

学位論文  
**Doctoral Thesis**

新規癌抗原SPARCを標的とした癌免疫療法の開発  
(**Identification of a novel tumor-associated antigen,  
SPARC, as a possible target for immunotherapy  
of gastric, colorectal, and pancreatic cancers**)

井上 光弘  
**Mitsuhiro Inoue**

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医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医学専攻免疫識別学

**2010年3月**

# 目次

目次	1
1 要旨	3
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 <sup>+</sup> 細胞傷害性T細胞(CTL)への提示	12
図 2 MHCクラスII分子による抗原ペプチドのCD4 <sup>+</sup> T細胞への提示	13
5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし	14
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	15
5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定	16
5-4) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定	18
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	20
5-5) 樹状細胞を用いた癌の免疫療法	21
5-6) 本研究の目的	23
6 実験方法	24
6-1) マウス	24
6-2) 細胞株	24
6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取	24
6-4) REVERSE TRANSCRIPTION-PCR (RT-PCR)	25
6-5) WESTERN BLOT 法	25
6-6) 免疫組織化学的解析	26
6-7) レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入	27
6-8) 使用したペプチド	27
表 1 ヒト SPARC 由来で HLA-A24(HLA-A*2402)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト	27
図 5 BALB/C マウスを用いた、SPARC 由来の HLA-A24 (A*2402)拘束性エピトープの同定	28
6-9) 健常人、癌患者 PBMC からの SPARC 反応性 CTL の誘導	28
図 6 腫瘍抗原ペプチド特異的 CTL 株の樹立法	29
6-10) 細胞傷害活性の検討	30
6-11) CTL の HLA 拘束性の検討	31
6-12) NOD/SCID マウスを利用した養子移植免疫療法モデル	31
図 7 NOD/SCID マウスを利用した養子移植免疫療法モデル療法のプロトコール	31
6-13) NOD/Shi-scid IL2rgamma <sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた <i>in vivo</i> での SPARC 特異的 CTL の誘導	32
図 8 NOG マウスを用いた <i>in vivo</i> での腫瘍抗原特異的 CTL の誘導モデル	32
7 実験結果	34
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	34
図 9 cDNA マイクロアレイ解析による、膀胱癌細胞で高発現している遺伝子のリスト	35
図 10 cDNA マイクロアレイによる、正常組織における SPARC 遺伝子の発現解析	36
表 2 様々な悪性腫瘍における SPARC 遺伝子の発現	37
7-2) 癌細胞株、癌組織および正常組織における SPARC の発現解析	38
図 11 癌細胞株、癌組織および正常組織における SPARC の発現解析	39
7-3) SPARC 蛋白の免疫組織化学的解析	40
図 12 SPARC 蛋白の癌組織での免疫組織化学的解析	40
図 13 SPARC 蛋白の正常組織での免疫組織化学的解析	41
7-4) HLA-A24陽性の健常人および癌患者の PBMC からの SPARC	

特異的 CTL の誘導 .....	42
図 14 健常人および癌患者における、SPARC 特異的 CTL の誘導 .....	43
7-5) SPARC 特異的 CTL の HLA 拘束性の証明 .....	44
図 15 SPARC 特異的ヒト CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明 .....	44
7-6) SPARC 特異的 CTL の NOD/SCID マウスへの I.V. TRANSFER による、 <i>IN VIVO</i> における抗腫瘍効果 .....	45
図 16 NOD/SCID マウスにおける SPARC 特異的 CTL 株の養子免疫による、 <i>IN VIVO</i> における抗腫瘍効果 .....	45
7-7) NOD/Shi-scid IL2rgamma <sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた <i>in vivo</i> でのSPARC 特異的 CTL の誘導 .....	47
図 17 NOD/Shi-scid IL2rgamma <sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた <i>in vivo</i> での SPARC 特異的 CTL の誘導 .....	48
<b>8 考察</b> .....	49
<b>9 結論</b> .....	52
<b>10 参考文献</b> .....	53

## 1 要旨

**【目的】** cDNA マイクロアレイ解析により、スキルス胃癌に高発現する新規癌関連抗原遺伝子として、SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) が同定されている。また、すでに SPARC は、マウスにおいて抗腫瘍免疫を誘導できることが知られている。本研究は、SPARC によるヒト細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を検討し、SPARC を標的とした癌免疫療法の可能性を探ることを目的とする。

**【方法】** 共同研究者らにより、スキルス胃癌 13 症例の腫瘍組織から Laser Capture Microdissection system を用いて癌組織と正常組織を分離し、これらの組織における約 23,000 種類の遺伝子の発現について cDNA マイクロアレイ解析が行われた。さらに正常組織と比較して癌部で 5 倍以上高発現する新規腫瘍関連抗原遺伝子の1つとして、SPARC が同定された。そのアミノ酸配列より、HLA-A24 (A\*2402) に対して高い親和性を持つと予想される構造モチーフを有するペプチドを検索して合成した。これらのペプチドを健常人ならびに癌患者の末梢血単核細胞 (PBMC) から分離した CD14 陽性細胞から GM-CSF を用いて誘導した DC および PHA ブラスト細胞に負荷し、CD8 陽性細胞を3回刺激して CTL を誘導し、IFN- $\gamma$  ELISPOT 法と Cr 放出試験により抗原特異的 CTL 応答の評価を行なった。さらに NOD/SCID マウスに SPARC を発現しているヒト腫瘍細胞株を接種し、健常人由来の SPARC 特異的 CTL の静注による、抗腫瘍効果を検討した。また、これらのペプチドを負荷した健常人由来 CD14 陽性細胞から誘導した DC に SPARC ペプチドを負荷して、CD8 陽性細胞と共に NOG マウスの腹腔内に注入した。7日後に再度ペプチド負荷 DC を腹腔内投与し、NOG マウス体内における SPARC 特異的なヒト CTL を、NOG マウス脾臓細胞より、ヒト CD8 陽性細胞を分離して、IFN- $\gamma$  ELISPOT 法により検出した。

**【結果】** cDNA マイクロアレイ解析により、スキルス胃癌において SPARC は、非癌部と比較して平均 133,000 倍高く発現しており、正常組織では低い発現を認めるのみであった。また SPARC はスキルス胃癌 13 例中 11 例で、通常型胃癌において 26 例中 16 例で、膵癌で 16 例中 13 例で、大腸癌で 15 例中 10 例で、それぞれ癌部に高発

現していた。また多様な癌細胞株における RT-PCR により SPARC mRNA の発現が確認されたが、正常組織の RT-PCR では脊髄、小腸、肺などに軽度に発現を認めたが、癌細胞と比較すると低かった。また免疫組織化学的染色において胃癌、大腸癌、膵癌の組織において、SPARC が癌および癌周囲の間質に発現していたが、正常組織では精巣のみに発現していた。これらの結果より SPARC が胃癌、大腸癌、膵癌などに対する癌免疫療法の標的抗原として有用であると考えられた。HLA-A24 に結合すると推定された 2 種類の SPARC ペプチドを用いて、健常人および癌患者の PBMC から、抗原特異的な HLA-A24 拘束性 CTL を誘導することができた。これらの CTL は、*in vitro* で抗原特異的かつ HLA-A24 拘束性の細胞傷害活性を示すのみでなく、SPARC を発現するヒト腫瘍細胞株を接種した NOD/SCID マウスに、SPARC 特異的ヒト CTL を静注することにより抗腫瘍効果が観察された。また NOG マウスを用いて SPARC ペプチドを負荷したヒト DC を、ヒト CD8 陽性細胞と共にマウスの腹腔内に移入することにより、マウス体内で SPARC 特異的 CTL が誘導された。

**【結論】** 新規腫瘍関連抗原 SPARC について、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープを同定した。このペプチドを用いて誘導した CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、抗原特異的な細胞傷害活性を示し抗腫瘍効果を発現した。以上より、SPARC を標的とした抗腫瘍免疫療法の有用性が示された。

## Summary

### Abstract

**Purpose:** It is important to identify tumor-associated antigens (TAAs) to direct the immune system to attack cancer in order to establish efficient anti-cancer-immunotherapy. A genome-wide cDNA microarray analysis identified that *SPARC* gene is overexpressed in the gastric, pancreatic and colorectal cancer tissues but not in their non-cancerous counterparts. This study attempted to identify HLA-A24 (A\*2402)-restricted and SPARC derived CTL epitopes.

**Experimental design:** We previously identified H-2K<sup>d</sup>-restricted and SPARC-derived CTL epitope peptides in BALB/c mice, of which H-2 K<sup>d</sup>-binding peptide motif is comparable to that of HLA-A24 binding peptides. By using these peptides, we tried to induce HLA-A24 (A\*2402) -restricted and SPARC-reactive human CTLs, and demonstrate an antitumor immune response.

**Results:** The SPARC-A24-1<sub>143-151</sub> (DYIGPCKYI) and SPARC-A24-4<sub>225-234</sub> (MYIFPVHWQF) peptides-reactive CTLs were successfully induced from PBMCs by *in vitro* stimulation with these two peptides in HLA-A24 (A\*2402) positive healthy donors and cancer patients, and these CTLs exhibited cytotoxicity specific to cancer cells expressing both SPARC and HLA-A24 (A\*2402). The adoptive transfer of the SPARC-specific CTLs could inhibit the tumor growth in NOD/SCID mice bearing human cancer cells expressing both HLA-A24 (A\*2402) and SPARC. Furthermore the SPARC-A24-4-reactive CTLs were successfully induced by *in vivo* priming in NOG mice

**Conclusions:** These findings suggest that SPARC is a potentially useful target candidate for cancer immunotherapy.

## 2 発表論文リスト

1. Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Ikuta, Y., Hayashida, Y., Irie, A., Harao, M., Imai, K., Tomita, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., Ito, T., Nakamura, Y., Baba, H., Nishimura, Y.: Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int. J. Cancer*. in press
2. Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Irie, A., Baba, H., and Nishimura, Y.: An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rgamma (null) (NOG) mice. Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, Nishimura Y. *Immunol. Lett.* 126: 67-72, 2009.
3. Harao M., Hirata S., Irie A., Senju S., Nakatsura T., Komori H., Ikuta Y, Yokomine K., Imai K., Inoue M., Harada K., Mori T., Tsunoda T., Nakatsuru S, Daigo Y., Nomori H., Nakamura Y., Baba H, and Nishimura Y. 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*. 123: 2616-2625, 2008.
4. 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.* 14: 6487-6495, 2008.

## 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、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角田卓也先生、古川洋一先生および中村祐輔教授に深謝いたします。さらに、研究方法に関して直接御指導を頂いた免疫識別学分野平田真哉助教、入江厚講師、千住覚准教授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機能病理学分野の伊藤隆明教授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癌患者の皆様はじめ諸先生方に深く感謝いたします。

## 4 略語一覽

**BM-DC**; bone marrow cell-derived dendritic cell

**cDNA**; complementary DNA

**CTL**; cytotoxic T lymphocyte

**DC**; dendritic cell

**DNA**; deoxyribonucleic acid

**ELISPOT**; enzyme-linked Immunospot

**GM-CSF**; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

**HLA**; human histocompatibility leukocyte antigens

**IFN**; interferon

**Ig**; immunoglobulin

**IL**; interleukin

**MHC**; major histocompatibility complex

**mAb**; monoclonal antibody

**mRNA**; messenger ribonucleic acid

**PBMC**; peripheral blood mononuclear cell

**PBS**; phosphate-buffered saline

**RT-PCR**; reverse transcription-PCR

**SPARC**; Secreted Protein acidic and rich in Cysteine

**TAAs**; tumor-associated antigen

**TAP**; transporter associated with antigen processing

**TCR**; T cell receptor

**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

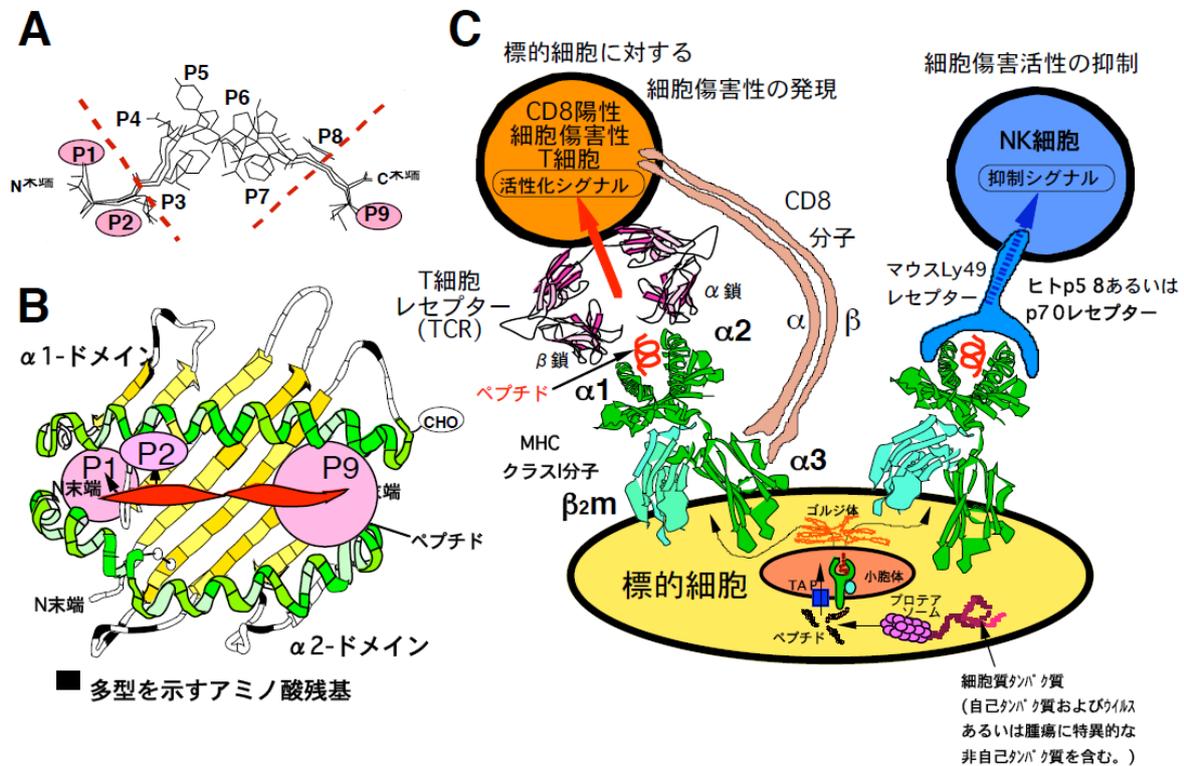


図 1. MHCクラスI による抗原ペプチドのCD8<sup>+</sup> 細胞傷害性T細胞 (CTL) への提示

(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(右巻きラセン)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。α1, α2, α3 および β2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよびβ2 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

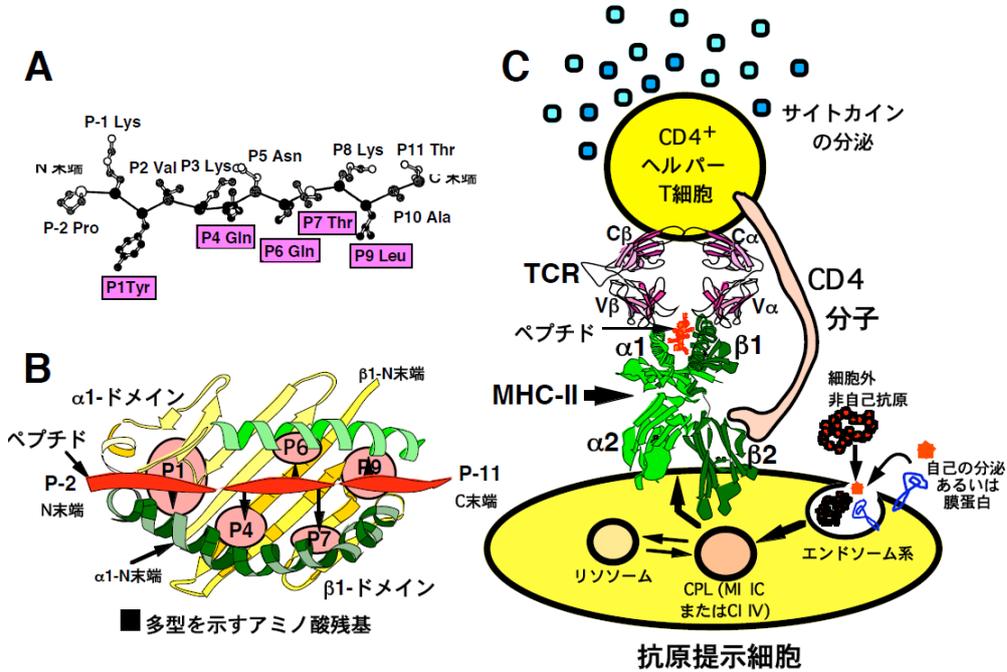


図 2. MHCクラスII分子による抗原ペプチドのCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞への提示

(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<sup>+</sup>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αβ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

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- $\gamma$ , 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

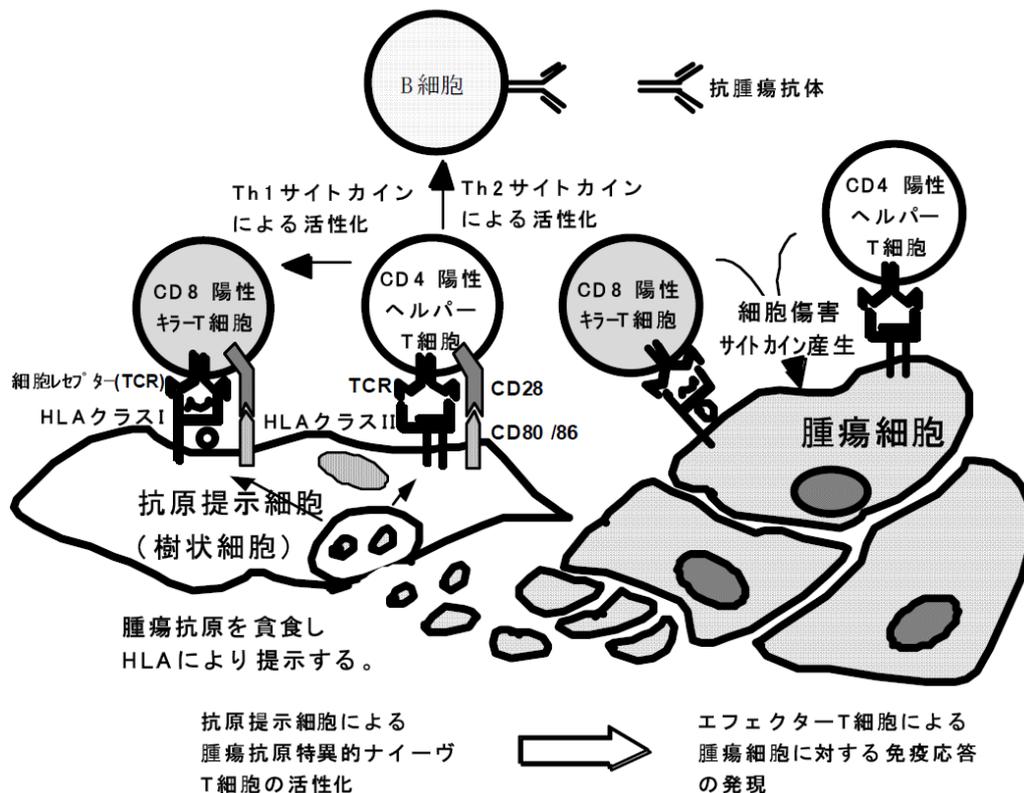


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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- $\gamma$ , 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。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、分子生物学的な方法、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<sup>+</sup>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な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[28-31] 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、癌の免疫逃避、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、理想的な腫瘍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解析 [32-37]。

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、一度に数千から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、発現の組織特異性が優れた抗原を満たす遺伝子を選出することができる。場合によっては免疫系からの逃避が起こりにくい抗原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、各遺伝子の発現頻度も知ることができる。

我々は、これま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、肝臓癌に特異的に高発現する遺伝子として Glypican-3 (GPC3)[38]を、食道癌に特異的に高発現する遺伝子として Proliferation potential-related protein (PP-RP)[37]を、肺癌に特異的に高発現する遺伝子として Cell division cycle associated 1 (CDCA1)[39]、膵臓癌、胃癌、大腸癌等に高発現する遺伝子として Cadherin-3 (CDH3)[40]、肺癌、胆管癌等に高発現する遺伝子として Fork head box M1 transcription factor (FOXM1)[41]を同定し、腫瘍免疫療法の理想的な抗原となりうる可能性について報告してきた。これらの抗原について、当該抗原を発現する腫瘍細胞を傷害する 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

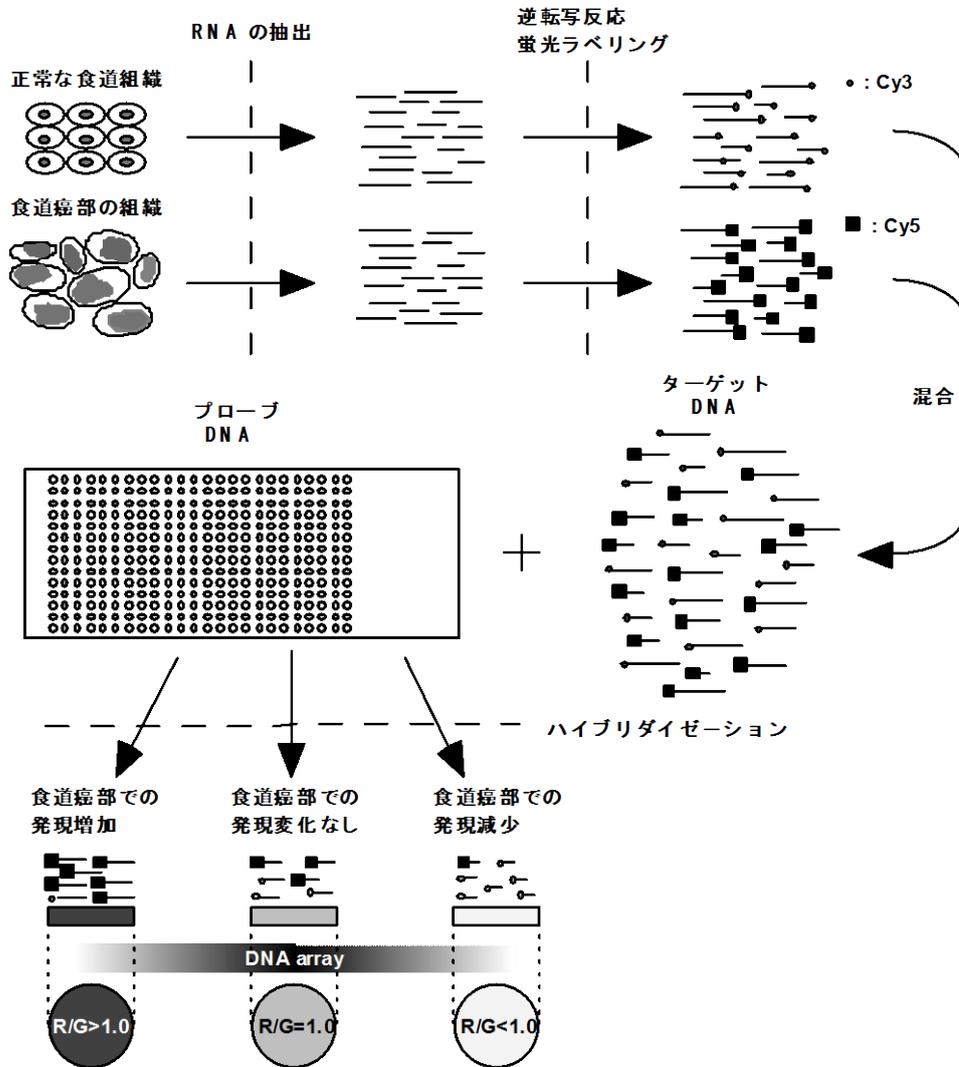


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

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) 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[42, 43]。

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[44]。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。

## 5-6) 本研究の目的

本研究では、スキルス胃癌組織に高発現する新規腫瘍関連抗原として同定した SPARC に対し、その腫瘍免疫療法への応用を目指すことを目的とする。SPARC 特異的 HLA-A24 拘束性の CTL エピトープを同定し、このペプチドを用いて、健常人および癌患者の末梢血単核細胞から、HLA-A24 と腫瘍関連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。さらに、誘導した CTL の、免疫不全マウスの *in vivo* における抗腫瘍効果を検討する。また NOG マウスを用いたヒト化マウス体内にて腫瘍抗原特異的ヒト CTL の誘導が可能かどうかを検討した。

## 6 実験方法

### 6-1) マウス

Balb/c マウス (H-2<sup>d</sup>)、および Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウスは日本チャールズリバーより購入し、Balb/c マウスは 7 週齢、NOD/SCID マウスは 6 週齢の雌を用いた。

また、NOD/Shi-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (NOG) マウスは、実験動物中央センターより購入し、6週齢の雄を用いた。

### 6-2) 細胞株

ヒト膵癌細胞株PANC1、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC3、ヒト大腸癌細胞株CaCo-2、TAP遺伝子の発現を欠損し、*HLA-A\*0201*陽性の細胞であるT2細胞は理研バイオリソースセンターより供与頂いた。ヒト膵癌細胞株PK8は東北大学加齢医学研究所より供与頂いた。ヒト肝癌細胞株SKHep1は久留米大学免疫学教室の伊藤恭悟先生より供与頂いた。ヒト大腸癌細胞株HCT116は、Johns Hopkins UniversityのB. Vogelstein先生より供与頂いた。

### 6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取

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-A24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。癌患者からの血液サンプルは、2007年5月から2008年12月までの間に、熊本大学消化器外科にて治療中の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 50ml から、先に報告した Ficoll-Conray 密度勾配遠心法[30]によって、末梢血単核球細胞(PBMC)を単離した。各患者が HLA-A24 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。癌組織および非癌部組織についても同様に、インフォームドコンセントを得た後に採取した。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、その後を使用した。

#### **6-4) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)**

RNeasy kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) を用いて、様々な組織と細胞株から total RNA を抽出した。また、各 1 $\mu$ 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 の各遺伝子特異的プライマーを作成し、PCR 反応は 94°C 1 分間、58°C 1 分間、72°C 1 分間で 30-35 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特異的バンドを検出した。プライマーのシーケンスは、以下に示した。

SPARC: 5'-CGAAGAGGAGGTGGTGGCGGAAAA-3' and antisense,  
5'-GGTTGTTGTCCTCATCCCTCTCATAC-3'

比較対照として、 $\beta$ -actin 特異的なプライマーも同時に用いた。用いた  $\beta$ -actin プライマー配列は、sense 5'-CATCCACGAAACTACCTTCAACT-3', antisense 5'-TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3'である。

#### **6-5) Western blot 法**

目的の細胞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。0.2% スキムミルクを加えた 0.2% Tween 20-TBS 溶液を用いて、室温で 30 分間ブロッキングし

た。検出には、マウス抗 SPARC モノクローナル抗体(AON-5031, Santa Cruz 社)を一次抗体として使用した。HRP 標識抗マウス IgG 抗体もしくは抗ラビット抗体 (Amersham Bioscience 社)を 2 次抗体として使用した。

### 6-6) 免疫組織化学的解析

EnVision+システム キット(DAKO 社)を用いて免疫組織学化学的解析を行った。一次抗体は、上述のマウス抗 SPARC モノクローナル抗体(AON-5031, Santa Cruz 社)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、オートクレーブにて antigen retrieval を行い、室温で 0.5%スキムミルクを用いて 10 分間ブロックした後に、一次抗体を 4°C で 14 時間反応させ、phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した。さらに En Vision+システムのポリマーHRP 標識抗マウス IgG 抗体と室温で 30 分反応させた後に PBS で洗浄し、DAB+ chromogen を用いて発色させた。

### 6-7) 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[45]。17 $\mu$ gのSPARC cDNAをいれたCSII-CMV-RfAとCSII-EF-RfAの自己不活化ベクターと、10 $\mu$ 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 (50000g $\times$ 2 時間) でペレットにした。そのペレットを 50 $\mu$ lのRPMI1640 で溶解し、ターゲット細胞を  $5 \times 10^4$ と 10 $\mu$ l のviral suspensionを加え U底 96 穴のプレートで培養した。遺伝子の発現は、ELISA法, Western blot法で確認した。

## 6-8) 使用したペプチド

特定のHLAに結合するペプチドの構造モチーフ探索データベース (<http://bimas.dcrt.nih.gov/>)を利用して、ヒトのSPARC由来のアミノ酸配列をもつペプチドでHLA-A24(A\*2402) 分子に結合すると推定される 9-10 個のアミノ酸からなるペプチドをそれぞれ 4 種類選択(表 1)し、Any Gen社に合成を委託し購入した。我々は以前にBalb/cマウスでの実験で、このうちペプチド 1; SPARC<sub>143-151</sub> (DYIGPCKYI)およびペプチド 4; SPARC-4<sub>225-234</sub> (MYIFPVHWQF)を用いた場合に、ペプチド特異的なCTLが可能であることを確認している(図 5)。Balb/cマウスのH-2KdとHLA-A24 の結合モチーフに類似性があることより、Balb/cマウスでCTLの誘導が可能であったこれら 2 種類のペプチドを、ヒトHLA-A24 拘束性SPARC特異的CTLの誘導に用いた。

**表 1.** ヒト SPARC 由来で HLA-A24 (HLA-A\*2402)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト

A24-binding peptide	Position	Subsequence residue listing	HLA-A24 binding score *
SPARC-1	143-151	DYIGPCKYI	75
SPARC-2	123-131	HFFATKCTL	20
SPARC-3	161-170	EFPLMRDWL	30
SPARC-4	225-234	MYIFPVHWQF	210

BIMAS ソフトウェアを用いて HLA-A24 (A\*2402)に親和性が高いと推測される SPARC 由来のペプチドを 4 種類選択し Balb/c マウスに免疫するエピトープ候補ペプチドとした(Purity > 95%)。

## 図 5

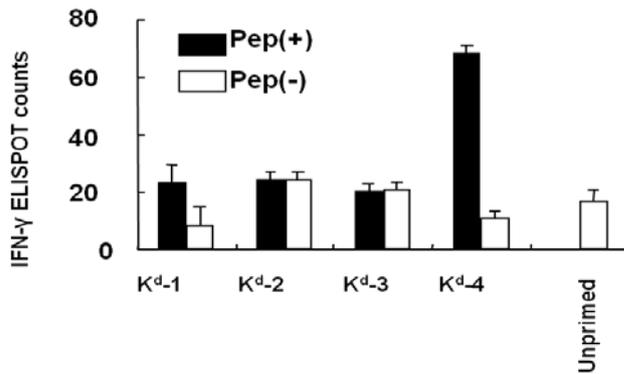


図 5. Balb/C マウスを用いた、SPARC 由来の HLA-A24 (A\*2402)拘束性エピートープの同定

HLA-A24 (A\*2402) に結合親和性を示すと推定されたSPARC由来のペプチド 4 種類のうち、ペプチド 1 と 4 においてBalb/cマウス(H-2 K<sup>d</sup>)においてSPARCペプチド特異的なCTLの誘導が認められた。これら 2 種類のペプチドを、HLA-A24 拘束性SPARC特異的エピートープ候補として用いた。

## 6-9) 健常人、癌患者 PBMC からの SPARC

### 反応性 CTL の誘導

以下のヒトを対象にした研究については、熊本大学医学薬学研究部の倫理委員会の承認を得た上で行った。

HLA-A24陽性の健常人または癌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50ml採取し、先に報告したFicoll-Conray密度勾配遠心法 [30]によって末梢血単核球細胞(PBMC)を単離した。HLA-A24を有しているか否かの判定は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を用いて検討した。本研究に用いた抗ヒトHLAモノクローナル抗体は以下の通りである。W6/32 (抗HLA-クラスIフレームワーク抗体)、anti-HLA-A24

(SIGMA Saint-louis USA)。腫瘍抗原ペプチド特異的なCTL株の樹立法を、図6および以下に示す[32, 37, 39]。

まず全血よりFicoll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陽性細胞を分離した。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)を加えた2% AIM-Vメディウムで培養して5日目にOK432 (0.1 KE/ml) を加えさらに2日培養し、成熟DCに分化させて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DCに20 mMのペプチドと4 mg/mlのβ2ミクログロブリンを加え、2時間後に40 Gy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、24穴プレートに1ウェルあたり凍結保存しておいた $2 \times 10^6$ 個のCD8陽性細胞と、ペプチドパルスした $1 \times 10^5$ 個のDCを加え培養した。第0日目にIL-7 (5 ng/ml) を加え、第3日目にはIL-2 (20 U/ml) を加えた。第7日および第14日に同じドナー由来のPHAブラスト細胞を準備し20mMのペプチドを加え、2時間後に100Gyの放射線を照射した。CD8陽性細胞をAIM-Vで1回洗浄後、PHAブラスト細胞で再刺激した。この際翌日にIL-2 (50 U/ml) を加えた。第20-21日目にIFN- $\gamma$  ELISPOT assayあるいは $^{51}\text{Cr}$ 放出試験を行った。

図 6

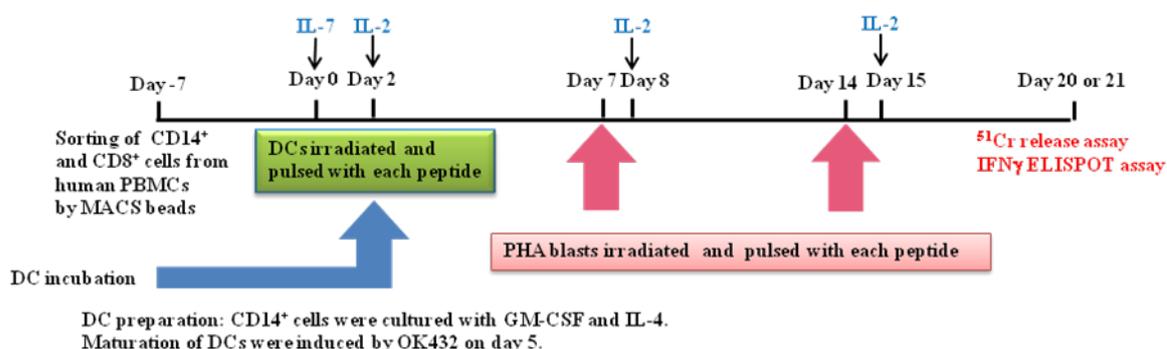


図 6. 腫瘍抗原ペプチド特異的 CTL 株の樹立法

静脈血よりFicoll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陽性細胞を分離した。CD14陽性細胞をGM-CSF (100 ng/ml) とIL-4 (100 U/ml)を加えた2% AIM-Vメディウムで培養して5日目にOK432 (0.1 KE/ml) を加えさらに2日培養し、成熟

DCに分化させて抗原提示細胞として使用した。成熟DCに 50 mMのペプチドと 4 mg/mlの $\beta$ 2 ミクログロブリンを加え、2 時間後に 40Gy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、24 穴プレートに 1 ウェルあたり凍結保存しておいた  $2 \times 10^6$ 個のCD8 陽性細胞と、ペプチドパルスした  $1 \times 10^5$ 個のDCを加え培養した。第 0 日目にIL-7 (5 ng/ml) を加え、第 3 日目にはIL-2 (20 U/ml) を加えた。第 7 日および第 14 日に同じドナー由来のPHAブラスト細胞を準備し 20mMのペプチドを加え、2 時間後に 100Gyの放射線を照射した。CD8 陽性細胞をAIM-Vで 1 回洗浄後、PHAブラスト細胞で再刺激した。この際にIL-2 (50 U/ml) を加えた。

## 6-10) 細胞傷害活性の検討

ペプチド特異的CTLの誘導の確認は、HLA-A\*2402 遺伝子導入EB virus 関連lymphoma由来細胞(C1R-A\*2402)を標的細胞にした $^{51}\text{Cr}$ 放出法による細胞傷害試験を指標として行った。C1R-A2402 細胞を $^{51}\text{Cr}$  ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ )でラベルし、96 穴 U底プレートに 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$ 個まき、その 10、20、40 倍の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 $^{51}\text{Cr}$ の放射活性を測定することにより行った。

通常 of 癌細胞に対する細胞傷害活性を検討するため、SPARCと HLA-A24 の両方を発現している癌細胞株、HLA-A24 は発現しているがSPARCを 発現していない癌細胞株、SPARCを発現しているがHLA-A24 を発現していない 細胞株を用いて、それらに対する細胞傷害活性を検討した。さらに癌細胞を傷害 するCTLが抗原特異的に反応しており、また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、HLA-A24 と抗原ペプチドの複合体として癌細胞表 面に提示されているかを検討するため、SPARCを発現していない細胞株に、上述 したレンチウイルスを用いて各々の抗原遺伝子を遺伝子導入した細胞株を標的と して、 $^{51}\text{Cr}$ 放出試験を行った。 $^{51}\text{Cr}$ 放出法による細胞傷害の定量は、1 日目に細胞 を $^{51}\text{Cr}$ 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、 $5 \times 10^3$ 個まき、 2 日目にターゲット細胞に対して、10、20、40 倍の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 $^{51}\text{Cr}$ を測定することにより行った。

### 6-11) CTL の HLA 拘束性の検討

抗原特異的CTLがMHC拘束性に細胞傷害活性を示すか否かを、抗体によるMHCクラスIのブロッキング試験によって検討した[32]。細胞傷害活性の検討を<sup>51</sup>Cr放出法もしくはELISPOT法にて検討する際、標的細胞を抗MHCクラスI抗体であるW6/32 (10 µg/ml)と共に1時間培養した後、CTLと共培養して細胞傷害活性の有無を検討した。コントロールとして、抗HLA-DR抗体であるH-DR-1 抗体(10 µg/ml)を使用した。

### 6-12) 養子移植免疫療法モデル

6週齢のメスのNOD/SCIDマウスをチャールズリバー社より購入し、熊本大学のCenter for Animal Resources and Development (CARD) にてSPF 環境下に飼育した。まず、ヒトメラノーマ由来癌細胞株164  $4 \times 10^6$ 個をNOD/SCIDマウスの背部皮下に移植した。プロトコルを図7に示す。164が腫瘍を形成し、その大きさが25mm<sup>2</sup>になったところで、 $4 \times 10^6$ 個のSPARC特異的なCTL細胞株をマウスの尾静脈より投与した。コントロールとして、HLA-A24拘束性のHIV由来ペプチド(ILKEPVHGV)で誘導したT細胞株、あるいはPBSのみをマウスに静脈内投与した。移植後7日目と14日目に2回、各T細胞株を投与し、その後週2回腫瘍の大きさ(長径 × 短径)を測定した。

図 7

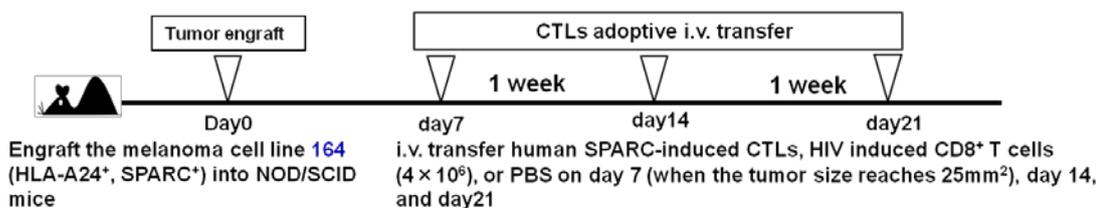


図 7. 養子移植免疫療法モデルのプロトコール

ヒトメラノーマ癌細胞株 164  $4 \times 10^6$ 個をNOD/SCIDマウスの背部皮下に移植し、その大きさが25mm<sup>2</sup>になったところで、 $4 \times 10^6$ 個のSPARCペプチド特異的なCTL細胞株をマウスの尾静脈より投

与した。コントロールとして、HLA-A24 拘束性のHIV由来ペプチド(ILKEPVHGV)で誘導したT細胞株、あるいはPBSのみをマウスに静脈内投与した。移植後7日目と14日目に2回、各T細胞株を投与し、その後週2回腫瘍の大きさ(長径 × 短径)を測定した。

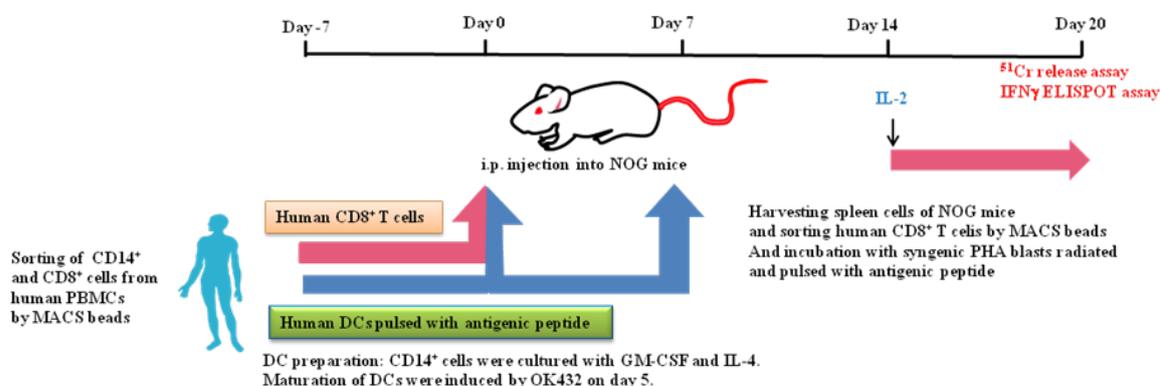
## 6-13) NOD/Shi-scid IL2rgamma<sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた

### *in vivo*でのSPARC特異的CTLの誘導

NOD/Shi-scid IL2ry<sup>null</sup> (NOG) マウスは、NOD/SCIDマウスとIL2γ鎖ノックアウトマウスを交配して作成された重症免疫不全マウスであり[46-49]、NOD/SCIDマウスと同様T細胞、B細胞が欠損しているとともにNK細胞も欠損していることにより、ヒトの細胞の移植モデルとして、NOD/SCIDマウスよりも生着率が高く様々なヒト化マウスの実験に応用されている。このNOGマウスを用いてマウス体内でヒトの腫瘍抗原特異的なCTLを誘導できるか検討を行った。

まず健常人由来のPBMCよりCD8陽性細胞とCD14陽性細胞を分離し、CD14陽性細胞より前述の方法により、DCを作成した。DCにSPARCペプチドを50mM負荷し、2時間培養し、洗浄した。1 x 10<sup>7</sup>個のCD8陽性T細胞と5 x 10<sup>5</sup>個のペプチドを負荷したDCを500μLのメディウムにて混合し、NOGマウスの腹腔内に注射した。第8日目に同様に作成したペプチド負荷DCを5 x 10<sup>6</sup>個、NOGマウス腹腔内に注射し、追加免疫を行った。第15日目にNOGマウスの脾臓細胞より、ヒトCD8陽性T細胞を分離した。同じドナー由来のPHAブラスト細胞にペプチドを負荷し、2時間培養した後、100Gyの放射線を照射した。分離したCD8陽性T細胞とPHAブラスト細胞をIL-2 (100 U/ml)を加えて共培養し、第23日目にIFN-γ ELISPOT assayおよび<sup>51</sup>Cr 放出試験にてSPARC特異的ヒトCTLの誘導の有無を評価した。

図 8



## 図 8. NOD/Shi-scid IL2rgamma<sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた*in vivo*での腫瘍抗原特異的CTLの誘導モデル

健常人由来のPBMCよりCD8陽性細胞とCD14陽性細胞を分離した。CD14陽性細胞より前述の方法により、DCを作成した。DCにSPARCペプチドを50 mMの濃度にて負荷し、2時間培養して洗浄した。1 x 10<sup>7</sup>個のCD8陽性T細胞と5 x 10<sup>5</sup>個のペプチドを負荷したDCを500 μLのメディウムにて混合し、NOGマウスの腹腔内に注射した。第8日目に同様に作成したペプチド負荷DCを5 x 10<sup>6</sup>個、NOGマウス腹腔内に注射し、追加免疫を行った。第15日目にNOGマウスの脾臓細胞より、ヒトCD8陽性T細胞を分離した。同じドナー由来のPHAブラスト細胞にペプチドを負荷し、2時間培養した後、100 Gyの放射線を照射した。分離したCD8陽性T細胞とPHAブラスト細胞をIL-2 (100 U/ml)を加えて共培養し、第23日目にIFN-γ ELISPOT assayおよび<sup>51</sup>Cr 放出試験にてSPARC特異的ヒトCTLの誘導の有無を評価した。

## 7 実験結果

### 7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍関連抗原遺伝子の選定

スキルス胃癌患者13例の癌部と非癌部のRNA をそれぞれ抽出し、27,648種類の遺伝子についてcDNA マイクロアレイ解析を行った。そのうち、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9)。これら12種類の遺伝子の正常組織での発現を確認後、SPARCを膵癌における腫瘍関連抗原として選りした (図10)。SPARC遺伝子は膵癌13例中11例全例において、非癌部と比して癌部で5倍以上の発現を認め、癌部の非癌部に対する比の平均は約133,000倍と非常に高値であった。正常および胎生期の組織においては、SPARCは脊髄、卵巣と胎盤で、やや高い発現が認められたが、その発現は癌と比べると著しく低いものであった。また、同様の手法でスキルス胃癌以外の様々な癌種におけるこれらの遺伝子の発現を解析すると、SPARCは通常型胃癌や大腸癌、膵癌で高発現を認めた(表2)。

図 9

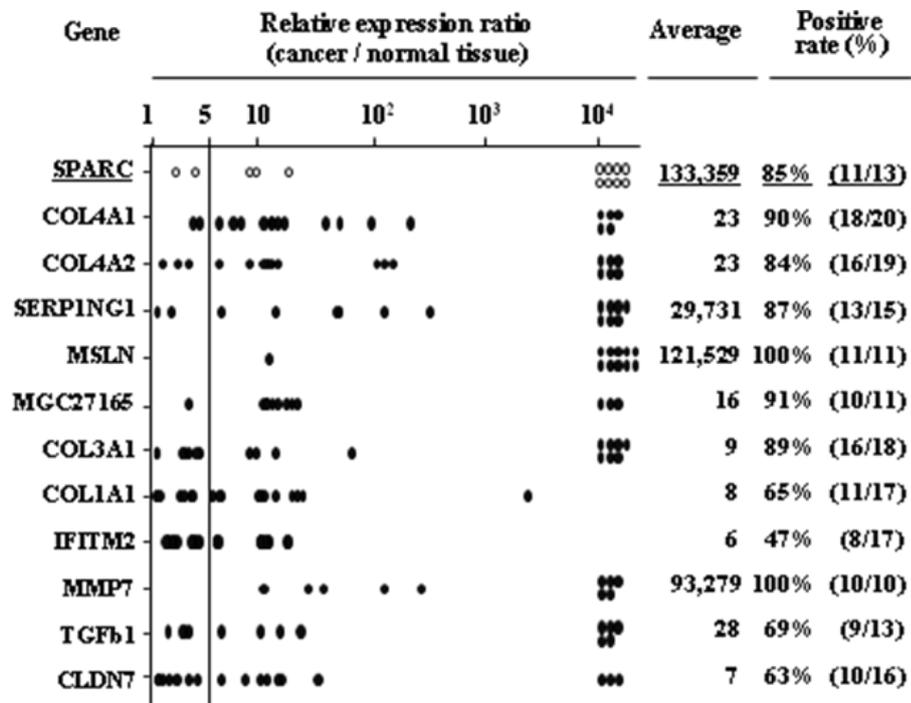


図9. cDNAマイクロアレイ解析による、スキルス胃癌細胞で高発現している遺伝子のリスト

これら12種類の遺伝子は、スキルス胃癌において非癌部より癌部で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択した。

図 10

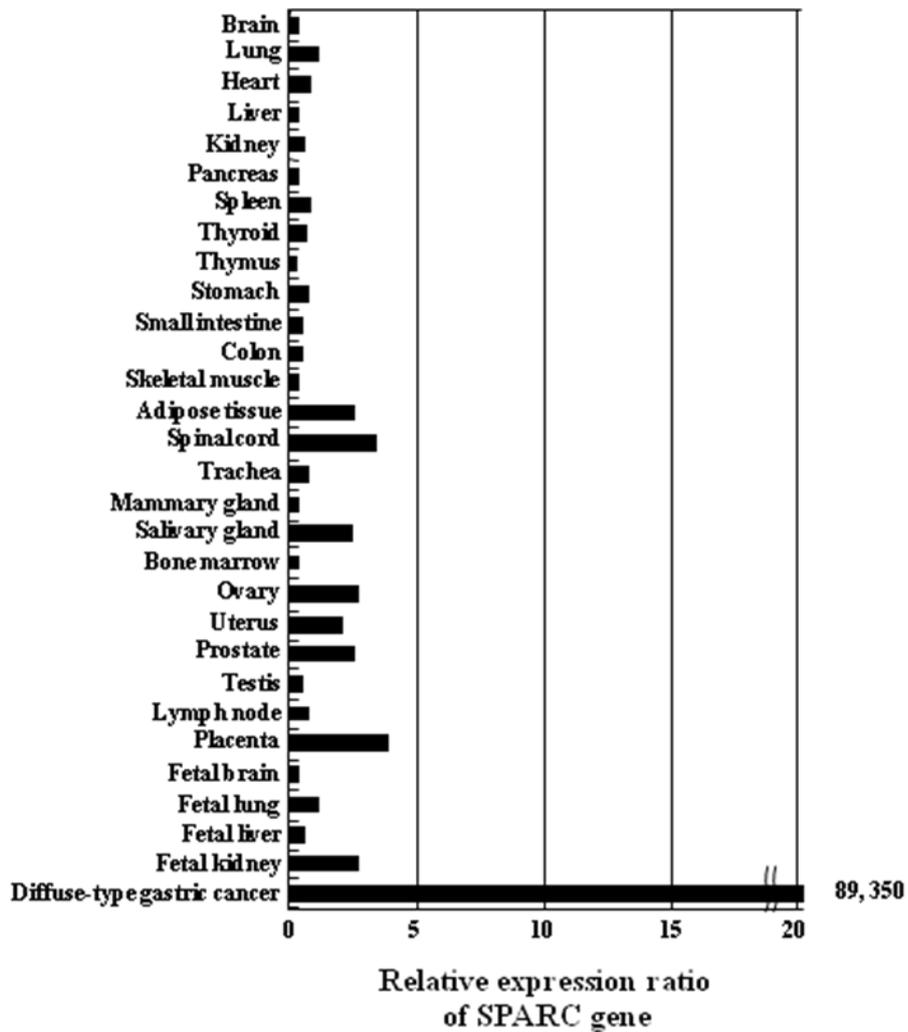


図 10. cDNA マイクロアレイ解析による、正常組織における *SPARC* 遺伝子の発現解析

*SPARC* は脊髄、卵巣と胎盤等で、癌組織と比べると、はるかに弱い発現を認めたが、他の正常成人組織における発現はいずれも低かった。

表 2. 様々な悪性腫瘍における *SPARC* 遺伝子の発現

Type of cancer	N	Positive rate**(%)	Average of relative expression ratio
<u>Diffuse-type gastric cancer</u>	<u>11/13</u>	<u>85</u>	<u>133,359</u>
Intestinal-type gastric cancer	16/26	62	19,901
Pancreatic cancer	13/16	81	55,283
Colorectal cancer	10/15	67	15,739
Cholangiocellular carcinoma	5/25	20	2.5
Breast cancer	13/77	17	1,723
Esophageal cancer	7/64	11	1.6
Ovarian cancer	1/10	10	1.5
Prostate cancer	2/55	4	0.9
Chronic myelocytic leukemia	3/77	4	1.9
Renal cell carcinoma	3/25	12	2.6
Hepatocellular carcinoma	1/20	5	4.4
Acute myelocytic leukemia	0/54	0	0.2
Urinary bladder cancer	0/34	0	0.2
Uterine cervix cancer	0/19	0	0.6
Lung cancer	0/27	0	0.1
Osteosarcoma	0/27	0	0.8
Testicular cancer	0/13	0	0.1

\*\*The relative expression ratio (cancer/normal tissue) > 5 was considered to be positive.

## 7-2) 癌細胞株、癌組織および正常組織における SPARC の発現解析

胎生臓器2種類を含む16種類の正常組織におけるSPARC遺伝子発現をRT-PCR (図11a)にて、解析した。その結果、正常組織にはほとんどSPARC遺伝子の発現は脊髄、肺、小腸に軽度認められたが、メラノーマ由来癌細胞株164と比較すると弱いものであった。36種類の様々な癌種の細胞株におけるSPARC遺伝子の発現をRT-PCRにて解析したところ、多くの細胞株でSPARC遺伝子の高発現を認めた(図11b)。さらに、手術検体を用いたRT-PCRでは、胃癌4例中3例、大腸癌7例中6例において、その癌部でSPARC遺伝子の高発現を認めたが、非癌部においては、ほとんど発現を認めなかった(図11c)。

図 11

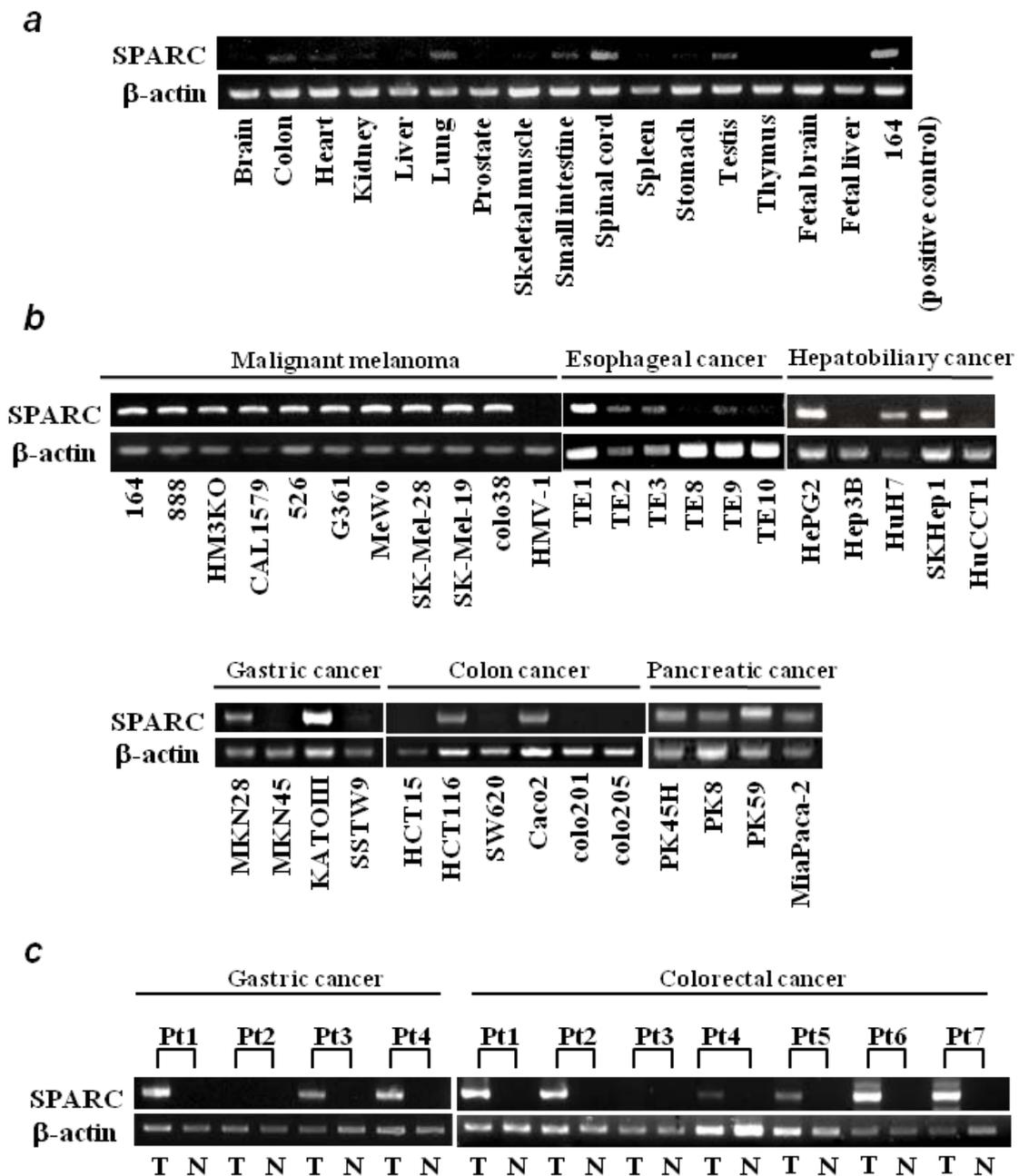


図 11. 癌細胞株、癌組織および正常組織における SPARC の発現解析

a, 正常組織における SPARC mRNA の発現解析。正常組織での発現は脊髄や、肺、小腸に軽度発現を認めたが、メラノーマ細胞株 164 と比較するとわずかであった。b: 癌細胞株の RT-PCR 解析。様々な癌腫において発現が認められた。c: 膵癌、胃癌および大腸癌組織における SPARC mRNA の発現解析。癌部においては高頻度に発現が認められたが、非癌部ではほとんど発現を認めなかった。

### 7-3) SPARC 蛋白質の免疫組織化学的解析

胃癌、大腸癌、膵癌、および正常組織についてパラフィン標本を用いて、SPARC 蛋白質の発現を免疫組織化学的解析により検討した (図 12,13)。胃癌、大腸癌、膵臓癌組織において、癌細胞の細胞質および間質細胞を中心として SPARC 蛋白質の発現を認めた (図 12)。正常組織においては、精巣にて SPARC 蛋白質の発現を認めたが、その他の組織においては脊髄、肺等においても、SPARC 蛋白質の発現は認められなかった。

図 12

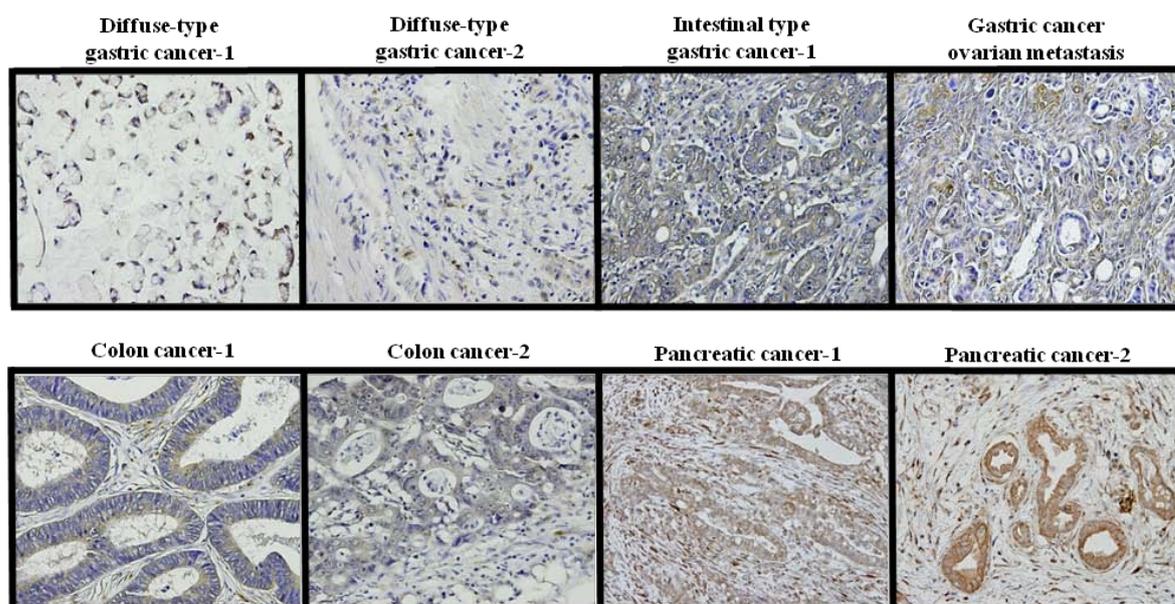


図 12. SPARC 蛋白質の癌組織における免疫組織学化学的解析

胃癌や大腸癌、膵癌組織においては、癌細胞および癌周囲の間質細胞に SPARC の発現を認めた。

図 13

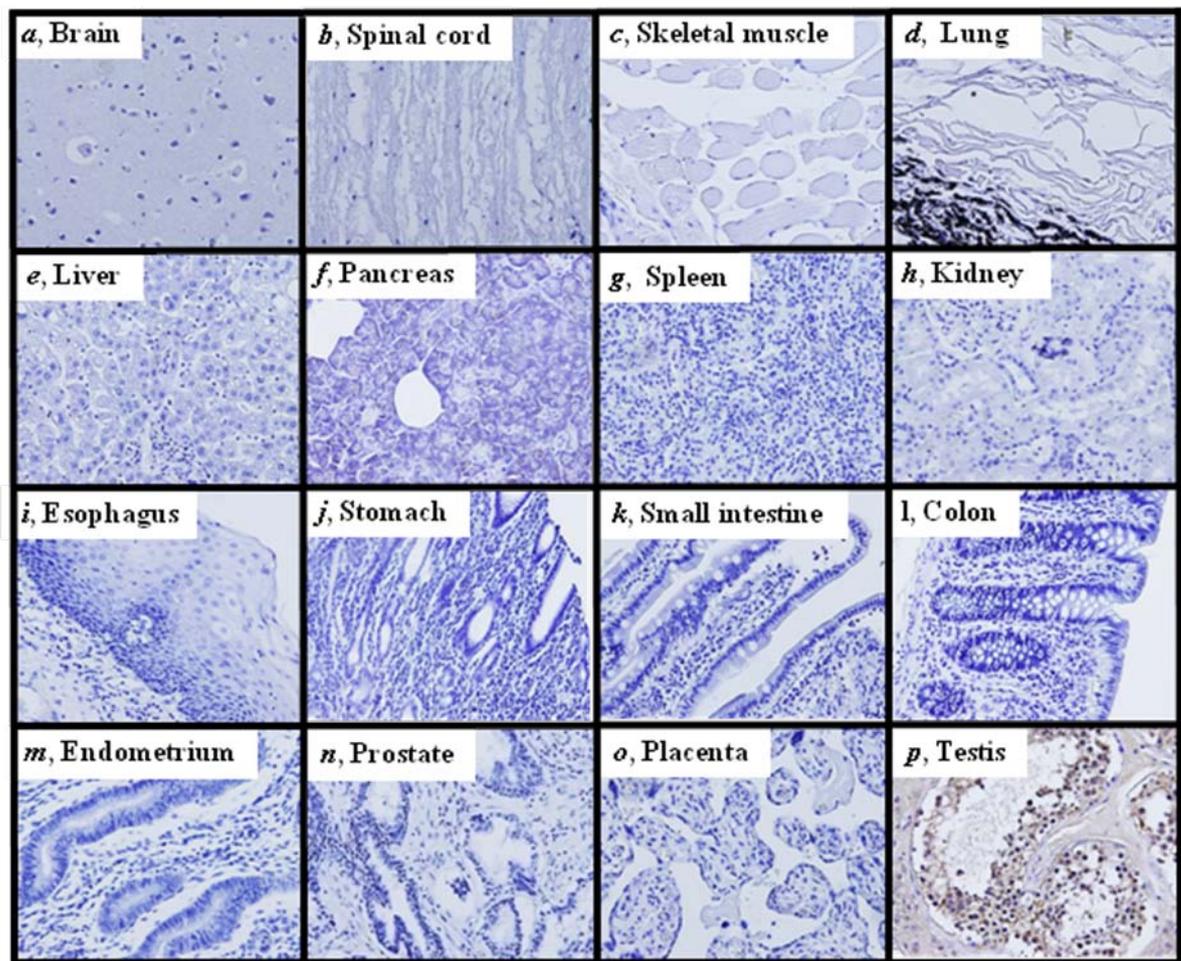


図 13. SPARC 蛋白質の正常組織における免疫組織学化学的解析

正常組織において、SPARC 蛋白質の発現は精巣のみに認められ、その他の組織においては認められなかった。

#### 7-4) HLA-A24 陽性の健常人あるいは癌患者の PBMC からの

#### SPARC 特異的 CTL の誘導

Balb/cマウスでCTLの誘導が可能であったペプチド 1; SPARC<sub>143-151</sub> (DYIGPCKYI)およびペプチド 4; SPARC-4<sub>225-234</sub> (MYIFPVHWQF)を用いて、HLA-A24 陽性の健常人あるいは癌患者のPBMCから、ペプチド特異的CTLの誘導を試みた。HLA-A24 陽性の癌患者より得られたPBMCからCD8 陽性細胞を分離し、SPARC-1<sub>143-151</sub>あるいはSPARC-4<sub>225-234</sub> ペプチドを負荷したDCで刺激し、さらに同じペプチドを負荷したPHAブラストで2回追加刺激して得られたCTLは、これらのペプチドを負荷したC1R-A\*2402 細胞に対して、ペプチドを負荷していないC1R-A\*2402 細胞に比べて、明らかに強い細胞傷害活性を示した(図 14a)。また、誘導されたCTLは、SPARCおよびHLA-A24 を発現している胃癌細胞株KATOIIIや肝癌細胞株HepG2 に対して細胞傷害活性を示したが、SPARCを発現していないHLA-A24 陽性の食道癌細胞株TE10 や大腸癌細胞株SW620 およびSPARCは発現しているがHLA-A24 陰性の大腸癌細胞株HCT116 に対しては細胞傷害活性を示さなかった。また、HLA-A24 陽性でSPARC陰性のTE10, SW620 にSPARCを遺伝子導入したTE10/SPARC, SW620/SPARCに対しては、強い細胞傷害活性を示した(図 14b)。

以上より、今回同定した2種類の SPARC エピトープペプチドは、癌細胞内で当該蛋白質が自然なプロセッシングを受け、HLA-A24 分子と複合体を形成して癌細胞表面へ提示されていることが明らかとなった。

# 図 14

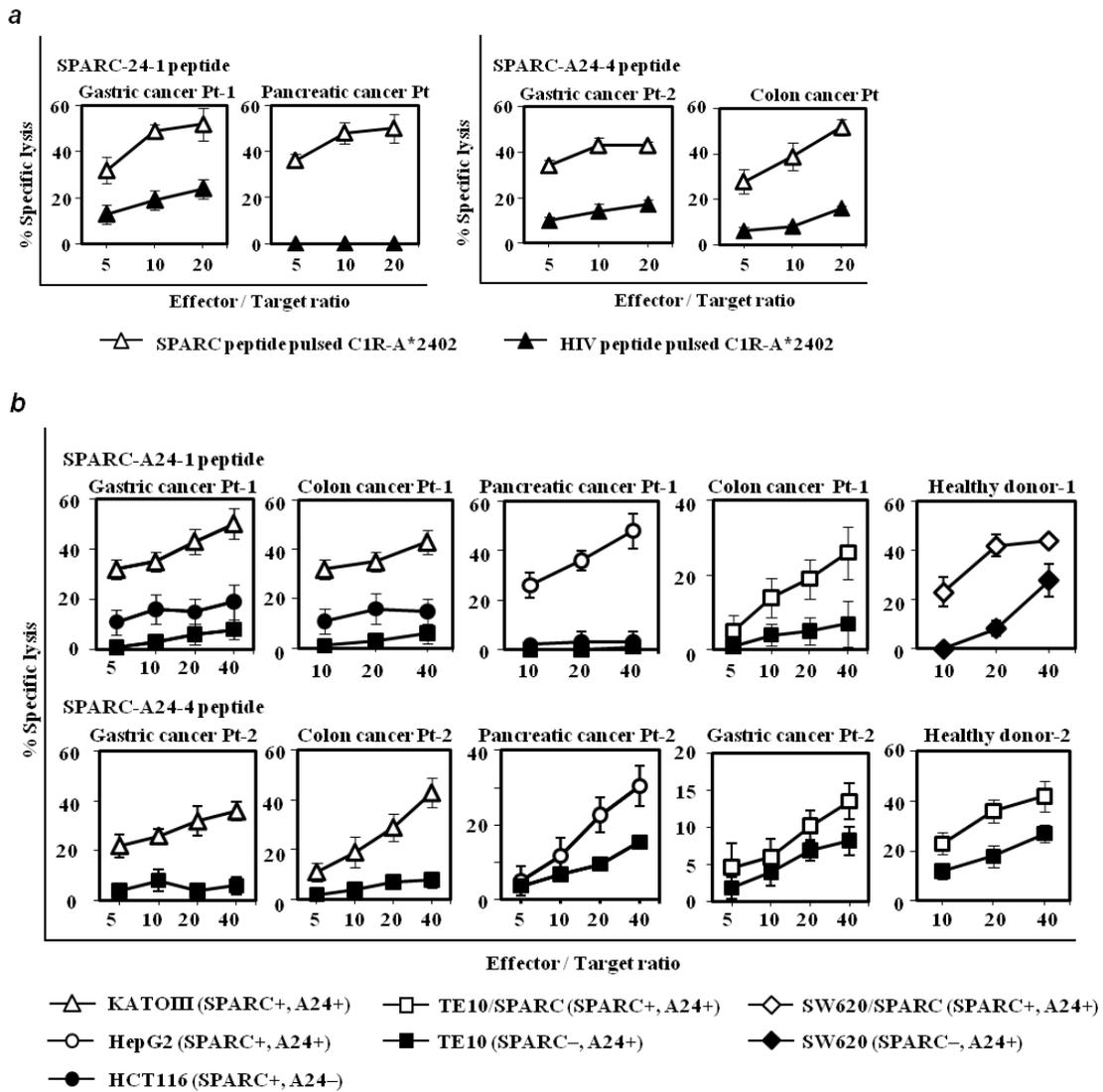


図 14 健康人および癌患者における、SPARC 特異的 CTL の誘導

健康人および癌患者のPBMCより、SPARCペプチドを用いてSPARCペプチド特異的に細胞傷害活性を示すCTLを誘導した。a: SPARC<sub>143-151</sub>あるいはSPARC-4<sub>225-234</sub>ペプチドを負荷したDCおよびPHAブラスト細胞でCD8陽性細胞を計3回刺激することにより誘導されたCTLは、SPARCペプチドを負荷したC1R-A\*2402細胞に対して強い細胞傷害活性を示したが、コントロールペプチドを負荷したC1R-A\*2402細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかった。b: 癌患者由来のPBMCより誘導したCTLはSPARC陽性、HLA-A24陽性の細胞株KATOIIIおよびHepG2に対して細胞傷害活性を示したが、SPARCを発現していないHLA-A24陽性のTE10やSW620、SPARCは発現しているがHLA-A24陰性のHCT116に対しては細胞傷害活性を示さなかった。また、HLA-A24陽性でSPARC陰性のTE10, SW620にSPARCを遺伝子導入したTE10/SPARC, SW620/SPARCに対しては、強い細胞傷害活性を示した。

### 7-5) SPARC 特異的 CTL の HLA 拘束性の証明

SPARCペプチド特異的ヒトCTL がHLA拘束性に細胞傷害活性を示すか否かを、抗体によるHLA-クラスI の阻止実験により検討した。HLA-A24陽性の健常人のPBMCより誘導したSPARC特異的CTLは、SPARCを発現するHLA-A24陽性メラノーマ癌細胞株164に反応してIFN- $\gamma$ を産生あるいは細胞傷害活性を示したが、この反応は抗HLA-クラスI抗体であるW6/32により抑制された(図15)。この反応は、抗HLA-クラスII抗体であるH-DR-1では抑制されなかった。

図 15

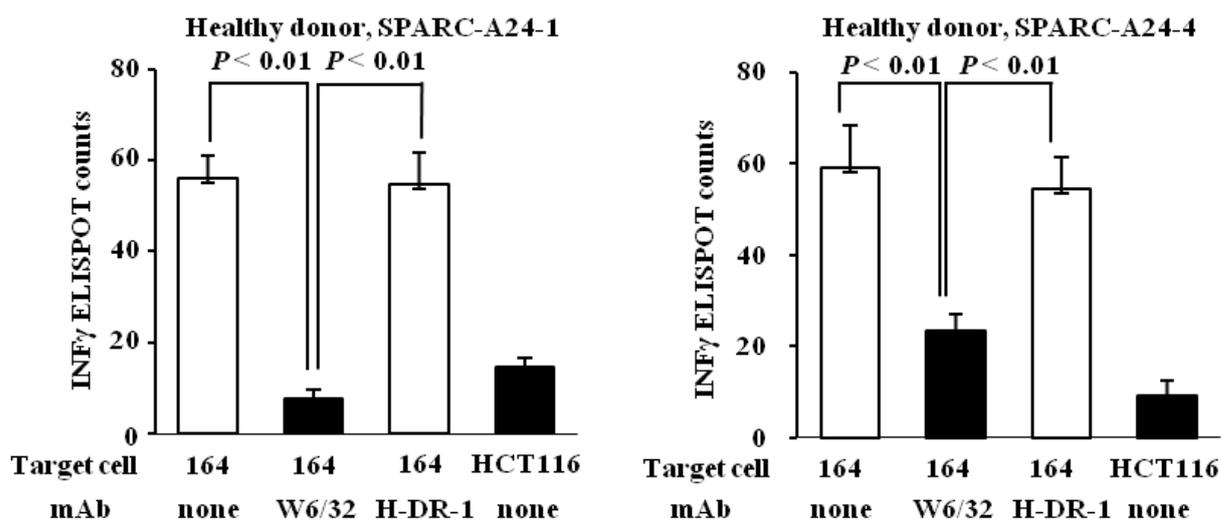


図 15. SPARC 特異的ヒト CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明

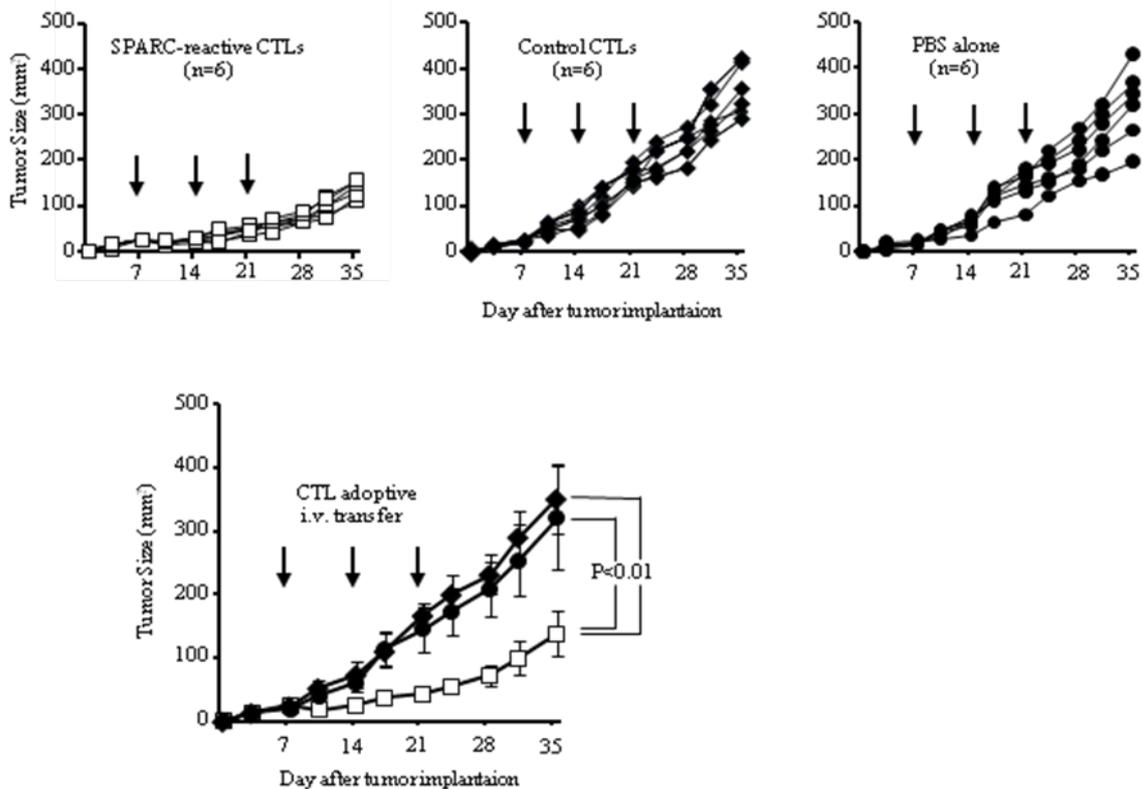
SPARC 特異的ヒト CTL の細胞傷害活性が HLA-クラス I 拘束性か否かを、HLA-クラス I 抗体を用いた HLA-クラス I 阻止実験により検証した。SPARC 特異的 CTL は、SPARC を発現する HLA-A24 陽性細胞株 164 に反応して IFN- $\gamma$ を産生するが、これは抗 HLA-クラス I 抗体である W6/32 により抑制された。この反応は、抗 HLA-クラス II 抗体である H-DR-1 では抑制されなかった。

## 7-6) NOD/SCID マウスにおけるSPARC 特異的 CTL の i.v. transfer

### による、*in vivo* における抗腫瘍効果

NOD/SCID マウスにSPARCを発現するHLA-A24陽性ヒトメラノーマ細胞株164を皮下接種して生着させた後に、SPARC-1<sub>143-151</sub>およびSPARC-4<sub>225-234</sub>ペプチドで刺激して誘導したヒトCTL株を、尾静脈より静脈注射にて養子免疫した。HIV蛋白由来のペプチドで刺激したCD8陽性T細胞株投与群、あるいはPBSのみの投与群をコントロールとして用いた。NOD/SCID マウスに生着した164細胞が形成した腫瘍の大きさの経時的変化を図15に示す。SPARCのエピトープペプチドにて誘導したCTL株を養子免疫したNOD/SCIDマウスでは、コントロールのT細胞株あるいはPBSのみを投与した群と比較して、有意に腫瘍の増殖抑制が認められた。

図16



**図16. NOD/SCIDマウスにおける、SPARC特異的CTL株の養子免疫による、*in vivo*における抗腫瘍効果**

ヒトメラノーマ細胞株164細胞を生着させたNOD/SCIDマウスに、SPARC特異的CTL株を静脈注射することにより、有意に16細胞の増殖が抑制された。A: Day 0に164細胞を $4 \times 10^6$ 個皮下へ移植し、腫瘍が $5 \times 5 = 25 \text{ mm}^2$ となったところで、 $4 \times 10^6$ 個のSPARC特異的CTL株(■)を尾静脈よりi.v.にて投与した(Day 7)。再度、Day 14にも繰り返しCTL株を局所注入した。コントロールとして、HLA-A24拘束性HIVペプチドで誘導したCD8陽性T細胞(◇)あるいはPBS (○) も同様に投与した。B: 各群における腫瘍の大きさの平均を示す。SPARCのエピトープペプチドにて誘導したCTL株を養子免疫したNOD/SCIDマウスでは、コントロールのT細胞株あるいはPBSのみを投与した群と比較して、有意に腫瘍の増殖抑制が認められた( $P < 0.0001$ )。

## 7-7) NOD/Shi-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (NOG)マウスを用いた

### *in vivo* での SPARC 特異的 CTL の誘導

有効な癌免疫療法の開発のために、様々な腫瘍抗原が同定され、臨床試験により有効性が示されているものもある。前臨床段階における、これらの腫瘍抗原の免疫療法の有効性を検討するためのヒト化マウスの樹立が望まれる。現在、腫瘍免疫実験に応用可能な、様々なヒト化マウスが作成されているが、これらのマウスを用いて *In vivo* で、CTLのprimingを行って十分な抗原特異的免疫応答を誘導できるシステムは、未だ確立されていない状況である。このため、我々は、NOD/Shi-scid IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> (NOG) マウスを用いた *in vivo* での腫瘍抗原特異的CTLの誘導法についての検討を行った。また、この方法を用いて、SPARCペプチド特異的CTLのprimingが *in vivo* で可能かどうかを検討した。

NOG マウスは、NOD/SCID マウスと IL2 $\gamma$ c 鎖ノックアウトマウスを交配して作成された重症免疫不全マウスであり、NOD/SCID マウスと同様 T 細胞、B 細胞が欠損しているとともに NK 細胞も欠損していることにより、ひとの細胞の移植モデルとして、NOD/SCIDm マウスよりも生着率が高く様々なヒト化マウスの実験に応用されている。この NOG マウスを用いてマウス体内でヒトの腫瘍抗原特異的な CTL を誘導できるか検討を行った。

まず健常人ドナー由来のPBMC由来のCD8 陽性細胞とCD14 陽性細胞を分離し、CD14 陽性細胞より、前述の方法により、*in vitro*にてDCを作成した。DCにSPARCペプチドを 50mM負荷し、2 時間培養した後、 $1 \times 10^7$ 個のCD8 陽性T細胞と  $5 \times 10^5$ 個のペプチドを負荷したDCを混合し、NOGマウスの腹腔内に注射した。第 8 日目にペプチド負荷DCを腹腔内に再度注射し、追加免疫を行った。第 15 日目にNOGマウスの脾臓細胞より、ヒトCD8 陽性T細胞を分離し、ELISPOT法にて *ex vivo*にて腫瘍抗原ペプチドを負荷した腫瘍細胞

と共培養した際のIFN $\gamma$ 産生を確認した。この方法により、HLA-A2拘束性のMART1ペプチド、HLA-A24拘束性のWT1ペプチドを用いてNOGマウス体内で腫瘍抗原特異的CTLのプライミングが可能であった。

SPARC特異的ペプチドについても同様に評価を行った。第一日目にSPARC-4<sub>225-232</sub>をDCに付加してCD8陽性T細胞とともにNOGマウス体内に注射し、第8日目に再度SPARC-4<sub>225-232</sub>ペプチド付加DCを腹腔内に注入し、追加免疫を行った。第15日目にNOGマウスの脾臓細胞を回収し、同じドナー由来のSPARC-4<sub>225-232</sub>を付加したPHAプラスト細胞と共培養し、第21日目にELISPOT法および<sup>51</sup>Cr放出試験にて評価を行い、SPARC-4<sub>225-232</sub>特異的ヒトCTLのNOGマウス体内でのプライミングが可能であることを確認した。(図17)

図 17

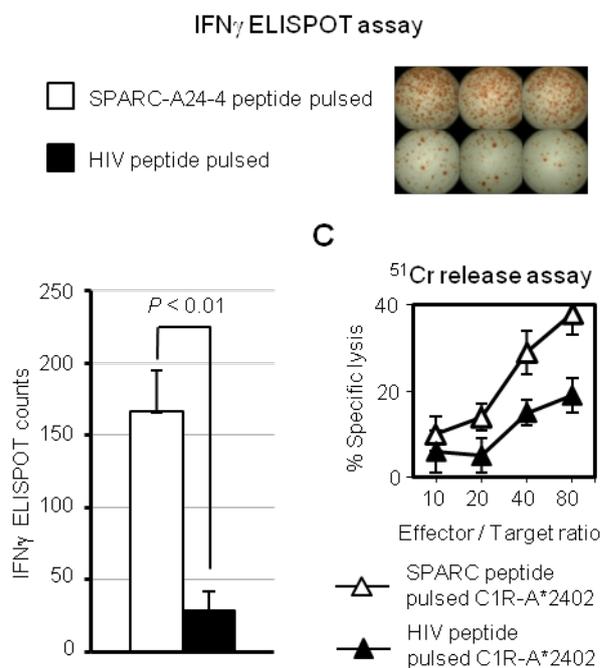


図 17. NOG マウスを用いた *in vivo* での SPARC 特異的 CTL の誘導

ヒトCD8陽性T細胞をSPARCペプチドを付荷した同じドナー由来のDCとともに、NOGマウスの腹腔内に移入し、7日後にSPARCペプチドを付荷したDCを再度腹腔内に移入して追加免疫を行った。この結果、NOGマウス体内にてSPARC特異的ヒトCTLがprimingされ、回収したNOGマウスの脾臓細胞中

のヒトCD8陽性細胞を同じペプチドを負荷したPHAブラストで刺激することにより、SPARCペプチド特異的なCTL反応が観察された。

## 8 考察

今回我々は cDNA マイクロアレイ解析より、スキルス胃癌に高発現する新規腫瘍関連抗原として SPARC を同定した。さらに、HLA-A24 (*HLA-A\*2402*) 拘束性の SPARC 抗原由来のヒト CTL エピトープを同定し、これらのペプチドを用いて、抗原特異的、HLA-A24 拘束性に癌細胞を傷害する CTL を誘導することができた。

腫瘍関連抗原を腫瘍免疫療法に利用するにあたり、腫瘍抗原が、免疫系からの逃避が起こりにくい抗原であること、つまり癌細胞の悪性形質転換、細胞増殖、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失うと癌の悪性形質を失ってしまうようなものが望ましい[18, 50]。SPARC はオステオネクチンとも呼ばれる、細胞間質における非構造的マトリックス糖蛋白であり、他の細胞外器質との相互作用により、組織の修復や、細胞接着阻止に関連する分泌蛋白質である[51-53]。正常でも組織の修復部などに軽度発現することが知られている。SPARC の高発現がメラノーマや乳癌、グリオーマや前立腺癌など多くの癌種において、悪性度や予後不良と相関することが報告されている[54-63]。SPARC は癌細胞の浸潤転移や増殖、生存に重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究においてSPARCはスキルス胃癌に高発現する遺伝子として同定された。スキルス胃癌は、びまん浸潤型の胃癌であり、進行が早く、早期にリンパ節転移や腹膜播種を来しやすく、治療が困難な癌の一つである。このためスキルス胃癌を標的とする腫瘍関連抗原の同定はスキルス胃癌に対する治療の選択枝を増やす意味でも重要である。また SPARC は、スキルス胃癌だけではなく、通常型胃癌[54, 64, 65]や大腸癌[66-68]、膵癌[69-72]でも高頻度に高発現していることが示された。またメラノーマにおいてもSPARCの高発現が報告されており[63, 73]、我々の過去の研究でも早期のメラノーマ患者の血清においてグリピキャン 3 (GPC3)とSPARCが上昇していることを報告している[74]。これらの癌種に対する免疫療法の標的抗原として SPARC が有用であることが示唆される。また本研究において、SPARCは脊髄と肺、小腸等にいずれも軽度の mRNA の発現を認めたが、免疫組織学的染色における SPARC 蛋白の発現は検出なかった。これは、SPARCを標的とした腫瘍免疫療法を行うにあたって、正常組織を傷害することなく、つまり副作用を惹起することなく、癌組織のみを傷害することができることを示唆する。また SPARC は細胞外器質の再構築に関連する分泌タンパク質であり、癌細胞だけでなく、癌周囲の間質細胞や線維芽細胞にも発現していることが示されている[66, 69, 71]。このため、SPARC を癌免疫療法の標的抗原とすることは、癌細胞そのものだけでなく、周囲の間質細胞も含めて攻撃できる可能性がある。以上の結果より、我々は SPARC を腫瘍免疫療法における腫瘍関連抗原の候補として選択した。

本研究では、HLA-A24 拘束性エピトープ同定において、以前の研究結果で示されているHLA-A24 とエピトープペプチドの結合モチーフが類似しているH-2K<sup>d</sup>を有するBalb/cマウスにおいてSPARC特異的CTLの誘導が可能であった2種類のSPARC特異的ペプチドを応用してヒトSPARC特異的CTLの誘導を行った。HLA-A24 (A\*2402) は日本人において最も頻度の高いHLA対立遺伝子の一つであり[75]、HLA-A24 拘束性のCTLエピトープの同定は、日本人の癌患者にとって有益となる可能性がある。

我々は上記 2 種類の HLA-A24 拘束性 SPARC 特異的エピトープ候補ペプチドを用いて健常人および癌患者の PBMC を *in vitro* で刺激することにより、SPARC および反応性 CTL を誘導することができた。この CTL は、*in vitro* で抗原特異的、HLA-A24 拘束性に癌細胞を傷害した。さらに、NOD/SCID マウスに SPARC を高発現する HLA-A24 陽性メラノーマ細胞株である 164 を皮下に移植し、SPARC 反応性 CTL を養子免疫することにより、*in vivo* においても著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。しかしながら、2 度目の養子免疫以降腫瘍は再度増殖をはじめ、養子免疫の際は可能な限り何度でも繰り返し行う必要性が示唆された。

また、NOG マウスを用いて、*in vivo* でのヒト腫瘍抗原特異的 CTL の priming を確認するために、HLA-A24 拘束性 SPARC-4<sub>225-234</sub> ペプチドをヒト PBMC から培養した DC に負荷して、同じヒト由来 PBMC 由来の CD8 陽性 T 細胞とともに NOG マウスの腹腔内に移入する実験を行った。この実験において NOG マウス体内にて CTL の priming が可能であり、NOG マウスの脾臓より回収したヒト CD8 陽性 T 細胞を、PHA ブラスト細胞を用いて増幅することにより、SPARC ペプチド特異的 CTL の誘導が可能であった。NOG マウスは、現在様々なヒト細胞の移植実験や、感染モデル、ヒト免疫細胞のマウス体内での再構築モデル等に应用されている重症免疫不全マウスである。このマウスを用いて *in vivo* で腫瘍抗原特異的 CTL を誘導することは、今まで行われておらず、今回の実験によって示すことができた。

NOG マウスを用いたヒト免疫細胞の移入実験においては、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞の移入による造血幹細胞移植法[76, 77]と末梢血単核球を移入する方法[78, 79]とがあり、造血幹細胞を移植する場合は、ヒトの免疫細胞による GVHD が起こりにくく、ヒト免疫系細胞の分化が可能であるが[48, 80]、T 細胞の分化に関しては、HLA class I 拘束性の抗原特異的免疫応答が正常に機能しないと報告した論文は、希であり、この点より腫瘍抗原特異的ヒト CTL の誘導実験に応用することは、困難と考えられた。ヒト PBMC 由来の DC と CD8T 細胞を移入する方法は、簡便であり、この方法によって腫瘍抗原特異的ヒト CTL の priming が可能であ

ったことより、今後、*in vivo* の抗腫瘍実験に応用しうる可能性がある。しかし PBMC を移入した場合に、GVHD によって NOG マウスが早期に死亡する問題があり、この点の改良が必要である。

本研究によって、SPARC は、胃癌、大腸癌、膵癌、メラノーマ等を含む様々な癌腫における腫瘍免疫療法のターゲットとして有用であることが示された。この結果を基に、今後我々は次のステップ、つまりこれらのペプチドを用いた腫瘍免疫療法の臨床試験を行いたいと考えている。

## 9 結論

cDNA マイクロアレイ解析を用いて、スキルス胃癌における新規腫瘍関連抗原として SPARC を同定した。SPARC 特異的な 2 種類の HLA-A24 拘束性エピトープペプチドを用いて健常人および癌患者の PBMC よりペプチド反応性 CTL を誘導することができた。さらに、誘導した CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、抗原特異的かつ HLA-A24 拘束性に腫瘍細胞を傷害できることが示された。SPARC はスキルス胃癌のみでなくその他様々な癌腫においても発現しており、これらを標的とした腫瘍免疫療法の適応は非常に多いものと予想される。将来的に臨床の現場において、SPARC を標的としたペプチドワクチンや樹状細胞ワクチン等の腫瘍免疫療法が、癌治療の一翼を担えればと期待している。

## 10 参考文献

1. Germain RN: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76(2):287, 1994.
2. Berke G: The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 12:735, 1994.
3. Lanier LL, Phillips JH: Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 17(2):86, 1996.
4. York IA, Rock KL: Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369, 1996.
5. Heemels MT, Ploegh H: Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64:463, 1995.
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* 329(6139):512, 1987.
7. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC: Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353(6342):326, 1991.
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* 351(6324):290, 1991.
9. Engelhard VH: Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12:181, 1994.
10. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S: MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41(4):178, 1995.
11. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC: Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 219(2):277, 1991.
12. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi YI, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC: Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368(6473):711, 1994.

13. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368(6468):215, 1994.
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* 264(5161):961, 1994.
15. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038):1643, 1991.
16. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P: T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9(5):684, 1997.
17. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T, Rosenberg SA: 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(9):3515, 1994.
18. Kawakami Y, Rosenberg SA: Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 16(4):313, 1997.
19. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL, Jr.: Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264(5159):716, 1994.
20. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H, Itoh K: A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 187(3):277, 1998.
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* 284(5418):1351, 1999.
22. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, Nishimura MI, Gupta G, Settlege RE, Shabanowitz J, Rosenberg SA, Hunt DF, Topalian SL: Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 189(5):757, 1999.
23. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE: Immunologic and therapeutic evaluation of a

- synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4(3):321, 1998.
24. Jager E, Jager D, Knuth A: CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 18(1):143, 1999.
  25. Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, 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(2):219, 1999.
  26. 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* 4(3):328, 1998.
  27. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M: Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25):11810, 1995.
  28. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y: Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 281(4):936, 2001.
  29. Monji M, Senju S, Nakatsura T, Yamada K, Sawatsubashi M, Inokuchi A, Nishimura Y: Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 294(3):734, 2002.
  30. 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* 32(3):826, 2002.
  31. Monji M, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Sawatsubashi M, Shinohara M, Kageshita T, Ono T, Inokuchi A, Nishimura Y: Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):6047, 2004.
  32. 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, 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(9):2689, 2006.
33. 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. *Clin Cancer Res* 10(24):8630, 2004.
  34. Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Watanabe T, Hasegawa S, Satoh S, Ohgi S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H: Identification of secernin 1 as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray. *Cancer Sci* 97(5):411, 2006.
  35. Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H: Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10(24):8577, 2004.
  36. Watanabe T, Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Ura K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Ohgi S, Tahara H, Furukawa Y, Nakamura Y: Identification of immunoglobulin superfamily 11 (IGSF11) as a novel target for cancer immunotherapy of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas. *Cancer Sci* 96(8):498, 2005.
  37. 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, Nishimura Y: Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin Cancer Res* 10(19):6437, 2004.
  38. 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, Nishimura Y: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306(1):16, 2003.
  39. Harao M, Hirata S, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Komori H, Ikuta Y, Yokomine K, Imai K, Inoue M, Harada K, Mori T, Tsunoda T, Nakatsuru S, Daigo Y, Nomori H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y: 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* 123(11):2616, 2008.

40. 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, 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* 14(20):6487, 2008.
41. Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y: The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int J Cancer*, 2009.
42. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337, 1994.
43. Fong L, Engleman EG: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18:245, 2000.
44. Lu Z, Yuan L, Zhou X, Sotomayor E, Levitsky HI, Pardoll DM: CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191(3):541, 2000.
45. Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, Miyoshi H, Nakauchi H: Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34(-) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 30(1):11, 2002.
46. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100(9):3175, 2002.
47. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, Katamura K, Nakahata T: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/gammacnull mice model. *Blood* 102(3):873, 2003.
48. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz L, Harada M: Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106(5):1565, 2005.
49. Ito M, Kobayashi K, Nakahata T: NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice more appropriate for humanized mouse models. *Curr Top Microbiol Immunol* 324:53, 2008.
50. 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, 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(11-12):614, 2002.
51. Bradshaw A, Sage E: SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107(9):1049, 2001.
  52. Yan Q, Sage E: SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 47(12):1495, 1999.
  53. Brekken R, Sage E: SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol* 19(8):816, 2001.
  54. Wang C, Lin K, Chen S, Chan Y, Hsueh S: Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *Br J Cancer* 91(11):1924, 2004.
  55. Porter P, Sage E, Lane T, Funk S, Gown A: Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem* 43(8):791, 1995.
  56. Ledda F, Bravo A, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer O: 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(2):210, 1997.
  57. Le Bail B, Faouzi S, Boussarie L, Guirouilh J, Blanc J, Carles J, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Rosenbaum J: Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol* 189(1):46, 1999.
  58. Menon P, Gutierrez J, Rempel S: 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(4):683, 2000.
  59. Thomas R, True L, Bassuk J, Lange P, Vessella R: Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 6(3):1140, 2000.
  60. Yamanaka M, Kanda K, Li N, Fukumori T, Oka N, Kanayama H, Kagawa S: Analysis of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol* 166(6):2495, 2001.
  61. Iacobuzio-Donahue C, Argani P, Hempen P, Jones J, Kern S: 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(18):5351, 2002.
62. Yamashita K, Upadhyay S, Mimori K, Inoue H, Mori M: Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer* 97(10):2412, 2003.
  63. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, Reali U, Santucci M: Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol* 30(3):339, 1999.
  64. Inoue H, Matsuyama A, Mimori K, Ueo H, Mori M: Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray. *Clin Cancer Res* 8(11):3475, 2002.
  65. Maeng H, Song S, Choi D, Kim K, Jeong H, Sakaki Y, Furihata C: Osteonectin-expressing cells in human stomach cancer and their possible clinical significance. *Cancer Lett* 184(1):117, 2002.
  66. Porte H, Chastre E, Prevot S, Nordlinger B, Empereur S, Basset P, Chambon P, 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(1):70, 1995.
  67. Madoz-Gúrpide J, López-Serra P, Martínez-Torrecuadrada J, Sánchez L, Lombardía L, Casal J: Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis. *Mol Cell Proteomics* 5(8):1471, 2006.
  68. Kaiser S, Park Y, Franklin J, Halberg R, Yu M, Jessen W, Freudenberg J, Chen X, Haigis K, Jegga A, Kong S, Sakthivel B, Xu H, Reichling T, Azhar M, Boivin G, Roberts R, Bissahoyo A, Gonzales F, Bloom G, Eschrich S, Carter S, Aronow J, Kleimeyer J, Kleimeyer M, Ramaswamy V, Settle S, Boone B, Levy S, Graff J, Doetschman T, Groden J, Dove W, Threadgill D, Yeatman T, Coffey RJ, Aronow B: Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer. *Genome Biol* 8(7):R131, 2007.
  69. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H, Giese N, Wente M, Giese T, Büchler M, Berger M, Friess H: Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg* 242(2):224, 2005.
  70. Prenzel K, Warnecke-Eberz U, Xi H, Brabender J, Baldus S, Bollschweiler E, Gutschow C, Hölscher A, Schneider P: Significant overexpression of SPARC/osteonectin mRNA in pancreatic cancer

- compared to cancer of the papilla of Vater. *Oncol Rep* 15(5):1397, 2006.
71. Infante J, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein A, Riall T, Yeo C, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M: Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 25(3):319, 2007.
  72. Bloomston M, Ellison E, Muscarella P, Al-Saif O, Martin E, Melvin W, Frankel W: Stromal osteonectin overexpression is associated with poor outcome in patients with ampullary cancer. *Ann Surg Oncol* 14(1):211, 2007.
  73. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatié E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S: SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res* 66(15):7516, 2006.
  74. Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, Fukushima S, Ito S, Wakamatsu K, Baba H, Nishimura Y: Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 11(22):8079, 2005.
  75. Browning M, Krausa P: Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunol Today* 17(4):165, 1996.
  76. Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S, Hotta T: Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol* 169(1):204, 2002.
  77. Watanabe S, Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan M, Yu Z, Ito M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N: Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2Rgamma null mice develop human lymphoid systems and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109(1):212, 2007.
  78. Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka Y: Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. *J Virol* 77(16):8719, 2003.

79. Gorantla S, Santos K, Meyer V, Dewhurst S, Bowers W, Federoff H, Gendelman H, Poluektova L: Human dendritic cells transduced with herpes simplex virus amplicons encoding human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 elicit adaptive immune responses from human cells engrafted into NOD/SCID mice and confer partial protection against HIV-1 challenge. *J Virol* 79(4):2124, 2005.
80. Shultz L, Lyons B, Burzenski L, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies S, King M, Mangada J, Greiner D, Handgretinger R: Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 174(10):6477, 2005.

