

学位論文
Doctor's Thesis

新規ヒト癌関連抗原 Secreted protein acidic and rich in cysteine
(SPARC)の癌の診断と治療における有用性
(Secreted protein acidic and rich in cysteine, an ideal cancer-associated antigen
useful for serum diagnosis and immnotherapy of cancers,
identified using cDNA microarray analysis)

生田 義明
Yoshiaki Ikuta

指導教授

西村 泰治
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

馬場 秀夫
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

川筋 道雄
熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻心臓血管外科学

2007年3月

目次

目次	1
1 要旨	3
2 発表論文リスト	5
3 謝辞	6
4 略語一覧	7
5 研究の背景と目的	8
5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示	8
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	10
図 2 MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4 ⁺ T 細胞への提示	11
5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし	12
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誘導	13
5-3) 従来腫瘍拒絶抗原の同定法	14
5-4) cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍拒絶抗原の同定法	15
図 4 cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の同定法の概要	16
5-5) 新規癌関連抗原 SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)について	17
5-6) メラノーマの臨床と腫瘍マーカー	17
5-7) 本研究の目的	18
6 実験方法	19
6-1) cDNA マイクロアレイ解析によるスキルス胃癌に高発現する腫瘍抗原遺伝子の解析	19
6-2) 使用した細胞	19
6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取	20
6-4) Quantitative Reverse Transcription-PCR (定量による RT-PCR)	20
6-5) Western blot 法	20
6-6) SPARC の免疫組織化学的解析	21
6-7) ELISA 法による、メラノーマ細胞培養上清、メラノーマ患者血清および血漿中の 可溶性 SPARC 蛋白質の検出	21
6-8) メラノーマ患者血清中の 5-S-CD (HPLC 法) および GPC3 (ELISA 法) の測定	22
6-9) HLA-A24 および H2-K ^d 拘束性 SPARC 特異的 CTL エピトープのモチーフ検索 (データベースでの検索)	22
表 1 ヒトとマウスで共通のアミノ酸配列をもち HLA-A24 および H2-K ^d 分子に結合すると 推定される SPARC ペプチド	23
6-10) SPARC 特異的 CTL エピトープの同定	24
6-11) BALB/c マウスを用いた自己免疫反応の検討	24
6-12) 細胞傷害活性の検討	25
6-13) In vivo 腫瘍増殖抑制実験	25
6-14) 統計学的解析	25
7 実験結果	26
7-1) cDNA アイクロアレイ解析を用いた腫瘍拒絶抗原候補遺伝子の選定	26
図 5 スキルス胃癌の cDNA マイクロアレイ解析データの解析	26
図 6 正常組織での SPARC 遺伝子の発現解析 (cDNA マイクロアレイ解析による)	27
7-2) ヒト正常組織における SPARC mRNA の発現解析 (RT-PCR)	28

図 7	ヒト正常組織における SPARC mRNA の発現	28
7-3)	ヒト正常組織における SPARC 蛋白質の発現(免疫組織化学的解析)	29
図 8	ヒト正常組織における SPARC 蛋白質の発現	29
7-4)	ヒトメラノーマ細胞株における SPARC mRNA および蛋白質の発現	30
図 9	メラノーマ細胞株における SPARC mRNA および蛋白質の発現	30
7-5)	ヒトメラノーマ組織および巨大先天性母斑組織における SPARC 蛋白質の発現 (Western blot 法)	31
図 10	色素性母斑、メラノーマ組織における SPARC mRNA および蛋白質の発現	31
7-6)	ヒトメラノーマ組織および巨大先天性母斑組織における SPARC 蛋白質の発現 (免疫組織化学法)	32
図 11	色素性母斑、メラノーマ組織における SPARC 蛋白質の発現	32
7-7)	ELISA 法を用いたメラノーマ細胞株培養上清中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出	33
図 12	ELISA 法によるメラノーマ細胞株培養上清中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出	33
7-8)	ELISA 法によるメラノーマ患者、健常人および先天性色素性母斑患者血清中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出	34
図 13	ELISA 法を用いたメラノーマ患者血清中の SPARC 蛋白質の検出	35
表 2	メラノーマ患者 113 例のプロフィールと、血清 SPARC、GPC3 および 5-S-CD 値 の比較	36
7-9)	メラノーマ患者における SPARC 蛋白質の発現と血清中の可溶性 SPARC 蛋白質との 相関	39
図 14	ELISA 法を用いたメラノーマ患者血漿中の SPARC 蛋白質の検出	40
7-10)	ステージ別にみたメラノーマ患者血清中の SPARC、GPC3 および 5-S-CD 濃度の比較	41
表 3	ステージ別にみたメラノーマ患者血清中の SPARC、GPC3 および 5-S-CD 濃度の比較	41
7-11)	肉眼分類別メラノーマ患者における血清 SPARC 値の比較	42
表 4	肉眼分類別メラノーマ患者における血清 SPARC 値の比較	42
7-12)	外科的切除前後のメラノーマ患者における血清 SPARC 値の推移	43
表 5	術前の血清 SPARC 高値症例における術後の血清 SPARC、GPC 3 および 5-S-CD 値の推移	44
7-13)	BALB/c マウスを用いた SPARC 特異的 CTL エピトープの決定	45
7-14)	BALB/c マウスを用いた SPARC 特異的 CTL 株の樹立と、細胞傷害活性の検討	45
図 15	BALB/c マウスを用いた SPARC 由来の H2-K ^d 拘束性 CTL エピトープの同定	46
図 16	SPARC ペプチドを用いた SPARC 特異的な CTL の誘導	47
7-15)	SPARC ペプチド負荷 BM-DC を免疫したマウスにおける腫瘍増殖の抑制	48
図 17	SPARC ペプチド負荷 BM-DC ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果と、生存期間延長 効果の検討	49
7-16)	ペプチド負荷 BM-DC ワクチンの投与を受けた BALB/c マウスの病理組織学的解析	50
図 18	ペプチド負荷 BM-DC ワクチンの投与を受けたマウスの病理組織学的解析	50
8	考察	51
9	結語	55
10	参考文献	56

1 要旨

【目的】 本研究は新規の腫瘍関連抗原を同定し、その癌の診断および抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチンとしての、臨床医学への応用の可能性を探ることを目的とする。

【方法】 (1) 20人のスキルス胃癌患者の癌組織と正常組織におけるcDNAマイクロアレイ解析により、スキルス胃癌に特異的に高発現する遺伝子を同定した。(2) 同定した、Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)が、メラノーマに高発現する分泌蛋白質である事に着目し、血清SPARCのメラノーマ診断における有用性について検討した。原発性メラノーマ患者(109例)、巨大先天性母斑(5例)、健常人(61例)を対象とし、ELISA法を用いて血清中のSPARC蛋白質を定量し、その陽性率を既知の腫瘍マーカーであるGlypican3 (GPC3)および5-S-cysteinyl-dopa (5-S-CD)と比較検討した。(3) 次に、SPARCを標的とした免疫療法の開発を目的として、マウスを用いた動物実験を行った。ヒトとマウスのSPARCでアミノ酸配列が共通しているペプチドで、HLA-A24 および H2-K^d に共通したモチーフを持つものを4種類合成し、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回免疫した後に脾細胞を回収し、ペプチド特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を検討した。さらに、当該ペプチドを負荷したBM-DCワクチンのin vivoにおける腫瘍増殖抑制効果について検討した。

【結果】 (1) cDNAマイクロアレイ解析により、正常では脂肪組織、乳腺、卵巣、脊髄、精巣、子宮、胎盤などに軽度発現しているが、スキルス胃癌において発現が著明に増加する遺伝子として、SPARCを同定した。ヒト第5染色体上の遺伝子によりコードされるSPARCは303個のアミノ酸により構成される分泌蛋白質であり、細胞外基質蛋白質と細胞との相互作用を調節することにより、組織の修復、再構築や細胞増殖に関与すると考えられており、SPARCはメラノーマや骨肉腫などの腫瘍細胞および膀胱癌、胃癌などの腫瘍の間質細胞に高発現することが報告されていた。(2) メラノーマ患者の血清SPARC値は健常人と比べて有意に増加しており、健常人の平均値+2SDをカットオフ値とすると、SPARCの陽性率は33%であり、健常人では3例(5%)の疑陽性を認めた。術後経過を追う事が出来たSPARC陽性の13症例中10例が、術後にカットオフ値以下となった。5-S-CDの陽性例は、ほとんどがStage IVであったが、SPARCおよびGPC3は早期のメラノーマでも陽性を示し、両者を併用するとstage 0~IIのメラノーマの66%を検出でき、早期メラノーマの診断への有用性が証明された。(3) 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、同様のペプチド負荷BMDCを投与した後に、SPARCを高発現する細胞株を移植し、抗腫瘍効果を検討したところ、腫瘍の増殖が80%のマウスにおいて抑制され、生存期間の延長を誘導することができた。

【結論】 cDNAマイクロアレイ解析を用いて同定された新規癌抗原SPARCが、メラノーマの腫瘍マーカーとして有用であることを示した。さらにマウスを用いた動物実験により、SPARCを標的とした抗腫瘍免疫療法の有効性が示された。

Summary

Purpose: To establish effective diagnostic method and anti-tumor immunotherapy for several cancers, we tried to identify a novel tumor-associated antigen.

Experimental design: We analyzed data obtained from cDNA microarray analysis of diffuse gastric cancer tissue and 29 normal tissues to find a novel tumor-associated antigen, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC). Because melanoma cells were reported to express a large amount of SPARC, and because SPARC is a secreted protein, at first, secreted SPARC protein was quantified using ELISA in the sera from 109 melanoma patients, 5 patients with large congenital melanocytic nevus, 61 age-matched healthy donors and 13 disease-free patients after undergoing a surgical removal. We also quantified two other known tumor markers for melanoma, GPC3 and 5-S-cysteinyl-dopa (5-S-CD), in the same serum samples, and compared these markers for their diagnostic value. Because of the similarities in the binding peptide motifs shared between H2-K^d and HLA-A24 (A*2402), 4 peptides having these motifs were synthesized. Then, we investigated whether the H2-K^d-restricted SPARC peptides could induce SPARC reactive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) or not. In addition, we investigated the effect of the pre-immunization of BM-DC pulsed with the SPARC epitope peptides on a growth of SPARC-expressing tumor cells implanted in BALB/c mouse.

Results: In 20 diffuse gastric cancer tissues, an average of relative ratio of the expression of the SPARC mRNA in cancer cells versus adjacent normal gastric mucosas was 133,359. RT-PCR, western blotting and immunohistochemical analysis revealed that, SPARC is overexpressed in melanoma. The serum SPARC concentrations in melanoma patients were greater than those in healthy donors ($P=0.001$). When we fixed a cutoff value at the mean concentration plus 2SD of the healthy donors, the serum SPARC was found to be increased in the sera of 36 (33%) of the 109 melanoma patients, whereas there were 3 (4.9%) false-positive cases out of 61 healthy donors. Surprisingly, 19 of 36 patients showing increased SPARC levels were in stages 0-II. The serum SPARC level decreased under the cutoff level in 10 of 13 patients after surgical removal. Using SPARC and GPC3 in combination enabled us to detect 47 of 75 (66.2%) melanoma patients at an early stage (0-II). SPARC protein contains 2 epitopes recognized by mouse H2-K^d-restricted CTLs. These CTLs, generated in BALB/c mouse, had cytotoxic activity against cancer cell lines positive for SPARC. Furthermore, pre-immunization of BALB/c mice with BM-DC pulsed with the SPARC epitope peptides prevented the growth of the mouse fibrosarcoma cell line (Meth A) engrafted in BALB/c mouse and contributed to elongation of survival time without causing autoimmune diseases.

Conclusions: SPARC may prove to be an ideal tumor-associated antigen useful for diagnosis and immunotherapy of cancers including melanoma. cDNA microarray analysis is a useful method to identify tumor-associated antigens useful for cancer diagnosis and immunotherapy.

2 発表論文リスト

1. Yoshiaki Ikuta*, Yuki Hayashida*, Shinya Hirata, Atsushi Irie, Satoru Senju, Tatsuko Kubo, Tetsuya Nakatsura, Mikio Monji, Yutaka Sasaki, Hideo Baba and Yasuharu Nishimura (These two authors contributed equally) : Identification of the H2-K^d-restricted CTL epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice *Cancer Science* 2008 in press
2. Ikuta, Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H., and Nishimura, Y. Highly Sensitive Detection of Melanoma at an Early Stage Based on the Serum Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine and Glypican-3 levels. *Clin. Cancer Res.* 11: 8079-8088, 2005.
3. 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 HLA-A24-Restricted CTL Epitopes Possibly Useful for Glypican-3-Specific Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 2689-2697, 2006.
4. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Proliferation Potential-Related Protein, an Ideal Esophageal Cancer Antigen for Immunotherapy, Identified Using Complementary DNA Microarray Analysis. *Clin. Cancer Res.* 10: 6437-6448, 2004.
5. Nakatsura, T., Kageshita, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Monji, M., Ikuta, Y., Senju, S., Ono, T. and Nishimura, Y. Identification of Glypican-3 as a Novel Tumor Marker for Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 6612-6621, 2004.

3 謝辞

本研究を行なうにあたり、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、心臓血管外科分野の川筋道雄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、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授及び中面哲也前助手（現国立癌センター東病院・臨床開発センター・癌治療開発部・機能再生室・室長）、ならびに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。さらに、スキルス胃癌の cDNA マイクロアレイ解析のデータを御供与頂いた東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔教授、古川洋一教授、片桐豊雅助教授に深く感謝いたします。また、メラノーマ患者の血清 5-S-CD 値の測定に協力して下さった藤田保険衛生大学衛生学部の伊藤 祥輔教授および若松一雅教授、ならびにメラノーマ患者検体を御供与頂いた熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚科分野の影下登志郎前助教授、小野友道前教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

AJCC; American joint committee on cancer

ALM; acral lentiginous melanoma

BM-DC; bone marrow-derived dendritic cell

cDNA; complementary DNA

CTL; cytotoxic T lymphocyte

DNA; deoxyribonucleic acid

ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT; enzyme-linked immunospot

5-S-CD; 5-S-cysteinyl-dopa

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

GPC3; glypican-3

HEMn, human epidermal melanocytes, neonatal

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

IFN; interferon

IL; interleukin

LMM; lentigo maligna melanoma

MHC; major histocompatibility complex

MIA; melanoma inhibitory activity

NK; natural killer

NM; nodular melanoma

PBS; phosphate-buffered saline

RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction

SD; standard deviation

SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

SPARC; secreted protein acidic and rich in cysteine

SSM; superficial spreading melanoma

TAP; transporter associated with antigen processing

TCR; T cell receptor

TNF; tumor necrosis factor

TNM; Tumor-Node-Metastasis

UICC; unio international contra cancrum

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、ヒト組織適合性白血球抗原 (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 分子ごとに異なっている。つまり結合する 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)。これらのアミノ酸の側鎖はペプチド収容溝の左端あるいは右端に位置する、それぞれ 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すなどの作用を示し、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質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。いっぽう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。

図 1

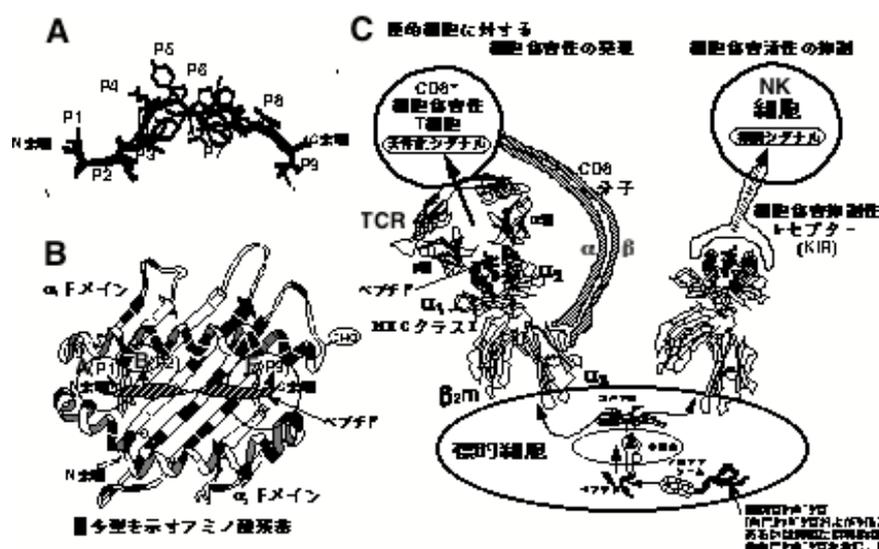


図 1. MHC クラス I による抗原ペプチドの CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) への提示

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。 $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ および $\beta 2m$ は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび $\beta 2$ 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。

図 2

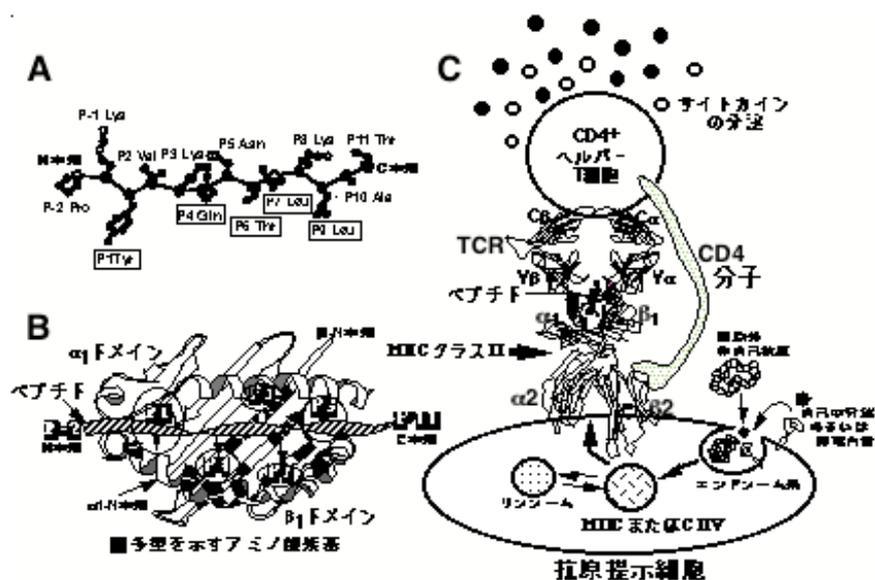


図 2. MHC クラス II 分子を介した抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパー T 細胞への提示

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。 $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ および $\beta 2$ 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はいるが、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無いナイーブ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。

図 3

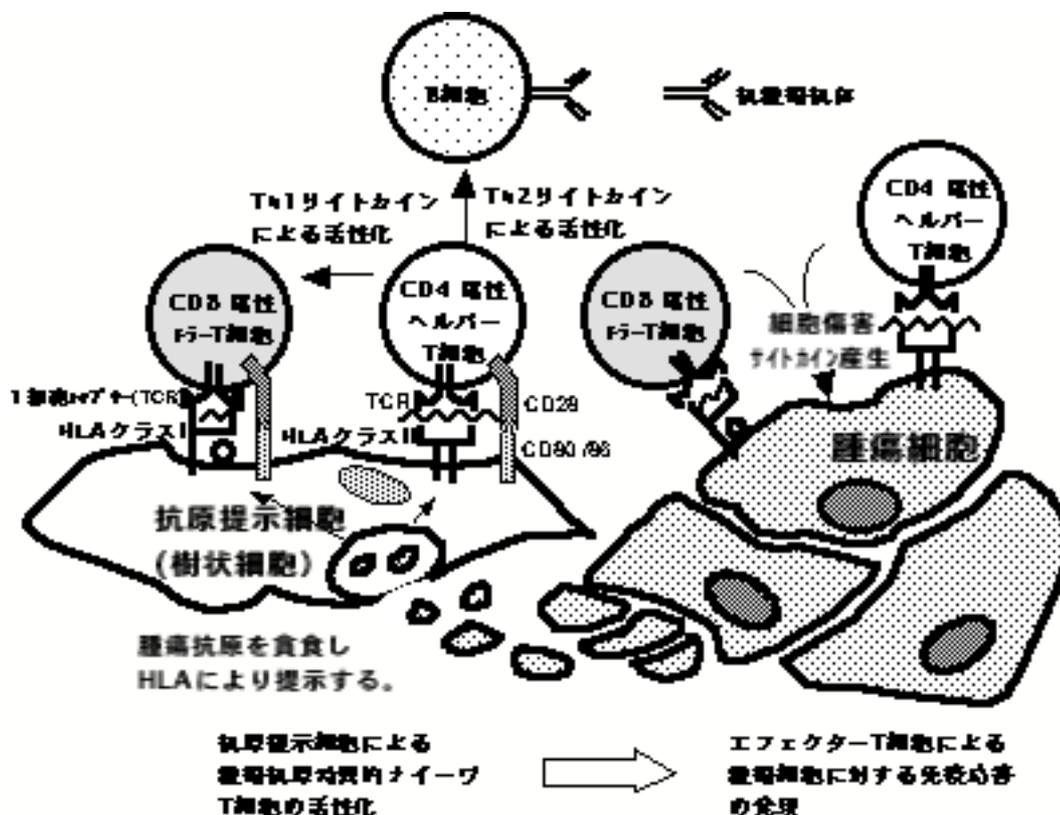


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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、抗原蛋白質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。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、抗 Her2 抗体 (Transtuzumab) や抗 CD20 抗体 (Rituximab) などは、正常組織に抗原が発現しているにも関わらず、それぞれ乳癌あるいは B リンパ腫の治療において優れた効果を示している。さらに、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(28-30)がデータベース化されている。(http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB)。

また、われわれ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た。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きている。

5-4) cDNA マイクロアレイ解析による 腫瘍拒絶抗原の同定

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、免疫原生、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りにくい抗原; 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、cancer-testis 抗原、組織特異抗原、変異ペプチド抗原、癌遺伝子、癌抑制遺伝子産物、癌胎児性抗原、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) 癌化と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、あるいはウイ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)。4) cDNA 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(31)、Glypican-3 (32, 33)ほか)。

このうちで最新にして最も有効な cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原同定の概略を図 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することができるところである。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、各遺伝子の癌における発現頻度も知ることができる。

図 4

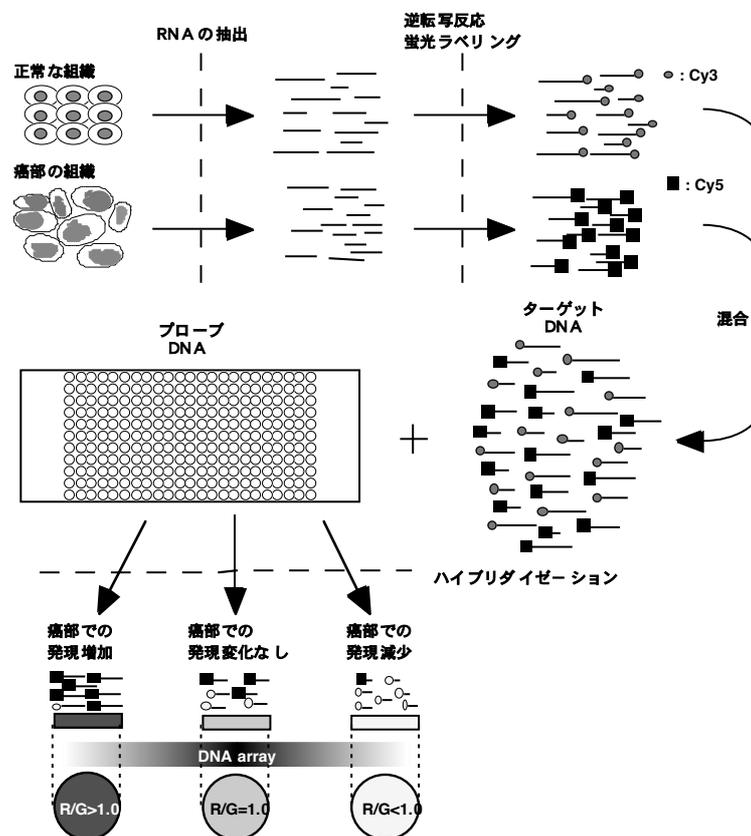


図 4. cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の同定法の概要

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、スキルス胃癌の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、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(Cy5:赤、Cy3: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) 新規癌関連抗原 SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine)について

SPARC (別名 osteonectin または BM-40) は骨の構成蛋白質として、1981 に初めて報告され、また基底膜から発生した腫瘍に発現していることが 1987 年に Mann らによって報告された(34, 35)。SPARC は様々な機能をもつ細胞-細胞間質糖蛋白質であり、コラーゲンやビトロネクチ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、その他の機能としては、細胞の接着阻止、G1 アレスト誘導による細胞の増殖抑制、様々な増殖因子・増殖抑制因子の調節などがあるが、正確なメカニズムは未だ解明されていない(36, 37)。

SPARC は、成人の骨、血小板あるいは創傷部位などの組織が改築をくり返している部位で高発現している。また、様々な腫瘍においても、腫瘍内部の間質細胞を中心に高発現しており、SPARC と腫瘍の関係については、様々な癌腫において多くの報告が行われている。癌細胞が分泌する SPARC が好中球の抗腫瘍作用を抑制し、エスケープ機構様の働きをすとの報告もある(38)。

Ledda らは、免疫組織学的検査にて、ヒトメラノーマ細胞に SPARC が高発現することを発見し、その発現が、腫瘍の進行に相関することを報告した(39)。また Ledda らは、SPARC のアンチセンス発現ベクターを用いてヒトのメラノーマ細胞の SPARC の発現を抑えると、*in vitro* で接着性や浸潤性が失われ、*in vivo* での発癌性がなくなったことを報告した(40)。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(41)。以上より、メラノーマを含むいくつかの癌腫では、SPARC は、癌の進行を促す分子ではないかと考えられている。

5-6) メラノーマの臨床と腫瘍マーカー

メラノーマ (悪性黒色腫) は、色素細胞 (メラノサイト) が癌化したものである。メラノーマは、皮膚癌のなかで最も悪性度が高く、非常に恐れられている。

日本におけるメラノーマの発生頻度は人口 10 万人あたり 1.5~2 人くらいと言われ、年間 1500 人~2000 人くらいが発症していると推測されている。欧米では人口 10 万人あたり 10 数人以上の発生と言われ、オーストラリアでは人口 10 万人あたり 20 数人以上の発生で世界一発生率が高いと言われている。それだけに欧米やオーストラリアの人々はメラノーマに関心を持ち、メラノーマの発生に注意をしている。また、外国でも日本でもメラノーマの発生は、年々増加傾向が認められている。最近の調査では、日本における年間死亡者数は 450 人前後である。メラノーマは、特に 40 歳以上になると発生率が高くなり、患者数は 60 歳~70 歳台で最も多くなっている。小児の発生は非常に少ないが、最近 20~30 歳台の若年者の発生が増加している傾向がある。発

症における、男女差は見られない。日本人でメラノーマが発生しやすい部位は、足底が最も多く、約3割を占める。そのほか、欧米人と同様に体幹、四肢、顔面、頭部など、いずれの部位にも発生する。メラノーマの治療法としては、外科的切除、化学療法および放射線療法が実施されているが、遠隔転移を来したような進行期の患者に対する治療法として免疫療法が注目され、実際に一部の患者では奏功している。

血清腫瘍マーカーの測定は、メラノーマの診断のみならず、術後症例における再発の早期発見と、進行期例の治療効果の判定に重要である。メラノーマの腫瘍マーカーとしては、これまでに血清LDHや5-S-cysteinyl dopa (5-S-CD)の有用性が知られていたが、さらに近年、S-100 β 蛋白質およびmelanoma inhibitory activity (MIA)がより鋭敏なマーカーとして報告されている。本邦では、5-S-CDが広く用いられている。しかしながら、これらの腫瘍マーカーは主として進行期で検出されるものが多い。そのため、診断よりも転移巣の検出や経過観察のモニターとして用いられる。メラノーマは再発、転移を生じやすいので、メラノーマを早期検出できる腫瘍マーカーの意義は大きく、新たな腫瘍マーカーの発見が望まれる。

すでに当教室の中面らは、GPIアンカー膜蛋白であるGlypican-3 (GPC3)が、メラノーマ及び肝細胞癌に高発現し、さらにELISA法を用いてメラノーマ患者および肝細胞癌の共に約40%において、患者の血清中に検出され、これが、肝細胞癌およびメラノーマの新しい腫瘍マーカーとして有用であることを報告した(42)(43)。

5-7) 本研究の目的

本研究はスキルス胃癌のcDNAマイクロアレイ解析により新たな腫瘍関連抗原を同定し、その癌の診断および抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

6 実験方法

6-1) cDNA マイクロアレイ解析による スキルス胃癌に高発現する腫瘍抗原遺伝子の解析

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、びまん性浸潤性胃癌に特異的に高発現する遺伝子の解析を行った。

スキルス胃癌患者 20 人の癌部と非癌部の組織から抽出した RNA を逆転写反応により cDNA を合成する際に、それぞれ Cy3 と Cy5 にて標識し、ターゲット DNA とした。それらを、ヒトで発現している 23,040 種類のプローブ DNA とハイブリダイズさせることにより、遺伝子の発現プロファイルを解析した。その解析結果を基に、以下の手順で、多くの症例で、正常胃粘膜組織（非癌部）では発現が低い、スキルス胃癌で発現が著明に増加する遺伝子を選出した。

- 1) スキルス胃癌患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 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。
- 2) 次にそれらの各遺伝子について、29 臓器（胎生期の 4 臓器を含む）の正常組織における 23,040 種類の遺伝子の発現プロファイルを解析して、正常組織には発現の弱い遺伝子を選ぶ。

6-2) 使用した細胞

メラノーマ細胞株である、CRL1579、G361、HMV-1 および SK-MEL-28 は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターから御供与頂いた。888mel および 526mel は、慶応大学先端医化学研究所細胞情報研究部門教授の河上裕教授からご供与頂いた。164、HM3KO、MeWo、SK-MEL-19、Colo38 は、熊本大学皮膚科の影下登志郎前助教授より御供与頂いた。これらのメラノーマ細胞株は、10%FCS を添加した DMEM あるいは RPMI1640 培養液中で培養し、SPARC の発現解析に使用した。さらに、正常ヒト表皮メラニン細胞 Human epidermal melanocytes, neonatal (HEMn) は、クラボウ（倉敷紡績株式会社）より購入した。

マウス腫瘍細胞株である B16、EL4、BALB/3T3、Colon26、A20、RL male1、Meth A は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから御供与頂いた。エピトープペプチド特異的な CTL の誘導の確認には、久留米大学の伊東恭吾教授（免疫学講座）から頂いた、T2-K^d (TAP 遺伝子の発現を欠損する T2 細胞に、H 2-K^d 遺伝子を強制発現させた細胞株)を用いた。

6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取

1994年から2004年の期間に、熊本大学医学部皮膚科にて治療を受けたメラノーマ患者および巨大先天性母斑患者からインフォームドコンセントを得た後に、末梢血サンプルを採取し、遠心分離によって、患者血清あるいは血漿を単離した。癌組織および母斑組織の手術摘出検体を検討できた患者に対しては、腫瘍組織におけるSPARCの発現を検討した。用いた抗体は以下の通りである。ウエスタンブロット法：抗ヒトSPARCモノクローナル抗体：AON-5031(Haematological Technologies社)、ELISA法：抗ヒトSPARCモノクローナル抗体：ON1-1(Zymed Lab社)、ビオチン化ヤギ抗ヒトSPARCポリクローナル抗体：EYR01(R&D system社)。

全ての患者サンプルは、符号をつけて匿名化し、実験時まで -80°C で保管し、その後使用した。サンプル提供患者に関しては、診療記録より、年齢、性別、腫瘍の臨床病期(UICC国際分類；AJCC分類)の臨床データを診療録より収集し、血清もしくは血漿中のSPARC値との関係について検討した。

6-4) Quantitative Reverse Transcription-PCR (定量による RT-PCR)

TRIZOL reagent を用いて、様々な組織と細胞株から total RNA を抽出した。いくつかの正常組織の total RNA は Biochain 社から購入した。各 $1\mu\text{g}$ の total RNA からランダムヘキサマープライマーを用いて、Superscript reverse transcriptase (インビトロジェン社) により各 cDNA を合成した。RT-PCR の SPARC 特異的プライマーを作成し、ロッシュ社のライトサイクラーを用いて、定量的 RT-PCR を行った。用いた SPARC PCR プライマー配列は、センス：5'-CGAAGAGGAGG TGGTGGCGGAAAA-3', アンチセンス：5'-GGTTGTTGTCCTCATCCCTCTCATAAC-3' である。

PCR 反応は 95°C 1 秒間、 68°C 1 秒間、 72°C 10 秒間で 45 サイクル行い、培養メラノサイト細胞株である HEMn の 10 倍希釈標準曲線を用いて、HEMn の発現を 1 として定量化した。また、ヒトの正常組織の半定量的 RT-PCR は、 95°C 1 分間、 60°C 1 分間、 72°C 分秒間で 30 サイクル行い、PCR 産物を 1% アガロースゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色して特異的バンドを検出した。比較対照として、 β アクチン特異的なプライマーも同時に用いた。用いた β アクチンプライマー配列は、センス：5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3', アンチセンス：5'-GGATCTTCATGAGG TAGTCAGTC-3' である。

6-5) Western blot 法

11 種類の培養メラノーマ細胞株、1 種類の培養メラノサイト細胞株、色素性母斑

患者の摘出組織およびメラノーマ患者の摘出組織における、SPARC 蛋白質の発現を Western blot 法を使用して検討した。各サンプルを、ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、溶解バッファー (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 1mM sodium orthovanadate (和光社), 1mM EDTA, plus a protease inhibitor tablet (Amersham Bioscience 社)) を用いて溶解した。

その上清サンプルを、10%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、ニトロセルロースメンブレン (BIO-Rad 社) に転写した。5%スキムミルクを加えた 0.2% Tween 20-TBS 溶液を用いて、4℃で 16 時間ブロッキングした。0.2 μ g/mL の濃度のマウス抗ヒト SPARC モノクローナル抗体 AON-5031 (Haematological Technologies 社) を 1 次抗体として 1 時間室温でインキュベーションし、洗浄の後に、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham Bioscience 社) を用いて洗浄した後に、ECL Western Blotting detection Reagents (Amersham Bioscience 社) にて検出した。

6-6) SPARC の免疫組織化学的解析

EnVision+システム キット (DAKO 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により、免疫組織学化学的解析を行った。一次抗体は、マウス抗ヒト SPARC モノクローナル抗体 AON - 5031 を 2000 倍希釈したものをを用いた。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、正常ヤギ血清にて室温で 60 分間ブロックした後に、一次抗体を 4℃で 14 時間反応させ、phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。さらにビオチン標識抗マウス IgG 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 で洗い、diaminobenzidine で発色させた。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った。

6-7) ELISA 法による、メラノーマ細胞培養上清、メラノーマ患者血清および血漿中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出

メラノーマ細胞株の培養上清、メラノーマ患者血清および血漿中の SPARC の測定は、抗ヒト SPARC 抗体及びビオチン化抗ヒト SPARC ポリクローナル抗体を用いて酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) によって検出した。

96 ウェルの ELISA プレート (Nunc 社) に、PBS (pH 7.4) に溶解した 0.05 μ g / ウェルの抗ヒト SPARC モノクローナル抗体 ON1-1 (Zymed laboratories 社) を加え、室温で一晩インキュベートした。次いで、溶液を除いた後に、100% ブロックエース (大日本製薬株式会社) を用い、室温で 1 時間、プレートの表面をブロックした。

血清を含まない細胞培養上清サンプルを得るために、各細胞株を、細胞培養用ディッシュにほぼコンフルエンス状態になった後に、PBS を用いて 2 回洗浄し、血清を含

まない培養液で24時間培養した。その培養液を遠心分離し、細胞を除いたものをELISAに使用した。

陽性対照の標準サンプル、10%ブロッカーで4倍希釈したメラノーマ細胞株培養上清および10%ブロッカーで200倍希釈した患者血清、血漿サンプルを、ビオチン化抗ヒトSPARCポリクローナル抗体EYR01 (R&D system社)と共に添加し、室温で2時間インキュベートした。PBSで3回洗浄した後に、各ウェルにHRPを結合させたストレプトアビジン (ENDOGEN社)を添加した。30分のインキュベーションの後、プレートをPBSで3回洗浄し、TMB基質溶液 (ENDOGEN社)を添加した。発色反応を定量するためにELISAリーダー (モデル550、Bio-Rad社)で450nmの吸光度を測定した。

6-8) メラノーマ患者血清中の5-S-CD (HPLC法) およびGPC3 (ELISA法)の測定

SPARCを測定した同じメラノーマ患者血清について、従来の腫瘍マーカーである5-S-CDと、新規腫瘍マーカーとして当教室の中面らが先に報告したGPC3を測定した。

血清中5-S-CDおよびGPC3は、それぞれ高速液化クロマトグラフィー法(HPLC)(44)およびELISA法を用いて測定した(43)。

6-9) HLA-A24 および H2-K^d 拘束性 SPARC 特異的 CTL エピトープのモチーフ検索 (データベースでの検索)

次に、新規癌関連抗原SPARCが、理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかを検討した。日本人の約60%が陽性であるHLA-A24と、BALB/cマウス (H-2^d) のクラスI分子のK^dに結合するペプチドの構造モチーフは、非常に類似していることがわかっている。さらに、ヒトとマウスのSPARCでは、アミノ酸配列が95%以上のホモロジーを認めることから、ヒトとマウスのSPARCでアミノ酸配列が完全に一致し、HLA-A24、K^dのいずれにも結合しうるSPARC由来のペプチドをモチーフ探索データベース (<http://bimas.dcrn.nih.gov/>) を用いて検索し、4種類を選択して合成した (表1)。HLA-A24 (A*2402) 結合モチーフの概略は、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の第2番目のアミノ酸残基 (P2) にチロシン、フェニルアラニン、第9あるいは10番目のアミノ酸残基 (P9またはP10) にロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンが存在することである。これら4種類のペプチドをBALB/cマウスに免疫して解析し、K^d拘束性のCTLエピトープペプチドの同定を試みた。

表 1

ヒトとマウスで共通のアミノ酸配列をもち HLA-A24 および H2-K^d 分子に結合すると推定される SPARC ペプチド

Peptide	Sequence	Start position	Binding score [*]	
			A24	K ^d
SPARC- K ^d -1	DYIGPCKYI	143	75	400
SPARC- K ^d -2	HFFATKCTL	123	20	1382
SPARC- K ^d -3	EFPLRMRDWL	161	30	960
SPARC- K ^d -4	MYIFPVHWQF	225	210	120

* HLA-A24 および H2-K^d 分子への binding score は、BIMAS ソフトウェアを用いて算出した。

6-10) SPARC 特異的 CTL エピトープの同定

BALB/c マウスの骨髄細胞から従来どおりの誘導法で、骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) を誘導した。(32) すなわち BALB/c マウスの骨髄細胞 2×10^6 個にマウス 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 BM-DC を誘導した。このようにして得られた BM-DC を上記で決定したペプチド 4 種類の混合物(各 $10 \mu\text{M}$)と 2 時間インキュベートした。それらを洗浄、遠心した後に、BALB/c マウス一匹あたり 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、最終投与の 1 週間後にマウスの脾細胞を回収して CTL の誘導に用いた。CD4⁺T 細胞による非特異的反応の影響を除外するために、脾細胞は採取時磁気ビーズ (MACS, Miltenyi Biotec 社) を用いて CD4⁺T 細胞を除去したものをを用いた(図 13A)。

回収した免疫マウスの脾細胞を、試験管内でペプチドを添加した BM-DC 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 BM-DC およびペプチドを添加していない BM-DC を標的細胞とし、ペプチド特異的に免疫応答を示した CTL が産生する IFN- γ を Enzyme-linked immunospot (ELISPOT)法にて検出した。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。前日から抗 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、 1×10^5 個のエフェクター細胞($100 \mu\text{L}/\text{well}$)と 1×10^4 個の標的細胞($100 \mu\text{L}/\text{well}$)とを混合し、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 IFN- γ 抗体と 2 時間、さらに HRP 標識ストレプトアビジンと 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(45)。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置にて行った。

6-11) BALB/c マウスを用いた自己免疫反応の検討

前項に示した SPARC ペプチド負荷 BM-DC を免疫した BALB/c マウスの重要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓)に対する自己免疫現象の有無を、2 回目の免疫 1 週間後に各臓器における CD8⁺および CD4⁺T 細胞の浸潤の有無により検討した。免疫した BALB/c マウスの各臓器を採取し、直ちに Tissue-Tek OCT compound (Miles 社) に包埋し、5 μm の切片を切り出した。20 倍希釈の抗 CD8 抗体 Ly-2(BD PharMingen 社)および 50 倍希釈の抗 CD4 抗体 L3T4(BD PharMingen 社)を用いて、37°C で 1 時間反応させ、PBS で洗浄した。さらにマウス MAX PO(nichirei 社)と室温で 30 分間反応させた後に 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 で洗い、diaminobenzidine で発色させた。

6-12) 細胞傷害活性の検討

ペプチド特異的 CTL の誘導の確認は、T2-K^d細胞を標的細胞にした ⁵¹Cr 放出法による細胞傷害試験により行った。⁵¹Cr 放出法による細胞傷害の定量は、標的細胞をペプチドをパルスした群としなかった群に分け、⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄) で 1 時間ラベルした後、96 穴 U 底プレートに 1 ウェルあたり 1×10⁴個まいた。それぞれの標的細胞をエピトープペプチドで誘導した CTL と共培養し、培養上清中に CTL によって傷害された細胞より放出された ⁵¹Cr を測定して 2 群間で比較することにより行った。

腫瘍細胞反応性 CTL の誘導の確認は、H2-K^d陽性で SPARC を発現していない細胞株 RL male1、および H2-K^d陽性で SPARC を発現している繊維肉腫細胞株 Meth A を標的細胞として用いて細胞傷害活性を測定した。細胞を ⁵¹Cr で 1 時間ラベルした後に、96 穴平底プレートに 1 ウェルあたり、1×10⁴個まいた。次に、ターゲット細胞に対して、10、20、40 倍の数の CTL 細胞株を加え、6 時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された ⁵¹Cr を測定した。

6-13) in vivo 腫瘍増殖抑制実験

7 週齢のメスの BALB/c マウスを SLC 社より購入し、熊本大学の Center for Animal Resources and Development (CARD)にて SPF 環境下に飼育した。1 週間培養して誘導した BM-DC を、SPARC ペプチド 4 種類の混合物(各 10 μM)と 2 時間インキュベートした後に、一匹あたり 5×10⁵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、さらにその 1 週間後に 1×10⁶個の Meth A 細胞株を BALB/c マウスの背部皮下に移植し、腫瘍の大きさ(長径×短径)を 3 日毎に測定した。また、マウスの生存期間も観察した。

6-14) 統計学的解析

血清 SPARC 値、血漿 SPARC 値、マウスの腫瘍に対する細胞傷害活性および in vivo 腫瘍増殖の各群間の有意差検定については、Two-tailed Student's *t* test を用いて行った。*P* < 0.05 の場合に、有意差ありと判定した。統計解析は StatView 5.0 (Abacus Concept 社製)を用いて行った。

7 実験結果

7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた 腫瘍拒絶抗原候補遺伝子の選定

共同研究者である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らが、スキルス胃癌患者 20 例の癌部と非癌部の RNA をそれぞれ抽出し、24,030 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行った。そのデータの供与を受けて解析し、20 例中 10 例以上の患者で非癌部より癌部で 5 倍以上発現が増加している遺伝子を 12 種類選り出した (図 5)。選んだ 12 種類の遺伝子の正常組織での発現を確認後、Secreted protein acidic and rich in cystein (SPARC) を腫瘍特異抗原の候補として選んだ (図 6)。

その結果、SPARC 遺伝子は 20 例 (発現情報があった症例は 13 例) 中 11 例において、非癌部に比べて癌部で 5 倍以上の発現がみられる遺伝子であった。また、正常および胎生期の組織では、脂肪組織、乳腺、卵巣、脊髄、精巣、子宮、胎盤などに少量発現していたが、スキルス胃癌の癌部では正常胃粘膜と比較して平均 13 万倍以上と、発現が著明に増加している遺伝子であった。

図 5

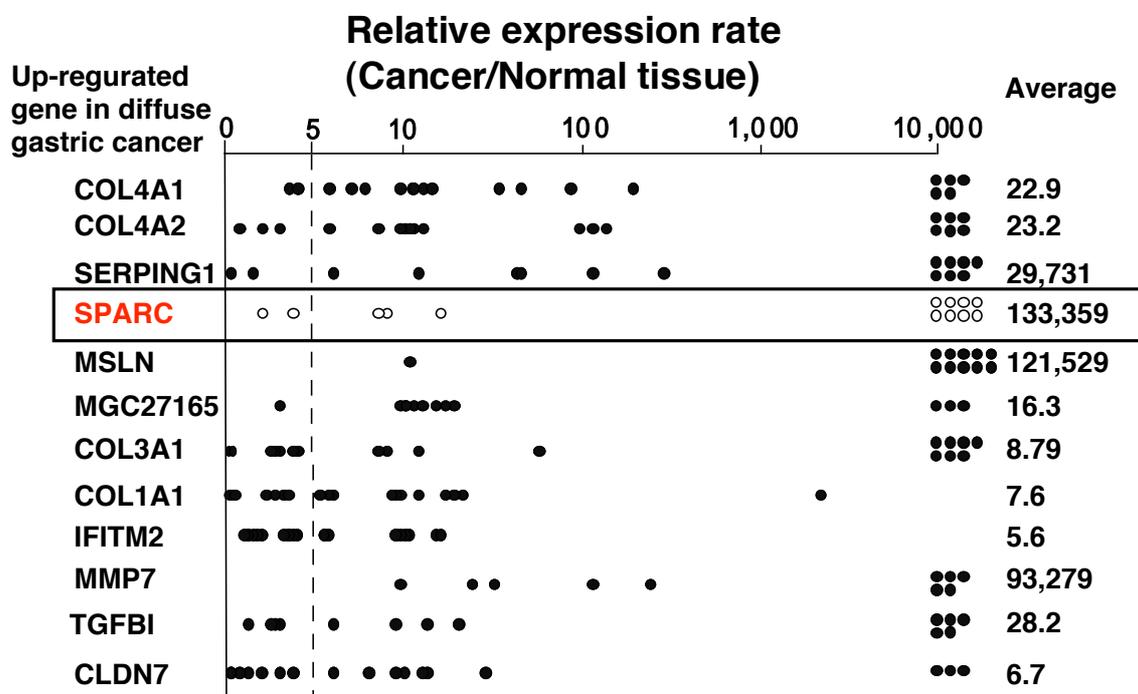


図 5. スキルス胃癌の cDNA マイクロアレイ解析データの解析

これらの遺伝子は、スキルス胃癌患者 20 例中 10 例以上で、非癌部より癌部で 5 倍以上の発現増加がみられる遺伝子である。この中から、SPARC を免疫療法の標的抗原の候補として選んだ。SPARC 遺伝子は、20 例中 11 例において非癌部より癌部で 5 倍以上 (平均 133,359 倍) の発現増加が認められる遺伝子であった。

図 6

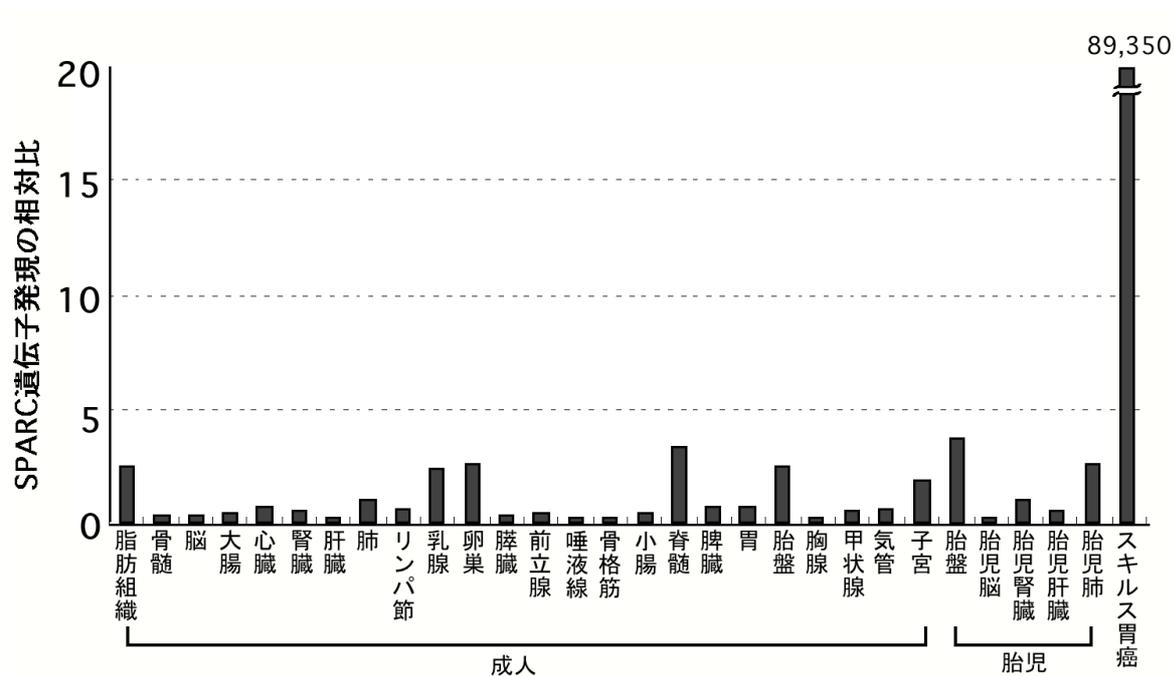


図 6. 正常組織での SPARC 遺伝子の発現解析 (cDNA マイクロアレイ解析による)

正常および胎生期の組織における SPARC 遺伝子の発現を cDNA マイクロアレイ解析データにより解析したところ、SPARC 遺伝子は脂肪組織、乳腺、卵巣、脊髄、精巣、子宮、胎盤などに少量の発現を認めたと、スキルス胃癌では異常な高発現を認めた。

7-2) RT - PCR による正常組織における SPARC 遺伝子の発現解析(RT-PCR)

16 種類の正常組織における SPARC 遺伝子の発現を RT-PCR (図 7) にて確認した。その結果、SPARC 遺伝子は、脊髄に発現が認められ、大腸、肺、小腸、精巣でも弱い発現が認められた。正常な胃組織では発現は認められなかった。

図 7

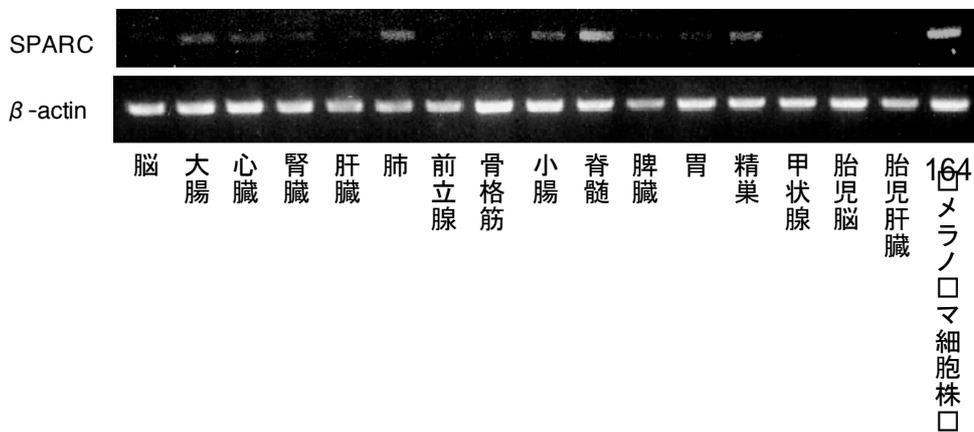


図 7. ヒト正常組織における SPARC mRNA の発現

胎生期の臓器を含む 16 種類の正常組織における、SPARC 遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した。その結果、SPARC 遺伝子は、脊髄に発現が認められ、大腸、肺、小腸、精巣でも弱い発現が認められたが、正常な胃組織では発現は認められなかった。陽性対照としてメラノーマ細胞株 164 を用いた。

7-3) ヒト正常組織における SPARC 蛋白質の発現 (免疫組織化学的解析)

cDNA マイクロアレイおよび RT - PCR において、SPARC の発現を認めた乳腺、子宮、大腸、小腸、肺、精巣の組織について、パラフィン包埋標本を用いて SPARC 蛋白質の発現を検討した。その結果、精巣においてのみ SPARC 蛋白質の発現が認められた (図 8F) が、子宮、大腸、小腸、肺では認められなかった (図 8A-E)。その他、大脳、心臓、肝臓、腎臓などの臓器にも、明らかな発現は認めなかった (未発表データ)。

図 8

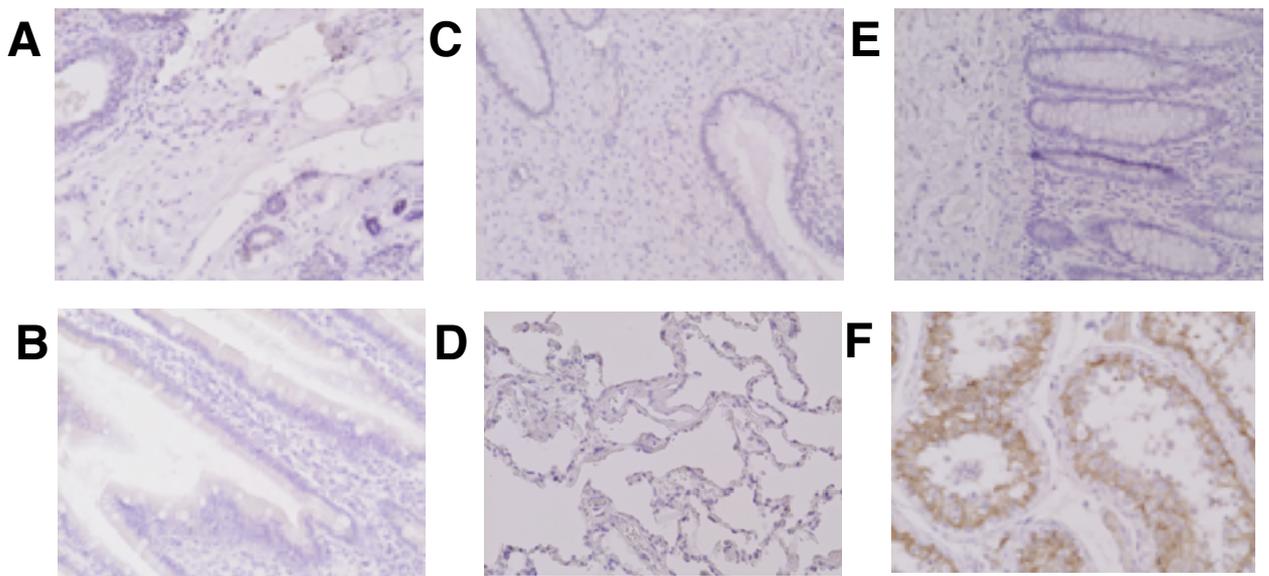


図 8. ヒト正常組織における SPARC 蛋白質の発現

乳腺(A)、子宮 (B)、大腸 (C)、小腸 (D)、肺 (E) および精巣(F)における SPARC 蛋白質の発現を免疫組織化学的解析にて検討した。精巣において SPARC の発現が検出されたが、その他の臓器では明らかな発現の増加は認めなかった。(x200)

7-4) ヒトメラノーマ細胞株における SPARC mRNA および蛋白質の発現

11 種類のメラノーマ細胞株と 1 種類の培養メラノサイト細胞における、SPARC mRNA の発現を Quantitative RT-PCR にて確認した (図 9A)。その結果、調べた 11 種類中 10 種のメラノーマ細胞株と培養メラノサイト細胞株において SPARC 遺伝子の発現が観察された。

さらに、同じ細胞株における SPARC 蛋白質の発現を Western blot 法にて確認した (図 9B)。その結果、RT-PCR 法と同様に、11 種類中 10 種のメラノーマ細胞株と培養メラノサイト細胞株において SPARC 蛋白質の発現を認めた。

図 9

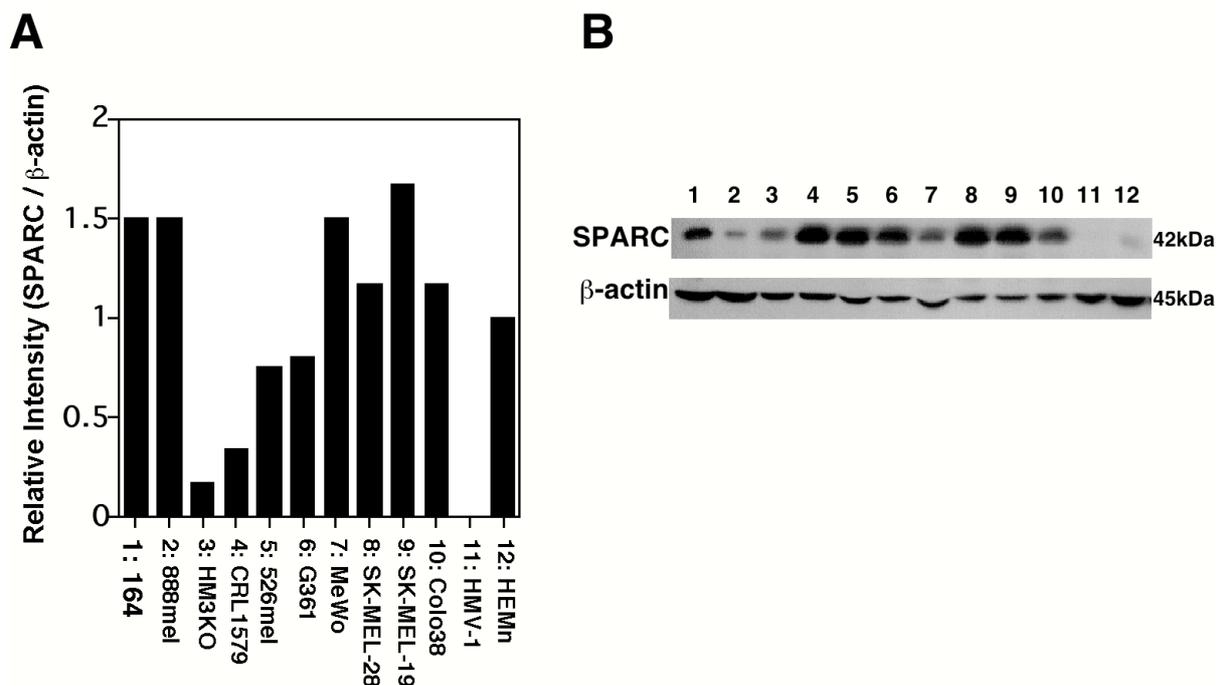


図 9. メラノーマ細胞株における SPARC mRNA および蛋白質の発現

(A) real-time RT-PCR 法によるヒトメラノーマ細胞株(Lanes 1-11) および培養メラノサイト (HEMn; Lane 12) における SPARC mRNA の発現解析。SPARC mRNA の相対比は SPARC / β -actin 比として算出した。Lanes 1: 164, 2: 888mel, 3: HM3KO, 4: CRL1579, 5: 526mel, 6: G361, 7: MeWo, 8: SK-MEL-28, 9: SK-MEL-19, 10: Colo38, 11: HMV-I, 12: HEMn (B) 抗ヒト SPARC モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によるヒトメラノーマ細胞株(Lanes 1-11)および培養(HEMn; Lane 12) における SPARC 蛋白質の発現解析。Lane は図 A と同様。

7-5) ヒトメラノーマ組織および巨大先天性母斑組織における SPARC 蛋白質の発現 (Western blot 法)

巨大色素性母斑患者の摘出組織と、メラノーマ患者の正常皮膚、メラノーマ組織 (Radical growth phase、Vertical growth phase) および転移性リンパ節組織における SPARC 蛋白質の発現を Western blot 法にて確認した (図 10)。その結果、いずれの原発性メラノーマ患者 (患者 46、66、84 および 89) においても、メラノーマの Vertical growth phase 組織においては、SPARC 蛋白質の発現の著明な増加を認めた。また、転移性リンパ節組織においても著明な SPARC 蛋白質の増加を認めた。また、メラノーマの Radical growth phase 組織においては、SPARC 蛋白質は中等度の発現を認めた。一方、正常組織では、弱い発現を認め、巨大先天性母斑の組織でも、低～中等度の SPARC 蛋白質の発現を認めた。

図 10

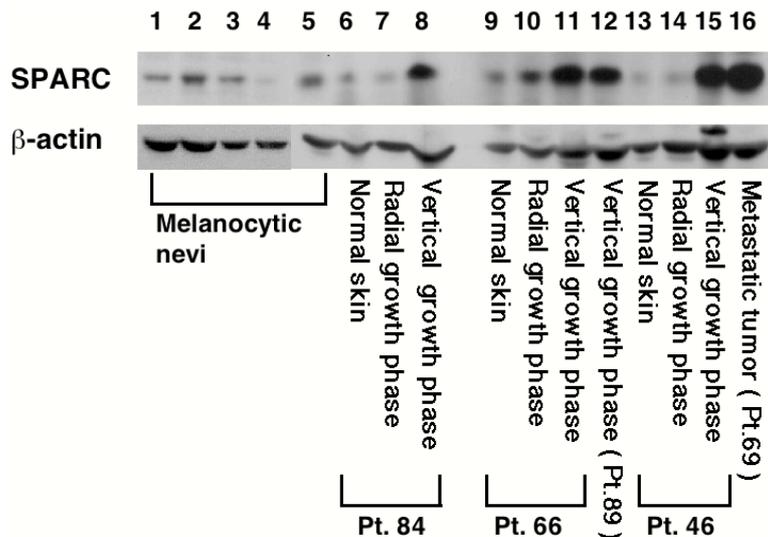


図 10. 色素性母斑、メラノーマ組織における SPARC mRNA および蛋白質の発現

巨大色素性母斑(Lanes 1-5)と、メラノーマ患者(Lanes 6-16)の正常皮膚、メラノーマ組織 (Radical growth phase、Vertical growth phase) および転移性リンパ節組織における SPARC 蛋白質の発現を Western blot 法にて検討した。メラノーマ患者 84: Lane 6 (正常皮膚), Lane 7 (Radial growth phase), Lane 8 (Vertical growth phase), メラノーマ患者 66: Lane 9 (正常皮膚), Lane 10 (Radial growth phase), Lane 11 (Vertical growth phase), メラノーマ患者 89: Lane 12 (Radial growth phase), メラノーマ患者 46: Lane 13 (正常皮膚), Lane 14 (Radial growth phase), Lane 15 (Vertical growth phase), and 患者 69: Lane 16(リンパ節転移)。患者番号は表 2 と対応。

7-6) ヒトメラノーマ組織および巨大先天性母斑組織 における SPARC 蛋白質の発現 (免疫組織化学的解析)

SPARC の免疫組織化学的解析を 33 例の原発性メラノーマ、7 例の転移性メラノーマおよび 14 例の色素性母斑組織において検討した。(表 2 および図 11)

免疫組織化学的解析では、SPARC はすべての原発性および転移性メラノーマ組織において検出された。その発現の程度は、原発性メラノーマ組織では、強陽性 12 例、中等度陽性 14 例、弱陽性 7 例と様々であった。転移性メラノーマ組織においては、強陽性 5 例、中等度陽性 2 例、弱陽性 0 例と、比較的強い発現を認めた。メラノーマ細胞における SPARC の発現は、主に細胞質に認められた。

また、14 例すべての色素性母斑組織においても、SPARC 蛋白質の発現を認め、強陽性 4 例、中等度陽性 6 例、弱陽性 4 例と、その発現レベルは様々であった。

図 11

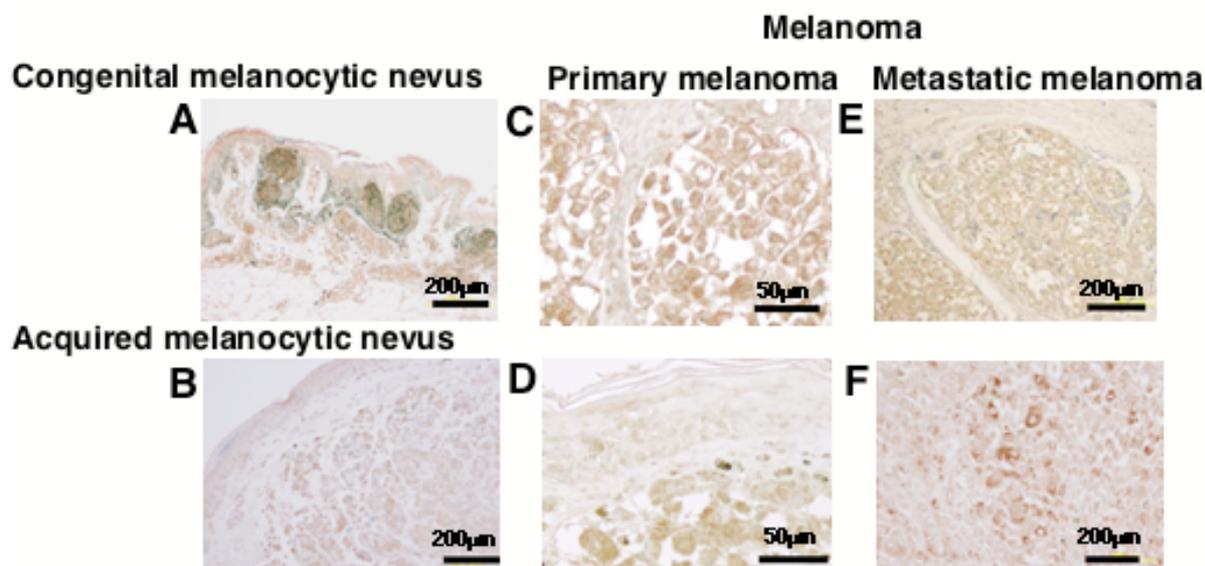


図 11. 色素性母斑、メラノーマ組織における SPARC 蛋白質の発現

巨大色素性母斑(A、B)、原発性メラノーマ (C、D)および転移性リンパ節組織(E、F)における SPARC 蛋白質の発現を免疫組織化学的検査にて検討した。SPARC は、すべての原発性および転移性メラノーマ組織において検出された。Scale bar : 200µm (A,B,E,F)、50µm (C,D)

7-7) ELISA 法を用いたメラノーマ細胞株培養上清中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出

抗ヒト SPARC モノクローナル抗体及びビオチン化抗ヒト SPARC ポリクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を用いて、可溶性 SPARC の検出を行った。

全 11 種類のうち、10 種類のメラノーマ細胞と、培養メラノサイト HEMn の培養上清中に SPARC 蛋白質が検出された (図 12)。mRNA および蛋白質レベルでの発現を認めなかった HMV-1 の培養上清中には、可溶性 SPARC 蛋白質は検出されなかった。各細胞の培養上清中の可溶性 SPARC 蛋白質の分泌量と、mRNA の発現量とを比較してみたが、必ずしも一致しなかった。

図 12

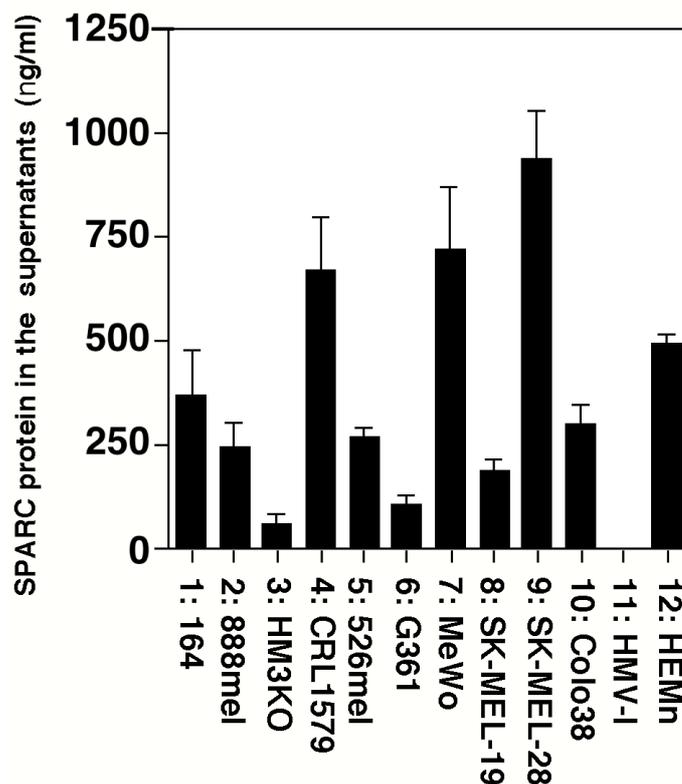


図 12. ELISA 法を用いたメラノーマ細胞株培養上清中の可溶性 SPARC 蛋白質の検出

ヒトメラノーマ細胞株(Lanes 1-11) および培養メラノサイト(HEMn; Lane 12) の培養液上清中の、可溶性 SPARC 蛋白質を ELISA 法にて検出した。全 11 種類のうち、HMV - 1 を除く 10 種類のメラノーマ細胞株と、HEMn の培養上清中に SPARC 蛋白質が検出された。

7-8) ELISA によるメラノーマ患者、健常人 および先天性色素性母斑患者血清中可溶性 SPARC 蛋白質の検出

次に、メラノーマ患者血清中の可溶性 SPARC 蛋白質の定量を行った。109名の術前メラノーマ患者から血液サンプルを採取し、医療記録から患者の臨床所見を集めて TNM 分類に基づいて臨床段階を決定した。109名のメラノーマ患者及び61名の健常人の血清中の SPARC 蛋白質の量を ELISA 法により評価した(表2, 図13)。

まず、市販の SPARC 蛋白質を用いて、ELISA 法における SPARC の定量の精度を評価した。SPARC 蛋白質を段階希釈したものをを用いて、その ELISA 法により得られた吸高度(OD)に基づいて SPARC 蛋白質を定量するための標準曲線を作製した(図13A)。その結果、SPARC 濃度が0~80ng/mL の範囲で直線性は保たれていた。よって、200倍希釈血清を用いる場合は、0 μ g/mL~16 μ g/mL の範囲で、可溶性 SPARC 蛋白質の定量が可能であることが明らかとなった。

健常人血清中にも血小板由来と思われる SPARC 蛋白質が検出されたが、メラノーマ患者の一部では、より高値の SPARC 蛋白質が検出された。つまり、メラノーマ患者109例の血清 SPARC 値は、 $2.02 \pm 1.02 \mu\text{g/mL}$ であり、健常人の値 $1.62 \pm 0.36 \mu\text{g/mL}$ より有意に高値であった ($P=0.001$) (図13B)。

健常人の平均値+2SD ($2.34 \mu\text{g/mL}$) をカットオフ値とした場合、メラノーマ患者109人中36人(33.0%; $3.21 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$)、健常人では61人中3人(4.9%; $2.46 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$)、色素性母斑の患者では、5人中2人(40%)が、SPARC 高値と判断された。よって、この検査法によるメラノーマ検出の特異度は92.4%と算定された。

メラノーマ患者では、健常人より多くの血清 SPARC 蛋白質が検出されたことより、メラノーマ細胞より血清中に SPARC が分泌されていることが示唆された。

図 13

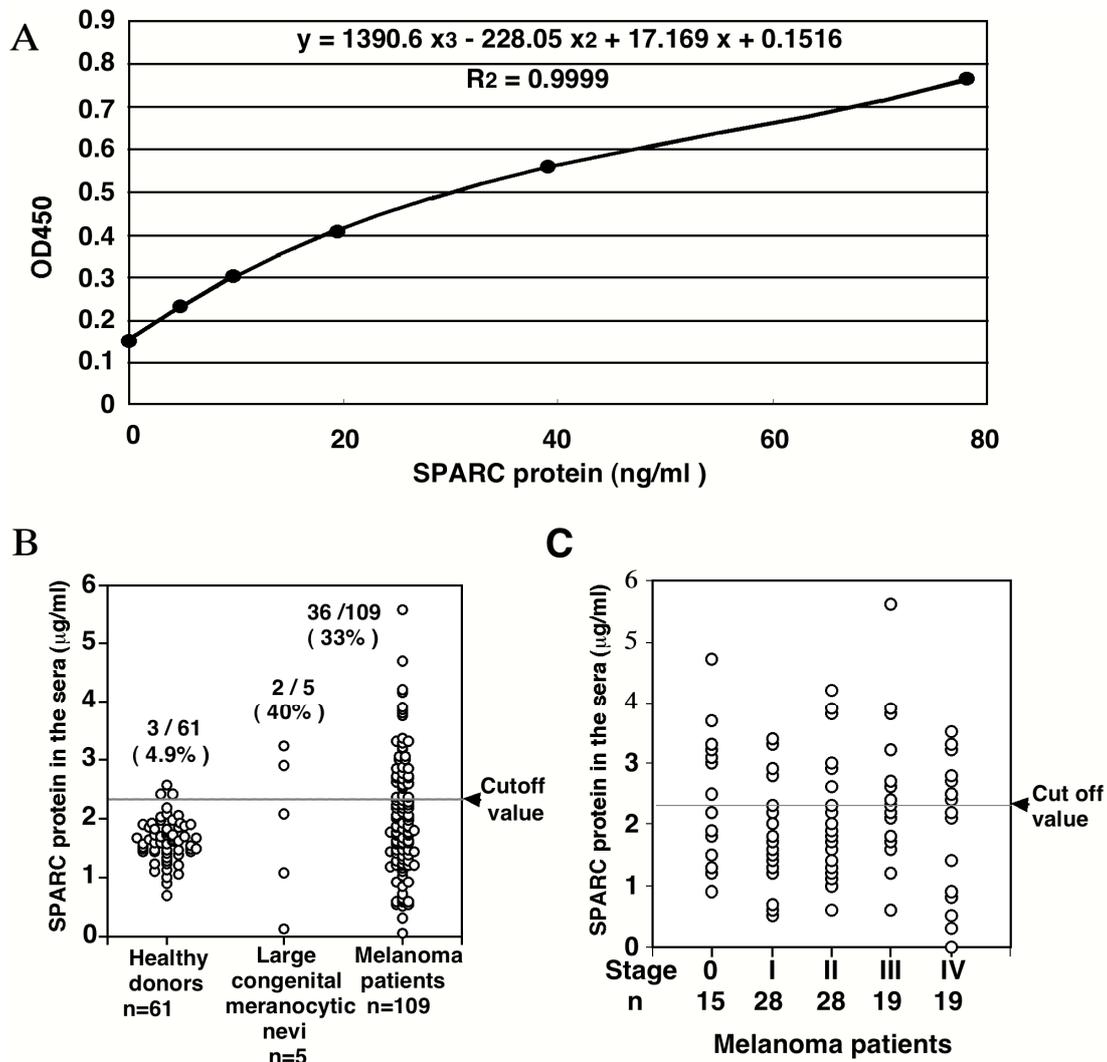


図 13. ELISA 法を用いたメラノーマ患者血清中の SPARC 蛋白質の検出

- (A) 段階希釈したヒト SPARC 蛋白質の測定値を基に、吸光度より SPARC 蛋白質を定量するための標準曲線を描いた。
- (B) 109 例のメラノーマ患者、5 例の巨大先天性母斑および 61 例の健常人血清中の SPARC 蛋白質を ELISA 法で測定した。健常人の平均値 + 2SD である $2.34 \mu\text{g/mL}$ をカットオフ値とすると、メラノーマ患者では 33.0% (36/109) が、陽性となり、巨大先天性母斑および健常人では、それぞれ 40% (2/5)、4.9% (3/61) の偽陽性を認めた。
- (C) 臨床ステージで分類したメラノーマ患者の血清 SPARC 値の比較。血清中 SPARC 値は、臨床ステージの進行とは無関係に、比較的早期のメラノーマ患者でも陽性例を認めた。

表 2

メラノーマ患者 113 例のプロフィールと、血清 SPARC、GPC3 および 5-S-CD 値の比較

Pt. ID	stage *	Age	Sex	Type	Serum concentrations of tumor markers			
					SPARC staining †	SPARC (µg/ml) ‡	GPC3 (U/ml) §§	5-S-CD (nmol/L) ¶¶
1	•	70	•			42	•	46
2	•	73	•			•	•	19
3	•	73	•			2	•	12
4	•	74	•			33	•	61
5	•	75	•			12	•	31
6	•	75	•			32	11	38
7	•	76	•			11	18	33
8	•	76	•			11	11	16
9	•	76	•			15	18	47
10	•	77	•			12	18	68
11	•	78	•			12	18	38
12	•	78	•		II	2	32	11
13	•	78	•			3	•	14
14	•	79	•	♀, M, M		•	13	11
15	•	79	•			47	13	11
16	•	79	•			110	•	30
17	•	79	•			110	11	18
18	•	79	•			110	11	18
19	•	79	•	♀, M, M		•	•	14
20	•	79	•		II	•	•	14
21	•	79	•			47	•	36
22	•	79	•			•	13	•
23	•	79	•			•	13	10
24	•	79	•			•	13	36
25	•	79	•			•	13	31
26	•	79	•			•	13	36
27	•	79	•			•	13	10
28	•	79	•			•	13	18
29	•	79	•			•	13	44
30	•	79	•			•	13	44
31	•	79	•			•	13	47
32	•	79	•		II	•	14	47
33	•	79	•		II	11	13	3
34	•	79	•			•	13	11
35	•	79	•			•	13	11
36	•	79	•			•	13	36
37	•	79	•			•	13	10
38	•	79	•			•	13	18
39	•	79	•		III	16	13	11
40	•	79	•			•	13	11
41	•	79	•			•	13	11
42	•	79	•			•	13	11
43	•	79	•			•	13	11
44	•	79	•			•	13	11
45	•	79	•			•	13	11
46	•	79	•		II	14	•	66
47	•	79	•			•	•	12
48	•	79	•			•	13	24
49	•	79	•			47	13	47
50	•	79	•			•	13	34
51	•	79	•		II	12	13	46
52	•	79	•		III	32	•	48

SPARC staining: 0 = none

表 2 (続き)

Pt. ID	stage *	Age	Sex	Type	Serum concentrations of tumor markers			
					SPARC staining †	SPARC (µg/ml) ‡	GPC3 (U/ml) §§	5-S-CD (nmol/L) ¶¶
7	II	77	♀	III-V		3	34	3.0
71	II	88	♀	III-V		2	•	4.7
73	II	7	♀	III-V	II	11	32	3.4
74	II	78	♀	III-V	III	13	43	4.7
77	II	77	♀	III-V	II	4	27	3.4
78	II	71	♀	III-V		11	23	2.7
77	II	88	♀	III-V		3	•	•
78	II	88	♀	III-V		3	•	3.7
79	II	77	♀	III-V		31	•	4.7
87	II	69	♀	III-V		•	11	4.6
8	II	77	♀	III-V		33	•	3.4
81	II	69	♀	III-V		13	•	3.3
83	II	7	♀	III-V	II	7	•	4.7
84	II	87	♀	III-V		12	22	4.3
87	II	77	♀	III-V		3	43	3.3
88	II	77	♀	III-V		12	•	1.4
89	II	68	♀	III-V	III	•	13	4.7
89	II	79	♀	III-V		47	13	3.3
90	II	47	♀	III-V	III	41	•	3.3
91	II	77	♀	III-V	I	13	•	3.6
9	II	77	♀	V,CO,B	I	3	•	3.7
91	II	77	♀	III-V	III	13	14	2.4
93	II	88	♀	III-V		4	14	3.3
94	II	84	♀	III-V		3	4	4.7
95	II	3	♀	III-V		•	•	3.7
96	II	88	♀	III-V	III	12	•	2.7
97	II	77	♀	III-V	III	•	•	3.3
98	II	86	♀	III-V	II	7	•	3.7
99	II	79	♀	III-V	II	13	•	3
87	II	77	♀	III-V		•	•	4.7
8	II	68	♀	III-V		13	•	4.3
81	II	79	♀	III-V		12	11	4.7
83	II	78	♀	V,CO,B		14	11	•
84	II	78	♀	III-V	I	13	•	2
87	II	87	♀	III-V		33	4	3.7
88	II	76	♀	III-V		13	•	1.7
89	II	79	♀	V,CO,B		31	•	•
88	II	77	♀	III-V	I	3	33	2
89	II	87	♀	IV	III	3	33	3.4
97	II	68	♀	III-V	III	12	13	4.3
9	II	77	♀	III-V		•	•	1.3
91	II	47	♀	V,CO,B		32	•	1.3
93	II	77	♀	III-V		•	13	4.7
94	II	68	♀	III-V	III	11	13	4.4
97	II	47	♀	III-V		33	33	1.7
98	II	77	♀	III-V	I	12	•	3.6
97	II	67	♀	III-V		14	•	4.7
98	II	78	♀	V,CO,B		11	•	4.3
99	II	67	♀	III-V	I	4	•	3.4
99	II	76	♀	V,CO,B	III	4	•	•

Continued on the following page

表 2 (続き)

Pt. ID	stage *	Age	Sex	Type	Serum concentrations of tumor markers			
					SPARC staining †	SPARC (µg/ml) ‡	GPC3 (U/ml) §	5-S-CD (nmol/L) ¶
101	IV	72	F	BBW		1.9	1	281
102	IV	73	F	BBW		1.3	1	261
103	IV	45	F	unknown		1.8	LL	5.5
104	IV	61	F	MUCOUS		2.2	B	8.6
105	IV	72	M	NW		1	1	225
106	IV	51	M	BBW		2.7	1	257
107	IV	47	F	NW		1	1	257
108	IV	22	M	unknown		3.2	57	25.8
109	IV	39	M	NW		1.5	1	171
110	IV	74	F	ALW		2.7	1	305
111	IV	68	M	unknown		2.1	33	24.2
112	IV	66	F	ALW	+++	2.8	1	246
113	IV	67	F	unknown		3.5	53	151
Nevus1		32	M	Congenital		3.2	1	3.5
Nevus2		38	M	Congenital		2.1	1	4.1
Nevus3		24	M	Congenital		1.1	1	NT
Nevus4		9	F	Congenital		1.1	1	1.8
Nevus5		4	M	Congenital		2.9	1	21

* 臨床病期分類は、UICC/AJCC の TNM 分類にしたがっておこなった。

† 免疫組織学的検査による SPARC 蛋白質の発現

‡ ELISA 法で測定した血清中 SPARC 蛋白質。2.34 µg/mL をカットオフ値とした。

§ ELISA 法で測定した血清中 GPC 3 蛋白質。1unit/mL をカットオフ値とした。

¶ HPLC 法で測定した血清中 5-S-CD 蛋白質。10 nmol/L をカットオフ値とした。

Congenital: Congenital melanocytic nevus, NT: Not tested.

7-9) メラノーマ組織における SPARC 蛋白質の発現と患者血清中の可溶性 SPARC 蛋白質との関係

30例のメラノーマ患者において、メラノーマの免疫組織化学的方法による SPARC 蛋白質の発現解析と患者血清中の SPARC 蛋白質の測定を同時に施行することが出来たため、両者の関係について検討した。30例中9例(30%)の患者において、血清 SPARC 値の増加を認めた(表2)。その9例中6例(患者39、42、50、76、90および112)の患者は免疫組織学的にも強陽性であり、2例(患者44および49)は中等度陽性であった。残りの1例(患者96)は弱陽性であった。また、組織学的に SPARC 蛋白質が強陽性であった13例中の7例は、血清 SPARC 蛋白質の増加を認めなかった。したがって、メラノーマ組織における SPARC 蛋白質の発現と患者血清中の可溶性 SPARC 蛋白質の間には相関関係は認められなかった。

一方、先天性色素性母斑の患者においては、血清と組織を同一患者から得ることが出来なかったため、組織学的な SPARC の発現と血清 SPARC 値の相関を検討することは出来なかった。

血小板に SPARC の発現が認められ、血液中に少量の SPARC が検出されることが知られている。今回の健常対照群とメラノーマ群の血小板数を比較したが、健常人では、 21.3 ± 0.9 万個/ mm^3 であり、メラノーマ患者では、 21.6 ± 0.8 万個/ mm^3 と、有意な差を認めなかった。しかしながら、健常人の血清中にも、血小板由来と思われる SPARC 蛋白質が検出されたため、血小板由来の SPARC 蛋白質の影響を排除する目的で、11名のメラノーマ患者及び21名の健常人の血漿 SPARC 蛋白質を ELISA 法により定量した(図14)。メラノーマ患者21例における血漿 SPARC 値は、 0.61 ± 0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、健常人の値 0.14 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より有意に高値であった ($P=0.003$)。

健常人の平均値+2SD ($0.43 \mu\text{g}/\text{mL}$) をカットオフ値とした場合、メラノーマ患者11例中4例(36.4%)が陽性となるが、健常人でも21例中1例(4.9%; $2.46 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$) が陽性となり、メラノーマ検出における特異度は、血清 SPARC とほぼ同等の95%となった。

図 14

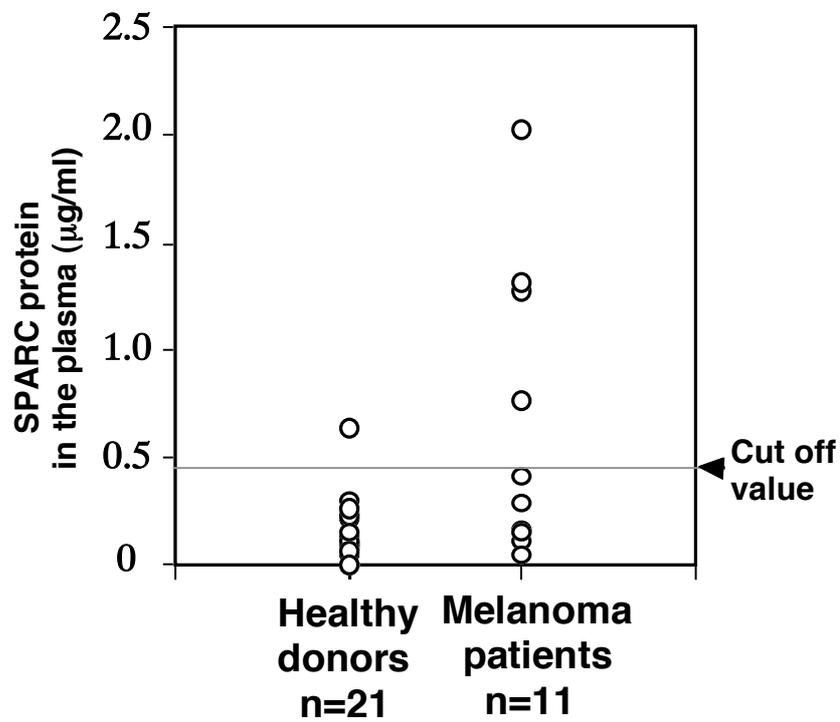


図 14. ELISA 法を用いたメラノーマ患者血漿中の SPARC 蛋白質の検出

11 例のメラノーマ患者と 21 例の健常人血漿中の SPARC 蛋白質を ELISA 法で測定した。健常人の平均値 + 2SD である 0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をカットオフ値とすると、メラノーマ患者では 36.3% (4/11) が、陽性となり、健常人では 4.8% (1/21) の偽陽性を認めた。

7-10) ステージ別に見たメラノーマ患者血清中の SPARC、GPC3 および 5-S-cysteinyl-dopa 濃度の比較

さらに、同じメラノーマ患者血清について、従来の腫瘍マーカーである 5-S-CD と、新規腫瘍マーカーとして当教室の中面らが先に報告した GPC3 を測定し、SPARC の値と比較検討した(表2および3)。なお GPC3 の測定は ELISA 法を用いて行い、5-S-CD の測定は高速液体クロマトグラフィー法を用いて行った。GPC3 については、1unit/mL をカットオフ値とし、5-S-CD に関しては 10nmol/L をカットオフ値とした(43, 44)。全メラノーマ患者の陽性率は、それぞれ SPARC が 33.0% (109 例中 36 例)、GPC-3 が 42.5% (113 例中 48 例)、5-S-CD が 22.7% (110 例中 25 例)であった。

表 3 には、それぞれステージ別のメラノーマ患者の血清 SPARC、GPC3 および 5-S-CD 値を示している。ステージ別に陽性率を解析してみると、従来の腫瘍マーカーである 5-S-CD は、ステージ III, IV のように進行してからでないとは陽性にはならなかったが、SPARC および GPC3 はステージにかかわらず陽性例を認め、ステージ 0 の in situ メラノーマであっても、それぞれ 53.3%、46.7% が陽性であった。特に Stage 0, I, II では、5-S-CD と比較して高い陽性率を示し、両者を併用すると stage 0~II のメラノーマの 66% が陽性であり、早期メラノーマの検出に有用であることが示された。さらに、血清 SPARC 値が増加している 36 例中の 18 例では、GPC3 および 5-S-CD が共に陰性であり、その多くは比較的早期のステージ 0~II の患者であった。一方、ステージ IV における 5-S-CD の陽性率は、84.2% (19 例中 16 例) であり、SPARC と GPC-3 のそれと比較して有意に高率であった。

これらの 3 種類の腫瘍マーカーの間には、明らかな相関関係は認められなかった。そこで、これら 3 種類の腫瘍マーカーを併用すると、実に 72.9% (107 例中 78 例) のメラノーマ患者を検出することが可能であった。

表 3

ステージ別に見たメラノーマ患者血清中の SPARC、GPC3 および 5-S-cysteinyl-dopa 濃度の比較

stage	SPARC(%)	GPC3(%)	5-S-CD(%)	GPC3+SPARC* (%)	GPC3+SPARC+5-S-CD† (%)
0	8/15 (53.3)	7/15 (46.7)	0/15 (0.0)	13/15 (86.7)	13/15 (86.7)
I	4/28 (14.3)	12/30 (40.0)	2/29 (6.9)	14/28 (50.0)	15/27 (55.6)
II	7/28 (25.0)	16/30 (53.3)	2/28 (7.1)	20/28 (71.4)	19/27 (70.4)
III	8/19 (42.1)	7/19 (36.8)	5/19 (26.3)	12/19 (63.2)	13/19 (68.4)
IV	9/19 (47.4)	6/19 (31.6)	18/19 (94.7)	12/19 (63.2)	18/19 (94.7)
Total	36/109 (33.0)	48/113 (42.5)	25/110 (22.7)	71/109 (65.1)	78/107 (72.9)

SPARC、GPC3 および 5-S-CD の各腫瘍マーカーの陽性率を、ステージ別に検討した。SPARC および GPC3 は、ほぼステージに関係なく陽性例を認め、比較的早期のメラノーマでも陽性例を認めた。一方、5-S-CD は陽性例のほとんどがステージ IV の進行癌であった。

* GPC3+SPARC : GPC3 と SPARC のいずれか、あるいは両方が陽性。

† GPC3+SPARC+5-S-CD : 3 種類の腫瘍マーカーの少なくとも一つが陽性。

7-11) 肉眼分類別メラノーマ患者における血清 SPARC 値の比較

また、メラノーマの肉眼分類別にメラノーマ患者血清中の SPARC 陽性率を検討した。表 4 に示すように、血清 SPARC はメラノーマの肉眼分類の違いによらず、様々な肉眼分類を呈する患者の約 20~50%において増加を認めた。

この結果は、日本人に多い足の裏にできる末端黒子型や、欧米人に多くみられる表在拡大型や悪性黒子型などの肉眼分類の違いによらず、血清 SPARC の定量が様々な肉眼分類の診断に貢献することを示すものである。

表 2

肉眼分類別メラノーマ患者における血清 SPARC 値の比較

Type	SPARC (%)	GPC3 (%)	5-S-CD (%)
ALM	12/46 (26.1)	15/49(30.6)	6/47 (12.8)
SSM	5/15 (33.3)	9/15 (60.0)	8/14 (57.1)
LMM	3/10 (30.0)	8/11 (72.7)	2/11 (18.2)
NM	1/ 5 (20.0)	2/ 5 (40.0)	3/ 5 (60.0)
Mucous	4/12 (25.0)	3/12 (25.0)	2/12 (16.7)
in Situ	8/15 (53.3)	7/15 (46.7)	0/15(0.0)
Total	33/103(31.4)	44/107(40.6)	21/104(20.2)

SPARC、GPC3 および 5-S-CD の各腫瘍マーカーの陽性率を、肉眼分類別に検討した。いずれの腫瘍マーカーも、特に肉眼分類の違いによらず、様々な肉眼分類で増加を認めた。

7-12) 外科的切除前後のメラノーマ患者における血清 SPARC 値の推移

術前の血清 SPARC 値が陽性であった症例で、術後も経過を追うことの出来た 13 例について、血清 SPARC、血清 GPC 3 および血清 5-S-CD 値を測定し、その変化について検討した (表 5)。その結果、13 例中 10 例において、外科的切除後に血清中 SPARC 値はカットオフ値以下に減少した。このことより、血清中 SPARC 値の測定は、治療効果の判定に有用であると考えられた。一方、これらの 13 例においては、術前、術後を通じて GPC 3 および 5-S-CD はほとんどが陰性であった。

経過中にメラノーマが再発した 3 例中 2 例 (患者 87 および 92) においては、血清 SPARC 値が外科的切除後に一旦カットオフ値以下にまで減少したが、再発後に再度増加した。5-S-CD 値は、再発したすべての患者で増加していた。血清 SPARC 値の測定が、再発の判定に有用か否かについては、さらなる症例の蓄積が必要であると考えられた。

表 5

術前の血清 SPARC 値高値症例における術後の血清 SPARC、GPC 3 および 5-S-CD 値の推移

FIGO *		Pre op	POD56		
1	SPARC (μg/ml)	<u>4.7</u>	1.6		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>4.6</u>	<u>4.9</u>		
		Pre op	POD1484		
9	SPARC (μg/ml)	<u>2.5</u>	0.5		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>4.7</u>	<u>4.1</u>		
		Pre op	POD15		
10	SPARC (μg/ml)	<u>3</u>	<u>3.4</u>		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>6.8</u>	<u>3.3</u>		
		Pre op	POD7		
12	SPARC (μg/ml)	<u>3.2</u>	<u>2.3</u>		
	GPC 3 (U/ml)	<u>7.7</u>	<u>40</u>		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>5.5</u>	<u>8.8</u>		
		Pre op	POD37		
13	SPARC (μg/ml)	<u>3</u>	<u>3.2</u>		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>6.75</u>	<u>5</u>		
		Pre op	POD274		
23	SPARC (μg/ml)	<u>3.3</u>	0.9		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>1</u>	<u>4</u>		
		Pre op	POD140	POD217	
44	SPARC (μg/ml)	<u>3.4</u>	<u>2</u>	<u>2.3</u>	
	GPC 3 (U/ml)	0	0	0	
	5-S-CD (nmol/L)	<u>6.6</u>	<u>3.4</u>	<u>4.9</u>	
		Pre op	POD1472		
49	SPARC (μg/ml)	<u>2.9</u>	1.6		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>4.6</u>	<u>3.7</u>		
		Pre op	POD1008	POD1358	
50	SPARC (μg/ml)	<u>3.9</u>	<u>3.3</u>	<u>2.6</u>	
	GPC 3 (U/ml)	0	0	0	
	5-S-CD (nmol/L)	<u>4.3</u>	<u>5.3</u>	<u>2.9</u>	
		Pre op	POD1567		
61	SPARC (μg/ml)	<u>3.8</u>	<u>2.3</u>		
	GPC 3 (U/ml)	0	0		
	5-S-CD (nmol/L)	<u>3.4</u>	<u>5</u>		
		Pre op	POD329	POD462(Meta)	POD559(Free)
69	SPARC (μg/ml)	<u>4.2</u>	<u>2</u>	<u>1.6</u>	<u>0.4</u>
	GPC 3 (U/ml)	0	0	0	0
	5-S-CD (nmol/L)	<u>6.3</u>	<u>4.3</u>	<u>3.4</u>	<u>31</u>
		Pre op	POD82	POD325	POD713(Meta)
87	SPARC (μg/ml)	<u>3.2</u>	<u>2.4</u>	<u>1.4</u>	<u>3.5</u>
	GPC 3 (U/ml)	0	0	0	<u>45</u>
	5-S-CD (nmol/L)	<u>8.8</u>	<u>5</u>	<u>5.1</u>	<u>46</u>
		Pre op	POD455	POD678	POD762(Meta)
92	SPARC (μg/ml)	<u>3.9</u>	0.3	<u>2.4</u>	<u>2.2</u>
	GPC 3 (U/ml)	0	0	0	0
	5-S-CD (nmol/L)	<u>10.3</u>	<u>7.8</u>	<u>7.3</u>	<u>10</u>

術前の血清 SPARC 値が陽性であった症例で、術後も経過を追うことの出来た 13 例について、血清 SPARC、GPC 3 および 5-S-CD 値を測定し、その変化について検討した。その結果、13 例中 10 例において、外科的切除後に血清 SPARC 値はカットオフ値以下に減少した。陽性値には下線を引いた。

POD : post operative days, Free : disease free

7-13) BALB/c マウスを用いた SPARC 特異的 CTL エピトープの同定

選択した H2-K^d に結合親和性を示すと推定される SPARC 由来のペプチド 4 種類のうち、SPARC 特異的に CTL を誘導出来るエピトープペプチドを ELISPOT アッセイにて探索した (図 15A)。それぞれの SPARC ペプチドを提示させた BM-DC により、BALB/c マウスを *in vivo* で感作 (免疫) した後に、脾細胞を *in vitro* で再刺激後した。その後に、ELISPOT 解析を行ったところ、刺激細胞としてペプチド K^d-4 を負荷した BM-DC を用いた場合に生じたスポット数は、 1×10^5 個の CD4 陰性脾細胞あたり 68.5 ± 2.1 個であり、一方コントロールとしてペプチド負荷しない BM-DC に対しては 11.3 ± 4.0 個であり、K^d-4 ペプチドが最も強く SPARC 特異的 CTL を誘導した ($p < 0.005$)。また、ペプチド K^d-1 による刺激においても、同様に 1×10^5 個の CD4 陰性脾細胞あたり 23 ± 6.3 個 (コントロールは 8.3 ± 7.7 個) のスポットが観察され、SPARC 特異的反応を認めた ($p < 0.005$)。

以上より、これら二種類のペプチド SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4 を、SPARC 由来 H2-K^d 拘束性 CTL エピトープとして同定した (図 15B)。

7-14) BALB/c マウスを用いた SPARC 特異的 CTL 株の樹立と、細胞傷害活性の検討

上記の方法により、H2-K^d 拘束性 SPARC エピトープペプチド K^d-1 あるいは 4 負荷した BM-DC を用いて BALB/c マウスを免疫して、その脾臓細胞から誘導した CTL は、ペプチドを負荷しない T2-K^d 細胞に対しては、細胞傷害活性を示さなかったが、エピトープペプチド K^d-1 および 4 を負荷した T2-K^d 細胞に対しては、強い細胞傷害活性を示した (図 7)。以上より、CTL 細胞株は H2-K^d 拘束性に SPARC ペプチドを認識することが明らかとなった。

さらに、CTL の誘導に用いたペプチドが癌細胞内でプロセッシングを受け、H2-K^d 分子と SPARC ペプチドの複合体として癌細胞の表面に提示されているか否かを検討するために、SPARC を発現しない H2-K^d 陽性の T 細胞性白血病細胞株 RL[♂]1 および、内因性に SPARC を発現する H2-K^d 陽性の繊維肉腫細胞株 Meth A を標的細胞として CTL の反応を検討した (図 16)。K^d-1 および 4 ペプチドを用いて誘導した CTL は、SPARC⁻H2-K^{d+} の RL[♂]1 に比べ、SPARC⁺H2-K^{d+} である Meth A に対して強い細胞傷害活性を示した。以上の結果は、今回同定した 2 種類のエピトープペプチドが、SPARC 発現癌細胞内で SPARC 蛋白質のプロセッシングにより産生され、H2-K^d-SPARC ペプチド複合体として細胞表面上に提示されていることを示すものである。同定したエピトープペプチドで誘導した CTL は、このような癌細胞表面に発現する H2-K^d-SPARC ペプチド複合体を認識して、癌細胞に対する細胞傷害活性を示したものと考えられる。

図 15

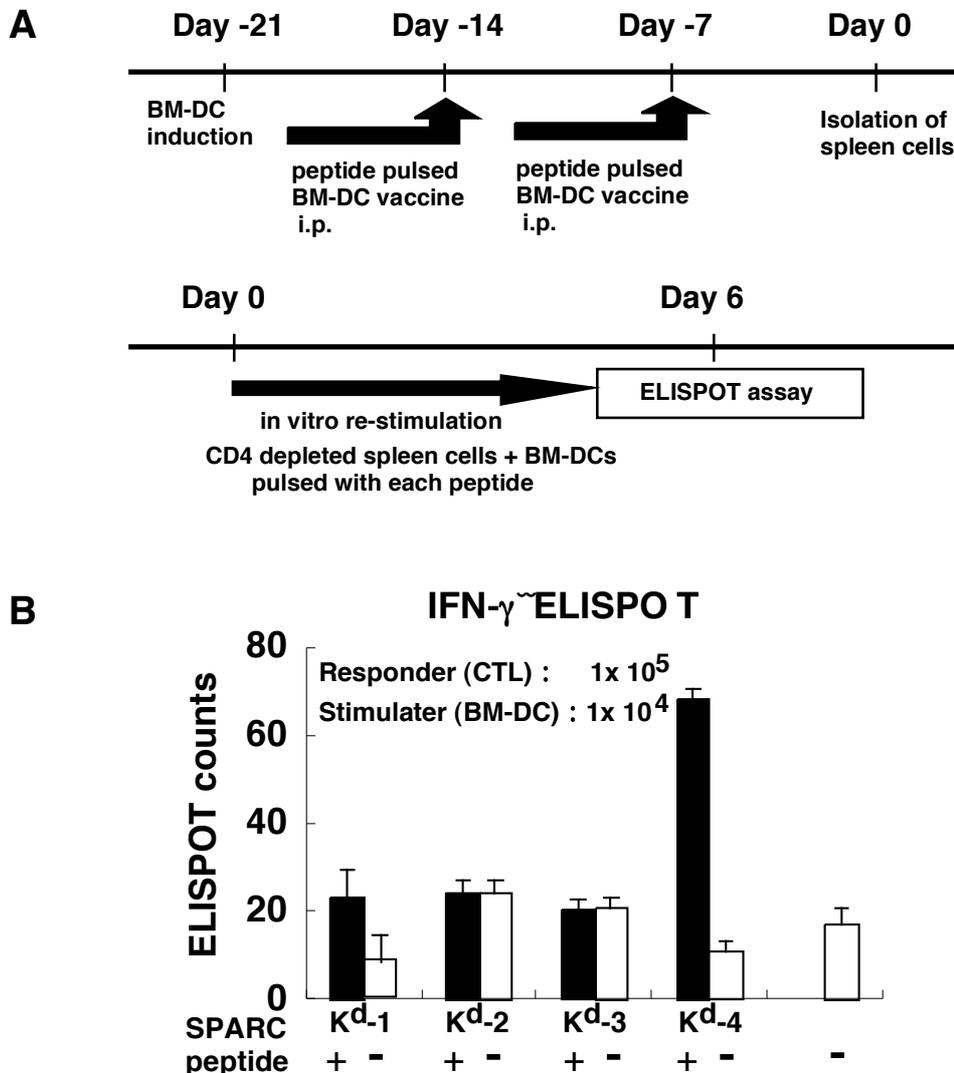


図 15. BALB/c マウスを用いた SPARC 由来の H2-K^d 拘束性 CTL エピトープの同定

- (A) CTL エピトープ同定のための実験プロトコール。BALB/c マウスの BM-DC に H2-K^d 拘束性 SPARC ペプチド 4 種類の混合物を負荷し、1 週間毎に 2 回、 5×10^5 個ずつ腹腔内投与(i.p.)にて免疫し、7 日後に脾細胞を回収した。CD4 陰性脾細胞を分画し、in vitro にて再び BM-DC にそれぞれの SPARC ペプチドを負荷したものと共培養し、6 日後に ELISPOT アッセイにてペプチド特異的な CTL 応答を検討した。ELISPOT の際には刺激細胞としてペプチドを負荷した BM-DC と、負荷しない BM-DC を用い、両刺激の間でスポット数の差が有意に大きいものをエピトープ候補とした。
- (B) IFN- γ ELISPOT 法によるスポット数を示す。SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4 についてペプチド特異的な CTL 応答を認め、CTL エピトープと判定した。

図 16

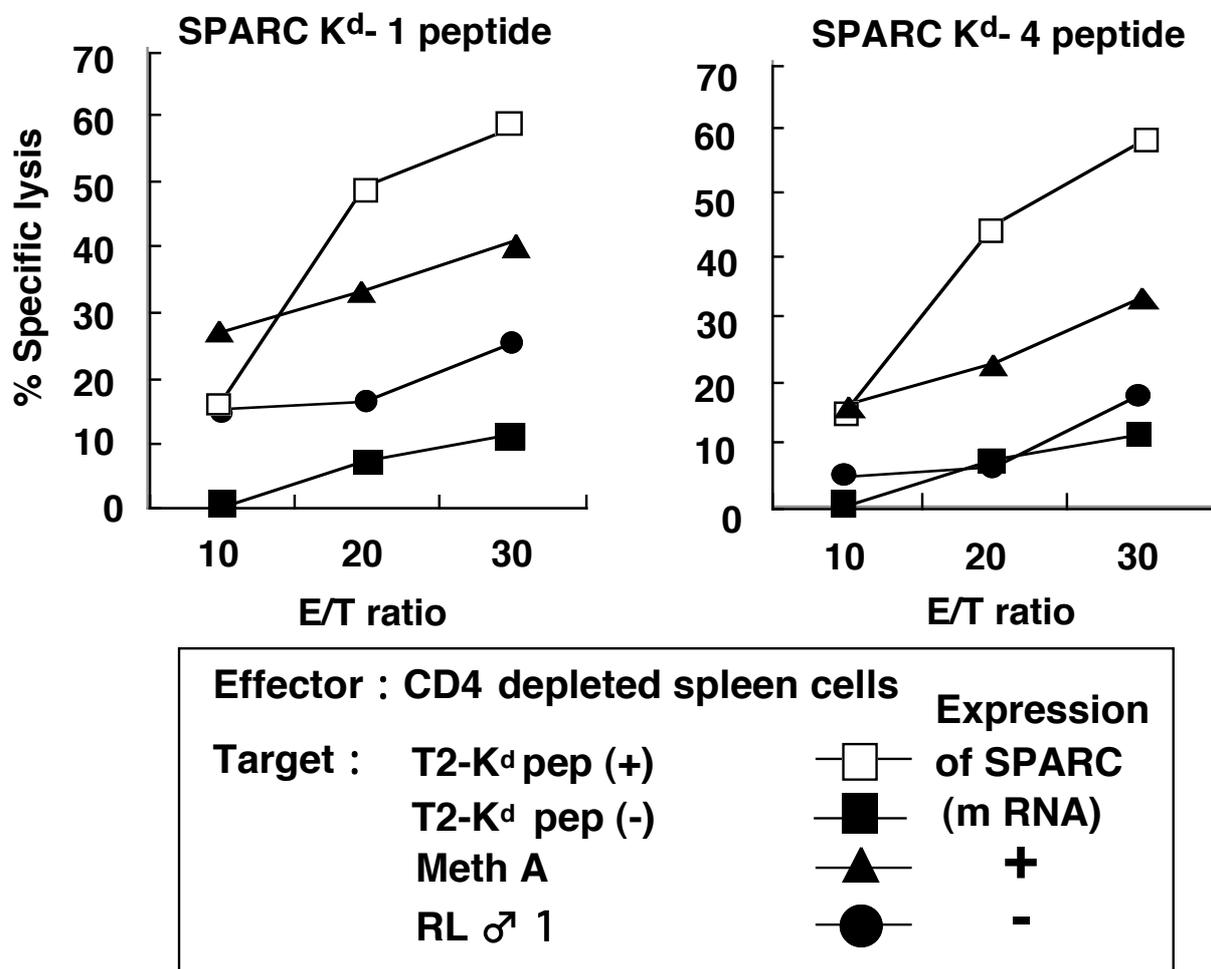


図 16. SPARC ペプチドを用いた SPARC 特異的な CTL の誘導

BALB/c マウスの BM-DC に H2-K^d 拘束性 SPARC エピトープペプチド(SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4)を負荷し、1 週間毎に 2 回、 5×10^5 個ずつ腹腔内投与にて免疫し、7 日後に脾細胞を回収した。脾細胞から、CD4 陽性細胞を磁気ビーズで除き、in vitro にて再び BM-DC にそれぞれの SPARC ペプチドを負荷したものと共培養し、6 日後に ELISPOT アッセイにてペプチド特異的な CTL 応答を検討した。

ELISPOT アッセイにおけるペプチド特異性は、T2-K^d 細胞に SPARC エピトープを負荷したもの(□)に対する傷害活性と、陰性対照としてペプチドを加えないもの(■)に対する傷害活性を比較した。癌細胞に対する H2 - K^d 拘束性 SPARC 特異的な細胞傷害活性は、共に H2 - K^d 陽性で内因性 SPARC を発現する細胞株である Meth A(▲)と、SPARC 陰性の細胞株である RL♂1 (●)に対する傷害活性の有無で検討した。これらの癌細胞に対する細胞傷害活性を比較することにより、腫瘍が発現している SPARC 蛋白質から生成されるエピトープペプチドと MHC 分子 (H2 - K^d) の複合体を認識して CTL が細胞傷害活性を示していることがわかった。

7-15) SPARC ペプチド負荷 BM-DC を免疫したマウスにおける腫瘍増殖の抑制

BALB/c マウスに、H2-K^d 拘束性 SPARC エピトープペプチド K^d-1 と 4 を混合して負荷した BM-DC を 1 週間間隔で 2 回免疫し、2 回目の免疫の 1 週間後に SPARC を高発現繊維肉腫細胞株 Meth A を側背部に皮下移植して、腫瘍増殖抑制効果について検討した。ペプチドを負荷しない BM-DC 投与群、あるいは非投与群をコントロールとして用いた。BALB/c マウスに生着した Meth A 細胞が形成した腫瘍の大きさの経時的変化を図 17A、B、C に示す。エピトープペプチドを負荷した BM-DC で免疫したマウスでは、一旦生着した腫瘍が 10 匹中 8 匹で完全に拒絶され、コントロールの BM-DC 非投与群と比較して明らかな腫瘍増殖抑制が認められた ($p < 0.05$)。なお、コントロールの BM-DC 投与群でも、10 匹中 4 匹において腫瘍拒絶が認められたため、エピトープペプチドを負荷した BM-DC と比較して有意差は認められなかったが ($p = 0.07$)、腫瘍増殖の抑制傾向 (Day31: 267.8 ± 252.8 VS 51.3 ± 82.1) が認められた。

SPARC エピトープペプチド負荷 BM-DC 群、コントロール BM-DC 群、非投与群の生存曲線を図 17D に示す。エピトープペプチド負荷 BM-DC 群と非投与群では、生存期間においても有意な差が生じた ($p < 0.05$)。非投与群は、70 日以内にすべてが死亡してしまったのに対し、エピトープペプチド負荷 BM-DC 群では 100 日の時点で 10 匹中 8 匹が生存しており、その後も 1 年以上の生存を認めた。一方、コントロール BM-DC 投与群と比較しても生存の延長を認めたが、有意な差は認めなかった ($p = 0.07$)。

図 17

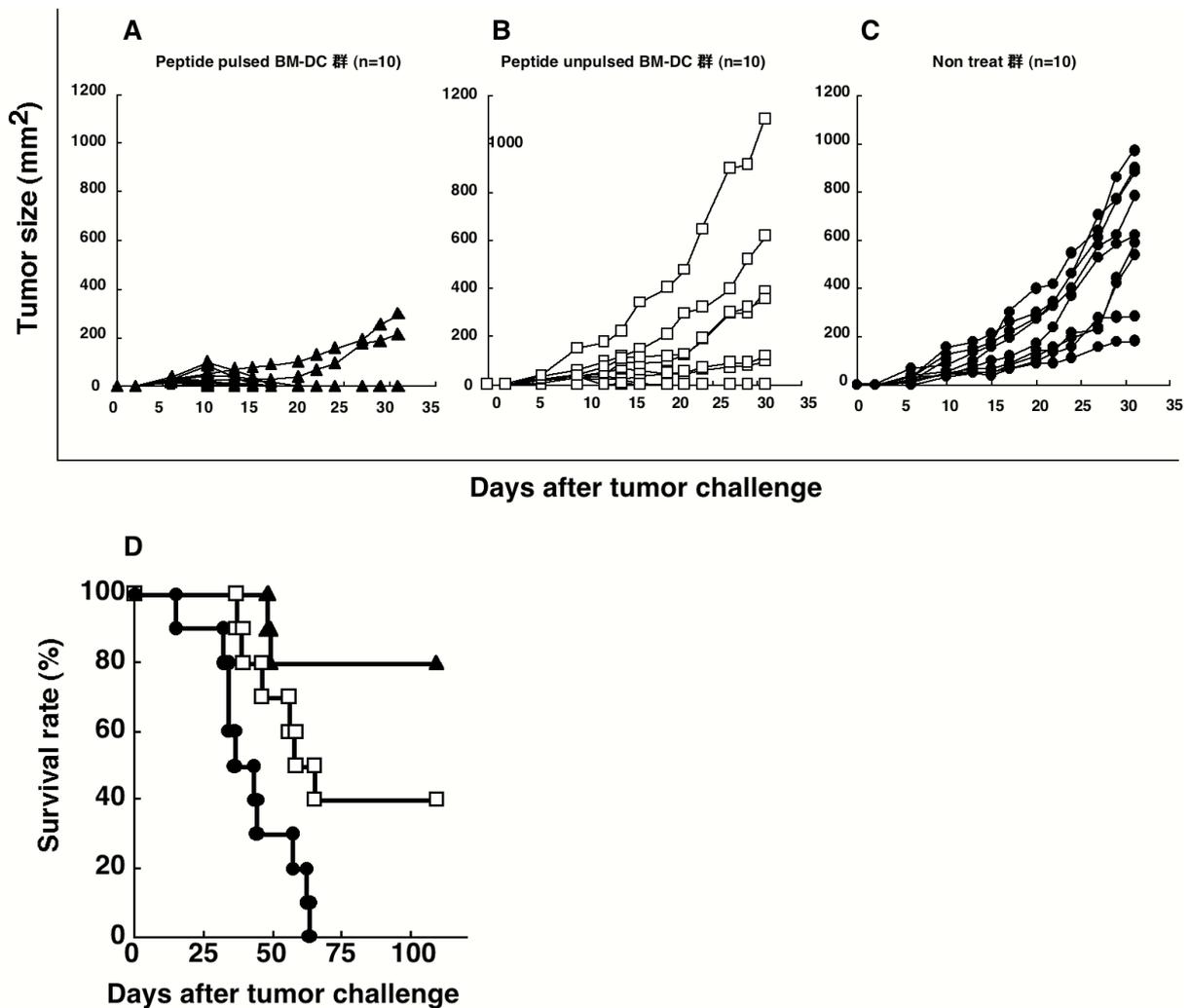


図 17. SPARC ペプチド負荷 BM-DC ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果と、生存期間延長効果の検討

H2-K^d 拘束性 SPARC エピトープペプチド (SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4) を負荷した BM-DC ワクチンを、1 週間間隔で 2 回 BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、2 回目の免疫のさらに 1 週間後に、マウスの側背部皮下に Meth A 細胞を移植し、腫瘍増殖抑制効果と、生存期間延長効果について検討した。

(A, B, C) SPARC エピトープペプチド負荷 BM-DC 群 (▲)、コントロール BM-DC 群 (□)、非投与群 (●) のマウスにおける腫瘍の大きさの変化を、それぞれ図 16A, B, C に示した。SPARC エピトープペプチド負荷 BM-DC 群では、一旦生着した腫瘍が 10 匹中 8 匹で完全に拒絶された。腫瘍の大きさは長径×短径で表した。SPARC エピトープペプチド負荷 BM-DC 群と非投与群とを比較すると、明らかな腫瘍増殖抑制が認められた ($p < 0.05$)。

(D) 各群のマウスの生存期間を示した。コントロールマウスは、70 日以内にすべて死亡してしまったのに対し、エピトープペプチド負荷 BM-DC 群では 100 日の時点で 10 匹中 8 匹が生存しており、その後も長く生存を認めた。エピトープペプチド負荷 BM-DC 群と非投与群では、生存期間においても有意な差が生じた ($p < 0.05$)。

7-16) ペプチド負荷 BM-DC の投与を受けた BALB/c マウスの病理組織学的解析

癌免疫療法の臨床応用を目指す際には、癌特異的抗原に対する免疫応答が自己免疫現象を誘導するか否かに留意しなければならない。例えば、良く知られているメラノーマの分化抗原の MART-1 や gp100 は、メラノーマの免疫療法に有用であるが、自己免疫反応として白斑やブドウ膜炎を誘導する場合があることが報告されている(46)。エピトープペプチド SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4 を含む SPARC ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した BALB/c マウスについて、重要臓器(脳、心、肺、肝、腎)への CD8 陽性 T 細胞または、CD4 陽性 T 細胞の浸潤を免疫組織化学的解析にて検討したところ、細胞浸潤を認めなかった。また、マウスは体重減少、活動性の低下、麻痺や下痢などの症状を示さず、自己免疫病は発生していないものと判断した(図 18)。

図 18

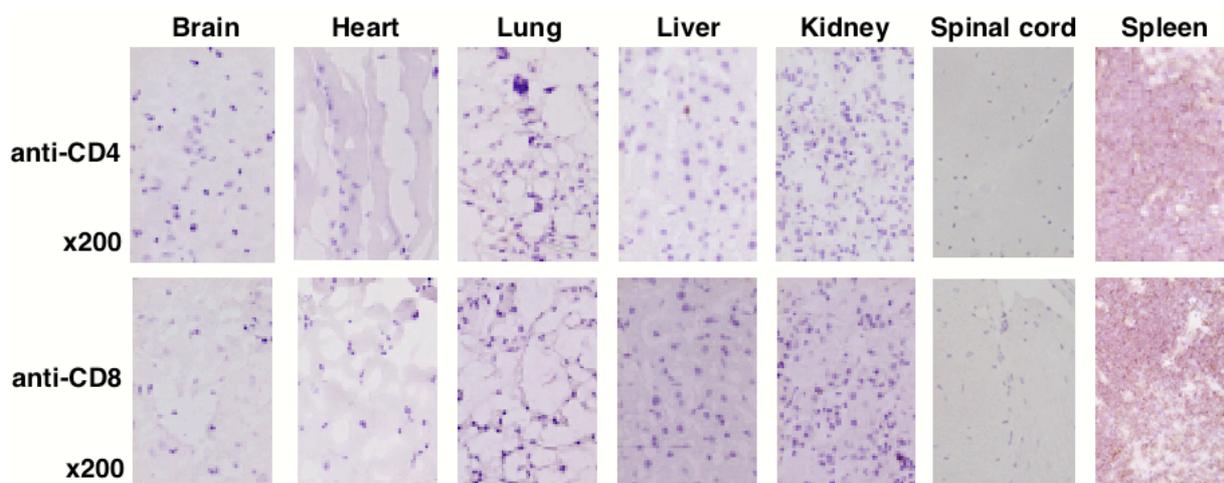


図 18. ペプチド負荷 BM-DC ワクチンの投与を受けたマウスの病理組織学的解析

SPARC ペプチド(SPARC-K^d-1 および SPARC-K^d-4)を負荷した BM - DC ワクチンを腹腔内投与した 1 週間後に脾臓を採取する際に、同時に重要臓器への細胞浸潤の有無を検討した。抗 CD8 抗体および抗 CD4 抗体を用いて脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脊髄への CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞浸潤の有無を検討したが、浸潤は認められなかった。(脾臓は陽性対照)

8 考察

癌免疫療法の標的抗原として理想的なものは、腫瘍細胞中で自然にプロセッシングされて出来たペプチドが、細胞表面上に MHC 分子と共に提示される抗原で、かつ免疫系からの逃避が起こりにくい抗原、すなわち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があげられる(18, 47)。今回われわれが同定した SPARC 遺伝子は、正常では脂肪組織、乳腺、卵巣、脊髄、精巣、子宮、胎盤などに少量発現しているが、スキルス胃癌において発現が著明に増加する遺伝子であり、その他の癌腫における cDNA マイクロアレイ解析でも、膀胱癌、大腸癌などの 75%以上の患者で、癌部に異常な高発現を認めるものである(未発表データ)。SPARC 蛋白質の発現を免疫組織学的解析により確認したところ、正常精巣、メラノーマ細胞で強い発現が認められたが、その他の正常臓器には、ほとんど発現を認めなかった。

SPARC は様々な癌腫で高発現する事が報告されており、局所の浸潤度、リンパ節転移、肝転移、予後や生存の不良などとの関連が報告されている(39, 48-59)。一方、卵巣癌では、悪性度と逆の相関が報告されている(58)。多くの癌では、SPARC は、癌の間質細胞に発現しており、癌細胞自身にはほとんど発現していない(48, 55)。しかしながら、ヒトメラノーマ細胞には SPARC が高発現することが報告されており、その発現が腫瘍の浸潤性や悪性度と正の相関を示すとされている(39, 40)。これらのことより、SPARC は多様な癌の免疫療法において、有効な標的抗原となる可能性があると考えられた。

まず、我々はメラノーマ細胞株とメラノーマ組織において、mRNA および蛋白質レベルで SPARC が高発現していることを確認した。また、メラノーマ細胞株培養上清中に可溶性 SPARC 蛋白質が分泌され、これを検出できることを発見した。さらに、実際にメラノーマ患者の血清中にも可溶性 SPARC 蛋白質が分泌され、診断に有用ではないかと考えた。実際に、今回の研究では、メラノーマ患者の 33%において、血清中の SPARC 値が増加しており、メラノーマの検出に有用であることが証明された。

一般に、血清腫瘍マーカーの値と、病気の進行度は相関している(44)。しかしながら、今回の検討では、血清中 SPARC 値と、メラノーマの進行度には、明らかな相関が見られなかった。検討したほとんどすべてのメラノーマ組織およびメラノーマ細胞株に SPARC が発現しているのに、なぜ 33%の限られた症例のみでしか、血清中の SPARC が高値にならないのであろうか。メラノーマ細胞株において、蛋白質の発現と、培養上清中に分泌される可溶性 SPARC の量は、完全には相関していなかった(図 9B および図 12)。同様のことは、患者のデータにおいて観察され、SPARC の免疫組織化学的解析で、中等度あるいは強陽性であった 24 例中 16 例が、血清中の SPARC が低値のままであった(表 2)。これらのことより、すべてではなく一部のメラノーマ細胞が、SPARC を分泌しているのではないかと考えられた。メラノーマ細胞株を

培養した場合、培養上清中に分泌される可溶性 SPARC 蛋白質は、培養ディッシュ中の細胞数にほぼ相関していた（未発表データ）。しかし血清 SPARC 値は、腫瘍の大きさやステージとは明らかな相関を示さなかった。今回の検討では、むしろ早期癌に比べて、ステージ IV の進行癌では、血清 SPARC 値は比較的に低値であった。メラノーマからの SPARC 分泌の機構は明らかになっていないが、血清 SPARC は、比較的早期のメラノーマの検出に有用なマーカーである事が示唆された。

正常人においても、血小板由来の SPARC 蛋白質が血清中に存在し、血小板数と相関するとの報告がなされている(60)。我々の検討でも、健常人においては、血清 SPARC 値と血小板数とは、ほぼ正の相関を示していた（未発表データ）。さらに、今回健常対照群と、メラノーマ群の血小板数を測定したところ、その数に全く有意差は認められなかった（ 21.3 ± 0.9 万個/mm³ 対 21.6 ± 0.8 万個/mm³）。

今回の、血清 SPARC 値の検討では、健常対照群で 3 例（4.9%）の偽陽性例を認めたが、その SPARC 値は、多くの SPARC 陽性メラノーマ患者の値よりも低かった。よって、その SPARC 値の増加は、血小板増加などの因子が関与しているのではないかと疑ったが、そのような例は認めなかった。血漿中の SPARC を測定することにより、血小板の影響を抑えることが出来るため、血漿での検討を行ったが、結果的には、健常人では 21 例中 1 例（4.8%）の偽陽性を認め、メラノーマ患者の陽性率も、血清サンプルと明らかな差を認めなかった（36.4%対 33.0%）。これらのことより、メラノーマ患者の血清中で増加している SPARC は、血小板由来のものではなく、メラノーマ細胞から分泌されているものと推測された。

免疫組織化学的解析によると、色素性母斑は SPARC および GPC3 を共に高発現している。巨大先天性母斑患者 5 例においては、GPC3 値の上昇は見られなかったが、2 例（40%）において血清 SPARC 値の増加を認めた。母斑症例については、偽陽性の危険性が高いために、メラノーマの鑑別診断における血清 SPARC 値の利用には注意を要すると考えられた。

今回の研究では、日本人のメラノーマ患者検体のみを用いた。日本人は欧米人と比較し、ALM の発生率が圧倒的に高いが、欧米人では SSM や LMM の頻度が高い。臨床的、病理学的、また分子遺伝学的にも ALM は他のタイプと異なると報告されている(61-64)。そこで、これらの臨床型別に SPARC と GPC3 の陽性率を比較してみた。その結果、臨床型とこれらのマーカーの陽性率には、明らかな相関は認めなかった。このことより、SPARC と GPC3 という 2 種類の腫瘍マーカーは、日本人のみではなく、欧米白人のメラノーマにも応用可能であると考えられた。

SPARC は、特に早期のメラノーマの腫瘍マーカーとして有用である事が示唆された。また、5-S-CD と GPC3 という 2 種類の腫瘍マーカーと同時に測定することにより、検出率はさらに向上し、メラノーマの診断、治療成績の向上に寄与するものと考えている。現時点では、Atypical nevi syndrome や、他のメラノーマのハイリスク群におけるこれらの腫瘍マーカーの検討はなされていない。新しい腫瘍マーカーである SPARC および GPC3 を臨床応用するためには、これらの症例を含めた、さらなる検

討が必要である。一方、われわれはメラノーマの他に、乳癌患者（通常型10例、スキルス型10例）の血清についても、血清 SPARC を測定したが、有意な血清 SPARC 値の増加は認めなかった（未発表データ）。また、膵癌20例について血清 SPARC 値が測定されているが、有意な増加は認めなかったと報告されている(65)。SPARC が他の癌腫についても、腫瘍マーカーとして有用であるか否かについては、さらなる検討が必要である。

本研究で、われわれは、BALB/c マウスの系において、K^d 拘束性の SPARC 由来 CTL エピトープを同定し、これらのペプチドを用いて BALB/c マウスを免疫することにより、その脾臓細胞から SPARC に反応する CTL を誘導出来た。これらのペプチドを負荷した BM-DC によるワクチンは、BALB/c マウスに有害な自己免疫反応を引き起こすことなく CTL を誘導できた。われわれは、同様の方法で同定した H2-K^d と HLA-A24 に共通した結合モチーフをもつ GPC 3 由来エピトープペプチドが、HLA-A24 陽性の HCC 患者の約 50%において CTL を誘導できることを報告している(33)。このことは BALB/c マウスが HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定に有用であることを示唆しており、今回同定した SPARC エピトープペプチドについても、HLA-A24 陽性のメラノーマ患者から CTL を誘導できる可能性が高いと考えている。

われわれは、BALB/c マウスに、SPARC エピトープペプチド負荷 BM-DC を予防的に投与することにより、その後皮下移植した Meth A 細胞の増殖が抑制され、生存期間も延長することを観察した。しかしながら、ペプチドを負荷しない BM-DC を投与したマウス群でも、一部で腫瘍増殖抑制効果が観察された。この機序として、BM-DC の培養の際に用いた FCS 由来の蛋白質が、抗原として作用し、それを認識する癌細胞に非特異的な CTL やヘルパー T 細胞が誘導されて、腫瘍増殖抑制に働いた可能性が考えられた。現在、SPARC を高発現するその他の腫瘍について、同様の検討を行っている。また、実際に生着した腫瘍に CTL を注入する養子免疫療法の有用性についても、検討する予定である。

SPARC は、従来のように腫瘍反応性 T 細胞や癌患者血清中の抗癌抗体を用いて同定された抗原ではなく、cDNA マイクロアレイ解析の結果から抗原となりそうな候補分子を推測し、その分子のアミノ酸配列から CTL エピトープを予測する方法によって同定された腫瘍拒絶抗原である。この様な方法で同定された抗原の免疫原性については十分に確認する必要があるが、癌細胞における発現が非常に高く、また癌患者における発現頻度も高い分子を選択できるという利点がある。また、その分子の機能を解明しておくことも、治療の標的分子として臨床的に利用する際には必要であり、その解析も今後行うべきであろう。

最後に、本研究で同定した SPARC はメラノーマ、スキルス胃癌のみならず、膵癌、大腸癌患者にも高頻度で発現していることから、多様な癌の診断薬および免疫療法における効果的な標的抗原となる可能性がある。さらに、腫瘍の間質細胞から分泌される SPARC が間質を増生させることにより腫瘍の増殖を促進させ、SPARC ノックアウトマウスでは、この現象がなくなるために腫瘍の増殖が抑制されるとの報告があり

(41)、腫瘍細胞のみならず、間質の SPARC をターゲットとした免疫療法が有効となる可能性も考えられる。現在、われわれは、ヒトへの応用を考えて、HLA-A2 transgenic マウスを用いた HLA-A2 拘束性エピトープの同定、および間質細胞をターゲットとした腫瘍免疫療法について解析中である。

9 結語

cDNA マイクロアレイ解析を用いて同定された新規癌抗原 SPARC が、メラノーマの腫瘍マーカーとなるとともに、マウスの系において、腫瘍免疫療法の標的分子になりうることを示した。今後、SPARC がヒトの SPARC を発現する癌の患者においても CTL を誘導し、腫瘍を傷害することが可能か否かを検討することは重要な課題である。抗腫瘍ワクチンとして、また当教室で進めている樹状細胞療法と組み合わせることによって、腫瘍免疫療法の一翼を担えればと期待している。

10 参考文献

1. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-299, 1994.
2. Berke, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol*, 12: 735-773, 1994.
3. Lanier, L. L. and Phillips, J. H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today*, 17: 86-91, 1996.
4. York, I. A. and Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, 14: 369-396, 1996.
5. Heemels, M. T. and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, 64: 463-491, 1995.
6. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518, 1987.
7. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 353: 326-329, 1991.
8. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
9. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 12: 181-207, 1994.
10. Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41: 178-228, 1995.
11. Saper, M. A., Bjorkman, P. J., and Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol*, 219: 277-319, 1991.
12. Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 368: 711-718, 1994.
13. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368: 215-221, 1994.
14. Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor

- antigens. *Science*, 264: 961-965, 1994.
15. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.
 16. Van den Eynde, B. J. and van der Bruggen, P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*, 9: 684-693, 1997.
 17. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T., and Rosenberg, S. A. 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*, 91: 3515-3519, 1994.
 18. Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res*, 16: 313-339, 1997.
 19. Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F., and Slingluff, C. L., Jr. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*, 264: 716-719, 1994.
 20. Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H., and Itoh, K. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 187: 277-288, 1998.
 21. Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L., and Rosenberg, S. A. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284: 1351-1354, 1999.
 22. Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F., and Topalian, S. L. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 189: 757-766, 1999.
 23. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., and White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med*, 4: 321-327, 1998.
 24. Jager, E., Jager, D., and Knuth, A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev*, 18: 143-150, 1999.
 25. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager,

- E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P., and Boon, T. 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*, *80*: 219-230, 1999.
26. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., and Schadendorf, D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, *4*: 328-332, 1998.
 27. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 11810-11813, 1995.
 28. Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, *281*: 936-944, 2001.
 29. Monji, M., Senju, S., Nakatsura, T., Yamada, K., Sawatsubashi, M., Inokuchi, A., and Nishimura, Y. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun*, *294*: 734-741, 2002.
 30. Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y., and 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*, *32*: 826-836, 2002.
 31. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin Cancer Res*, *10*: 6437-6448, 2004.
 32. Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res*, *10*: 8630-8640, 2004.
 33. 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 HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, *12*: 2689-2697, 2006.
 34. Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L., and Martin, G. R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, *26*: 99-105, 1981.
 35. Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M., and Timpl, R. Solubilization of protein

- BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Lett*, *218*: 167-172, 1987.
36. Bradshaw, A. D. and Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*, *107*: 1049-1054, 2001.
 37. Brekken, R. A. and Sage, E. H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*, *19*: 816-827, 2001.
 38. Alvarez, M. J., Prada, F., Salvatierra, E., Bravo, A. I., Lutzky, V. P., Carbone, C., Pitossi, F. J., Chuluyan, H. E., and Podhajcer, O. L. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. *Cancer Res*, *65*: 5123-5132, 2005.
 39. Ledda, F., Bravo, A. I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol*, *108*: 210-214, 1997.
 40. Ledda, M. F., Adris, S., Bravo, A. I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J., and Podhajcer, O. L. Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells. *Nat Med*, *3*: 171-176, 1997.
 41. Sangaletti, S., Stoppacciaro, A., Guiducci, C., Torrisi, M. R., and Colombo, M. P. Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma. *J Exp Med*, *198*: 1475-1485, 2003.
 42. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun*, *306*: 16-25, 2003.
 43. Nakatsura, T., Kageshita, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Monji, M., Ikuta, Y., Senju, S., Ono, T., and Nishimura, Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res*, *10*: 6612-6621, 2004.
 44. Wakamatsu, K., Kageshita, T., Furue, M., Hatta, N., Kiyohara, Y., Nakayama, J., Ono, T., Saida, T., Takata, M., Tsuchida, T., Uhara, H., Yamamoto, A., Yamazaki, N., Naito, A., and Ito, S. Evaluation of 5-S-cysteinyldopa as a marker of melanoma progression: 10 years' experience. *Melanoma Res*, *12*: 245-253, 2002.
 45. Bourgault Villada, I., Moyal Barracco, M., Zioli, M., Chaboissier, A., Barget, N., Berville, S., Paniel, B., Jullian, E., Clerici, T., Maillere, B., and Guillet, J. G. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res*,

- 64: 8761-8766, 2004.
46. Kawakami, Y., Suzuki, Y., Shofuda, T., Kiniwa, Y., Inozume, T., Dan, K., Sakurai, T., and Fujita, T. T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity. *Pigment Cell Res, 13 Suppl 8*: 163-169, 2000.
 47. Tsuboi, A., Oka, Y., Udaka, K., Murakami, M., Masuda, T., Nakano, A., Nakajima, H., Yasukawa, M., Hiraki, A., Oji, Y., Kawakami, M., Hosen, N., Fujioka, T., Wu, F., Taniguchi, Y., Nishida, S., Asada, M., Ogawa, H., Kawase, I., and Sugiyama, H. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother, 51*: 614-620, 2002.
 48. Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., Chambon, P., and Gespach, C. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer, 64*: 70-75, 1995.
 49. Le Bail, B., Faouzi, S., Boussarie, L., Guirouilh, J., Blanc, J. F., Carles, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., and Rosenbaum, J. Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol, 189*: 46-52, 1999.
 50. Menon, P. M., Gutierrez, J. A., and Rempel, S. A. A study of SPARC and vitronectin localization and expression in pediatric and adult gliomas: high SPARC secretion correlates with decreased migration on vitronectin. *Int J Oncol, 17*: 683-693, 2000.
 51. Rempel, S. A., Ge, S., and Gutierrez, J. A. SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res, 5*: 237-241, 1999.
 52. Thomas, R., True, L. D., Bassuk, J. A., Lange, P. H., and Vessella, R. L. Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res, 6*: 1140-1149, 2000.
 53. Sakai, N., Baba, M., Nagasima, Y., Kato, Y., Hirai, K., Kondo, K., Kobayashi, K., Yoshida, M., Kaneko, S., Kishida, T., Kawakami, S., Hosaka, M., Inayama, Y., and Yao, M. SPARC expression in primary human renal cell carcinoma: upregulation of SPARC in sarcomatoid renal carcinoma. *Hum Pathol, 32*: 1064-1070, 2001.
 54. Yamanaka, M., Kanda, K., Li, N. C., Fukumori, T., Oka, N., Kanayama, H. O., and Kagawa, S. Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol, 166*: 2495-2499, 2001.
 55. Iacobuzio-Donahue, C. A., Argani, P., Hempen, P. M., Jones, J., and Kern, S. E. The desmoplastic response to infiltrating breast carcinoma: gene expression at the site of primary invasion and implications for comparisons between tumor types. *Cancer Res, 62*: 5351-5357, 2002.
 56. Yamashita, K., Upadhyay, S., Mimori, K., Inoue, H., and Mori, M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cystein in esophageal carcinoma and its relation

- to carcinoma progression. *Cancer*, 97: 2412-2419, 2003.
57. Wang, C. S., Lin, K. H., Chen, S. L., Chan, Y. F., and Hsueh, S. Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer*, 91: 1924-1930, 2004.
 58. Yiu, G. K., Chan, W. Y., Ng, S. W., Chan, P. S., Cheung, K. K., Berkowitz, R. S., and Mok, S. C. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Pathol*, 159: 609-622, 2001.
 59. Massi, D., Franchi, A., Borgognoni, L., Reali, U. M., and Santucci, M. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol*, 30: 339-344, 1999.
 60. Malaval, L., Ffrench, M., and Delmas, P. D. Circulating levels of osteonectin in normal subjects and patients with thrombocytopenia. *Bone Miner*, 9: 129-135, 1990.
 61. Kageshita, T., Nakamura, T., Yamada, M., Kuriya, N., Arao, T., and Ferrone, S. Differential expression of melanoma associated antigens in acral lentiginous melanoma and in nodular melanoma lesions. *Cancer Res*, 51: 1726-1732, 1991.
 62. Kremenz, E. T., Feed, R. J., Coleman, W. P., 3rd, Sutherland, C. M., Carter, R. D., and Campbell, M. Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Ann Surg*, 195: 632-645, 1982.
 63. Maldonado, J. L., Fridlyand, J., Patel, H., Jain, A. N., Busam, K., Kageshita, T., Ono, T., Albertson, D. G., Pinkel, D., and Bastian, B. C. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1878-1890, 2003.
 64. Bastian, B. C., Olshen, A. B., LeBoit, P. E., and Pinkel, D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol*, 163: 1765-1770, 2003.
 65. Sato, N., Fukushima, N., Maehara, N., Matsubayashi, H., Koopmann, J., Su, G. H., Hruban, R. H., and Goggins, M. SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions. *Oncogene*, 22: 5021-5030, 2003.