm)(29,30)は、フランスのパスツール研究所の Lamonnier 博士より恵与されたマウスで、埼玉医科大学 松井政則教授が繁殖させたマウスの譲渡を受けて、7 週齢のものを用いた。

HLA-A*0201 の mRNA の発現は RT-PCR 法にて mRNA の発現を確認した。この HLA-A2 Tgm は、 α 1 および α 2 ドメインが HLA-A2 に由来し、 α 3 ドメインがマウス H-2D^b に由来する異種キメラ MHC クラス I 分子(HLA-A2(HHD))で、N 末端にリンカーを介してヒト β 2 ミクログロブリンを共有結合した分子を発現する。さらに、マウス β 2 ミクログロブリン遺伝子およびマウス H-2D^b 遺伝子が標的破壊されていることにより、マウス固有の MHC クラス I 分子を発現することなく、HLA-A2 (HHD) を発現する遺伝子改変マウスである。

6-2) ノザンブロット解析と Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

ノザンブロット解析は 20 μ g の各種 totalRNA をナイロンメンブレン (hybond N, アマシャム社)に転写したもの、もしくは Poly (A)RNA blots of human tissues をもちいた。CDCA1 特異的 cDNA プローブを 32P でラベルしたものをハイブリダイズさせ CDCA1 遺伝子の発現を検出した(31)。各 1 μ g の totalRNA からランダムヘキサマーを用いて Superscript reverse transcriptase (インビトロジェン社)により各 cDNA を合成した。CDCA1 遺伝子特異的な RT-PCR プライマーは sense:

5'-CCCAGATATAATGTA GCTGAGATT-3', antisense:

5'-CTCCTGGTGTGCGGCGTTTA-3'で、PCR 反応は 94℃5 分で変性、55℃のアニーリングで 32 サイクル行った(32)。

6-3) CDCA1 の免疫組織化学的解析

患者組織サンプルの免疫組織化学的染色は Nuf2 マウスモノクローナル抗体 (Abcam 社)を用いた。Vectastain ABC-PO(rabbit IgG, mouse IgG)キット(Vector Laboratories 社)を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法で、免疫染色を行った。一次抗体は、Nuf2 マウスモノクローナル抗体を 200 倍希釈で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりパラフィンを除去して、正常ウサギ血清にて室温で 30 分間ブロックし、一次抗体を 4℃で 14 時間反応させた後に

phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した。さらにビオチン標識抗マウス抗体と室温で1時間反応させた後にPBSで洗浄し、ストレプトアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼと室温で1時間反応させてPBSで洗浄し、diaminobenzidineで発色させた。対比染色としてヘマトキシリン染色を施行した(33,37)。

6-4) 使用した血液サンプルと細胞

ヒト血液検体およびDNAを用いた研究に際しては、熊本大学医学薬学研究部の倫理委員会の承認を経た後に実施した。健常人はHLA-A2陽性のボランティアからインフォームドコンセントを得た後に採取した。非小細胞肺癌患者からの血液サンプルは、2006年9月から2007年12月までの間に、熊本大学呼吸器外科にて治療中のHLA-A2 (A*0201)陽性の非小細胞肺癌患者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。末梢血サンプル30~50mlを、先に報告したFicoll-Conray密度勾配遠心法(38)によって、末梢血単核球細胞(PBMC)を単離した。各患者がHLA-A2を有しているか否かは、PBMCを抗HLA抗体とFITC抗マウスIgG抗体により間接蛍光染色し、フローサイトメトリー(FACScan, Becton Dickinson)を用いて検討した。T2-A*0201 (TAP遺伝子の発現を欠損し、HLA-A*0201陽性の細胞株：HLA-A2エピトープペプチド特異的なCTLの誘導の確認に用いた)、膵癌細胞株Panc1 (CDCA1+、HLA-A2陽性)は理研バイオリソースセンターより購入し、CDCA1を発現しない大腸癌細胞株COLO201(HLA-A2陽性)、CDCA1を発現している肺癌細胞株EBC-1、LC-1sq (ともにHLA-A2陰性)は、ヘルスサイエンスリサーチリソースバンクから購入した。

6-5) レンチウイルスベクターを利用した遺伝子導入

レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。17 μ gのCDCA1cDNAをいれたCSII-CMV-RfAとCSII-EF-RfAの自己不活化ベクターと、10 μ gのpCMV-VSV-G-RSV -RevとpCAG-HIVgpを、10cm培養ディッシュで培養した293T細胞にLipofectamine 2000 (インビトロジェン)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入の60時間後にメディアウムを交換し、viral particleを超遠心(50,000 g $\times$ 2時間)でペレットにした。そのペレットを50 μ lのRPMI1640で溶解し、COLO201細胞を5 $\times$ 10⁴と10 μ lのviral suspensionを加えU底96穴のプレートで培養した。CDCA1遺伝子の発現は、ウェスタンブロット法で確認した(39,40)。

6-6) HLA-A2 Tgmを用いたCTLエピトープの決定

HLA-A2 (HHD) トランスジェニックマウス(HLA-A2 Tgm)の骨髓細胞から DC(BMDC)を誘導した。誘導法に関しては先に報告した方法(41)を用いた。すなわち HLA-A2 Tgm の骨髓細胞 2×10^6 個にマウスの GM-CSF を 5ng/ml の濃度で加え、10cm 培養プレート内で 1 週間培養して誘導した。このようにして得られた BMDC を、上記の解析により同定し合成したペプチド 40 種類のうち、2-3 種類ずつの混合物(各 10 μ M)と 2 時間インキュベートした後に、HLA-A2 Tgm 一匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与(免疫)した。1 週間の間隔をおいて 2 回免疫した後、マウスの脾細胞を回収して Cytotoxic T Lymphocyte (CTL：細胞傷害活性 T リンパ球)の誘導に用いた。CD4 陽性 T リンパ球による非特異的反応の影響を除外するため、脾細胞より MACS Beads を用いて、CD4 T リンパ球を取り除いたものを用いた(42-46)。

免疫されたマウスの CD4 陰性脾細胞を、試験管内でペプチドを負荷した BMDC により再刺激した。培養 6 日目に再び、ペプチドを負荷した BMDC およびペプチドを負荷していない BMDC を標的細胞とし、ペプチド特異的に CTL が産生する IFN- γ を ELISPOT 法にて検討した。IFN- γ 産生 CTL の数に相関するスポット数の検出は、検出キット(BD Biosciences ELISPOT Set)のプロトコールに準じて行った。前日から IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレートに培養液にて洗浄後、エフェクター細胞(100 μ L /well)と標的細胞(100 μ L /well)を混合し、37°C で 22 時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と 2 時間、さらにストレプトアビジン-HRP と 1 時間反応させ、基質溶液にて IFN- γ 陽性のスポットを検出した(42)。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置を用いて行った。

図 5

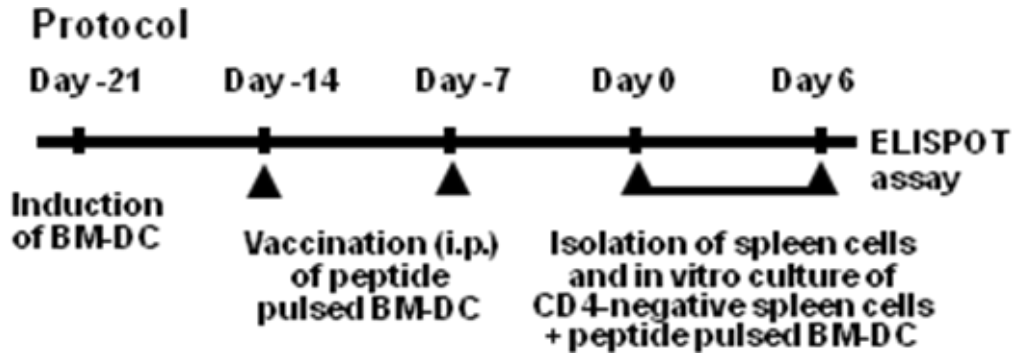


図 5 HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定

HLA-A2 Tgm の骨髄細胞 2×10^6 個にマウスの GM-CSF を 5 ng/ml の濃度で加え、10 cm 培養プレート内で 1 週間培養して誘導した。このようにして得られた BMDC を上記で決定したペプチド 40 種類のうち 2-3 種類ずつの混合物(各 $10 \mu\text{M}$)と 2 時間インキュベートした後に、HLA-A2 Tgm 一匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与(免疫)した。1 週間の間隔をおいて 2 回免疫した後、マウスの脾細胞を回収して Cytotoxic T Lymphocyte (CTL: 細胞傷害活性 T リンパ球)の誘導に用いた。CD4 陽性 T リンパ球による非特異的反応の影響を除外するため、脾細胞は採取時 MACS Beads を用いて CD4 T リンパ球を取り除いたものを用いた。免疫されたマウスの CD4 陰性脾細胞を、試験管内でペプチドを添加した BMDC により再刺激した。培養 6 日目に再び、ペプチドを添加した BMDC およびペプチドを添加していない BMDC を標的細胞とし、ペプチド特異的に CTL が産生する IFN- γ を ELISPOT 法にて検討した。

6-7) 健常人、癌患者 PBMC からの CDCA1 反応性 CTL の誘導

HLA-A2陽性の健常人、非小細胞肺癌患者由来のPBMCを、HLA-A2に拘束性を示すCTLエピトープ候補ペプチドで刺激し、HLA-A*0201拘束性にペプチドを認識するCTL細胞株を樹立した。具体的な方法を、図6および以下に示す(47,48)。

まず全血より Ficoll-Conrey 密度勾配遠心法にて PBMC を分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec 社) を用いて CD8 陽性細胞と CD14 陽性細胞を分離し、CD8 陽性細胞は凍結保存した。CD14 陽性細胞を GM-CSF (100 ng/ml) と IL-4 (100 U/ml) を添加した 2% 自己血清添加 AIM-V メディウム中で培養して、4 日目に OK432 を加え、さらに 1 日培養して成熟樹状細胞 (DC) に分化させ、抗原提示細胞として使用した。CTL の誘導には 2% 自己血清添加 AIM-V メディウムを使用した。このようにして調整した DC に、 $20 \mu\text{M}$ のペプチドと $\beta 2$ ミクログロブリン ($4 \mu\text{g/ml}$) を加え、2 時間後に 35Gy の放射線を照射した。細胞を洗浄しペプチドを取り除いた後、48 穴ブ

レートに1ウェルあたり凍結保存しておいた 5×10^5 個の CD8 陽性細胞と、ペプチドパルスした 1×10^4 個の DC を加え培養した。第0日目に IL-7 (10ng/ml) を、第3日目に IL-2 (20U/ml) を加え、さらに新しい DC の誘導を始めた。第8日および第15日に同様の DC を準備し、CD8 陽性細胞を AIM-V で1回洗浄後、DC で再刺激した。この際に IL-7 (5 ng/ml) と IL-2 (10 U/ml) を加えた。ペプチド特異的 CTL の誘導の確認は、T2-A*0201 細胞を標的にして IFN γ -ELISPOT 法と ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験を指標として、最後の抗原刺激から6日後に行った。また、陰性対照としてペプチドパルスなし、あるいは HIV ペプチドを加えた群に対する反応も検討した。 ^{51}Cr 放出法による細胞傷害性の定量は T2-A*0201 細胞を $^{51}\text{Cr}(\text{Na}^{51}\text{CrO}_4)$ で1時間ラベルした後、96穴平底プレートに 1×10^4 ずつまき、その10、20、40、倍数の培養25日目の CTL を加え、6時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された ^{51}Cr を測定することにより行った(34,35,47,49)。ELISPOT 法はプロトコールに沿って行った。前日から IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレートに培養液にて洗浄後、エフェクター細胞 ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) と標的細胞 ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) を混合し、 37°C で22時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と2時間、さらにストレプトアビジン-HRP と1時間反応させ、基質溶液にて IFN- γ 陽性のスポットを検出した。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置を用いて行った(34)。

また PE でラベルされた CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ ペプチドを結合した HLA-A2(A*0201) テトラマーは、Medical&Biological Laboratories 社より購入した。

図 6

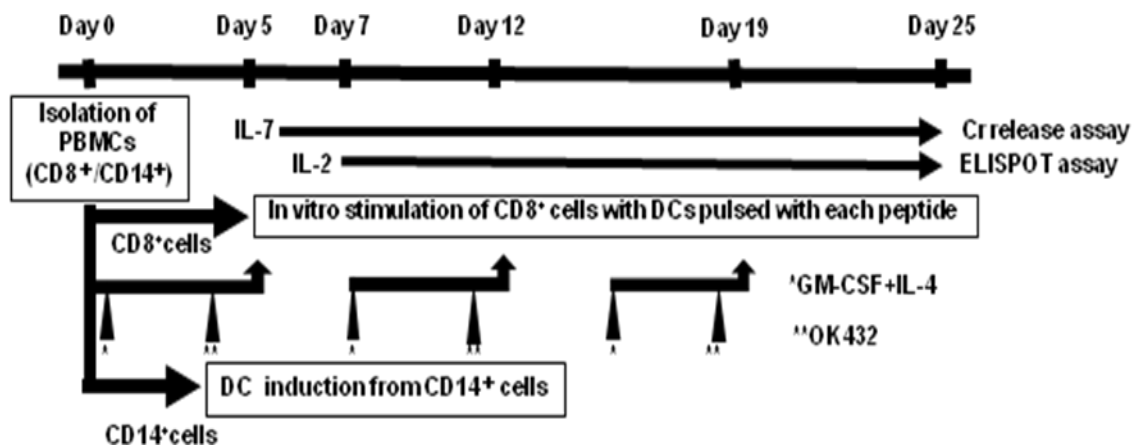


図 6 CDCA1 ペプチド特異的ヒト CTL の樹立法

全血より Ficoll-Conrey 密度勾配遠心法にて PBMC を分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec 社) を用いて CD8 陽性細胞と CD14 陽性細胞を分離し、CD8 陽性細胞は凍結保存した。CD14 陽性細胞を GM-CSF (100 ng/ml) と IL-4 (100 U/ml) を添加した 2% 自己血清添加 AIM-V メディウム中で培養して、4 日目に OK432 を加えさらに 1 日培養し、成熟樹状細胞 (DC) に分化させ、抗原提示細胞として使用した。CTL の誘導には 2% 自己血清添加 AIM-V メディウムを使用した。このようにして調整した DC に、20 μ M のペプチドと β 2 ミクログロブリン (4 μ g/ml) を加え、2 時間後に 35Gy の放射線を照射した。細胞を洗浄しペプチドを取り除いた後、48 穴プレートに 1 ウェルあたり凍結保存しておいた 5×10^5 個の CD8 陽性細胞と、ペプチドパルスした 1×10^4 個の DC を加え培養した。第 0 日目に IL-7 (10ng/ml) を、第 3 日目に IL-2 (20U/ml) を加え、さらに新しい DC の誘導を始めた。第 8 日および第 15 日に同様の DC を準備し、CD8 陽性細胞を AIM-V で 1 回洗浄後、DC で再刺激した。この際に IL-7 (5 ng/ml) と IL-2 (10 U/ml) を加えた。ペプチド特異的 CTL の誘導の確認は、T2-A*0201 細胞を標的にして IFN γ -ELISPOT 法と 51 Cr 放出法による細胞傷害試験を指標として、最後の抗原刺激から 6 日後に行った。

7 実験結果

7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍特異抗原候補遺伝子の選出

我々は、すでに東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により、cDNA マイクロアレイ解析を用いて、非小細胞肺癌に特異的に高発現する遺伝子を同定するために以下の2つの手順を踏み、上記の理想的な癌抗原としてふさわしい cell division cycle associated 1;CDCA1 の同定に成功した。①非小細胞肺癌 37 例の癌部と非癌部における 27,648 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、多くの症例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を選ぶ。②28 臓器（胎生期の 4 臓器を含む）の正常組織における 27,648 種類の遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を選ぶ。

この方法により、非小細胞肺癌患者 37 例の癌部と非癌部における 27,648 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を 9 種類選び、次にそれらの各遺伝子について 28 臓器（胎生期の 4 臓器を含む）の正常組織における 27,648 種類の遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された精巣にしか発現しない遺伝子を探し出した。今回、我々が腫瘍抗原として同定した CDCA1 は、非小細胞肺癌患者 37 例中 9 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上（平均 15,694）で、精巣に発現する以外は、ほとんどの正常臓器に発現を認めない遺伝子であった（図 7）。

図 7

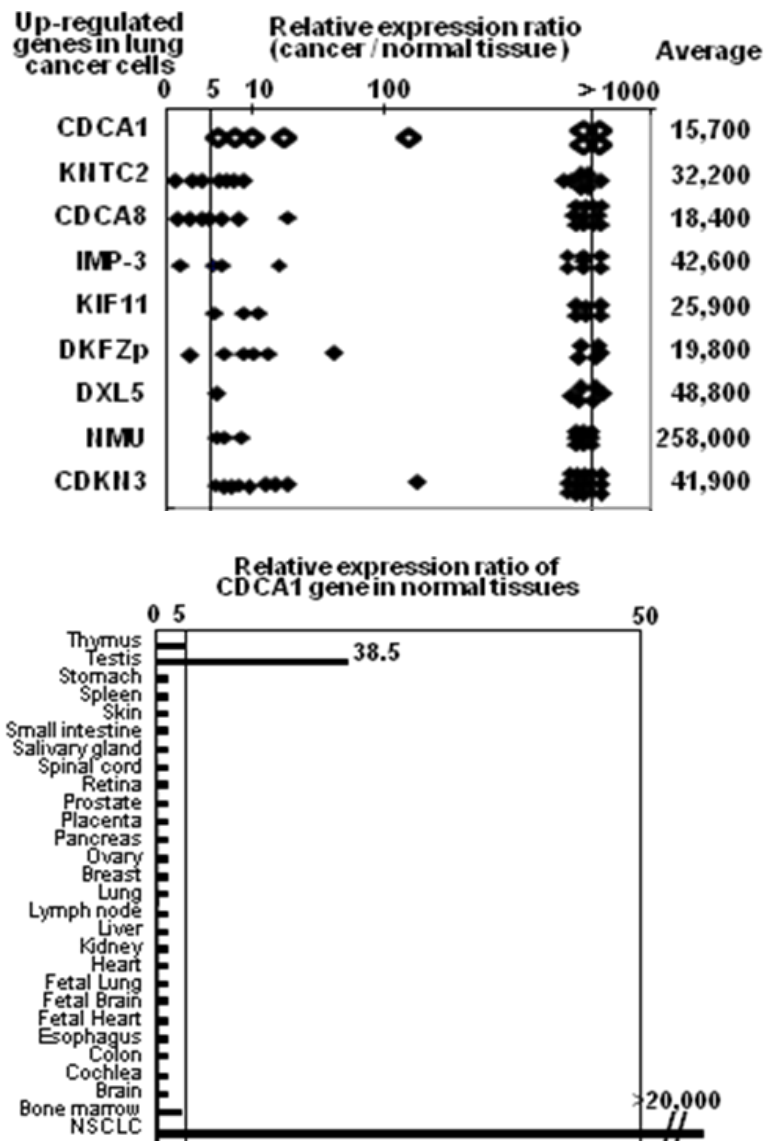


図 7 cDNA マイクロアレイ解析による癌部と正常組織における CDCA1 遺伝子の発現

cDNA マイクロアレイ解析を用い、癌部で高発現する遺伝子 9 種類をリストアップした。正常および胎生期の組織における CDCA1 遺伝子の発現を cDNA マイクロアレイにより解析したところ、CDCA1 は精巣のみに高発現していたが、他の成人正常成人組織における発現は、非常に低かった。

7-2) RT-PCR とノザンブロット解析による癌細胞株、癌組織および

正常組織における CDCA1 遺伝子の発現解析

14 種類の正常組織、5 種類の肺癌細胞株と 21 名の非小細胞肺癌患者由来の癌および正常組織での CDCA1 遺伝子の発現を RT-PCR で解析した。また、9 種類の正常組織の CDCA1 の発現をノザンブロット解析にて確認した。その結果 RT-PCR、ノザンブロット解析ともに CDCA1 遺伝子は正常組織には精巣しか発現しておらず、cDNA マイクロアレイの結果と同様であった（図 8）。

図 8

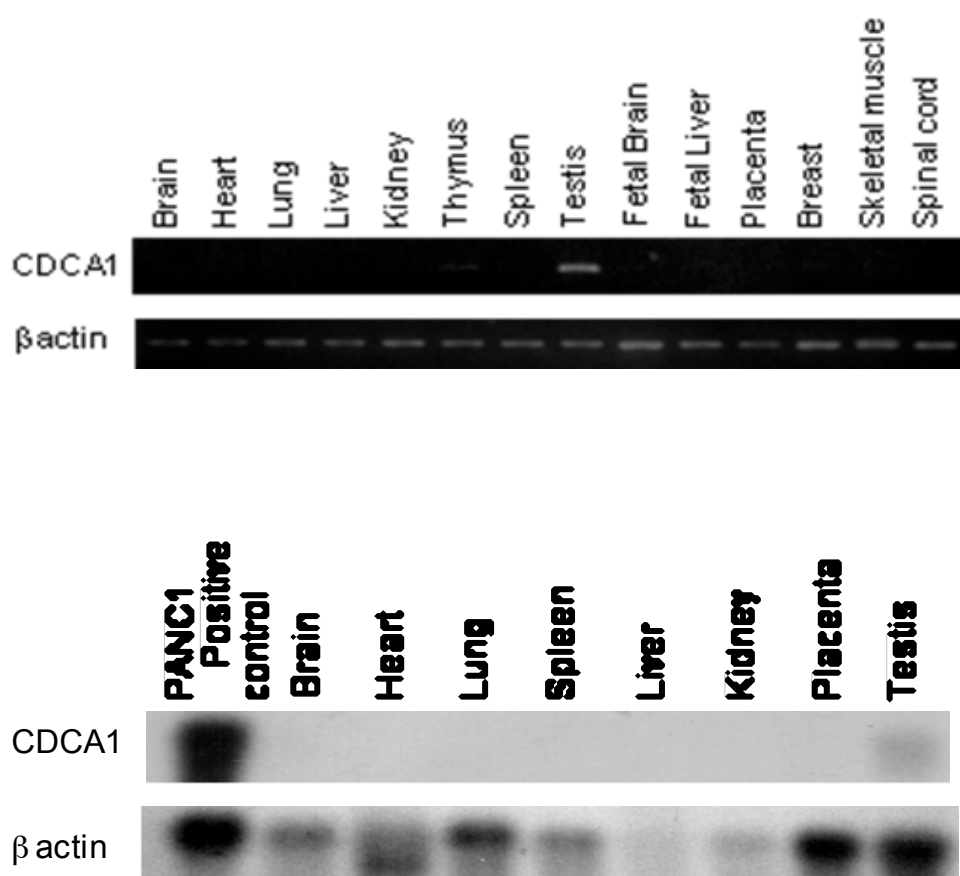


図 8 RT-PCR とノザンブロットによる正常組織における CDCA1 遺伝子の発現解析

正常組織について CDCA1 mRNA の発現を解析した。どちらも正常組織では精巣以外には、CDCA1 mRNA の発現は認めなかった。

また、肺癌細胞株である 1-89、A549、PC14、RERF-LC-KO（腺癌）、LC-1sq（扁平上皮癌）、および SBC5、Lu65（小細胞癌）ともに CDCA1 を強く発現していた。また、他の癌細胞株では 164（メラノーマ）、MCF7、CRL1500(乳癌)、Co9-22(口腔癌)、PANC1（膵癌）、sw620(大腸癌)、および TE10(食道癌)にも CDCA1 が高発現していた。非小細胞肺癌患者 19 症例中 18 症例の癌部組織に、CDCA1 が mRNA レベルで高発現していた。さらに非癌部と癌部の mRNA の発現を比較したところ、5 症例の肺癌患者のすべての癌部において CDCA1 が高発現していた（図 9）。

図 9

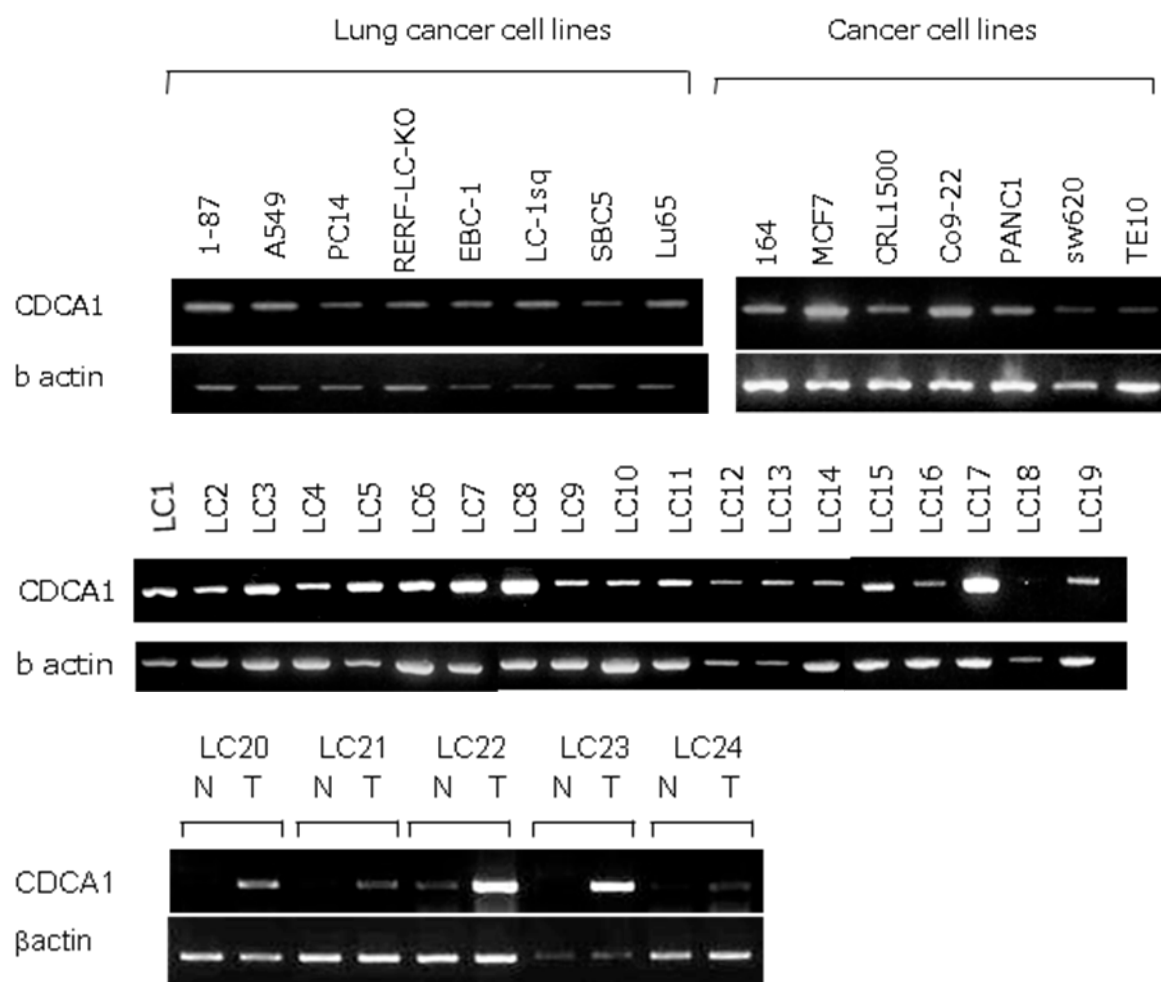


図 9 RT-PCR による癌細胞株および肺癌組織における CDCA1 遺伝子の発現解析

肺癌細胞株 8 種類、他の組織の癌細胞株 7 種類における CDCA1mRNA の発現を解析した。また、肺癌組織は 24 症例について検討し、そのうち 5 症例で非癌部と癌部での遺伝子発現の比較を行った。

さらに、他の癌腫における CDCA1 の発現レベルを cDNA マイクロアレイで検討したところ、小細胞肺癌、胆管細胞癌、膀胱癌、腎癌の多くの症例において非癌部と比較して癌部で高発現を認めた (図 10)。

図 10

Cancerous tissue	Relative expression ratio cancer/normal(>5)		Average
Small cell lung cancer	15/15	100 %	10,299
Non small cell lung cancer	9/ 9	100 %	15,694
Cholangiocellular cancer	12/12	100 %	6,885
Bladder cancer	28/28	100 %	3,880
Renal cell cancer	7/ 7	100 %	15
Prostate cancer	17/20	85 %	24,653
CML	14/17	82 %	27,898
Malignant lymphoma	7/ 9	78 %	26,159
Cervical cancer	12/16	75 %	10,068
Osteosarcoma	14/19	74 %	88,855
Breast cancer	25/39	64 %	3,070
Sarcoma	18/36	50 %	6,134
Colon cancer	4/10	40 %	2,996
Esophageal cancer	4/18	22 %	3.4
AML	0/16	0 %	1.6
Gastric cancer	0/ 5	0 %	0.4

図 10 各種癌組織における CDCA1 mRNA を高発現する症例の頻度に関する cDNA マイクロアレイ解析結果

各癌腫における CDCA1 遺伝子の発現を、cDNA マイクロアレイ解析データの分析により解析したところ小細胞肺癌、胆管細胞癌、膀胱癌、腎細胞癌をはじめとする、多様な癌で高率に高発現を認めた。

7-3) CDCA1 タンパク質の免疫組織化学的解析

正常脳、肝、肺、腎、脾、精巣と肺癌組織についてパラフィン標本を用いて CDCA1 タンパク質の発現を免疫組織化学的解析により検討した（図 11）。正常組織においては、精巣のみに CDCA1 タンパク質の発現が認められたが、脳、肝、腎、脾、では認められなかった。また、肺癌患者の組織サンプルでは腺癌、扁平上皮癌ともに CDCA1 タンパク質は高発現していた。

図 11

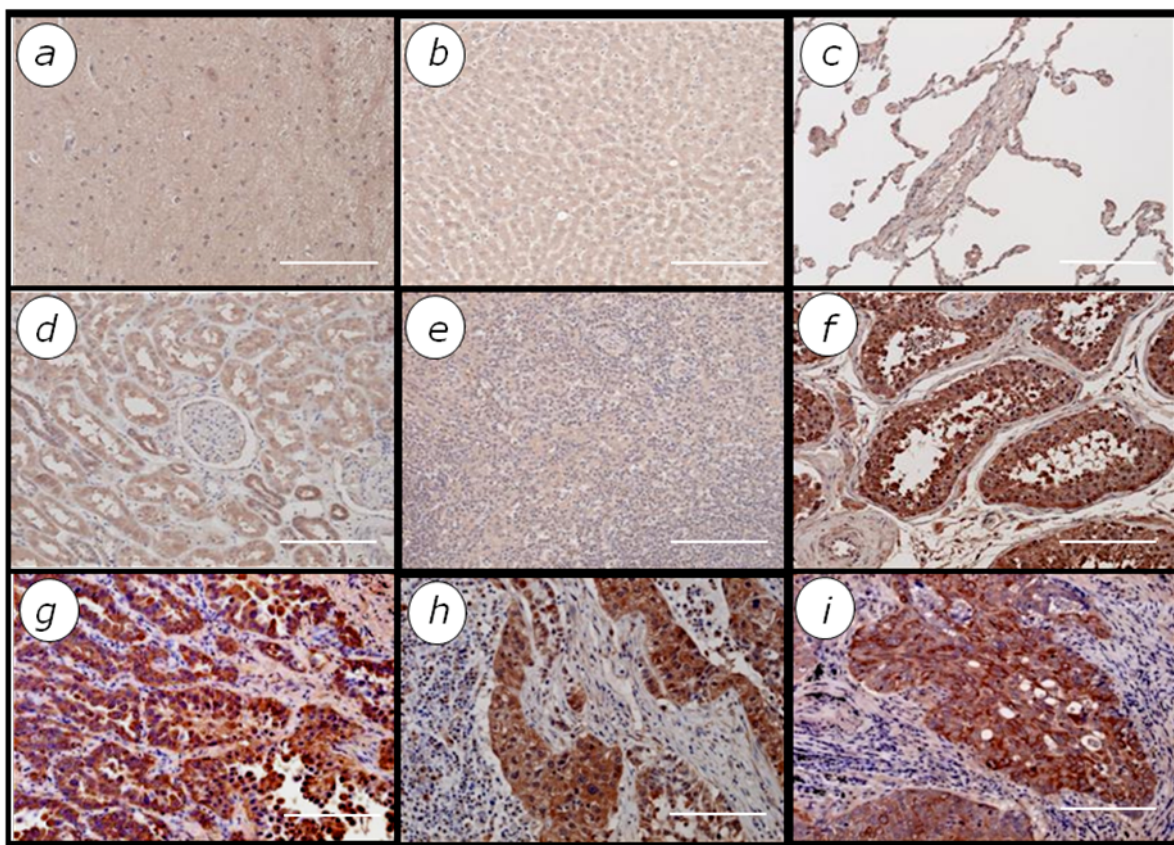


図 11 CDCA1 タンパク質の免疫組織化学的染色

脳 (a), 肝 (b), 肺 (c), 腎 (d), 脾 (e), 精巣 (f), 肺癌組織(ADC : g, h), 肺癌組織 (SqCC : i). スケール : 100 μ m.

7-4) HLA-A2 Tgm を用いたヒト CDCA1 における HLA-A2 拘束性マウス CTL エピトープの同定

ヒト CDCA1 のアミノ酸配列の中から、BIMAS ソフトウェアプログラムを用いて、HLA-A2(A*0201)に高親和性を示すと推定される 9 個あるいは 10 個のアミノ酸により構成されるペプチドを 40 種類選んだ（表 1）。BM-DC にペプチドを負荷したものを HLA-A2Tgm に 2 回免疫し、脾細胞を採取し CD4 陽性細胞を除いた後、これを各ペプチドを負荷した BM-DC で *in vitro* において刺激し、強くかつ再現性をもって CDCA1 特異的 CTL を誘導できるペプチドを ELISPOT アッセイにて決定した。その結果 CDCA1₆₅₋₇₃ と CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ の 2 種類のペプチドにおいて、ELISPOT アッセイの刺激細胞として、これらのペプチドを負荷させた BM-DC に対するスポット数とペプチドを負荷させないスポット数が、それぞれ 106 ± 13.1 vs 42.0 ± 9.64 、 42.3 ± 4.02 vs 24.6 ± 7.19 と CDCA1 特異的 CTL 応答の誘導を認めた($p < 0.05$)（図 12）。

表 1

ヒト CDCA1 由来で HLA-A2 に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト

No.	Position	Subsequence Residue Listing	Binding Score	No.	Position	Subsequence Residue Listing	Binding Score
1	65	YMMPVNSEV	855	21	227	KLLVVSLEKI	311
2	120	FLSGIINFI	607	22	222	RLNEIKLLVV	269
3	222	RLNELKLLV	285	23	294	QLYQKKIQDL	157
4	351	KLATAQFKI	211	24	87	NLVTHLDSFL	117
5	182	QLSDGIQEL	201	25	181	KQLSDGIQEL	64.5
6	141	FLWQYKSSA	190	26	47	MIYMRALQIV	49.1
7	3	TLSFPRYNV	69.6	27	402	KLGIQQLKDA	40.0
8	285	CLPSCQLEV	69.6	28	343	RLMIVKKEKL	38.7
9	228	LLVVSLKEI	40.8	29	309	KLASILKESL	36.6
10	386	AVYERVTTI	27.5	30	22	ILTGADGKNL	36.3
11	372	TVIEDCNKV	25.0	31	193	SLNQDFHQKT	28.3
12	243	KIVDSPEKL	20.7	32	52	ALQIVYGIRL	21.4
13	257	KMKDTVQKL	17.8	33	44	VLHMIYMRAL	16.7
14	88	LVTHLDSFL	17.5	34	35	DLYPNPKPEV	16.7
15	447	KIDEKTAEL	16.9	35	165	KLERIDSVPV	15.6
16	358	KINKKHEDV	16.4	36	65	YMMPVNSEVM	12.3
17	416	KLKSQEIFL	14.4	37	154	QLNAAHQEAL	10.5
18	82	FLPFSNLVT	14.1	38	60	RLEHFYMMPV	10.2
19	344	LMIVKKEKL	12.9	39	344	LMIVKKEKLA	6.1
20	44	VLHMIYMRA	12.7	40	453	AELKRKMFKM	4.8

BMAS ソフトウェアを用いて HLA-A2 に親和性が高いと推測される CDCA1 由来のペプチドを 40 種類選択し、HLA-A2.1(HHD)Tgm に免疫するエピトープ候補ペプチドとした。

図 12

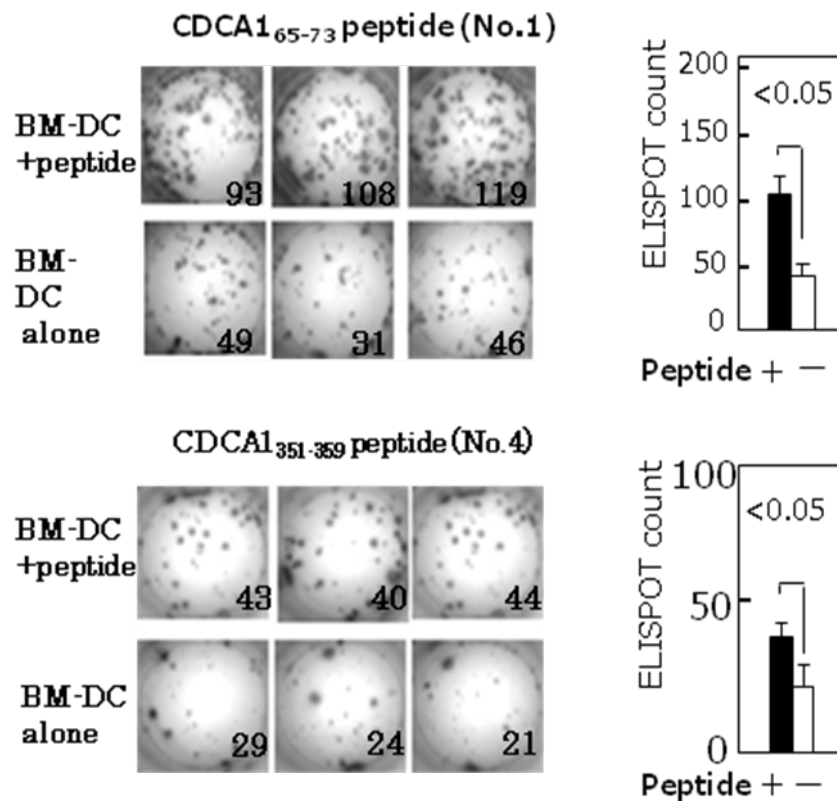


図 12 HLA-A2 拘束性マウス CTL エピトープの同定

HLA-A2 Tgm 由来の BM-DC にペプチドをパルスしたものを HLA-A2Tgm に 2 回免疫し、脾細胞を採取し CD4 細胞を除いた後、さらに各ペプチドを負荷させた BM-DC で in vitro において刺激し、強くかつ再現性をもって CDCA1 特異的に CTL を誘導できるペプチドを ELISPOT アッセイにて決定した。

7-5) HLA-A2 陽性の健常人あるいは非小細胞肺癌患者の PBMC からの CDCA1 特異的 CTL の誘導

CDCA1₆₅₋₇₃ および CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ ペプチドを用い、HLA-A2 陽性の健常人あるいは非小細胞肺癌患者の PBMC を刺激して誘導した CTL について、CDCA1 特異的な免疫応答を検討した。HLA-A2 陽性のドナーから得られた PBMC から CD8 陽性 T 細胞を分離し、ペプチドを負荷した自己の樹状細胞 (DC) で 3 回刺激して得られた CTL は、ペプチドを負荷していない DC、あるいは関係ない HIV ペプチドを負荷した DC と比べて、CDCA1 ペプチドを負荷した T2-A0201 細胞に対して、明らかに強い IFN- γ 産生を示した (図 13)。

図 13

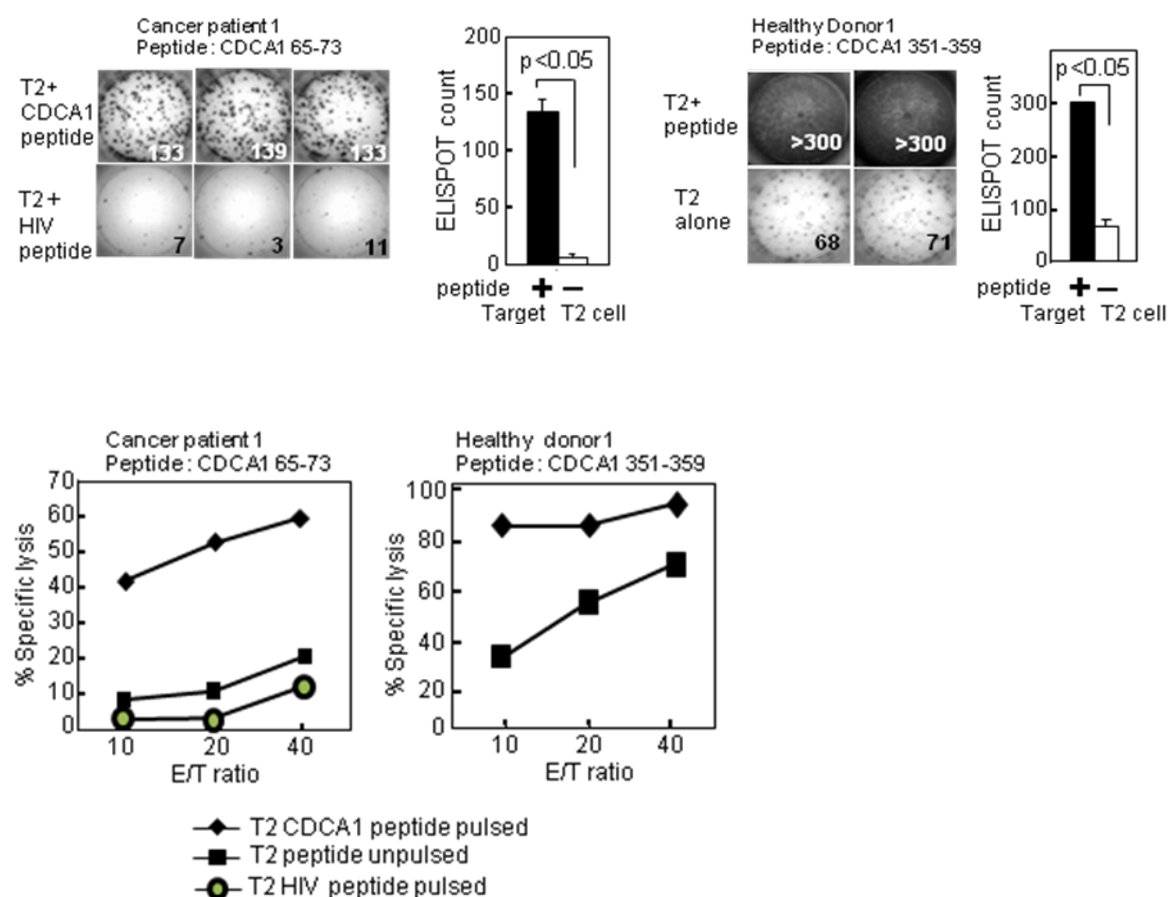


図 13. CDCA1 ペプチドで誘導した CTL のペプチド特異的な細胞傷害活性

CDCA1₆₅₋₇₃、CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ ペプチドを負荷した DC で、肺癌患者あるいは健常人の末梢血 CD8 陽性 T 細胞を刺激することにより誘導された CTL は、CDCA1 ペプチドを負荷した T2 細胞に反応して IFN γ を産生した。いっぽう、ペプチドを負荷しない T2 細胞、あるいは無関係な HIV ペプチドを負荷した T2 細胞に対して、CTL は反応しなかった。

また、DC に負荷するペプチドの濃度を変化させ ELISPOT アッセイを行ったところ、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度でペプチド濃度に依存して、ペプチドを負荷した T2-A0201 細胞に対して、 $\text{IFN-}\gamma$ 産生を示した (図 14)。

図 14

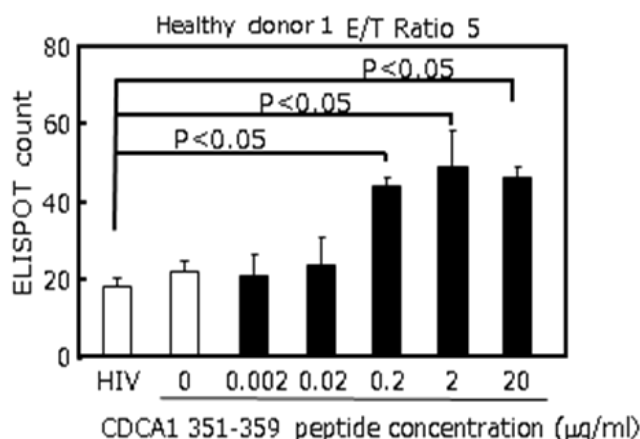


図 14 CTL 応答のペプチド濃度依存性の検討

ELISPOT アッセイにおいて、ターゲットの T2 細胞にパルスする $\text{CDCA1}_{351-359}$ ペプチドの濃度を変えて免疫応答を観察した。その結果、ペプチド濃度の増加に比例して、CTL の $\text{IFN-}\gamma$ 産生応答も増強した。

次に CTL の誘導に用いたペプチドが癌細胞内で CDCA1 タンパク質がプロセッシングを受け、該当 HLA -クラス I 分子と CDCA1 ペプチドの複合体を形成して癌細胞の表面に提示されるか否かを検討した。このために、 CDCA1 を発現しない HLA-A2 陽性の大腸癌細胞株 CLOL201 に GFP を遺伝子導入した COLO201/Mock、および、CLOL201 に CDCA1 遺伝子を導入した COLO201/ CDCA1 を標的細胞として用いて CTL の免疫応答を検討した (図 15)。健常人 1 から CDCA1_{65-73} ペプチドを用いて誘導された CTL は、コントロールの COLO201/Mock と比べ、 CDCA1 を遺伝子導入した COLO201/ CDCA1 に対して、ELISPOT アッセイで強い免疫応答を示した。健常人 2 から $\text{CDCA1}_{351-359}$ ペプチドを用いて誘導された CTL でも、同様の免疫応答が観察された。以上の結果は、今回同定した 2 つのエピトープペプチドが、 CDCA1 遺伝子を発現する癌細胞内で自然なプロセッシングを受けて産生されていることを示している。

図 15

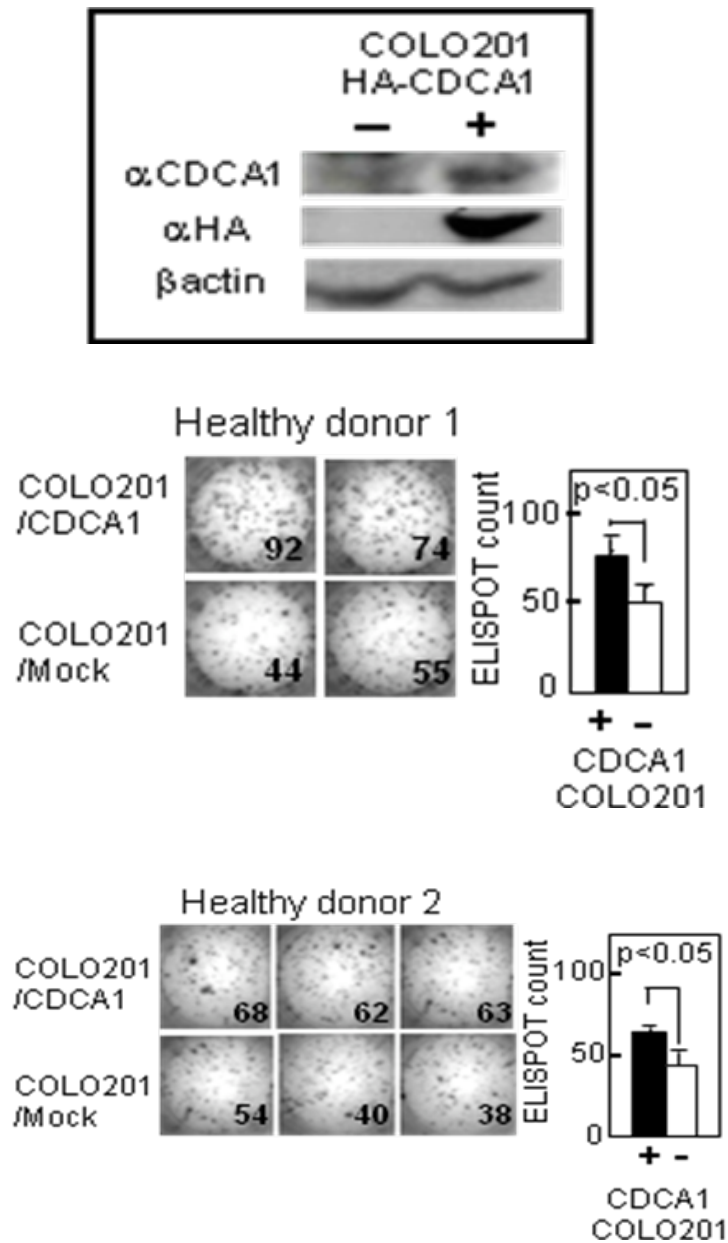


図 15 CDCA1 遺伝子強制発現細胞に対する CTL の免疫応答

CDCA1 を発現しない HLA-A2 陽性の大腸癌細胞株 COLO201 に GFP を遺伝子導入した COLO201/Mock、および、CDCA1 を発現しない HLA-A2 陽性の大腸癌細胞株 COLO201 に CDCA1 遺伝子を導入した COLO201/CDCA1 を標的細胞として用いて検討した。その結果、CTL が CDCA1 を特異的に認識して反応していることが、明らかとなった。

さらに内因性の CDCA1 を発現している癌細胞株において検討した結果を図 16 に示す。健常人 1 から誘導した CTL は、CDCA1 と HLA-A2 を共に発現する PANC1 に対して非常に強い免疫応答を示したが、CDCA1 陽性であるが HLA-A2 陰性である A549 に対しては、ほとんど反応を示さなかった。さらに細胞傷害活性を検討したところ、CDCA1₆₅₋₇₃ ペプチドを用いて癌患者 1 から誘導した CTL は、CDCA1 陽性かつ HLA-A2 陽性である PANC1 に対して、非常に強い細胞傷害活性を示したが、CDCA1 陽性であるが HLA-A2 陰性である A549、CDCA1 陰性であるが HLA-A2 陽性の COLO201 に対しては、ほとんど細胞傷害活性を示さなかった。同様に健常人 1 でも CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ ペプチドを用いて誘導した CTL が、PANC1 に強い細胞傷害活性を示したが、A549 には示さなかった。これらの結果は、今回同定した 2 つの CTL エピトープペプチドが、CDCA1 発現癌細胞内で CDCA1 タンパク質がプロセッシングを受けて産生され、HLA-A2 に結合して癌細胞の表面に発現していることを示すものである。

次に HLA-A2-CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ ペプチドテトラマーを用いて、CTL 中の HLA-A2 拘束性かつ CDCA1 特異的 CTL の頻度を確認した。CD8 陽性 T 細胞中に占めるテトラマー陽性 CTL の頻度と、ELISPOT アッセイにおける IFN- γ 産生細胞のスポット数は、強く相関していることが確認された。以上より HLA-A2 拘束性かつ CDCA1 ペプチド特異的 CTL が、この免疫応答に関わっていることが明らかとなった (図 17)。

図 16

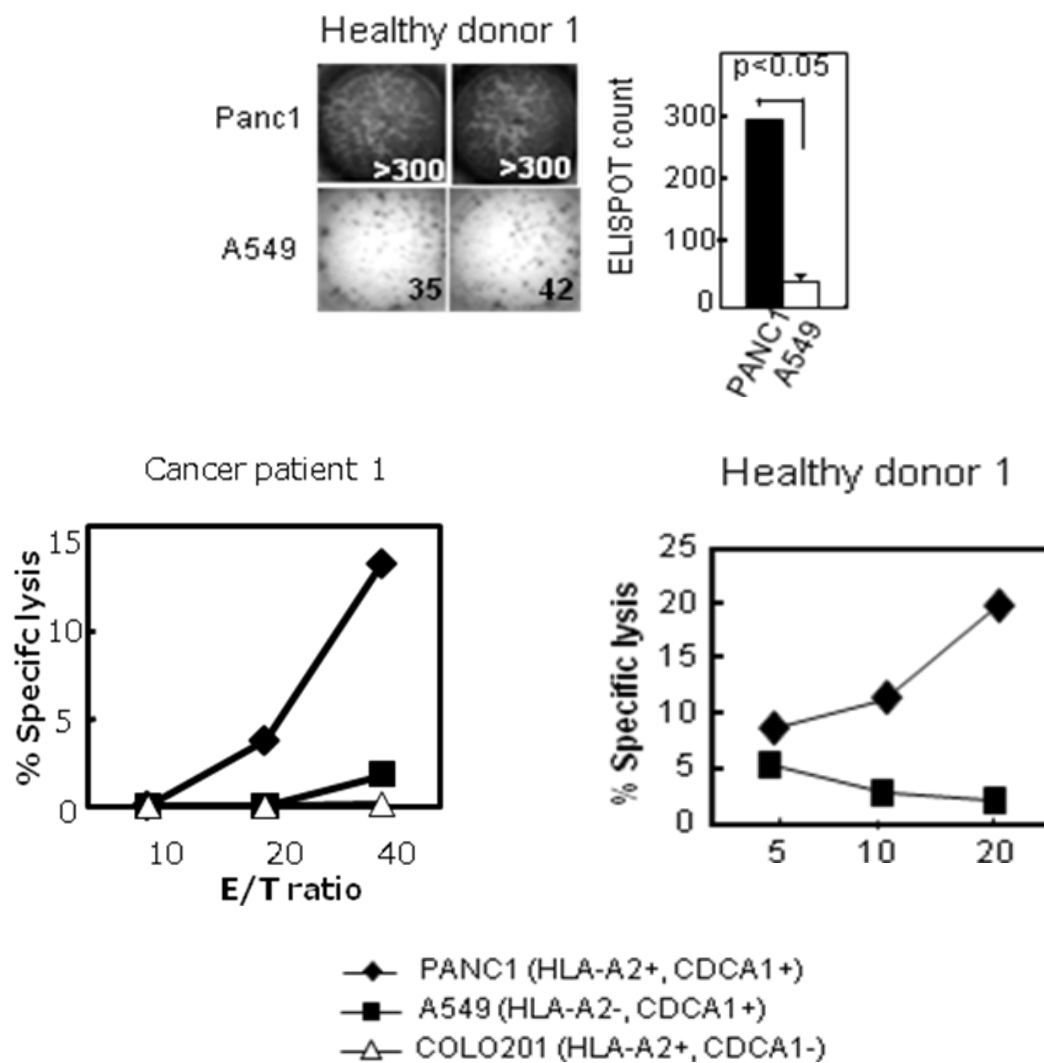


図 16 CDCA1 陽性癌細胞株に対する CTL の細胞傷害活性の検討

癌患者 1、健康人 1 から CDCA1 ペプチドで誘導した CTL を用いて、癌細胞株に対する免疫応答を IFN γ ELISPOT アッセイ (図上) と ^{51}Cr 放出試験 (図下) により検討した。その結果、CTL は CDCA1 と HLA-A2 を共に発現する癌細胞株に対してのみ、免疫応答を示すことが明らかとなった。

図 17

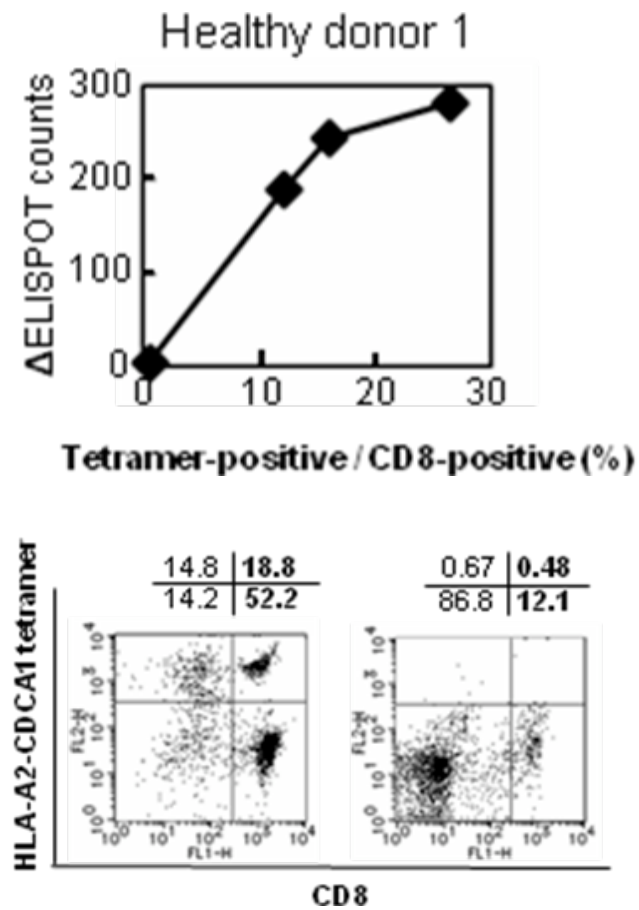


図 17 HLA-A2-CDCA1 351-359 ペプチドテトラマーによる HLA-A2 拘束性かつ CDCA1

特異的 CTL の検出

CD8 陽性 T 細胞中のテトラマー陽性細胞の頻度（図下）と、CTL が IFN γ ELISPOT アッセイに際して示したスポット数（図上）との間には、強い正の相関が観察された。

8 考察

癌特異抗原ペプチドを用いた CTL の誘導による癌免疫を確立する際には、癌特異抗原由来のペプチドが癌細胞内で、自然にプロセスされ当該ペプチドが HLA クラス I 分子により癌細胞の表面に提示されることが重要である。我々は、非小細胞肺癌患者の組織と正常組織の cDNA マイクロアレイ解析データを用いて、新規癌精巢 (CT) 抗原である CDCA1 を同定した。CDCA1 は mRNA、タンパク質レベルともに非小細胞肺癌組織と正常精巢のみに高発現している。精巢は免疫から隔離されている臓器であるため、CDCA1 をターゲットとした免疫療法では、CDCA1 ペプチド反応性 CTL は精巢を含めた正常組織を攻撃せず、非小細胞肺癌組織のみを攻撃すると考えられる。ゆえに、我々は CDCA1 を非小細胞肺癌の免疫療法の腫瘍関連抗原の候補として選んだ。

腫瘍関連抗原を癌免疫療法に利用する際には、当該分子が腫瘍の増殖あるいは生存に不可欠なものであるほど免疫療法には望ましい(35)。なぜならば、このような癌関連抗原は、染色体欠損、変異、低発現が起こりにくく、免疫回避が発生する危険性が小さいからである。CDCA1 は、細胞が有糸分裂をする際にキネトコアと紡錘体の微小管とが結合する際に必須で、これは細胞周期の維持に不可欠であることが報告されている (51)。また CDCA1 は、キネトコアの重要な部位である nuclear division cycle (NDC) 複合体の構成成分であり、染色体分裂が適切に行われるために重要な役割を果たして、この部分は多様な種において保存されている(52)。また、CDCA1 は Hela 細胞においてキネトコア中の centromere-associated protein E (CENP-E) が安定して局在するのに必要であり、RNAi を用いて CDCA1 遺伝子の発現を抑制すると、染色体分裂が異常となり最終的には細胞死に陥る(53)。この異常な染色体分裂は、アポトーシスあるいはカタストロフィーを誘導する原因ともなりうる。ゆえに CDCA1 は細胞の機能に必須のものであり、癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている分子である。

さらに CDCA1 は kinetochore associated 2 (KNTC2) とともにセントロメアタンパク複合体として報告されており、非小細胞肺癌の患者組織の免疫組織化学的染色で、発現が増加しているものでは予後不良との相関性が観察されている。また、CDCA1 のドミナントネガティブペプチドを用いると肺癌細胞株の増殖が阻害される (54)。術後の肺癌組織における CDCA1 の発現は有用な予後を予測するマーカーとなりうる。ゆえに CDCA1 をターゲットとした免疫療法は非小細胞肺癌の予後不良群に対する効果的な治療法と考えられる。

本研究で我々は、マウス H-2^b の内因性の MHC クラス I 分子を発現しない、HLA-A2 Tgm に CDCA1 ペプチドを免疫して、2 種類の HLA-A2 拘束性 CDCA1 エピトープペプチドを同定した。さらに我々は、健常人あるいは癌患者から分離した

PBMC を CDCA1 ペプチドで刺激することにより、CDCA1 に反応するヒト CTL を、誘導しえた。また我々は、これらのペプチド特異的な CTL 細胞株について、HLA-A2 拘束性に CDCA1 を発現する癌細胞株に対して細胞傷害性を示すか否か検討した。HLA-A2.1(HHD)Tgm は、ペプチドベースの免疫療法の動物モデルとして、前臨床に供されている。我々はさらに HLA-A2 拘束性の CTL エピトープを同定する際に HLA-A2.1 (HHD)トランスジェニックマウスが有用であることを確認した(29,30,34)。

この研究では、HLA-A2(A*0201)に親和性が高いと推定される CDCA1 由来のペプチドを、BIMAS ソフトウェアプログラムを用いて選び出したが、そのうちのいくつかのペプチドが有するアミノ酸は、ヒトとマウスとでは完全には保存されていなかった。たとえば、CDCA1₆₅₋₇₃ は 2 箇所ヒトとマウスではアミノ酸が異なっており (ヒト YMMPVNSEV、マウス YMMPMNIEV)、また CDCA1₃₅₁₋₃₅₉ は 1 箇所異なっていた (ヒト KLATAQFKI、マウス KLATARFKI)。したがって、HLA-A2 Tgm に対しては、非自己のヒト CDCA1 ペプチドは強いマウス CTL 応答を誘導するが、ヒトではこのように強い抗原性を示さない可能性が危惧された。しかし、我々は、これらのエピトープペプチドを用いて健常人と癌患者で CTL を誘導することができた。しかし、HLA-A2 Tgm を利用しているために、マウス CTL は認識できないが、ヒト CTL は認識可能なエピトープペプチドを見落としている可能性があることは否定できない。そこで、今後残りの 38 種類の CDCA1 ペプチドについても、ヒト PBMC を刺激して、その抗原性を確認する必要があると思われる。

我々は健常人あるいは癌患者の PBMC を *in vitro* で刺激することにより、CDCA1 反応性 CTL を誘導した。ペプチドを負荷した DC によって誘導された CTL は、CDCA1 を発現している癌細胞に対して HLA-A2 拘束性に細胞傷害活性を示した。ドナーの PBMC から CDCA1 ペプチド特異的かつ HLA-A2 (A0201) 拘束性 CTL が確実に誘導されていることは、HLA ペプチドテトラマー染色によって、さらに確認された。これらの CTL 応答は、程度の差はあれ再現性が確認されている。ゆえにこれらの CTL の反応は、CDCA1 特異的であると確信している。CDCA1 特異的 CTL の PANC1 に対する免疫応答が、相対的に弱い原因として、CDCA1 タンパク質のプロセッシングによる CTL エピトープペプチドの産生効率が低いため、あるいは PANC1 が何らかの理由により、CTL 抵抗性となっている可能性が考えられる。一方、これらの CTL は、CDCA1 ペプチドを負荷した T2 細胞には強い免疫応答を示した。これらの問題は、今後さらなる検討を必要とすると考えられる。

健常人や癌患者からの CDCA1 特異的 CTL の誘導は、さらなる癌関連抗原の検索と、その癌免疫療法への応用を促進するものである。さらに今後、我々は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胆管細胞癌、膀胱癌、腎細胞癌患者の PBMC から CDCA1 反応性 CTL を誘導する予定である。ペプチドやタンパクによるワクチン療法(55)、ペ

プチド負荷樹状細胞療法、タンパク質や腫瘍溶解物(56)、樹状細胞と腫瘍細胞のハイブリッド(57)、*ex vivo* で刺激して増殖させた腫瘍特異的 CTL 細胞株の養子免疫療法(58)など、抗腫瘍免疫を誘導する細胞療法には、多様な方法がある。我々が本研究で同定した CDCA1 ペプチドは、このような免疫療法への応用の可能性を秘めている。

9 結論

本研究では、cDNA マイクロアレイ解析を利用して、非小細胞肺癌に高発現する新規癌精巢抗原である CDCA1 を同定した。また CDCA1 は、非小細胞肺癌のほかにも小細胞肺癌、胆管細胞癌、膀胱癌および腎細胞癌にも高発現していることを確認した。患者の負担を軽減するとともに、*in vivo* 実験が可能な HLA トランスジェニックマウスを用いた実験により、CDCA1 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを迅速に決定した。さらに、これらのペプチドを用いて非小細胞肺癌患者の PBMC を刺激することにより、HLA-A2 拘束性かつ CDCA1 特異的に癌細胞を傷害する CTL の誘導が可能であることを示した。今後、これらの多様な癌患者を対象として、CDCA1 エピトープペプチドワクチンあるいは当該ペプチドを負荷した樹状細胞ワクチンなどを用いた、癌免疫療法の臨床試験を計画している。

10 参考文献

1. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287-99.
2. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-73.
3. Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 1996;17:86-91.
4. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369-96.
5. Heemels MT, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995;64:463-91.
6. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-8.
7. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326-9.
8. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290-6.
9. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12:181-207.
10. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995;41:178-228.
11. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219:277-319.
12. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711-8.
13. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-21.
14. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961-5.
15. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-7.

16. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:684-93.
17. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3515-9.
18. Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997;16:313-39.
19. Cox AL, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994;264:716-9.
20. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:277-88.
21. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999;284:1351-4.
22. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, et al. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1999;189:757-66.
23. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4:321-7.
24. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:143-50.
25. Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219-30.
26. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365, 1994
27. Fong, L. and Engleman, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 245-273, 2000.
28. Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H. I. and Pardoll, D. M. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 191: 541-550, 2000.
29. Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung G, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, et al. H-2 class I knockout,

- HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 1999;29:3112-21.
30. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.
 31. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25.
 32. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:6612-21.
 33. Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 2003;10:1777-82.
 34. Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, Fukuma D, Yokomine K, Harao M, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, et al. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:2689-97.
 35. Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, Matsuyoshi H, Tsukamoto H, Hosaka S, Komori H, Fukuma D, Ikuta Y, Katagiri T, Furukawa Y, et al. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin Cancer Res* 2004;10:6437-48.
 36. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y.: Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric and colorectal cancers. ***Clin. Cancer Res*** in press
 37. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, Yoshitake Y, Uemura Y, Nishimura Y. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol* 2004;172:776-86.
 38. Nakatsura, T Senju S. Ito M. Nishimura Y. Itoh K. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur. J. Immunol*; 2002;32, 826-836.

39. Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, Miyoshi H, Nakauchi H. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34(-) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2002;30:11-7.
40. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998;72:8150-7
41. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, Furukawa Y, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clinical Cancer Research* 2004;10:8630-8640
42. Bourgault Villada I et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64:8761-8766
43. Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki K, Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Kato H, Nakamura Y, Katagiri T. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. *Oncogene* 2004;23:2385-400.
44. Jinawath N, Furukawa Y, Hasegawa S, Li M, Tsunoda T, Satoh S, Yamaguchi T, Imamura H, Inoue M, Shiozaki H, Nakamura Y. Comparison of gene-expression profiles between diffuse- and intestinal-type gastric cancers using a genome-wide cDNA microarray. *Oncogene* 2004;23:6830-44.
45. Obama K, Ura K, Li M, Katagiri T, Tsunoda T, Nomura A, Satoh S, Nakamura Y, Furukawa Y. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2005;41:1339-48.
46. Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y. Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. *Int J Oncol* 2004;25:797-819.
47. Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y, Tahara H. Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2007.
48. Nakahara S, Tsunoda T, Baba T, Asabe S, Tahara H. Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res* 2003;63:4112-8.
49. Makita M, Hiraki A, Azuma T, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H, Fujita S, Tanimoto M, Harada M, Yasukawa M. Antitumor cancer effect of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2002;8:2626-31.

50. Yokomine K, Nakatsura T, Senju S, Nakagata N, Minohara M, Kira J, Motomura Y, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in Apc(Min/+) mice. *Cancer Sci* 2007;98:1930-5.
51. DeLuca JG, Moree B, Hickey JM, Kilmartin JV, Salmon ED. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J Cell Biol* 2002;159:549-55
52. DeLuca JG, Howell BJ, Canman JC, Hickey JM, Fang G, Salmon ED. Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Curr Biol* 2003;13:2103-9.
53. Liu D, Ding X, Du J, Cai X, Huang Y, Ward T, Shaw A, Yang Y, Hu R, Jin C, Yao X. Human NUF2 interacts with centromere-associated protein E and is essential for a stable spindle microtubule-kinetochore attachment. *J Biol Chem* 2007;282:21415-24
54. Hayama S, Daigo Y, Kato T, Ishikawa N, Yamabuki T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y. Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res* 2006;66:10339-48.
55. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-32.
56. Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L, McKenna E, Chang A, Mule J. Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet* 2000;356:1163-5.
57. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000;6:332-6.
58. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999;94:1201-8.