

学 位 論 文

Doctor's Thesis

新規の癌特異抗原を用いた癌免疫療法の前臨床試験

(Preclinical studies directing a development of effective cancer immune therapy)

横峰 和典

Kazunori Yokomine

指導教員

佐々木 裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器内科学

西村 泰治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻免疫識別学

2008 年 3 月

目次

目次	1
1 要旨	3
2 発表論文リスト	7
3 謝辞	8
4 略語一覧	9
5 研究の背景と目的	10
5-1) 抗腫瘍免疫のあらまし	10
5-2) HLA 分子による T 細胞への抗原提示	12
5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定	17
5-4) SEREX 法の特徴	19
5-5) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定	21
5-6) Heat shock protein 105	23
5-7) 樹状細胞を用いた癌の免疫療法	25
5-8) APC 遺伝子と <i>Apc</i> ^{Min/+} マウス	27
5-9) 本実験の目的	29
6 実験方法	30
6-1) 使用したマウスと細胞	30
6-2) HSP105 の精製	30
6-3) HSP105 パルス骨髄由来樹状細胞 (HSP105-BM-DC) の作製	32
6-4) HSP105 パルスによる BM-DC の変化に関する検討	32
6-5) ウェスタンブロッティング	33
6-6) HSP105-BM-DC の免疫によるマウスの腫瘍増殖予防実験	33
6-7) HSP105-BM-DC による自己免疫現象の誘導の有無に関する検討	34
6-8) 生体内における CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞の 除去下における腫瘍増殖予防実験	34
6-9) HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の検出	36
6-10) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍抗原遺伝子の同定	39
6-11) ノザンブロット解析と Reverse Transcription-PCR	

(RT-PCR).....	39
6-12) FOXM1 の免疫組織化学的解析	40
6-13) FOXM1 由来の HLA-A2 結合モチーフを有するペプチド	40
6-14) HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定.....	42
6-15) HLA-A2 陽性ヒト PBMC からの FOXM1 反応性 CTL の誘導	43
6-16) 細胞傷害活性の検討.....	45
7 実験結果.....	46
7-1) HSP105 は BM-DC の成熟を誘導しない	46
7-2) マウスの癌細胞株および正常組織における HSP105 の発現.....	46
7-3) HSP105-BM-DC で免疫したマウスにおける抗腫瘍免疫の誘導	50
7-4) HSP105-BM-DC を免疫されたマウスに自己免疫現象は誘導されない.....	50
7-5) CD4 陽性細胞あるいは CD8 陽性細胞を除去したマウスにおける 抗腫瘍免疫の消失.....	53
7-6) HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の存在.....	56
7-7) cDNA マイクロアレイ解析を用いた肝内胆管癌における 腫瘍拒絶抗原 FOXM1 の同定	60
7-8) 癌細胞株、癌組織および正常組織における FOXM1 の発現解析.....	64
7-9) HLA-A2Tgm を利用した FOXM1 由来 HLA-A2 (A*0201) 拘束性エピトープの同定	64
7-10) FOXM1 ペプチドを免疫された HLAA2-Tgm における 自己免疫現象の検討	68
7-11) エピトープペプチドを用いた FOXM1 反応性ヒト CTL の誘導.....	69
8 考察	71
9 結論	77
10 参考文献.....	78

1 要旨

〔 目的 〕 我々が膵癌細胞株由来の cDNA 発現ライブラリーの中から膵癌患者の IgG 抗体を用いて同定した heat shock protein (HSP105) は、多様なヒト癌腫で高発現を認め、抗腫瘍免疫療法の有望な標的と考えられる。また、肝内胆管癌組織と正常組織の cDNA マイクロアレイ解析結果を比較して、Forkhead box M1 (FOXM1) が肝内胆管癌をはじめとする多くの癌腫において高発現していることを見出した。いずれの抗原ともに正常組織における発現は特定の組織に限定され、かつ非常に低い。

本研究は、1) ヒトに対する癌免疫療法の前臨床試験として、マウスを用い HSP105 を標的とした抗腫瘍免疫療法の効果を検討すること、2) FOXM1 エピトープペプチドを用いた免疫療法のヒトへの応用を目指し、HLA-A2 拘束性 FOXM1 由来の CTL エピトープを同定すること を目的とする。

〔 方法 〕マウスに HSP105 蛋白をパルスした骨髄細胞由来の樹状細胞 (HSP105-BM-DC) を投与後に、HSP105を高発現する癌細胞株を皮下移植し、腫瘍径および生存期間を検討した。同様に、腸管に腺腫を自然に多発する *Apc^{Min/+}*マウスに、HSP105-BM-DC を投与し、腫瘍個数および生存期間を観察した。さらに、HSP105-BM-DC で免疫されたマウスの脾細胞を回収して、HSP105 に特異的な CD4 陽性 T 細胞、ならびに CD8 陽性 T 細胞の検出を試みた。

HLA-A2 結合モチーフを持つヒト FOXM1 ペプチドを 23 種類合成した。これらのペプチドの混合物をパルスした HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2Tgm) の骨髄由来樹状細胞を HLA-A2Tgm に 2 回免疫後、その脾細胞を回収し、各ペプチド特異的 CTL の誘導の有無を ELISPOT 法により検討した。同定された FOXM1 由来の HLA-A2 拘束性エピトープ候補のペプチドを用いて、健常人あるいは肺癌患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激して FOXM1 特異的な CTL を誘導を行なった。

〔 結果 〕 HSP105-BM-DC を免疫されたマウスでは、自己免疫現象を発現することなく皮下に移植された癌細胞株の増殖が抑制され、*Apc^{Min/+}*マウスに発生する小腸腺腫の個数も減少した。この抗腫瘍効果は、マウス体内の CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8

陽性 T 細胞を除去することにより消失した。また、同様のワクチン接種後にマウスの脾細胞より回収した CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞において、HSP105 に特異的な免疫応答を検出することができた。

HLA-A2Tgm を用いて、FOXM1 の HLA-A2 拘束性エピトープ候補のペプチドを 3 種類同定した。これらのペプチドを用い、HLA-A2 陽性の健常人 PBMC からペプチド特異的 CTL を誘導することができた。さらにこれらの CTL は、FOXM1 を発現している HLA-A2 陽性の癌細胞株を選択的に傷害することができた。

[考察] HSP105-BM-DC による抗腫瘍免疫効果には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞いずれも重要であった。さらに、この抗腫瘍免疫効果は、人為的な腫瘍株の移植モデルだけでなく、より実際の腫瘍発生に近いと考えられる、遺伝子変異による小腸腺腫の自然発症モデルにおいても同様に認められた。

同定した FOXM1 由来のペプチドは FOXM1 を高発現する癌細胞において、MHC クラス I 分子と複合体を形成して細胞表面に提示されていると考えられた。よって、これらのペプチドの投与、あるいはこれらのペプチドを用いて誘導した CTL の投与は、FOXM1 発現腫瘍に対する治療に有用である可能性が示唆された。

[結論] マウスモデルにおいて HSP105-BM-DC の投与は、自然発症モデルにおいて腫瘍の増殖を抑制した。また、HLA-A2 により提示される FOXM1 由来の CTL エピトープを同定し、これらを用いて誘導されたヒト CTL は、FOXM1 を発現する癌細胞株を傷害することを証明した。

Summary

Heat shock protein (HSP) 105 is overexpressed in various cancers, but is expressed at low levels in many normal tissues, except for the testis. In the present study, we set up a preclinical study to investigate the usefulness of dendritic cells (DCs) pulsed with mouse HSP105 as a whole protein for cancer immunotherapy *in vivo*. The recombinant HSP105 did not induce DC maturation, and the mice vaccinated with HSP105-pulsed BM-DCs were markedly prevented from the growth of subcutaneous tumors, accompanied with a massive infiltration of both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells into the tumors without causing an autoimmune reaction. In depletion experiments, we proved that both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells play a crucial role in anti-tumor immunity. Both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells specific to HSP105 were induced by stimulation with HSP105-pulsed DCs. These results indicate that HSP105 itself is a tumor rejection antigen which may possibly be useful for cancer immunotherapy, and that HSP105-pulsed BM-DC vaccinations can prime HSP105-specific T cells *in vivo*, to prevent the subcutaneous growth of tumors expressing HSP105. Because of the overexpression of HSP105 in a variety of human tumors, clinical trial of immunotherapy targeted against HSP105 may well be applicable to various cancers.

Because *Apc*^{Min/+} mice develop multiple adenomas throughout the intestinal tract by 4 months of age, the mice provide a clinically relevant model of human intestinal tumor. In the present study, we investigated the efficacy of the HSP105-pulsed BM-DC vaccine on tumor regression in the *Apc*^{Min/+} mouse. Western blot and immunohistochemical analyses revealed that the tumors of the *Apc*^{Min/+} mice endogenously overexpressed HSP105. Immunization of the *Apc*^{Min/+} mice with a HSP105-pulsed BM-DC vaccine significantly reduced the number of small-intestinal polyps. These findings indicate that the HSP105-pulsed BM-DC vaccine can provide potent immunotherapy for tumors that appear spontaneously as a result of the inactivation of a tumor suppressor gene, such as in the *Apc*^{Min/+} mouse model.

We have attempted to identify a useful target antigen of cholangiocarcinoma using

cDNA microarray to establish an effective antitumor immunotherapy for cholangiocarcinoma and identified forkhead box M1 (FOXM1) transcription factor as a novel candidate antigen. In 24 cholangiocarcinoma patients, the *FOXM1* mRNA was expressed in cancer cells more than five times higher in cancer cells as compared with their normal counterparts. *FOXM1* gene was expressed in the testis, bone marrow, small intestine, thymus, and fetal liver, although its expression level was far lower than that observed in cholangiocarcinoma tissues. Further investigation revealed that *FOXM1* mRNA was strongly expressed in other cancer tissues as well, such as the lung, bladder, and pancreatic cancers. Twenty-three human FOXM1 peptides with highest predicted binding score to HLA-A2 were synthesized to identify HLA-A2-restricted epitopes using HLA-A2.1 transgenic mouse. We found that three peptides stimulated HLA-A2.1 transgenic mouse CTL to produce IFN- γ in a HLA-A2-restricted manner. Furthermore, these peptide-reactive CTLs were generated from human peripheral blood mononuclear cells and the CTLs had cytotoxic activity against cancer cell lines positive for both FOXM1 and HLA-A2. Our study raises the possibility that these FOXM1 peptides may provide cancer immunotherapy for various cancers, including cholangiocarcinoma and lung cancer.

2 発表論文リスト

1. Kazunori Yokomine, Satoru Senju, Tetsuya Nakatsura, Atsushi Irie, Shinya Hirata, Yoswhiaki Ikuta, Michiko Harao, Katsunori Imai, Hideo Baba, Hiroaki Nomori, Takuya Tsunoda, Yusuke Nakamura, Yutaka Sasaki, and Yasuharu Nishimura. The Forkhead Box M1 Transcription Factor, as a Possible Immunotherapeutic Tumor-Associated Antigen. **Int. J. Cancer** 126: 2153-2163, 2010.
2. Kazunori Yokomine, Tetsuya Nakatsura, Satoru Senju, Naomi Nakagata, Motozumi Minohara, Jun-ichi Kira, Yutaka Motomura, Tatsuko Kubo, Yutaka Sasaki, and Yasuharu Nishimura. Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in *Apc^{Min/+}* mice. **Cancer Science** 98: 1930-1935, 2007.
3. Kazunori Yokomine, Tetsuya Nakatsura, Motozumi Minohara, Jun-ichi Kira, Tatsuko Kubo, Yutaka Sasaki, and Yasuharu Nishimura. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communication** 343: 269-278, 2006.
4. Hiroyuki Komori, Tetsuya Nakatsura, Satoru Senju, Yoshihiro Yoshitake, Yutaka Motomura, Yoshiaki Ikuta, Daiki Fukuma, Kazunori Yokomine, Michiko Harao, Toru Beppu, Masanori Matsui, Toshihiro Torigoe, Noriyuki Sato, Hideo Baba, and Yasuharu Nishimura. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for Glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research** 12: 2689-2697, 2006.
5. Masafumi Miyazaki, Tetsuya Nakatsura, Kazunori Yokomine, Satoru Senju, Mikio Monji, Seiji Hosaka, Hiroyuki Komori, Yoshihiro Yoshitake, Yutaka Motomura, Motozumi Minohara, Tatsuko Kubo, Keiichi Ishihara, Takumi Hatayama, Michio Ogawa, and Yasuharu Nishimura. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. **Cancer Science** 96: 695-705, 2005.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授、ならびに消化器内科分野の佐々木裕教授に深く感謝いたします。研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚准教授および中面哲也助教に深く感謝いたします。組織の免疫染色に御協力いただきました分子病理学分野の山本哲郎教授、および久保多津子さんに深く感謝いたします。HSP105 蛋白を御提供いただきました、九州大学医学部神経内科学分野の吉良潤一教授および三野原元澄助教に深く感謝いたします。また、肝内胆管癌の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、中鶴修一先生、小濱和貴先生、および角田卓也先生に深く感謝いたします。

4 略語一覽

APC; adenomatous polyposis coli

BM-DC; bone marrow derived dendritic cell

cDNA; complementary DNA

CLP; coactosin like protein

CT; cancer-testis

CTL; cytotoxic T cell

DC; dendritic cell

DNA; deoxyribonucleic acid

ELISPOT; enzyme-linked Immunospot

FAP; familial adenomatous polyposis

FOXM1; forkhead box m1

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

HSP105; heat shock protein 105

IFN; interferon

Ig; immunoglobulin

IL; interleukin

LPS; lipopolysaccharide

MBP; myelin basic protein

MHC; major histocompatibility complex

PBMC; peripheral blood mononuclear cell

PBS; phosphate-buffered saline

SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

TLR; toll like receptor

5 研究の背景と目的

5-1) 抗腫瘍免疫のあらまし

従来の癌患者に対する免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答による抗腫瘍効果を期待するものであった。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、が重要な課題となっている。

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 1 に示すように CD80/86 分子を発現する抗原提示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 (1)。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 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) 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 1)。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 1

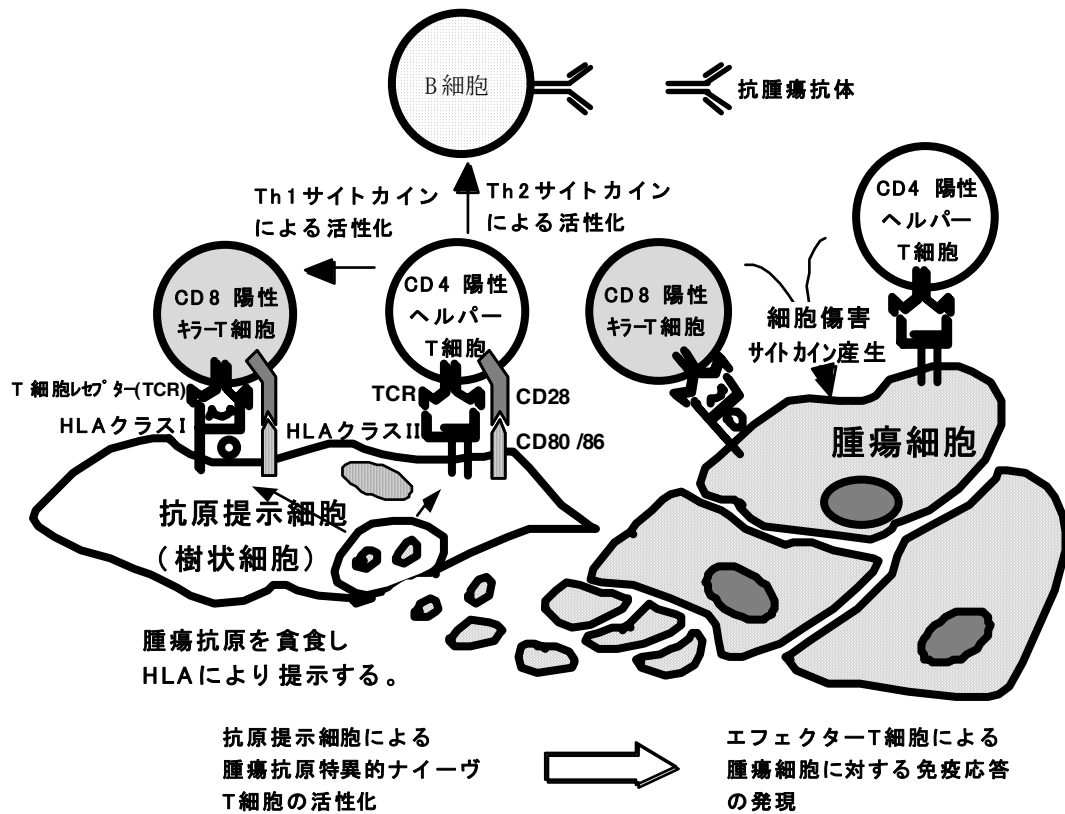


図 1. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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。

5-2) 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 (2)。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 (3)。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 2 C) (4)。

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、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 (5, 6)。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 2) (7)。この

図 2

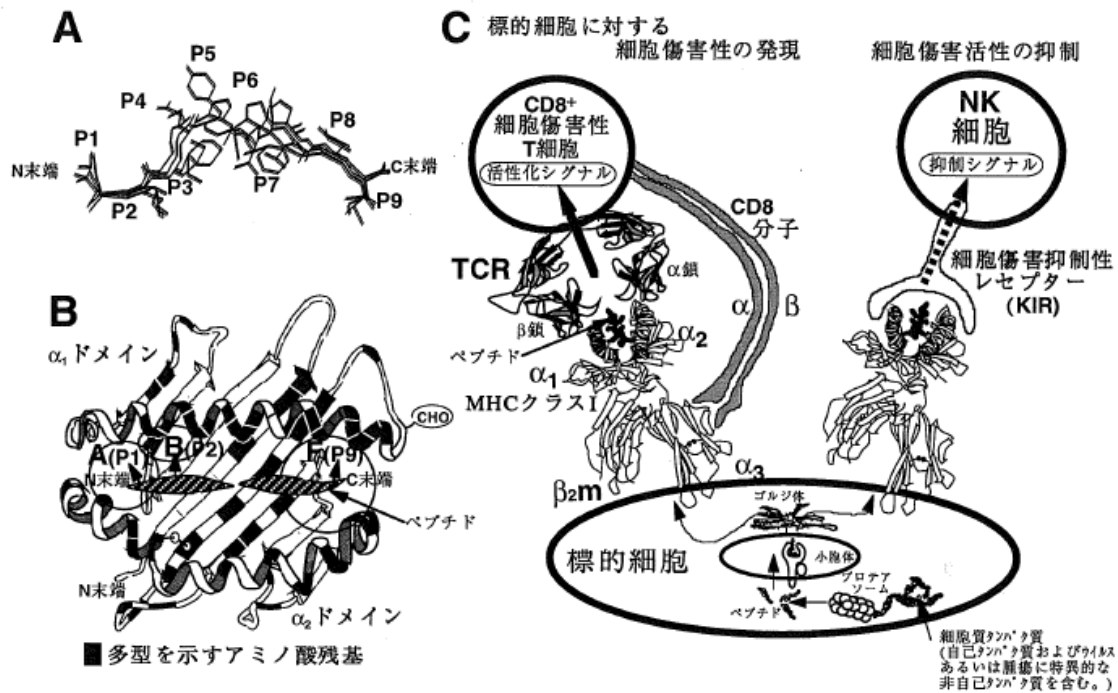


図 2. MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの CD8⁺細胞傷害性T細胞への提示

(A) MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1~P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基 (P3~P7) の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。(B) MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの α ヘリックス (右巻きらせん) 構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、() 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス I (ヒトの HLA クラス I) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。(C) MHC クラス I により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。 α_1 , α_2 , α_3 および β_2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび β_2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター (killer-cell inhibitory receptor) を表す。

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 2 A, B) (8-10)。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 (11)。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 2 B) (7, 12)。これらのポケットと () 内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性 (親水性あるいは疎水性) および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドは MHC クラス I に結合する。MHC クラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖が TCR により認識される。この状況は特にアミノ酸の数が 10 個以上のペプチドで顕著である。

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つ CD4 分子を発現する T 細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインは B 細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T 細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する (13)。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 3 C 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 MHC (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。MH 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（14、15）。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（15）。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 3 A, B）。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジーの状態になるなどして免疫寛容(トレランス)の状態にあり、応答を示すことはない(13)。

図 3

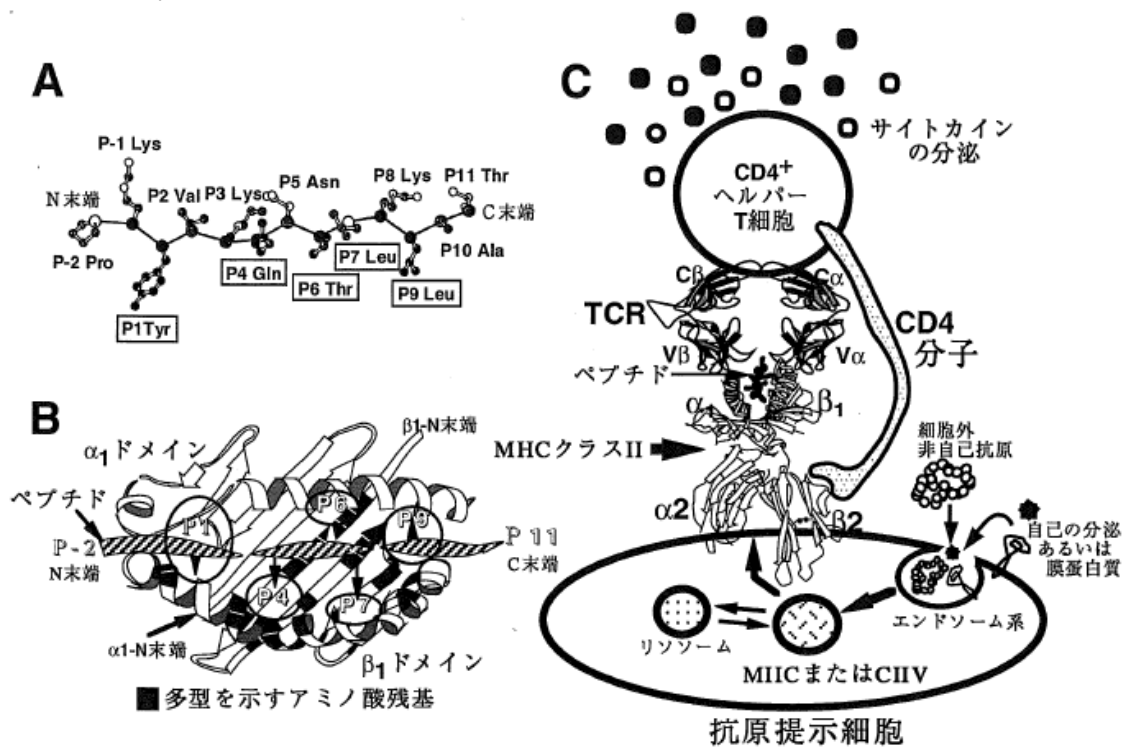


図 3. MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパーT細胞への提示

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

5-3) 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。CTL は抗原まる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) クラス I 分子とが結合した複合体を認識する (3)。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 T 細胞に認識される。

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に使えるという共通性 (発現頻度)、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、抗原消失性、自己免疫などの副作用、などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。すなわち、理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として以下の 3 つが考えられる。① 癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原; 癌細胞の拒絶までは至らないとしても、癌患者の血液中に抗原特異的な抗体や T 細胞の存在が検出できるもの。② 発現の組織特異性が優れた抗原; 癌細胞での発現は強いが、正常組織にはほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないもの。たとえば、胎児期組織および癌組織のみに発現する癌胎児性抗原や、癌細胞と免疫系から隔離された組織のみに発現する癌精巣抗原 (CT 抗原) など。③ 免疫系からの逃避が起こりにくい抗原; 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、① cancer-testis 抗原、② 組織特異抗原、③ 変異ペプチド抗原、④ 癌遺伝子、癌抑制遺伝子産物、⑤ 癌胎児性抗原、⑥ 癌細胞で発現が増強している抗原などがあげられるが、T 細胞によって認識されるヒト腫瘍抗原の同定法として以下の 4 つがあげられる。① 癌化に関連した腫瘍抗原の候補に対する T 細胞応答の解析; 細胞の癌化に関連した癌遺伝子や癌抑制遺伝子産物の突然変異部分、融合蛋白質の境界部分、あるいはウ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 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)) (NY-ESO-1 ほか多数)。④cDNA microarray analysis による、遺伝子発現の組織特異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定と、その抗原性の解析 (Glypican-3 (16)、PP-RP (17) ほか)。

5-4) SEREX 法の特徴

癌患者の血清中の抗体と同一患者由来の癌細胞との反応を検索し、腫瘍抗原を同定しようという試みが Old らにより (18) 1970 年代半ばより開始された。またそれ以前にも、吉田孝人ら (19) により、癌患者が産生する抗体の癌細胞に対する反応性の検索がおこなわれている。このようないわゆる「Autologous Typing 法」により、糖鎖抗原などの重要な腫瘍抗原が同定された。しかし、当初は細胞表面に発現する腫瘍抗原に検索を限っていたため、また当時はまだ各種の分子生物学的方法も確立されておらず、得られた成果は限られたものであった。

1995 年に Pfreundschuh らは Autologous Typing 法に遺伝子発現クローニングを取り入れて腫瘍抗原を同定する方法、SEREX 法を確立した (20)。SEREX 法の最大の利点は、その簡便性にある。つまり SEREX 法では、癌細胞の培養株の樹立を必要とせず、T 細胞培養株の樹立も必要としないため、あらゆる癌での腫瘍抗原の検索に応用が可能である。さらに、癌患者の血清中の抗腫瘍抗体を利用するため、あらかじめ *in vivo* において抗腫瘍免疫を誘導することがわかった抗原を同定できるという特色がある。また、抗原の同定と遺伝子の同定が直結しており、抗原の一次構造を直ちに決定できることも利点のひとつである。したがって、抗原の種々の正常あるいは癌組織における発現を調べることも容易である。

SEREX 法では患者血清を 100 倍に希釈し、また検出のために 2 次抗体として抗ヒト免疫グロブリン G (IgG) 抗体を用いる。このことにより、低力価の IgM クラス抗体の産生を誘導するような「自己抗原」を検索から除外し、高力価の IgG クラス抗体の産生を誘導する抗原に検索を限定することができる。IgG クラス抗体の産生にはヘルパー T 細胞の関与が必要であり、したがって同定された癌抗原は *in vivo* で少なくともヘルパー T 細胞には認識されることが保証されている。

メラノーマを対象におこなった SEREX 法による腫瘍抗原の最初の検索で、新しい抗原に加えて CTL で同定された MAGE-1 や tyrosinase の抗原も SEREX 法で検出できることが報告され、その実用性が示された (20)。その後、胃癌、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌、乳癌など種々の癌において、SEREX 法による腫瘍抗原の同定の試みが開始された (21, 22)。これまでに SEREX 法で同定された主な抗原は、1)

Cancer-testis (CT) 抗原、2) 分化抗原、3) 遺伝子増幅/過剰発現抗原、4) 突然変異抗原、5) 融合蛋白抗原、6) スプライシング異常により産生された抗原、7) レトロウイルス抗原の 7 グループに分類されている。

我々が、膀胱癌細胞株 CFPAC-1 由来の cDNA ライブラリーを、膀胱癌患者血清中の IgG 抗体を用いてスクリーニングすること (SEREX 法) によって同定した腫瘍抗原遺伝子 (23) を以下に示す (表 1)。

表 1

膀胱癌細胞株 CFPAC-1 より SEREX 法により同定された 18種の腫瘍抗原遺伝子

(Nakatsura et al. BBRC: 2001; 281: 936-944 (23) より引用)

腫瘍抗原遺伝子	相同性を示す遺伝子
KM-PA- 1	apg-2 (heat shock protein 110 family)
KM-PA- 2	EST (KIAA0124)
KM-PA- 3	β -actin
KM-PA- 4	coactosin-like protein (CLP)
KM-PA- 5	HALPHA44 (alpha-tubulin)
KM-PA- 6	unknown
KM-PA- 7	CDC-like kinase (CLK3)
KM-PA- 8	cytokeratin 18
KM-PA- 9	polyA binding protein
KM-PA-10	very-long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase (VLCAD)
KM-PA-11	unknown
KM-PA-12	HLA-Cw heavy chain (MHC Class I)
KM-PA-13	unknown
KM-PA-14	CGI 55 protein
KM-PA-15	glycosylation-inhibiting factor (GIF)
KM-PA-16	unknown
KM-PA-17	DNA binding protein A (dbpA)
KM-PA-18	heat shock protein 105 (KIAA0201)

5-5) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定

cDNA マイクロアレイ解析の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原候補の同定に cDNA マイクロアレイ解析を用いることの最大の利点は、一度に数千〜数万種類の遺伝子の発現をスクリーニングすることができる点である。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) 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) を同定し、癌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 (16, 17)。本研究においては、肝内胆管癌患者 25 例の癌部と非癌部における 27,648 種類の遺伝子の発現を比較検討した。

図 4

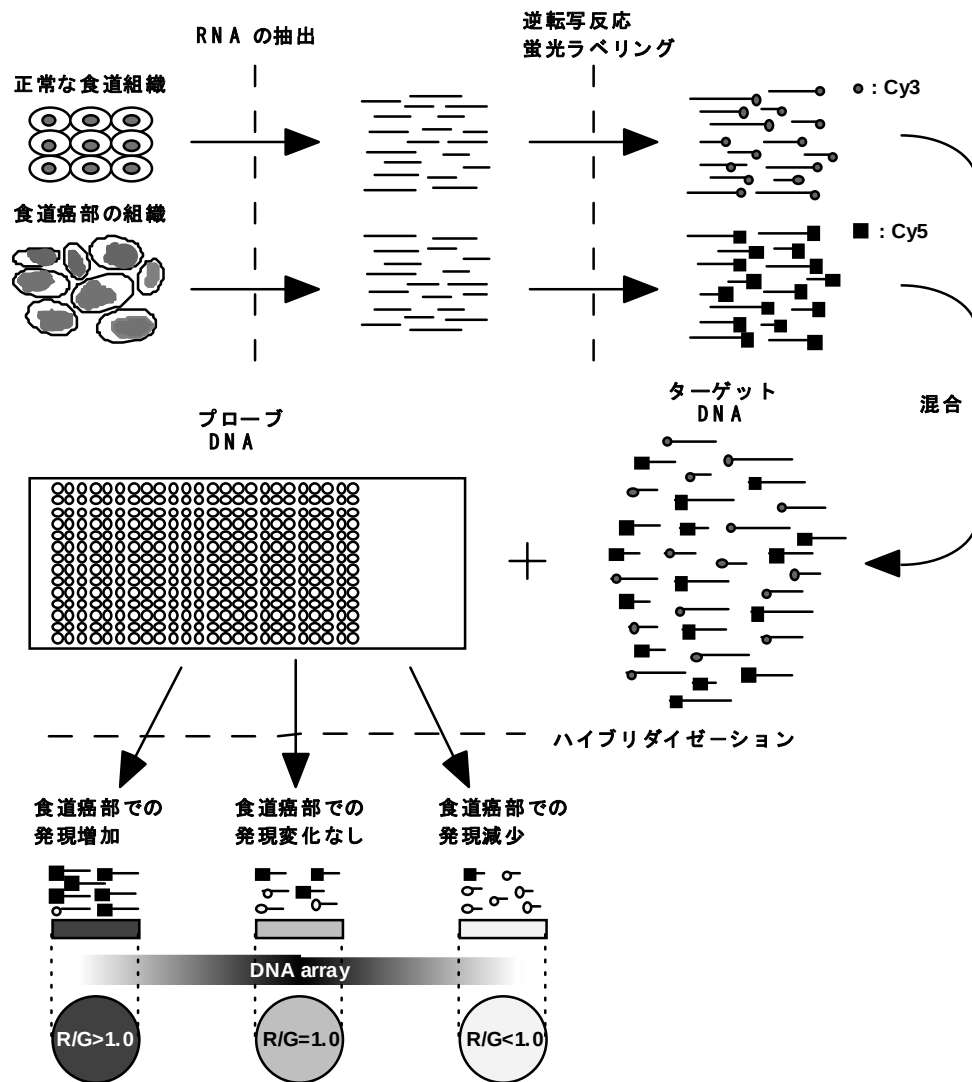


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

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、食道癌部 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。

5-6) Heat shock protein 105

Heat shock protein 105 (HSP110 と同義) (24) は HSP105/110 family に属するストレス蛋白であり、ほとんどの組織において軽度の発現を認め、マウスにおいては蛋白レベルで脳組織に高発現していることが知られている (24, 25)。他の heat shock protein と同様に、HSP105 は生理的な状況でシャペロンとしての重要な役割を担っている。また、HSP105 は他の HSP70 ファミリー蛋白質と同様に ATP-binding domain、 β -sheet、loop ならびに α -helix domain から成り、 β -sheet domain で異常蛋白質と結合し、その凝集を妨げている (25-27)。

マウス HSP105 を過剰発現させたラット神経細胞株 PC12 では、さまざまなストレスにより誘導されるカスパーゼ依存性のアポトーシスが抑制されている (28)。また、神経変性疾患である spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) の細胞モデルとして、COS-7 や SK-N-SH 細胞にポリグルタミン鎖を有するアンドロゲンレセプターを発現させると、ポリグルタミンの凝集を引き起こし、アポトーシスが誘導される。一方、アンドロゲンレセプターと HSP105 を共に発現させた細胞ではポリグルタミンの凝集は抑制され、その結果アポトーシスも抑制されたという報告がある (29)。これらの報告は、HSP105 がアポトーシスの制御に関わっていることを示唆しており、我々も様々な癌細胞株の HSP105 の mRNA の発現を small interfering RNA の手法を用いて抑制することにより、HSP105 を高発現するがん細胞株のアポトーシスが誘導されることを報告した (30)。

我々は、HSP105 蛋白 (図 5) が、大腸癌を含めた種々のヒト腫瘍において高発現していることを発見した (31)。さらに、大腸腺腫では発現しておらず、HSP105 の過剰発現が大腸癌の発癌過程の後期に起こっている可能性を報告してきた (31)。また、転移能が高い大腸癌細胞株において HSP105 蛋白の発現が増加しており、ヒト大腸癌組織を用いた免疫組織化学的検索において、臨床的進行度及びリンパ節の転移とも相関していることが報告されている (32)。

図 5

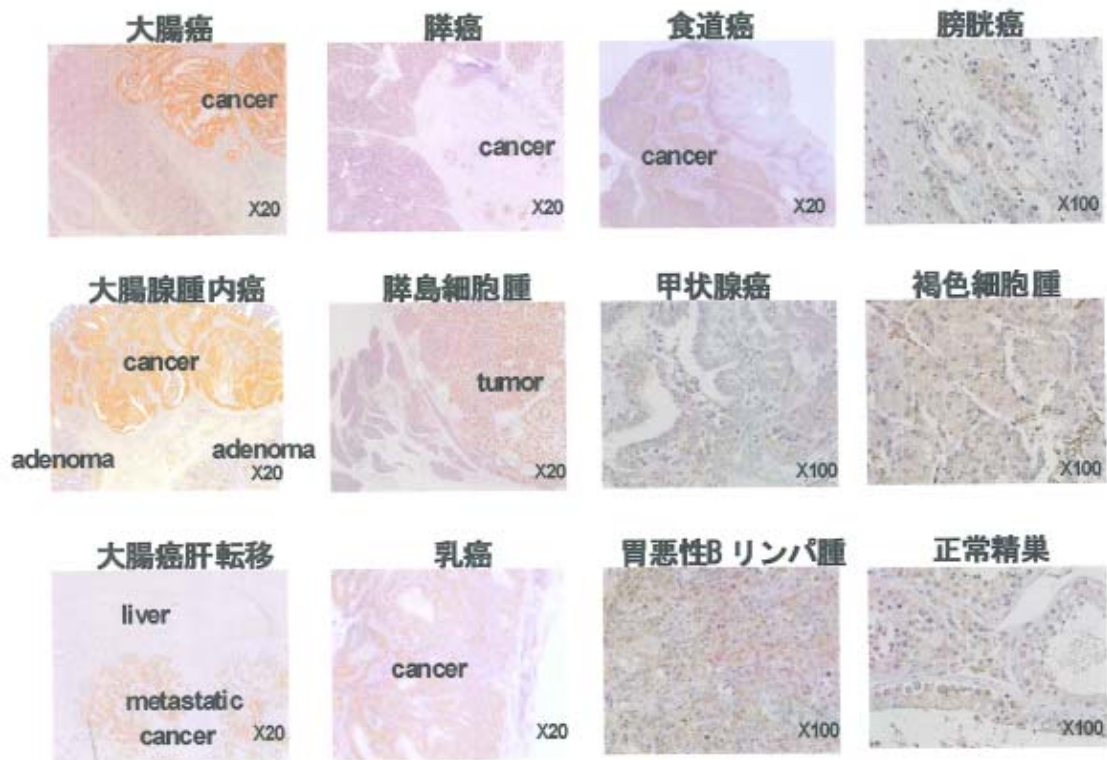


図 5 : HSP105 の多様な癌や腫瘍組織における高発現

(Kai, M., et al. Oncol. Rep. 10: 1777-1782, 2003 (31) より引用)

HSP105 蛋白は、多様なヒトの腫瘍細胞で高発現しており、
正常組織では精巢において高発現していた。

5-7) 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(33)。

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) などを通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(34)。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。

5-8) APC 遺伝子と *Apc*^{Min/+} マウス

最初に、APC (adenomatous polyposis coli) が関与している Wnt シグナル伝達経路について述べる。Wnt は細胞外に分泌され、受容体 Frizzled に結することにより Wnt シグナルを細胞内に伝える (図 6)。このシグナルは、Dsh (Dishevelled) を介して β -catenin のリン酸化の抑制を引き起こす。脱リン酸化された β -catenin は安定化して細胞内に蓄積し、核へ移行して TCF (T cell factor) / LEF (lymphoid factor) ファミリーの転写因子と複合体を形成してさまざまな標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。転写活性化を受けた標的遺伝子の作用により、細胞の増殖、分化、極性の変化などが引き起こされる (35)。

Wnt が細胞に作用していない状態では、 β -catenin は APC、Axin、GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β)、CKI (casein kinase I) 等からなる複合体によって N 末端領域がリン酸化され、ユビキチン化を受けてプロテアソームにより分解されるため、不安定で寿命が短い。が、 β -catenin の分解にかかわる APC や Axin に変異が起きて分解が効率よく起こらなくなったり (36、37)、 β -catenin そのものに変異が起きて分解されにくくなると (38)、ポリープや癌を引き起こすと考えられている。

APC は大腸癌をはじめとしたヒトの腫瘍で変異を起こしていることが見出され、腫瘍形成の重要な原因となっていると考えられている。変異 APC は FAP (familial adenomatous polyposis) の原因遺伝子で、散发性大腸癌の 80%以上の症例でも APC 遺伝子に変異を起こしており、大腸癌の癌抑制遺伝子として知られている (39)。APC 遺伝子の変異は大腸癌の多段階発癌の初期に起こり、ポリープ形成の原因となる (40)。大腸癌でみられる APC 遺伝子の変異のほとんどは 5' 側半分にかかるフレームシフト変異やナンセンス点突然変異で、終止コドンが生じて短い遺伝子産物ができる場合が多い。FAP では変異の位置によって症状が異なる場合があることが知られている。散发性の大腸癌では、特にコドン 1309～1550 の領域に変異が集中しており、この領域は MCR (mutation cluster region) と呼ばれる (41)。

Apc^{Min/+} マウスにおいては、8535bp ある *Apc* 遺伝子のうちの 2549bp の T が A に変異しているため、850 番目のコドン (TTG) が終止コドン (TAG) へと変化するため、Apc の作用を失っている。そのため、変異 *Apc* 遺伝子のホモ接合のマウスは胎生致

死であるが、正常 *Apc* 遺伝子と変異 *Apc* 遺伝子のヘテロ接合のマウス (*Apc*^{Min/+}マウス) は生後早いうちから小腸を中心とする腸管にポリープが多数生じ、数ヶ月で死亡する (42)。*Apc*^{Min/+}マウスはポリープ発生の原因遺伝子がヒトの FAP や散発性の大腸癌と同じであり、さらに生後 2,3 か月という早い時期よりポリープが多発することなどから、遺伝子変異による癌自然発生のモデルとして広く利用されている。

図 6

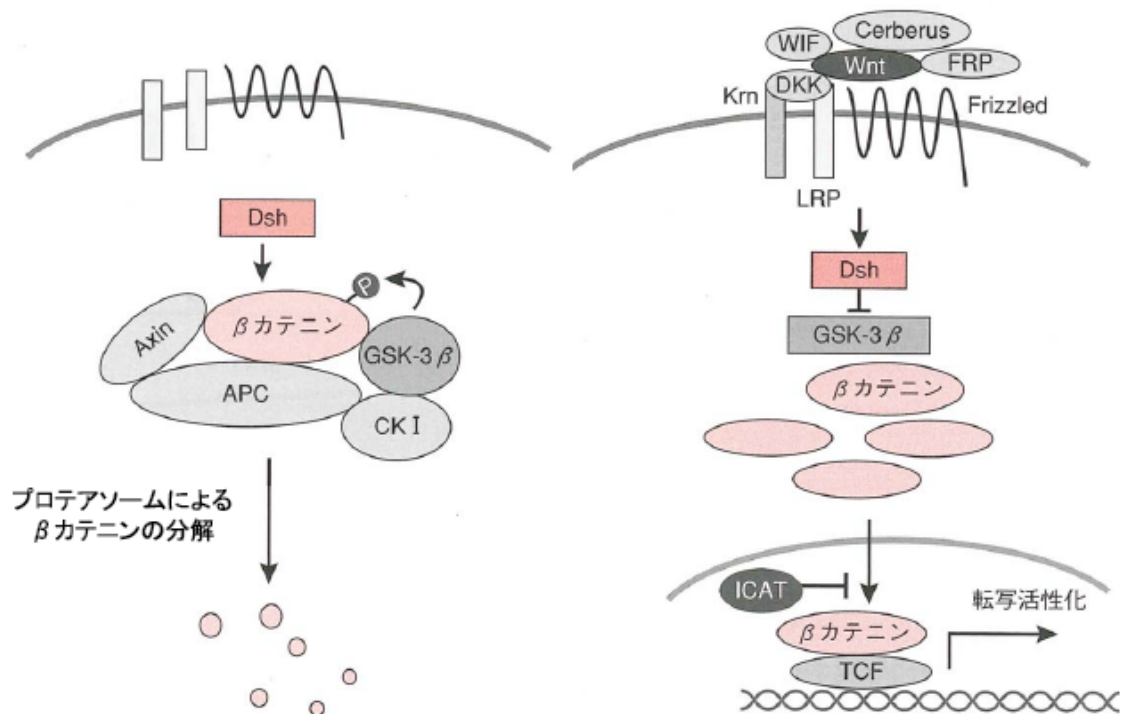


図 6. Wnt シグナル

Wnt が作用していない状態 (左) では、β-catenin は APC、GSK-3β などからなる複合体によって分解誘導を受けるが、Wnt が作用している状態 (右) では、β-catenin のリン酸化が抑制される。脱リン酸化された β-catenin は安定化し、核へ移行して標的遺伝子の転写を誘導する。

5-9) 本研究の目的

我々が膵癌細胞株由来の cDNA 発現ライブラリーの中から膵癌患者の IgG 抗体を用いて同定した heat shock protein (HSP105) は、多様なヒト癌種で高発現を認め、抗腫瘍免疫療法の有望な標的と考えられる。また、肝内胆管癌組織と正常組織の cDNA マイクロアレイによる比較解析を行い、Forkheadbox M1 (FOXM1) が肝内胆管癌をはじめとする多くの癌種において高発現していることを見出した。

本研究は、1) ヒトに対する癌免疫療法の前臨床試験として、マウスを用い HSP105 を標的とした抗腫瘍免疫療法の効果を検討すること、2) FOXM1 エピトープペプチドを用いた免疫療法のヒトへの応用を目指し、HLA-A2 拘束性 FOXM1 由来の CTL エピトープを同定すること、を目的とする。

6 実験方法

6-1) 使用したマウスと細胞

C57BL/6 マウスおよび BALB/c マウスは日本チャールス・リバーより購入した。*Apc*^{Min/+}マウスは、The Jackson laboratory より凍結胚を購入し、熊本大学生命資源研究・支援センターの動物資源研究開発部門 (CARD) からマウスを供給頂いた。その後は、オスの *Apc*^{Min/+}マウスとメスの C57BL/6 マウスを交配させて生まれたマウスの APC 遺伝子変異を検出して使用した。検出には、生後 4 週のマウスの尻尾より抽出した DNA を用いた。使用したプライマーは、5'-TGAGAAAGACAGAAGTTA-3' (*Apc* 遺伝子の 2532-2549bp)、5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC-3' (*Apc* 遺伝子の 2859-2841bp)、5'-GCCATCCCTTCACGTTAG-3' (*Apc* 遺伝子の 2241-2258bp) である。図 7 にこのプライマーを用いて typing を行った PCR の結果を示す。マウス大腸癌細胞株 Colon26 は、アステラス製薬の下村恭一氏より供与頂いた。マウスメラノーマ細胞株 B16-F10 をはじめとする、その他の細胞株は東北大学加齢医学研究所より供与頂いた。

6-2) HSP105 の精製

HSP105 蛋白の精製にあたり、マウスの HSP105 の全長を遺伝子導入した大腸菌株を、京都薬科大学学生化学教室の石原慶一先生、畑山巧教授より供与頂いた (43)。この大腸菌を集菌し、ニッケルカラムを用いて蛋白を抽出し PBS で透析を行った。エンドトキシンは polymyxin B-Agarose で除去し、エンドトキシンの値は Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000 を用いて測定し、10EU/mg 以下のものを使用した。

図 7

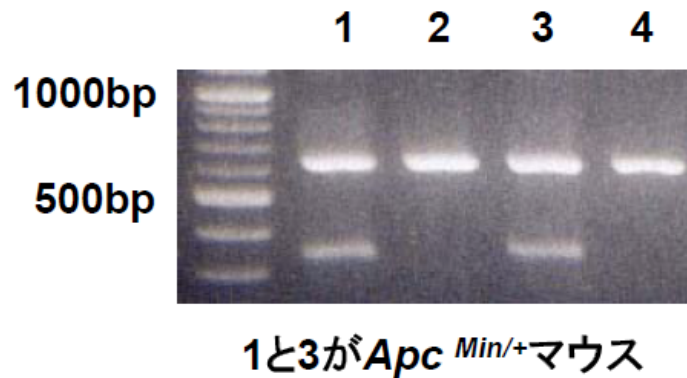


図 7. *Apc*^{Min} 変異遺伝子の検出

Apc^{Min/+}マウスを増やすために、オスの *Apc*^{Min/+}マウス（正常 *Apc* 遺伝子と変異 *Apc* 遺伝子のヘテロ接合のマウス）とメスの C57BL/6（正常 *Apc* 遺伝子のホモ接合のマウス）を交配した。*Apc*^{Min/+}マウスと C57BL/6 マウスが、1: 1 で生まれるため、*Apc*^{Min} 遺伝子を検出して *Apc*^{Min/+}マウスを同定した。使用したプライマーは、(1) 5'-TGAGAAAGACAGAAGTTA-3' (*Apc* 遺伝子の 2532-2549bp)、(2) 5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC-3' (*Apc* 遺伝子の 2859-2841bp)、(3) 5'-GCCATCCCTTCACGTTAG-3' (*Apc* 遺伝子の 2241-2258bp) である。ポジティブコントロールとして、(2) と (3) を用いた。このプライマーにより 618bp の DNA が増幅される。*Apc*^{Min/+}マウスを検出するプライマーとして、(1) と (2) を用いた。2549bp の T が A に変異している *Apc*^{Min/+}マウスのみ、329bp の DNA が増幅される。

6-3) HSP105 蛋白パルス骨髓由来樹状細胞 (HSP105-BM-DC) の作製

マウスの骨髓細胞から DC (bone marrow derived dendritic cell : BM-DC) を誘導した。誘導法に関しては先に報告した方法 (44) を用いた。つまり、マウスの大腿骨および脛骨より骨髓細胞を回収し、 5×10^6 個にマウスの GM-CSF を 5ng/ml の濃度で加え、10cm 培養プレート内で培養して誘導した。このようにして得られた BM-DC を HSP105 蛋白 $2 \mu\text{g/ml}$ と 16 時間インキュベートしたものを、HSP105 蛋白パルス骨髓由来樹状細胞 (HSP105-BM-DC) として使用した。

6-4) HSP105 パルスによる BM-DC の成熟に関する検討

HSP 投与により、DC が成熟するか否かという点について、相反する報告がある (45-48)。そこで我々は、HSP105 が BM-DC の成熟を誘導するか否かを確認するために、HSP105 のパルス前後での BM-DC の MHC クラス II、CD80、CD86 の発現についてフローサイトメトリーを用いて検討した。使用した抗体は、FITC conjugated anti-I-Ab (clone 28-16-8S; mouse IgG2a; Caltag, Burlingame, CA), R-PE-conjugated anti-mouse CD80 (clone RMMP-1; rat IgG2a; Caltag), R-PE-conjugated anti-mouse CD86 (clone RMMP-2; rat IgG2a; Caltag), FITC-conjugated mouse IgG2a control (clone G155-178; BD PharMingen), R-PE-conjugated rat IgG2a control (clone LO-DNP-16; Caltag) である。また、成熟刺激のポジティブコントロールとして TLR4 のアゴニストである LPS (lipopolysaccharide) を用いた。

6-5) ウエスタンブロッティング

様々なマウス細胞株の HSP105 の発現をウエスタンブロッティングにより検出した。目的の細胞を lysis buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH7.4, 1% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate), 10% glycerol, protease inhibitor tablet (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) で溶解した。各サンプルをアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。検出にはウサギポリクローナル抗 HSP105 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を 1 次抗体として使用し、HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を 2 次抗体として使用した。

6-6) HSP105-BM-DC の免疫によるマウスの腫瘍増殖予防実験

C57BL/6 マウスと BALB/c マウスへの免疫は、生後 6 週と 8 週の計 2 回行った。上記のように作成した 5×10^5 個の HSP105-BM-DC をマウスの腹腔内に投与した。2 回目の免疫から 2 週間後に、C57BL/6 マウスに対しては 1×10^4 個の B16-F10 を、BALB/c マウスに対しては 3×10^4 個の Colon26 を、それぞれ脇腹に皮下注し、腫瘍径および生存期間を観察した。また、*Apc*^{Min/+}マウスへの HSP105-BM-DC による免疫は生後 6 週、8 週、10 週の 3 回行い、生後 12 週の小腸の腫瘍個数の計測あるいは生存期間について観察を行った。これらのプロトコールを図 8 A に示す。コントロールとして、PBS、HSP105 パルスなしの BM-DC、無関係な蛋白として Myelin basic protein (MBP) でパルスした BM-DC (MBP-BM-DC) を免疫した。

6-7) HSP105-BM-DC による自己免疫現象の 誘導の有無に関する検討

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効であるが、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。HSP105-BM-DC を免疫したマウス、あるいは FOXM1 由来のエピトープペプチドを負荷した BM-DC を免疫された HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) の重要臓器 (脳、心臓、肝臓、腎臓、精巣等) におけ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 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の浸潤の有無により検討した。免疫したマウスの各臓器を採取し、抗 CD4 抗体 (clone L3T4; rat IgG2a; BD PharMingen, San Diego, CA) および抗 CD8 抗体 (clone Ly-2; rat IgG2a; BD PharMingen) にて免疫染色を施行した。脾臓はポジティブコントロールとして検討した。

6-8) 生体内における CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞の 除去下における腫瘍増殖予防実験

HSP105-BM-DC により誘導された抗腫瘍免疫応答における CD4 陽性 T 細胞、CD8T 細胞の重要性を検討するために、生体内の CD4 陽性 T 細胞、あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去し、前述のごとく、抗腫瘍免疫による癌予防実験を行った。CD4 抗体 (Rat monoclonal antibody GK1.5)、CD8 抗体 (Rat monoclonal antibody 2.43) は、それぞれのハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に投与し、腹水を採取することにより得た。腹水 100 μ l/mouse を腫瘍接種前に計 6 回 (腫瘍接種前 18 日、15 日、11 日、8 日、4 日、1 日) 腹腔内に投与し、腫瘍径および生存期間を観察した。Apc^{Min/+} マウスへの抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体の投与は生後 6 週から 9 週にかけて週 2 回の割合 (計 8 回) 行い、生後 10 週に小腸の個数の計測あるいは、生存期間を観察した。

また、ネガティブコントロールとして Rat IgG (Sigma, St. Louis, MO; 200 μ g/mouse) を投与した。実験のプロトコルを図 8 B に示す。

図 8

A

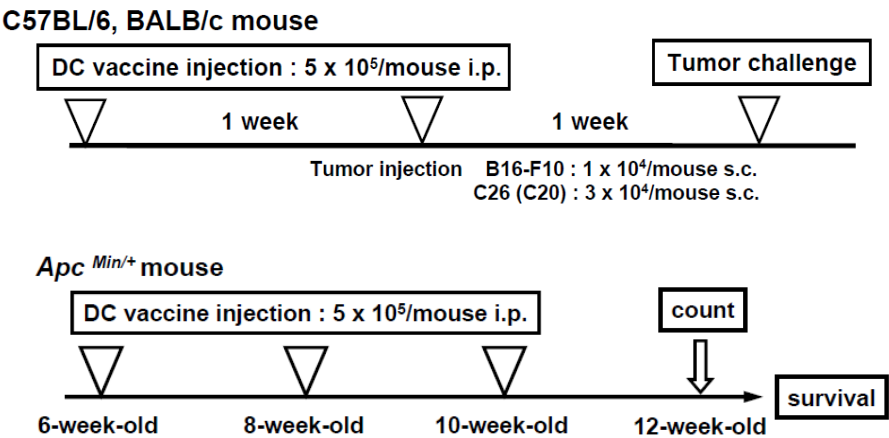


図 8 A. HSP105-BM-DC を免疫したマウスにおける腫瘍増殖予防実験のプロトコル

B

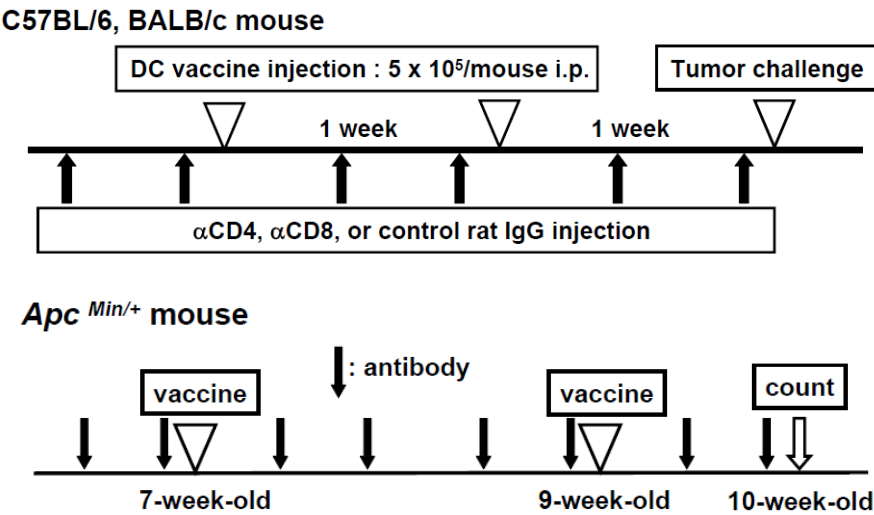


図 8 B. CD4 陽性 T 細胞、あるいは CD8 陽性 T 細胞を除去した状況下における HSP105-BM-DC の癌細胞増殖の予防効果を検討するための実験プロトコル

6-9) HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の検出

HSP105-BM-DC を免疫することにより、HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の検出を試みた。これまでと同様に、生後 6 週と 8 週の C57BL/6 マウスに HSP105-BM-DC を免疫し、生後 10 週に脾細胞を回収した。さらに、脾細胞からマイクロビーズ (Miltenyl Biotec 社) を用いて CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞を分離し、それぞれ別々に 24 穴プレート (3×10^5 /well) で培養した。さらに、in vitro で 3×10^4 /well の 45Gy で放射線照射した HSP105-BM-DC で 1 週間毎に 3 回 (回収した日、7 日後、14 日後) 刺激した。3 回の刺激後に HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の検出を、CD4 陽性 T 細胞については HSP105-BM-DC と共培養した際に観察される T 細胞増殖反応を ^3H -チミジン取り込み法により、または HSP105-BM-DC の存在下における IFN- γ の ELISPOT (enzyme-linked Immunospot) assay で、CD8 陽性 T 細胞については B16-F10 細胞を標的細胞にした ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験、または HSP105-BM-DC の存在下における IFN- γ の ELISPOT assay で検討した。

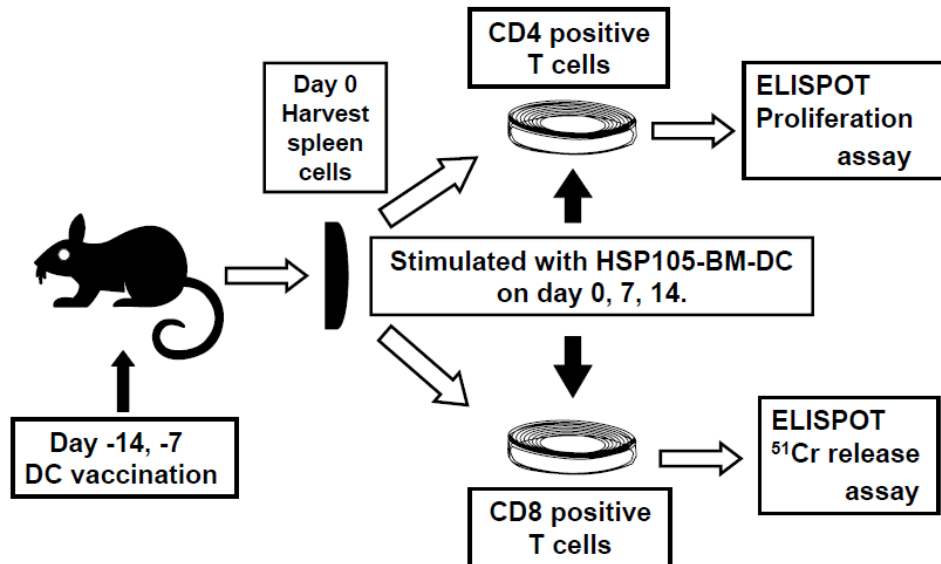
^3H -チミジン取り込み法による T 細胞増殖反応については、CD4 陽性 T 細胞を BM-DC, HSP105-BM-DC あるいは MBP-BM-DC のいずれかと共に 96 穴平底プレート中で 48 時間共培養後に ^3H を加えた。さらに 16 時間共培養し、 ^3H -チミジンの T 細胞内への取り込みを計測した。 ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験については、1 日目に B16-F10 細胞を ^{51}Cr で 1 時間ラベルした後に、96 穴平底プレートに 1 ウェルあたり、 1×10^4 個まいた。2 日目に B16-F10 細胞に対して、10、20、40 倍の数の CTL 細胞株を加え、4 時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された ^{51}Cr を測定した。ELISPOT assay については検出キット (BD Biosciences ELISPOT Set) のプロトコールに準じて行った。つまり、前日からマウス IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレートに培養液にて洗浄後、エフェクター細胞 ($100 \mu\text{L}$ /well) と標的細胞として BM-DC, HSP105-BM-DC あるいは MBP-BM-DC ($100 \mu\text{L}$ /well) を混合し、 37°C で 24 時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と 2 時間、さらにストレプトアビジン-HRP と 1 時間反応させ、基質溶液にて IFN- γ 陽性のスポットを

検出した。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置にて行った。

また、HSP105-BM-DC を投与した *Apc*^{Min/+}マウスにおける、HSP105 特異的 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の検出は *ex vivo* における HSP105-BM-DC に対する IFN- γ の ELISPOT assay で検討した。すなわち、生後 6 週、8 週に HSP105-BM-DC あるいは BM-DC で免疫されたマウスの脾細胞を生後 10 週で回収し、マイクロビーズを用いて CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を除いた。CD4 陽性 T 細胞を除いた群は CD8 陽性 T 細胞と APC として、CD8 陽性 T 細胞を除いた群は CD4 陽性 T 細胞と APC として用いた。この細胞群を HSP105 あるいは MBP を加える群、何も加えない群の 3 群に分け、前日からマウス IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレート上で、37°C で 24 時間培養し assay を行った。実験プロトコールの概略を図 9 に示す。

9

C57BL/6 mouse *in vitro* assay



***Apc*^{Min/+} mouse *ex vivo* assay**

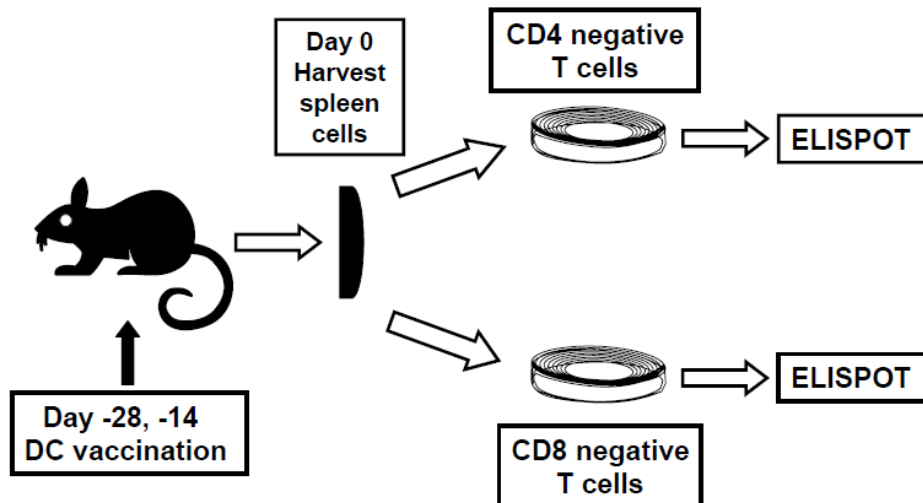


図 9. HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の検出
 上 : C57BL/6 マウスを HSP105-BM-DC で 2 回免疫後、脾細胞を *in vitro* で 3 回 HSP105-BM-DC
 で刺激し、ELISPOT assay あるいは ³H-チミジン取り込み法による T 細胞増殖反応や ⁵¹Cr
 放出法による細胞傷害試験を行なった。
 下 : *Apc*^{Min/+} マウスを HSP105-BM-DC で 2 回免疫後、脾細胞を用いて ELISPOT assay を行な
 った。

6-10) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍抗原遺伝子の同定

肝内胆管癌患者25人の癌部と非癌部の組織から抽出したRNAを、それぞれCy3とCy5にて標識後ターゲットDNAとし、ヒトで発現している27,648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リングを行った。

6-11) ノザンブロット解析と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。ノザンブロット解析では、20 μ g の各種total RNAをナイロンメンブレン (Hybond N+, アマシャム社) に転写したものに、FOXMI特異的な³²Pで標識したプローブをハイブリダイズさせ、FOXMI遺伝子の発現を検出した。また、各1 μ 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°C1分間、58°C1分間、72°C1分間で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特異的バンドを検出した。プライマーのシークエンスは、以下に示した。(FOXMIa、b、c の3つのスプライシングバリエントを分離できるプライマー)

5'-CACCCCAGTGCCAACCGCTACTTG-3'

5'-AAAGAGGAGCTATCCCCTCCTCAG-3'

(3つのスプライシングバリエントを分離できないプライマー)

5'-CCCTGACAACATCAACTGGTC-3'

5'-GTCCACCTTCGCTTTTATTGAGT-3'

6-12) FOXM1の免疫組織化学的解析

胆管癌や肺癌のホルマリン固定パラフィン包埋切片より免疫組織化学解析を行った。DakoCytomation EnVision+ System-HRP Labelled Polymer (DakoCytomation, Carpinteria CA, USA) を用いた。一次抗体には、マウス抗ヒトFOXM1 モノクローナル抗体 (Abnova, Taipei, Taiwan) を20倍希釈で用い、4℃で14 時間反応させた後にphosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。その後、Labelled Polymer-HRPと室温で30分反応させた後にPBS で洗浄し、さらにSubstrate-Chromogenと室温で30分反応させた。

6-13) FOXM1 由来の HLA-A2 結合モチーフを有するペプチド

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 FOXM 由来のアミノ酸配列をもつペプチドで HLA-A2 (A*0201) 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 23 種類選択 (表 2) し、Anygen 社 (Gwangju, South Korea) に合成を依頼し購入した。

表 2

HLA-A2 (A*0201) に結合すると予想されるヒト FOXM1 由来のペプチド

No.	Position	Sequence	Binding score
FOXM1-1	42-50	<u>N</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>V</u>	29
FOXM1-2	241-249	YMAMIQFAI	201
FOXM1-3	256-264	RMTLKDIYT	30
FOXM1-4	288-296	NLSLHDMFV	383
FOXM1-5	290-299	SLHDMFVRET	53
FOXM1-6	355-363	LLPRVSSYL	200
FOXM1-7	355-364	LLPRVSSYLV	118
FOXM1-8	362-370	YLVPIQFPV	1856
FOXM1-9	366-375	IQFPVNQSLV	44
FOXM1-10	373-382	SLVLQPSVKV	70
FOXM1-11	374-382	LVLQPSVKV	38
FOXM1-12	409-418	LL <u>A</u> <u>E</u> <u>E</u> GIAPL	342
FOXM1-13	429-438	LL <u>F</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>F</u> SPL	255
FOXM1-14	545-553	LL <u>F</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>P</u> ST	47
FOXM1-15	571-579	<u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>V</u>	26
FOXM1-16	616-625	KVGGIDFSPV	40
FOXM1-17	640-649	GLMDL <u>S</u> TTPL	324
FOXM1-18	660-669	<u>R</u> LL <u>S</u> SEPL <u>D</u> L	79
FOXM1-19	661-669	LL <u>S</u> SEPL <u>D</u> L	36
FOXM1-20	702-711	SLTEGLVLDT	70
FOXM1-21	711-719	TMNDSLKI	71
FOXM1-22	719-728	ILLDISFPGL	1047
FOXM1-23	720-728	LLDISFPGL	28

下線で示したアミノ酸は、ヒトとマウスで異なるものである。

6-14) HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定

HLA-A2トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) を用いた CTL エピトープの決定はKomoriらの報告 (49) に準じて行なった。HLA-A2 Tgmの骨髄細胞から先と同様の方法で BM-DC を誘導し、上記で決定したペプチド 4 または 5 種類の混合物 (各 10 μ M) と3時間インキュベートした後、HLA-A2 Tgm 一匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与した。1 週間の間隔をおいて 2 回免疫した後、マウスの脾細胞を回収して CTL の誘導に用いた。CD4 陽性 T リンパ球による非特異的反応の影響を除外するため、脾細胞は採取時 MACS Beads を用いて CD4 陽性 T リンパ球を取り除いたものを用いた (図 10)。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 CTL が産生する IFN- γ を ELISPOT 法にて検討した。

図 10

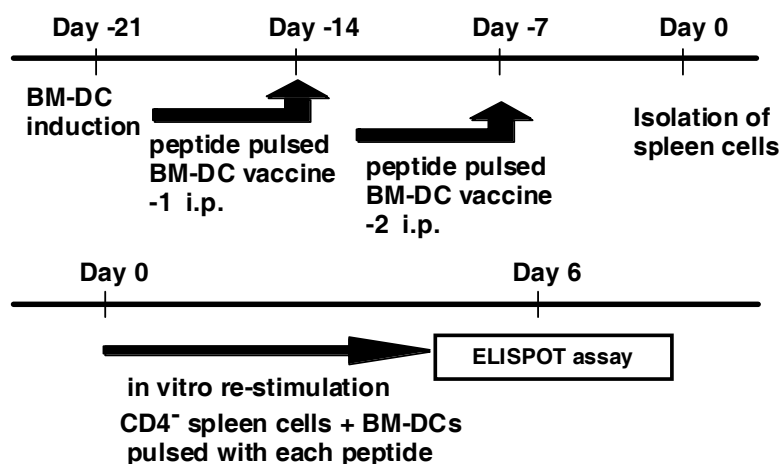


図 10. HLA-A2 Tgm を用いた FOXM1 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの同定法

CTL エピトープ同定のためのプロトコール。HLA-A2Tgm の BM-DC に HLA-A2 に結合すると予想される FOXM1 由来のペプチド 4-5 種類の混合物を負荷し、1 週間ごとに 2 回、 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与し、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 FOXM1 ペプチドを負荷したものと共培養し、6 日後に ELISPOT assay を行なった。

6-15) HLA-A2 陽性 PBMC からの FOXM1 反応性 CTL の誘導

HLA-A2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 (50) によって末梢血単核球細胞 (PBMC) を単離した。HLA-A2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-A2 (SIGMA Saint-louis USA)。HLA-A2陽性のPBMCを、CTLエピトープ候補ペプチドで刺激し、HLA-A2 (A*0201) 拘束性にペプチドを認識する細胞株を東京大学医科学研究所の方法に準じて行なった (51)。具体的な方法を、図11および以下に示す。

まず全血よりFicoll-Conrey密度勾配遠心法にてPBMCを分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec社) を用いてCD8陽性細胞とCD8陰性細胞に分離した。CD8陽性細胞は凍結保存した。CD8性細胞をGM-CSF (100 ng/ml) と、IL-4 (100 U/ml) を添加した2%自己血清入りのAIM-Vメディウムで培養し、5日目にOK-432 (0.1KE/ml) を加え、成熟DCに分化させ、抗原提示細胞として使用した。この樹状細胞に10 μ Mのペプチドを加え3時間後に45Gyの放射線を照射した。48穴プレートに1ウェルあたりDCを 1.5×10^4 個と、凍結保存しておいた 3×10^5 個のCD8陽性細胞を加え培養した。第0日目にIL-7 (10 ng/ml) を、第2日目にIL-2 (20 U/ml) を加えた。第7日および第14日に同様のDCで再刺激し、第20日目にIFN- γ のELISPOT assay、または ^{51}Cr 放出試験を行なった。

図11

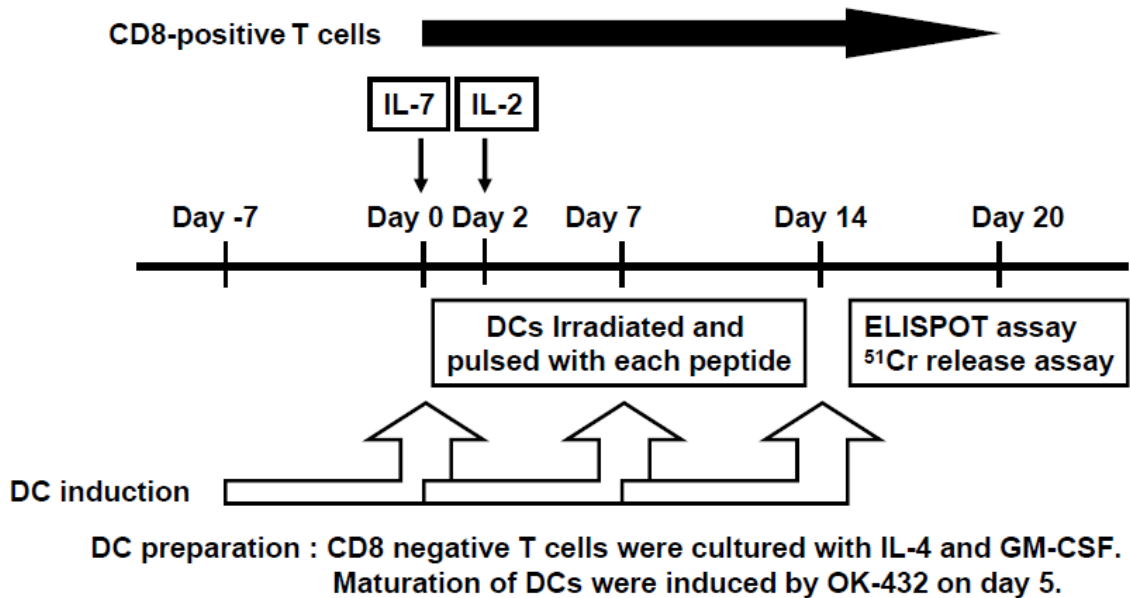


図11. 腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTL株の樹立法

末梢血からPBMCを分離し、MACSビーズによりCD8陽性細胞とCD8陰性細胞に分離した。CD8陰性細胞を、GM-CSFとIL-4の存在下に樹状細胞へと誘導させた。5日目にOK-432を添加し、成熟樹状細胞に分化させた。この成熟細胞に10 μ Mのペプチドを加え、3時間培養した後、45Gyの放射線を照射した。この樹状細胞とCD8陽性細胞を加え培養した。同様の樹状細胞でCD8陽性T細胞を1週間ごとに3回刺激し、assayを行なった。

6-16) 細胞傷害活性の検討

ペプチド特異的 CTL の誘導の確認は、TAP 欠損細胞株 T2 細胞 (HLA-A*0201 陽性) を標的細胞にした IFN- γ の ELISPOT assay により行った。T2 細胞を 26°C で 16 時間培養後、エピトープ候補のペプチドと 37°C で 3 時間培養したものと、ペプチドを加えなかったものを用いた。こうして得られた T2 細胞とペプチドで誘導された CTL を 24 時間反応させ、2 群間の IFN- γ 産生細胞のスポット数を比較した。

FOXM1 反応性 CTL の誘導の確認は、HLA-A2 陽性で FOXM1 を発現している膵臓癌細胞株 panc-1、および HLA-A2 陰性で FOXM1 を発現している膵臓癌細胞株 PK-8 を用いて細胞傷害活性を測定した。 ^{51}Cr 放出法による細胞傷害の定量は、1 日目に細胞を ^{51}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、 5×10^3 個まき、2 日目にターゲット細胞に対して、10、20、40 倍の数の CTL 細胞株を加え、4 時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された ^{51}Cr を測定することにより行なった。

7 実験結果

7-1) HSP105 は BM-DC の成熟を誘導しない

マウスの骨髄細胞から樹状細胞を誘導し、 $2\mu\text{g/ml}$ の HSP105 をパルスしたもの (HSP105-BM-DC) とパルスしていないもの (BM-DC) を用意し、16 時間後に MHC class II、CD80、CD86 の発現についてフローサイトメトリーを用いて検討した。DC 成熟刺激のポジティブコントロールとして $1\mu\text{g/ml}$ の LPS をパルスした 16 時間後の樹状細胞 (LPS-BM-DC) を用いた。図 12 に示すように BM-DC と HSP105-BM-DC における、これらの分子の発現は同程度であり、LPS-BM-DC と比べると発現量は小さかった。この結果より、HSP105 は DC の成熟を誘導しないことが示された。

7-2) マウスの癌細胞株および正常組織における HSP105 の発現

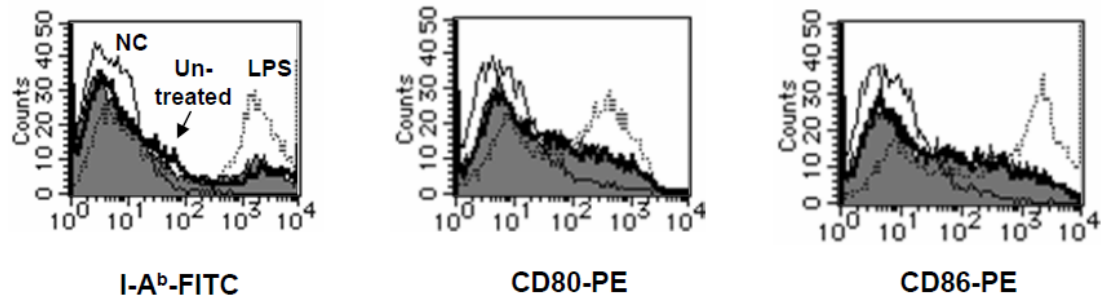
C57BL/6 (H-2^b) および BALB/c (H-2^d) の癌細胞株における HSP105 の発現をウェスタンブロットで検討したところ、すべての癌細胞株において蛋白質レベルで発現を認めた (図 13 A)。また、マウスの正常組織における発現を免疫染色で検討したところ、精巣に癌細胞株の転移巣と同レベルの強い発現を、脳に弱い発現を認め、肺、肝臓、心臓、腎臓などの主要臓器には発現を認めなかった (図 13 B)。さらに、転移巣における HSP105 の発現は均一であった。

Apc^{Min/+}マウスの腺腫についても HSP105 の発現について検討した。生後 14 週の *Apc*^{Min/+}マウスの小腸に発生した腺腫を免疫染色にて検討したところ、腺腫の部分に一致して HSP105 の強い発現を認めた (図 13 C)。また、*Apc*^{Min/+}マウスの腫瘍を含む小腸と C57BL/6 の小腸を、それぞれ 3 匹のマウスから摘出してホモジナイズし、ウェスタンブロットで HSP105 の発現を検討したところ、*Apc*^{Min/+}マウスの腫瘍を含む小腸においてのみ、HSP105 の強い発現を認めた (図 13 D)。

これらの結果より、マウスにおいて HSP105 は腫瘍免疫療法の有望な標的である可能性が強く示唆されたため、以下の実験を行った。

図 12

A



B

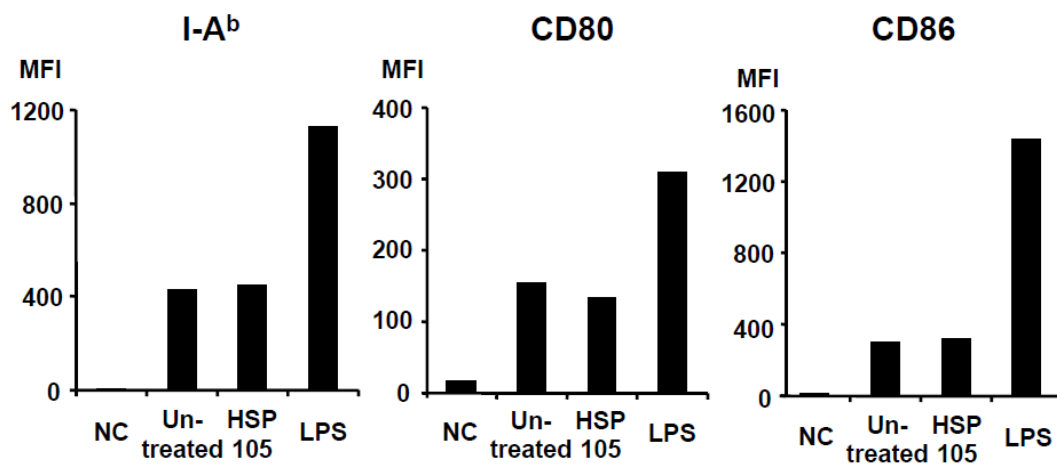
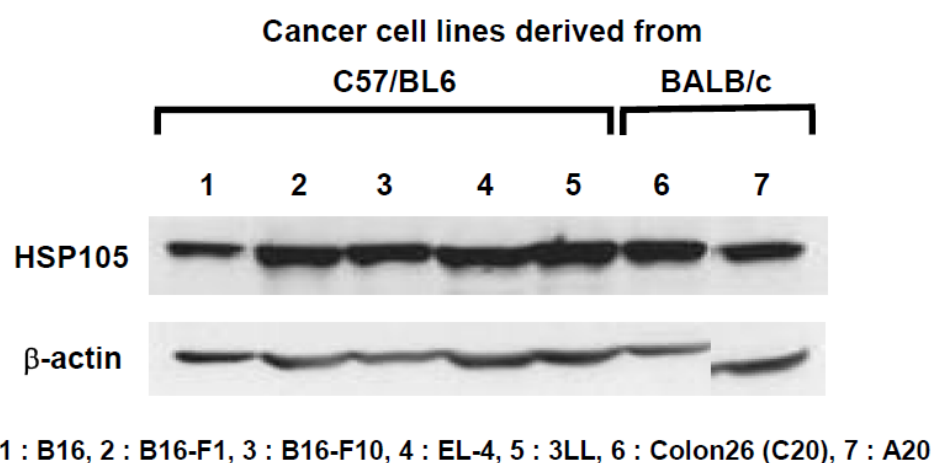


図 12. HSP105 は BM-DC の成熟を誘導しない

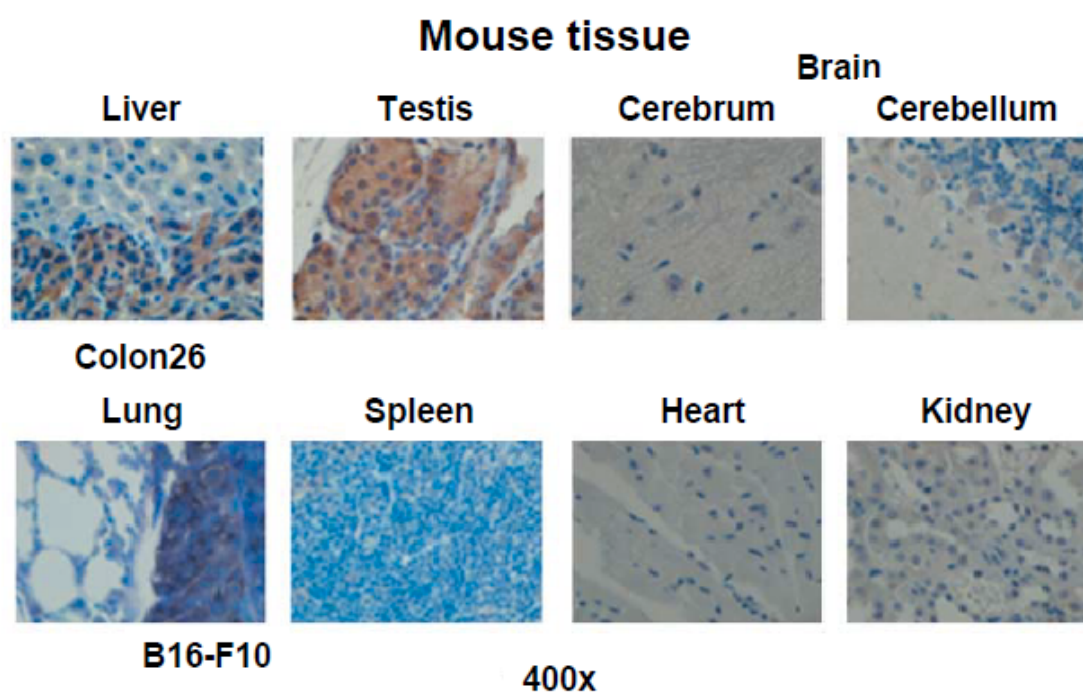
フローサイトメトリーによるBM-DC、HSP105-BM-DC、LPS-BM-DCの細胞表面のMHCクラスII、CD80、CD86の発現解析。HSP105-BM-DCはBM-DCに2 g/mlのHSP105を、LPS-BM-DCはBM-DCに1 μ g/ml のLPSを加え、16時間経過したものを解析に用いた。(A) HSP105-BM-DC (塗りつぶされた部)、LPS-BM-DC (点線 : LPS)、何も加えていないBM-DC (濃線 : Un-treated)、アイソタイプが一致した免疫グロブリンのコントロール (薄線 : NC) の発現。(B) これらの細胞における、MHCクラスII、CD80、CD86のmean fluorescence intensity (MFI)。このような実験を3回行い、同様の結果を得た。

図 13

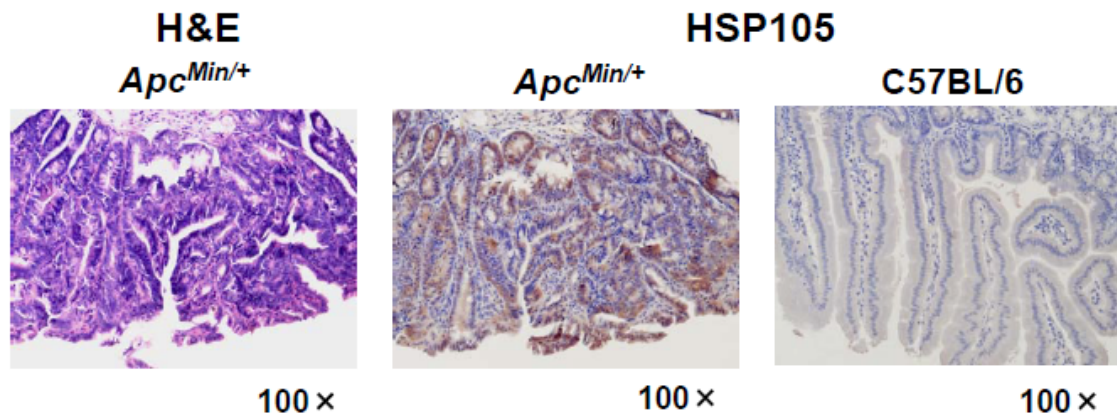
A



B



C



D

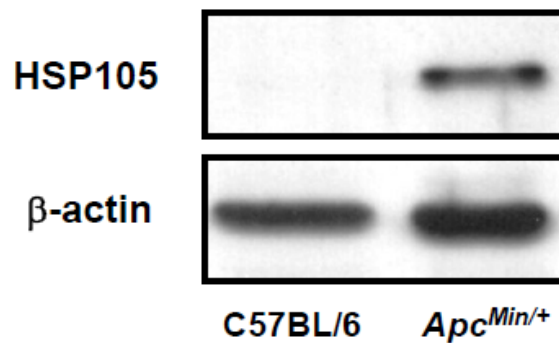


図 13. マウスにおける HSP105 の正常組織、腫瘍細胞株、腫瘍組織での発現

(A) Western blot によるマウス C57BL/6 (H-2^b) および BALB/c (H-2^d) 由来の様々な腫瘍細胞株における HSP105 の発現解析。(B) 免疫染色によるマウスの正常臓器ならびに皮下に移植した Colon26、あるいは B16-F10 細胞株が形成した腫瘍組織における HSP105 の発現解析。(C) 免疫染色による *Apc*^{Min/+} マウスから自然発生した腸管腫瘍における HSP105 の発現解析。生後 12 週の *Apc*^{Min/+} マウスを用いた。(D) Western blot による *Apc*^{Min/+} マウスの腸管における HSP105 の発現解析。生後 4 ヶ月の *Apc*^{Min/+} マウスおよび C57BL/6 マウスをそれぞれ 3 匹ずつ使用した。

7-3) HSP105-BM-DC で免疫したマウスにおける抗腫瘍免疫の誘導

HSP105 を標的とする抗腫瘍免疫療法を行なうにあたり、最も強い抗原提示能を有するとされる樹状細胞を用いた免疫療法を選択した。前の 5-6) 樹状細胞を用いた癌の細胞免疫療法で述べたように、効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導するには、CD8 陽性 T 細胞だけでなく CD4 陽性 T 細胞も活性化させる必要があることより、樹状細胞に HSP105 由来のエピトープペプチドではなく、HSP105 蛋白をパルスした。

C57BL/6 マウスあるいは BALB/c マウスに皮下接種された B16-F10 あるいは Colon26 は、HSP105-BM-DC の投与によって、他の群と比較して有意に増殖が抑制されており、8 匹中 5 匹中の C57BL/6 マウス、8 匹中 5 匹中の BALB/c マウスにおいて腫瘍が完全に拒絶された (図 14 A)。

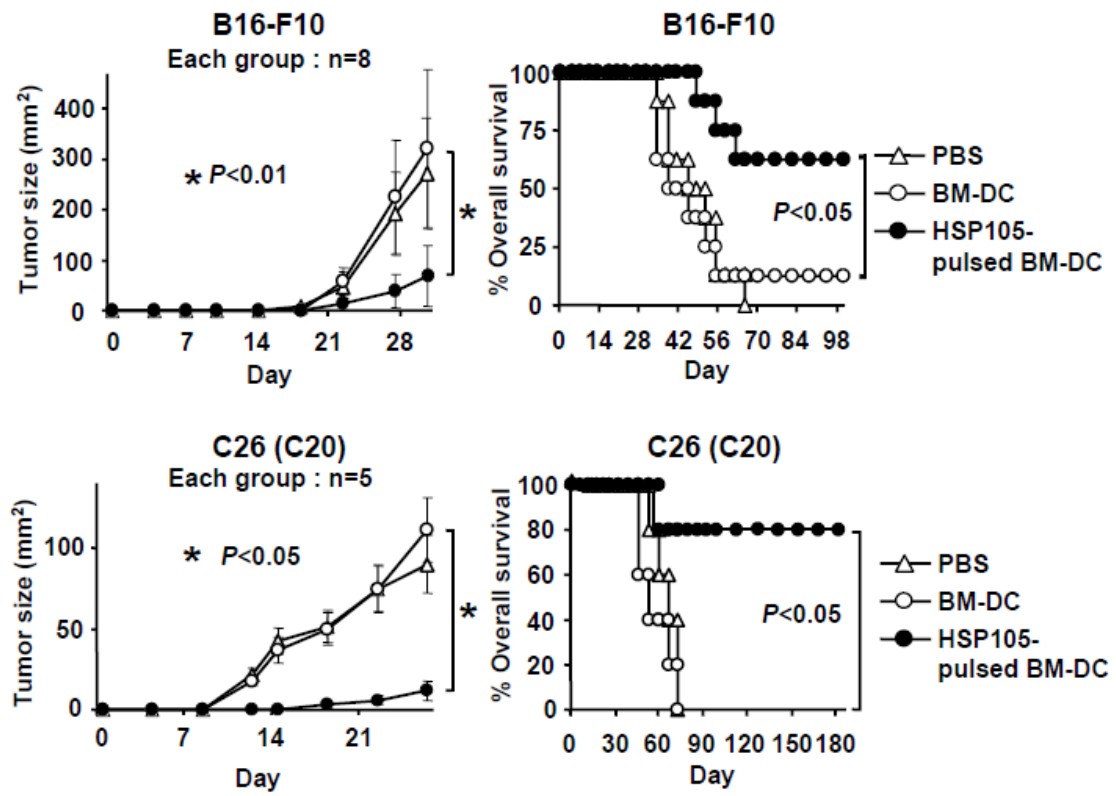
Apc^{Min/+}マウスの腺腫の個数についても、HSP105-BM-DC 投与によって、他の群と比較して小腸の腺腫の個数が有意に減少し、統計学的有意差は認められなかったものの、HSP105-BM-DC 投与群のマウスにおいて生存が延長する傾向が認められた (図 14 B)。

7-4) HSP105-BM-DC を免疫されたマウスには 自己免疫現象は観察されない

腫瘍予防実験と同様のプロトコールで HSP105-BM-DC を 2 回免疫されたマウスについて、大脳、心臓、肺、肝臓、腎臓などの重要臓器への CD4 陽性細胞または、CD8 陽性細胞の浸潤を免疫染色にて検討したところ、細胞浸潤を認めず自己免疫反応は生じていないものと判断した (図 15)。また、外見上もマウスに自己免疫現象を示唆するような体重減少、麻痺等の所見は認められなかった。

図 14

A



B

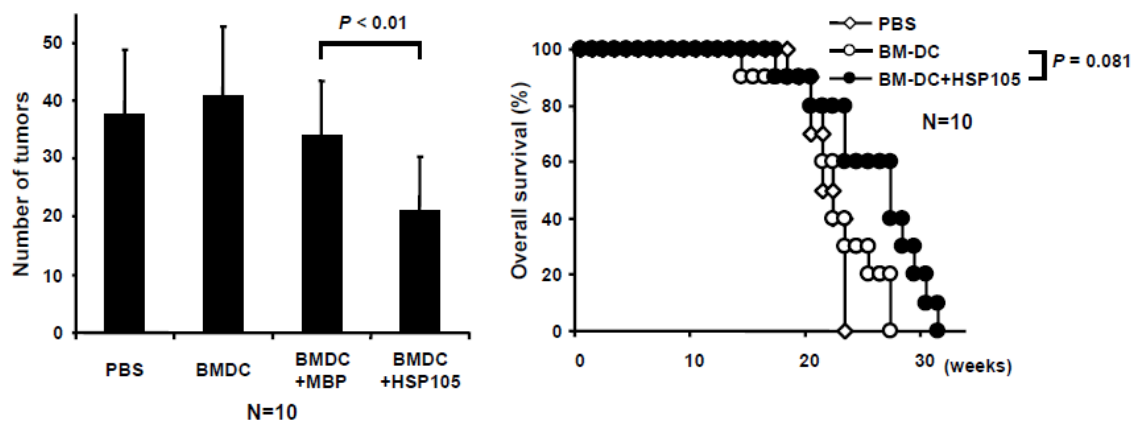


図 14. HSP105-BM-DC で免疫したマウスにおける抗腫瘍免疫の誘導

(A) C57BL/6およびBALB/cマウスにおける腫瘍予防実験。図6 Aに示すように、腫瘍を皮下に移植する14日前、7日前に、PBS、 5×10^5 個/マウスのBM-DCあるいはHSP105-BM-DCをマウスの腹腔内に投与した。二回目の投与から7日後に、C57BL/6マウスには 1×10^4 個/マウスのB16-F10を、BALB/cマウスには 3×10^4 個/マウスのColon26を皮下注射し、腫瘍の大きさ、マウスの生存期間について観察した。左：腫瘍の大きさ 右：生存率 (B) C57BL/6およびBALB/cマウスにおける腫瘍予防実験。図6 Aに示すように、生後6週の $Apc^{Min/+}$ マウスに、PBS、 5×10^5 個/マウスのBM-DC、MBP-BM-DC、あるいはHSP105-BM-DCを腹腔内に投与した。生後8週、生後10週にも、同様の投与を行なった。左：生後12週における全小腸における腫瘍の個数を肉眼で観察した。右：生存期間を調べた。

図 15

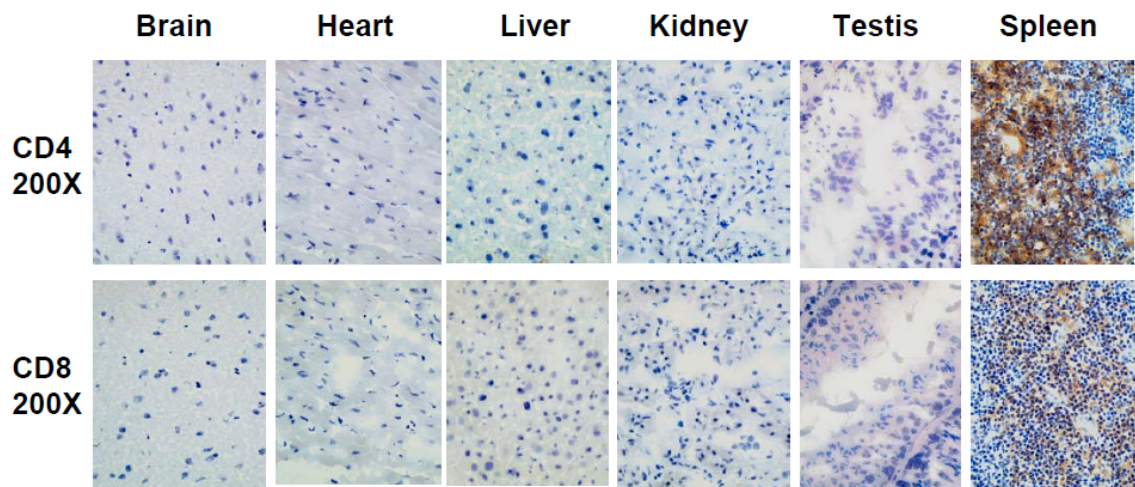


図 15. HSP105-BM-DC を免疫されたマウスは自己免疫現象は観察されない

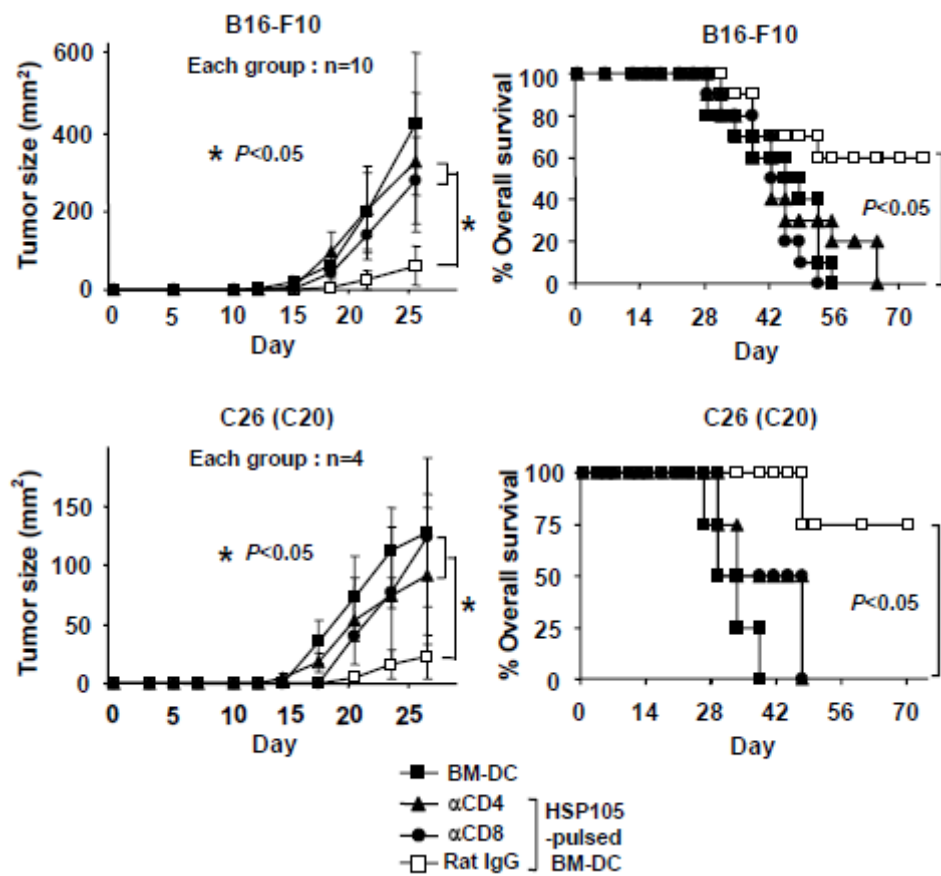
HSP105-BM-DC を 2 回免疫したマウスの主要臓器を回収し、CD4 と CD8 の免疫染色を行い陽性細胞の浸潤の有無を検討することにより、自己免疫反応の有無について検討した。ポジティブコントロールとして脾臓を用いた。

7-5) CD4 陽性細胞あるいは CD8 陽性細胞を除去したマウスにおける 抗腫瘍免疫の消失

次に、これらの抗腫瘍免疫応答における CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の重要性を検討するために、生体内で CD4 陽性細胞または、CD8 陽性細胞を除去した状態におけるマウスの抗腫瘍予防実験を行った。CD4 陽性細胞または、CD8 陽性細胞を除去されたマウスは C57BL/6 マウス、BALB/c マウス、*Apc^{Min/+}*マウスのいずれにおいても HSP105-BM-DC の免疫による抗腫瘍免疫効果が認められなくなっており、CD4 陽性細胞または、CD8 陽性細胞を除去された C57BL/6 マウスは全て 70 日以内に死亡した (図 16 A)。同様に、*Apc^{Min/+}*マウスの腺腫の個数の減少も認められなくなった (図 16 B)。以上の結果より、HSP105-BM-DC の免疫による抗腫瘍免疫効果には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞のいずれも重要であることが確認された。

図 16

A



B

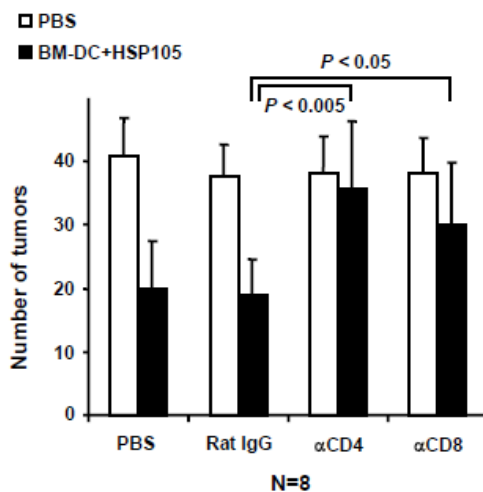


図 16. 生体内における CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を
除去したマウスにおける抗腫瘍免疫の消失

(A) 図6Bに示すように、C57BL/6マウスおよびBALB/cマウスに、抗CD4抗体、抗CD8抗体、ネガティ

ブコントロールとしてrat IgGあるいはPBSを腫瘍接種前に6回にわたって腹腔内に投与し、HSP-BM-DCあるいはBM-DCを免疫したマウスに腫瘍株を接種し、腫瘍の大きさと生存期間について検討した。左：腫瘍の大きさ 右：生存曲線。(B) 同様に、図6Bに示すように、*Apc*^{Min/+}マウスに、抗CD4抗体、抗CD8抗体、ネガティブコントロールとしてrat IgGあるいはPBSを生後6週から8週に8回にわたって腹腔内に投与し、HSP105-BM-DCあるいはPBSで免疫された*Apc*^{Min/+}マウスの生後10週における全小腸の腫瘍の個数について検討した。

7-6) HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞ならびに CD8 陽性 T 細胞の存在

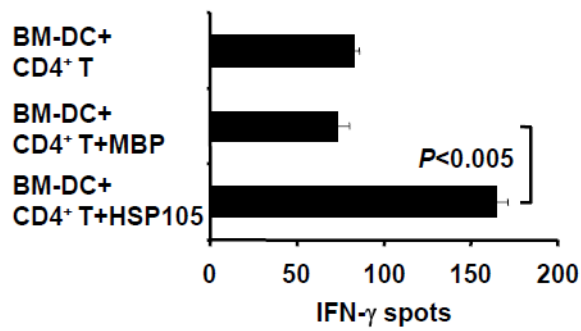
次に、実際に HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞が HSP105-BM-DC を投与されたマウスにおいて誘導されているか否かについて検討した。

HSP105-BM-DC で 2 回免疫された C57BL/6 マウス由来の CD4 陽性 T 細胞を *in vitro* でさらに 3 回 HSP105-BM-DC で刺激し、³H-チミジン取り込み法による T 細胞増殖反応、IFN- γ の ELISPOT assay で CD4 陽性 T 細胞の特異的反応について検討したところ、HSP105-BM-DC に対する反応が MBP-BM-DC や BM-DC に対する反応と比べて有意に大きかった (図 17 A, B)。また、同様に HSP105-BM-DC で 2 回免疫された C57BL/6 マウス由来の CD8 陽性 T 細胞を *in vitro* でさらに 3 回 HSP105-BM-DC で刺激し、IFN- γ の ELISPOT assay で CD8 陽性 T 細胞の特異的反応について検討したところ、HSP105-BM-DC に対する反応が MBP-BM-DC や BM-DC に対する反応と比べて有意に大きかった。さらに、B16-F10 細胞を標的細胞にした ⁵¹Cr 放出法による細胞傷害試験では、同様の操作を BM-DC で行なった CD8 陽性 T 細胞と比較して、HSP105-BM-DC を免疫されたマウス由来の CD8 陽性 T 細胞において有意に B16-F10 細胞に対する細胞傷害が強く認められた (図 17 C, D)。また、HSP105-BM-DC あるいは BM-DC で 2 回免疫された *Apc*^{Min/+} マウス由来の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の HSP105-BM-DC に対する反応を IFN- γ の ELISPOT assay (*ex vivo*) で検出したところ、HSP105-BM-DC で免疫された *Apc*^{Min/+} マウス由来の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞においてのみ HSP105-BM-DC で刺激したときに有意に多くの IFN- γ 産生細胞が検出された (図 17 E)。これらの結果より、HSP105-BM-DC で免疫することにより、確かに HSP105 特異的な CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞を誘導することができることが確認された。

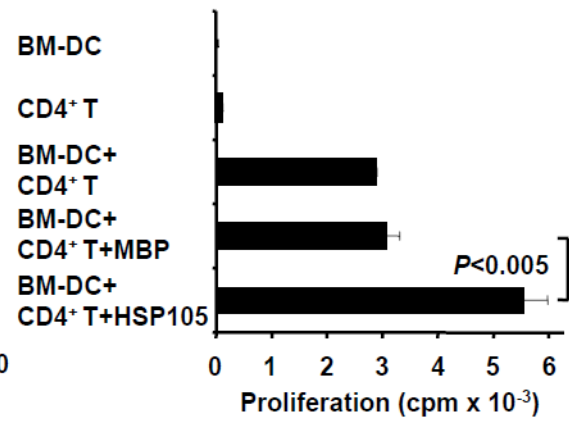
また、HSP105-BM-DC で免疫された C57BL/6 マウスおよび *Apc*^{Min/+} マウスの腫瘍内部には、BM-DC で免疫されたマウスよりも有意に CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の浸潤が認められ、HSP105-BM-DC で免疫されたマウスの腫瘍内には TUNEL 染色陽性の細胞が認められたことより (図 18)、これらの細胞は HSP105 特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞であり、腫瘍細胞を傷害しているものと推察された。

図 17

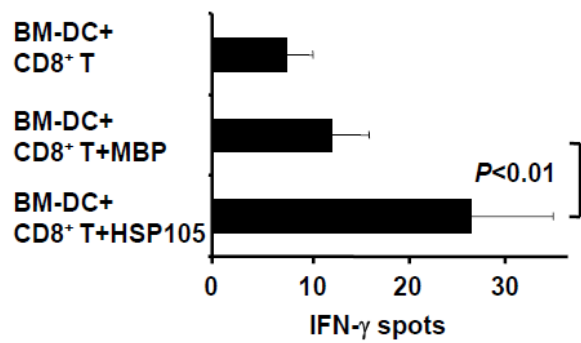
A



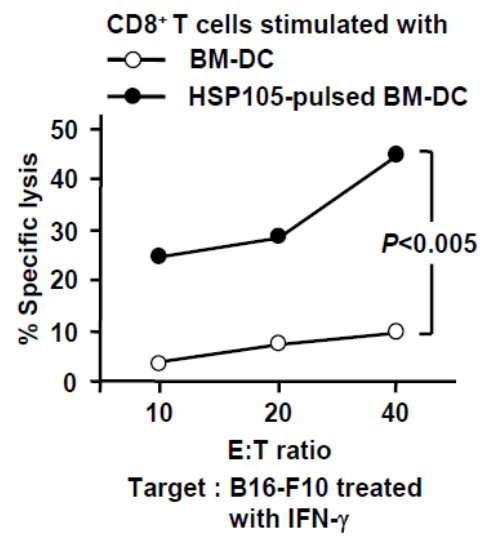
B



C



D



E

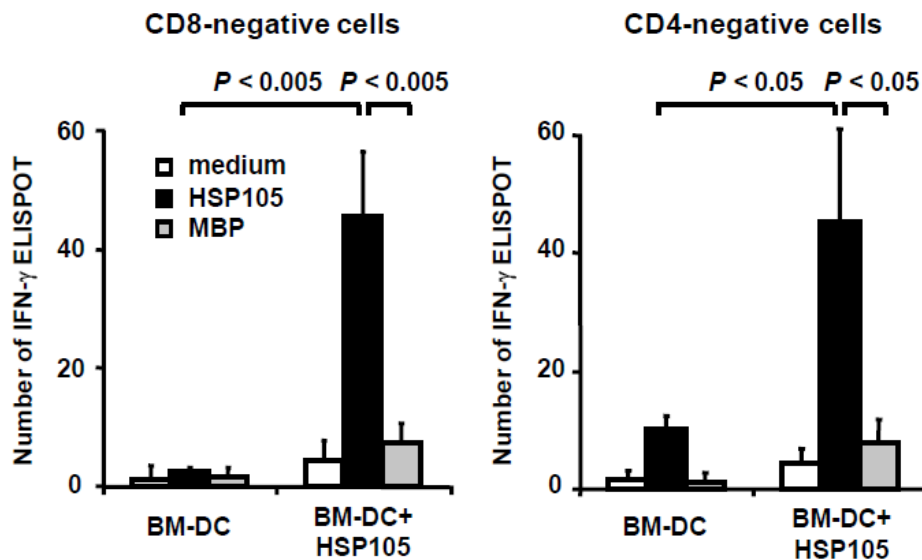


図 17. HSP105 に特異的に反応する CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の存在

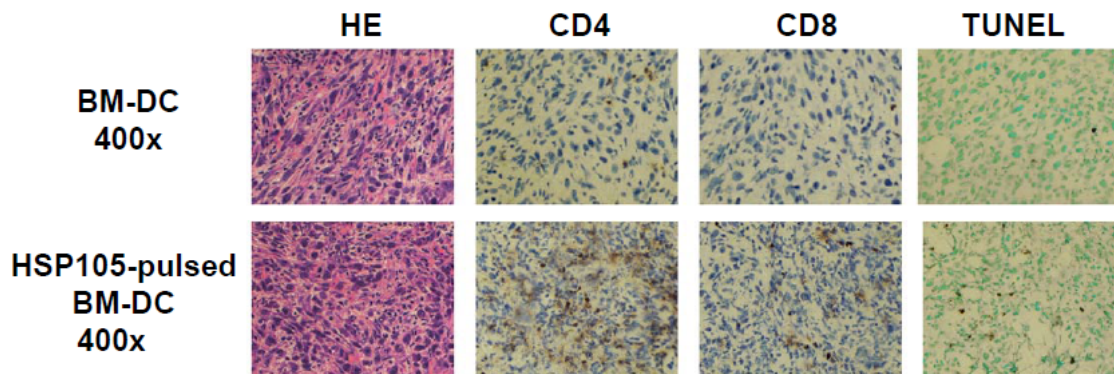
HSP105-BM-DCで2回免疫したC57BL/6マウス由来の脾細胞よりCD4陽性細胞を分離し、*in vitro*でHSP105-BM-DCでさらに3回刺激し、IFN- γ のELISPOT解析 (A) あるいは ^3H -チミジン取り込み法によるT細胞増殖反応試験 (B) を行なった。抗原提示細胞として、BM-DC、HSP105-BM-DC、MBP-BM-DCを用いた。同様にして得られたCD8陽性細胞に対し、IFN- γ のELISPOT解析 (C) あるいは ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験 (D) を行なった。標的細胞として、(C) に関してはBM-DC、HSP105-BM-DC、MBP-BM-DCを用い、(D) に関してはIFN- γ 処理したB16-F10を用いた。ネガティブコントロールとしてBM-DCで免疫したマウス由来のCD8陽性細胞を、*in vitro*でBM-DCでさらに3回刺激したものを用いた。

Apc^{Min/+}マウスに関しては*ex vivo*での検出を試みた。すなわち、HSP105-BM-DCで2回免疫したマウスの脾細胞から、CD8陽性細胞あるいはCD4陽性細胞を除き、CD8陽性細胞を除いた細胞はCD4陽性細胞と抗原提示細胞の細胞群として用い、CD4陽性細胞を除いた細胞はCD8陽性細胞と抗原提示細胞の細胞群として用い、*in vitro*で刺激することなくIFN- γ のELISPOT解析を行なった。標的細胞として、BM-DC、HSP105-BM-DC、MBP-BM-DCを用いた。ネガティブコントロールとしてBM-DCで免疫したマウス由来の細胞を用いた。

これらの実験は全て3回施行し、同様の結果を得た。

図 18

A



B

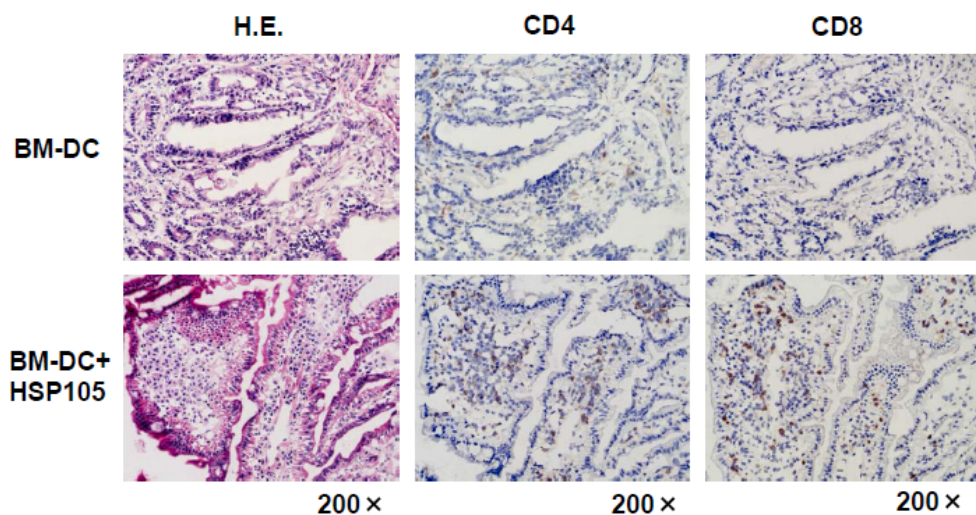


図 18. 腫瘍内に浸潤した CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の検出

HSP105-BM-DCを免疫したC57BL/6マウス (A) あるいは *Apc*^{Min/+}マウス (B) に発生した腫瘍組織を CD4あるいはCD8に特異的な抗体で染色し、腫瘍内へのCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の浸潤の有無について検討した。C57BL/6に関しては、TUNEL染色を行い、アポトーシス細胞の有無についても検討した。コントロールとしてBM-DCで免疫したマウス由来の腫瘍を用いた。

7-7) cDNA マイクロアレイ解析を用いた肝内胆管癌における 腫瘍拒絶抗原 FOXM1 の同定

肝内胆管癌患者25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、25例中15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18種類選び出した（図19）。選んだ18種類の遺伝子の正常組織での発現を確認後、FOXMIを腫瘍拒絶抗原候補として選択した（図20）。その結果、FOXMI遺伝子は25例中24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、癌部の非癌部に対する比の平均は106,710と18種類の遺伝子の中で、最も癌組織に高発現している遺伝子であった。また、正常および胎生期の組織において、FOXMIは胎児肝で高い発現が認められ、精巣、胸腺、骨髓、小腸で軽度の発現が認められたが、その発現は癌と比べると著しく小さかった。

近年、FOXMIはcDNAマイクロアレイを用いた解析により様々な癌種で高発現していることが報告されている（17, 52-57）。そこで、我々は肝内胆管癌以外の20種類の癌種におけるFOXMI遺伝子の発現解析を同様の手法で行なったところ、これまでの報告と同様に様々な癌種でFOXMI遺伝子の高発現を認め、特に小細胞肺癌、膀胱癌、膵癌、非小細胞肺癌といった癌種で高発現を認める頻度が高かった（表3）。そこで、肝内胆管癌だけでなく、全世界において症例が多い（58）、非小細胞肺癌についても解析を行なうこととした。

また、エピトープペプチドを用いた免疫療法を考慮する際に、腫瘍の免疫逃避として観察されるMHCクラス I 発現の消失が大きな問題となる。そこで、解析に用いた肝内胆管癌25症例の癌部と非癌部におけるMHCクラス I 発現の解析も行なったところ、明らかなMHCクラス I 発現の消失は認められなかった（図21）。

図19

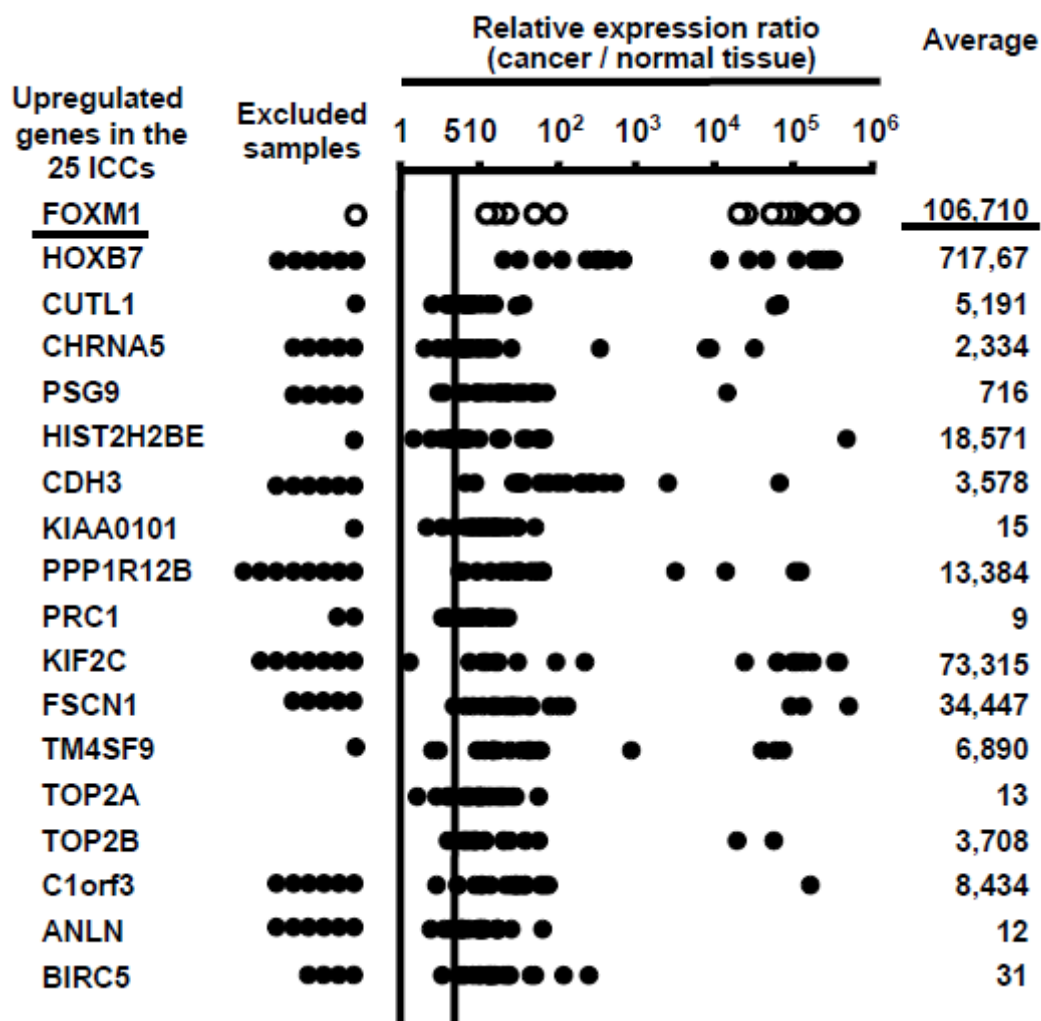


図19. 肝内胆管癌のcDNAマイクロアレイ解析

これらの18種類の遺伝子は、肝内胆管癌25例中20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、FOXM1を免疫療法の標的抗原の候補として選択した。FOXM1遺伝子は、25例中24例において非癌部より癌部で5倍以上（平均106,710倍）の発現増加がみられる遺伝子であった。

図20

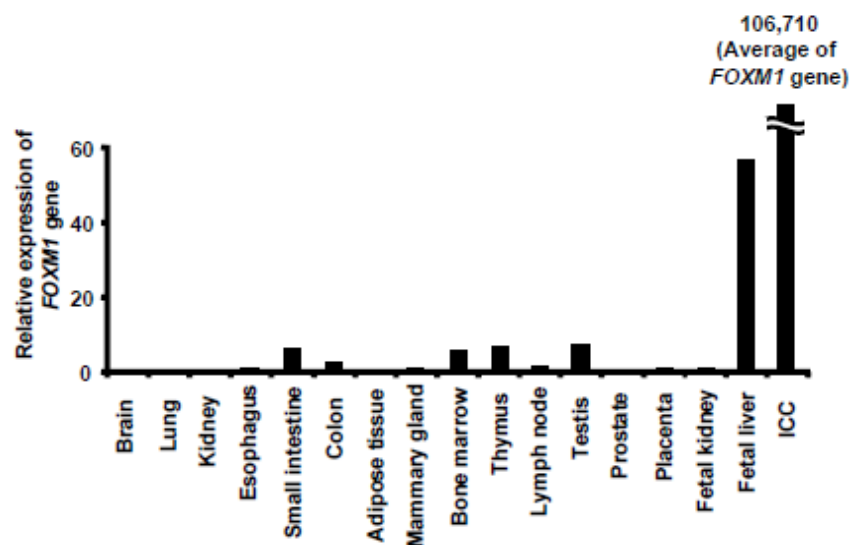


図20. cDNAマイクロアレイ解析による正常組織における
*FOXM1*遺伝子の発現解析

正常および胎生期の組織における*FOXM1*遺伝子の発現をcDNAマイクロアレイにより解析したところ、*FOXM1*遺伝子は胎児肝のみに高発現していたが、他の成人正常組織における発現は、非常に低かった。

図 21

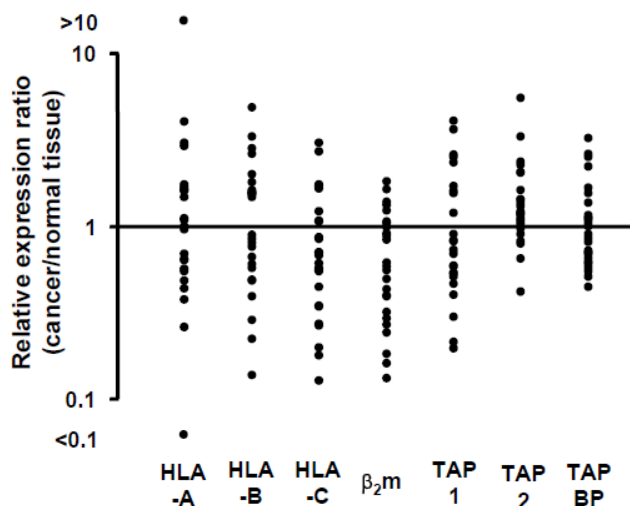


図 21. 肝内胆管癌 25 例における MHC クラス I 関連遺伝子の発現解析

FOXM1 の同定に使用した肝内胆管癌 25 例における、MHC クラス I 関連遺伝子の癌部と非癌部の発現の比。MHC 関連遺伝子の明らかな発現低下は認められなかった。

表 3

様々な癌腫における FOXM1 遺伝子の発現

Cancer	Frequency of FOXM1 overexpressing tumors		Average of rate	References
	N	%		
Cholangiocarcinoma	24/24	100 %	106,710	52
Bladder cancer	32/32	100 %	10,220	
Small cell lung cancer	15/15	100 %	50	
Pancreatic cancer	9/10	90 %	100,415	53
Non small cell lung cancer	17/22	77 %	49,377	54
Carcinoma of the uterine cervix	14/19	74 %	2,698	
Ovarian Cancer	6/ 9	67 %	36	
Malignant lymphoma	13/20	65 %	5,807	
Mammary cancer	32/49	65 %	4,693	55
Gastric cancer	17/28	61 %	26,081	
Esophageal cancer	36/62	58 %	28,464	17
Prostate Cancer	17/30	57 %	11	56
Hepatocellular carcinoma	7/14	50 %	20,545	57
Colon cancer	13/29	45 %	9,567	
Chronic myelogenous leukemia	18/42	43 %	9,079	
Renal cell carcinoma	2/10	20 %	4	
Soft tissue sarcoma	9/60	15 %	465	
Osteosarcoma	2/20	10 %	2	
Acute myelogenous leukemia	3/31	10 %	2	
Seminoma	0/11	0 %	2	
Neuroblastoma	0/10	0 %	1	
Endometriosis	0/ 6	0 %	0.4	

7-8) 癌細胞株、癌組織および正常組織におけるFOXM1の発現解析

23種類の肺癌細胞株、3種類の肝内胆管癌細胞株および2種類の肝癌細胞株、15例の肺癌組織における*FOXMI*遺伝子の発現をRT-PCR (図22 A) にて、また、27種類の正常組織における*FOXMI*遺伝子の発現をノザンブロット解析 (図22 B) にて確認した。その結果、調べた癌細胞株と肺癌組織のすべてにおいて*FOXMI*遺伝子の発現を認めた。また、*FOXMI*遺伝子は正常組織において、精巣に強い発現が認められ、胸腺、小腸、胃では弱い発現が認められた。さらに、肝内胆管癌および肺癌の組織をFOXMIモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行なったところ、FOXMIの発現を認めた (図22 C)。

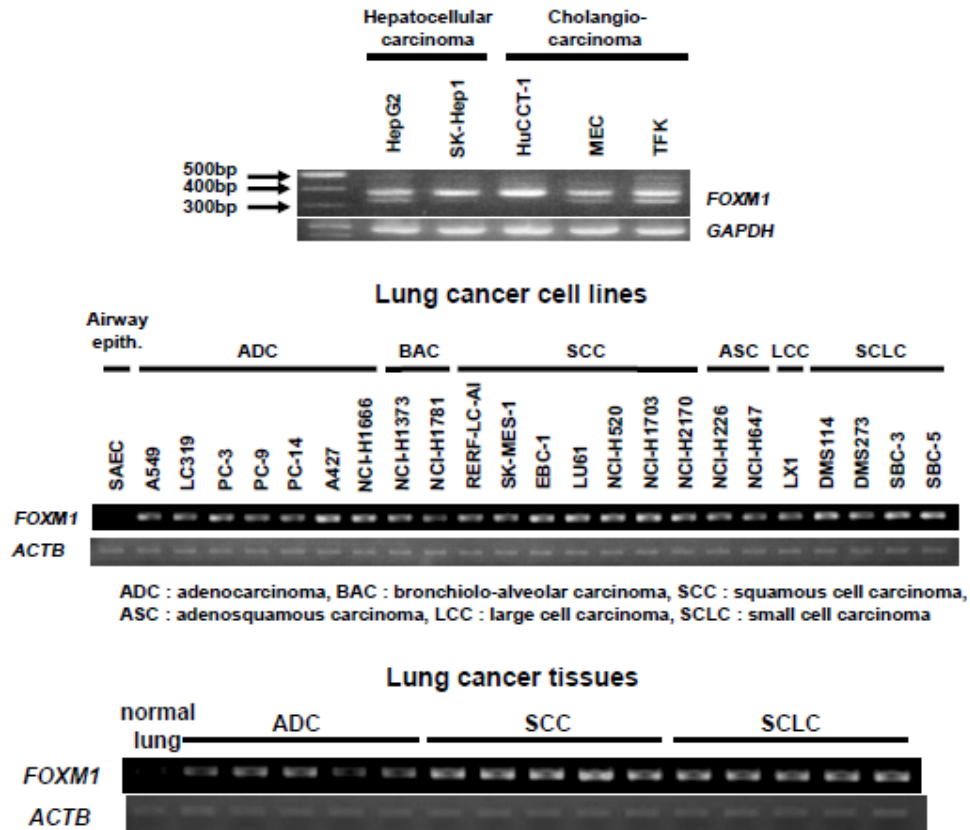
7-9) HLA-A2 Tgm を利用した FOXM1 由来 HLA-A2 (A*0201) 拘束性エピトープの同定

選択した HLA-A2 (A*0201) に結合親和性を示すと推定された FOXM1 由来のペプチド 23 種類のうち、FOXM1 特異的に CTL を誘導出来るエピトープペプチドを ELISPOT 解析により決定した。各々のペプチドについて検討したところ、ペプチド 8; FOXM1₃₆₂₋₃₇₀ YLVPIQFPV、ペプチド 10; FOXM1₃₇₃₋₃₈₂ SLYLQPSVKV、ペプチド 17; FOXM1₆₄₀₋₆₄₉ GLMDLSTTPL を提示させた BM-DC により *in vitro* で再刺激後に、ELISPOT 解析における刺激細胞としてそれぞれのペプチドを負荷した BM-DC を用いた場合に生じたスポット数は、ペプチドを負荷しない BM-DC で刺激した場合のそれと比較して有意にスポット数が多く、FOXM1 特異的反応を認めた (図 23)。

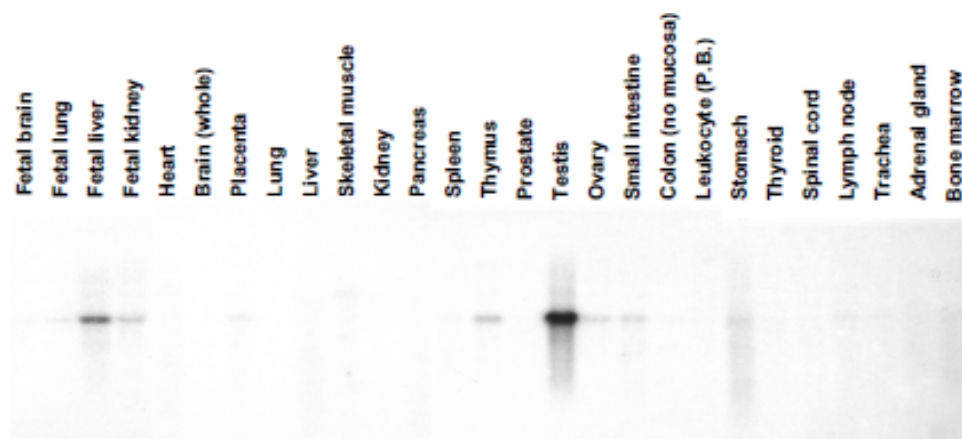
以上より検討した 23 種類のペプチドのうちでペプチド 8、ペプチド 10、ペプチド 17 の 3 種類を FOXM1 由来 HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの候補と決定した。

図 22

A



B



C

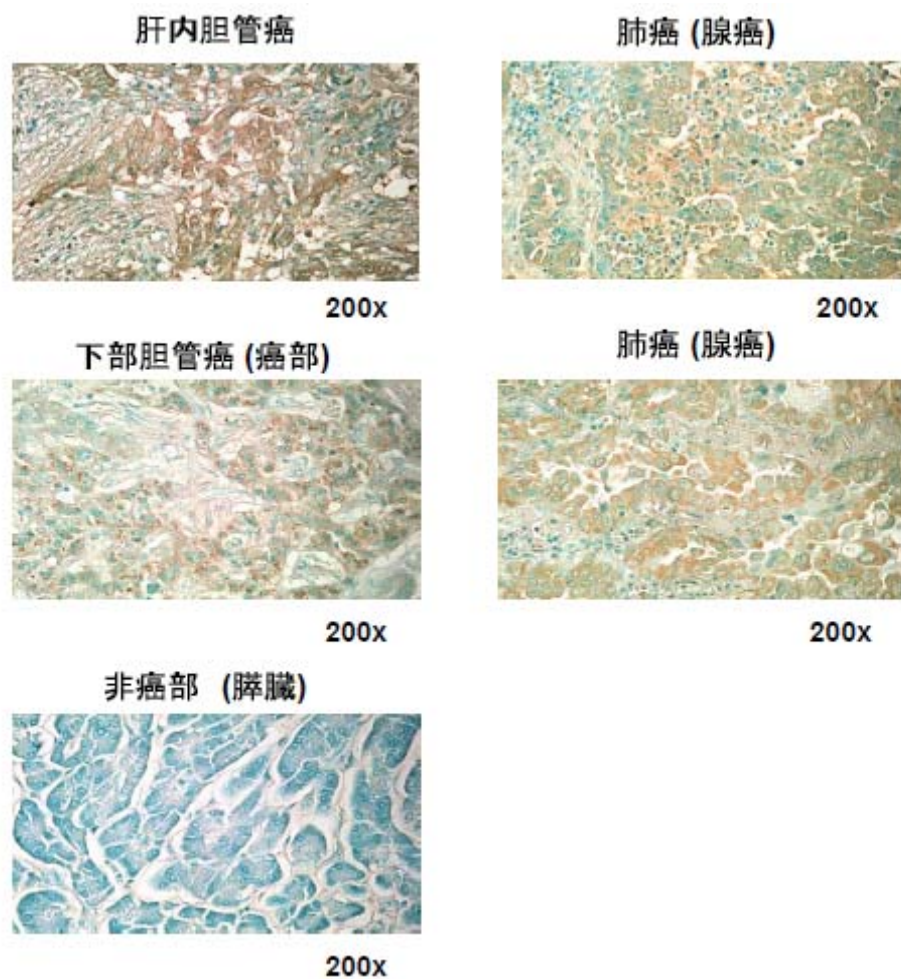


図 22. 癌細胞株、癌組織および正常組織における FOXM1 の発現解析

(A) 癌細胞株のRT-PCR。全ての癌細胞株においてFOXM1遺伝子の発現が認められた。(B) 正常組織のノザンブロット解析。胎児を除く正常組織では、精巣に強い発現が認められ、胸腺、小腸、胃に弱い発現が認められた。(C) 癌組織の免疫染色。癌部においてFOXM1の発現を認めたが、非癌部においては認められなかった。

図 23

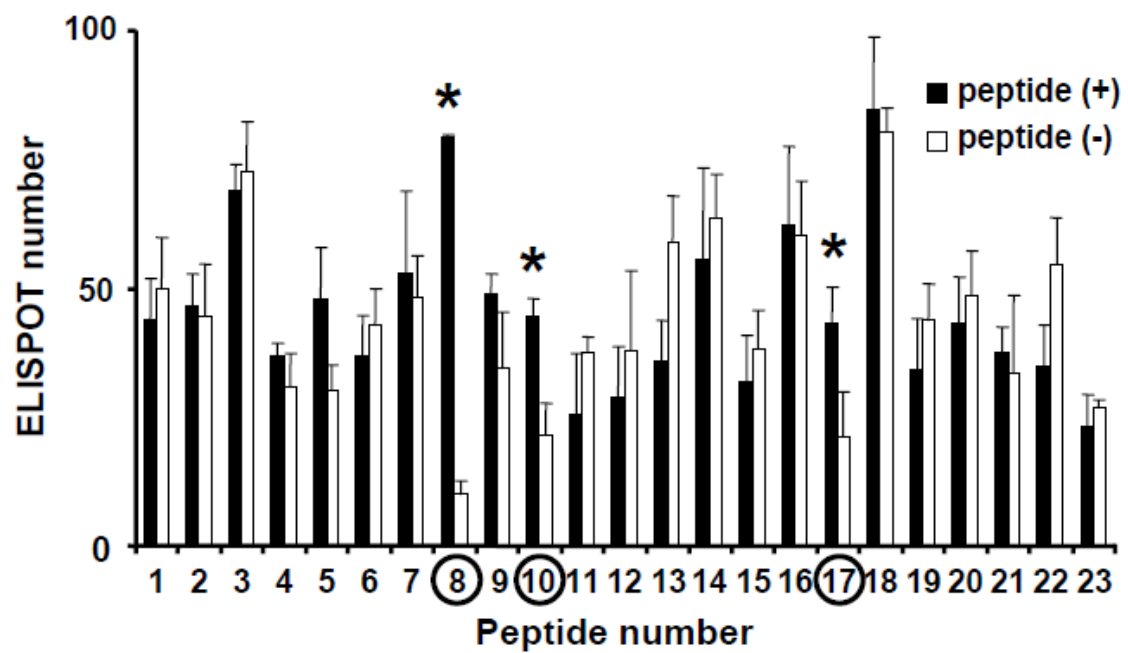


図 23. HLA-A2Tgm を利用した FOXM1 由来 HLA-A2 (A*0201)
拘束性エピトープの同定

HLA-A2 (A*0201) に結合親和性を示すと推定された FOXM1 由来のペプチド 23 種類のうち、ペプチド 8、10、17 において FOXM1 ペプチド特異的な反応が認められ、これら 3 種類のペプチドをエピトープ候補として選択した。

7-10) FOXM1 ペプチドを免疫された HLA-A2Tgm における 自己免疫現象の検討

今回同定したエピトープペプチドのうち、ヒトとマウスで同じアミノ酸配列を示すペプチド 8 とペプチド 10 をパルスした樹状細胞にて 2 回免疫した HLA-A2Tgm について、重要臓器(脳、皮膚、心、肺、肝、腎)への CD8 陽性細胞または、CD4 陽性細胞の浸潤を免疫染色にて検討したところ、細胞浸潤を認めず自己免疫反応は生じていないものと判断した (図 24)。また、外見上もマウスに自己免疫現象を示唆するような体重減少、麻痺等の所見は認められなかった。

図 24

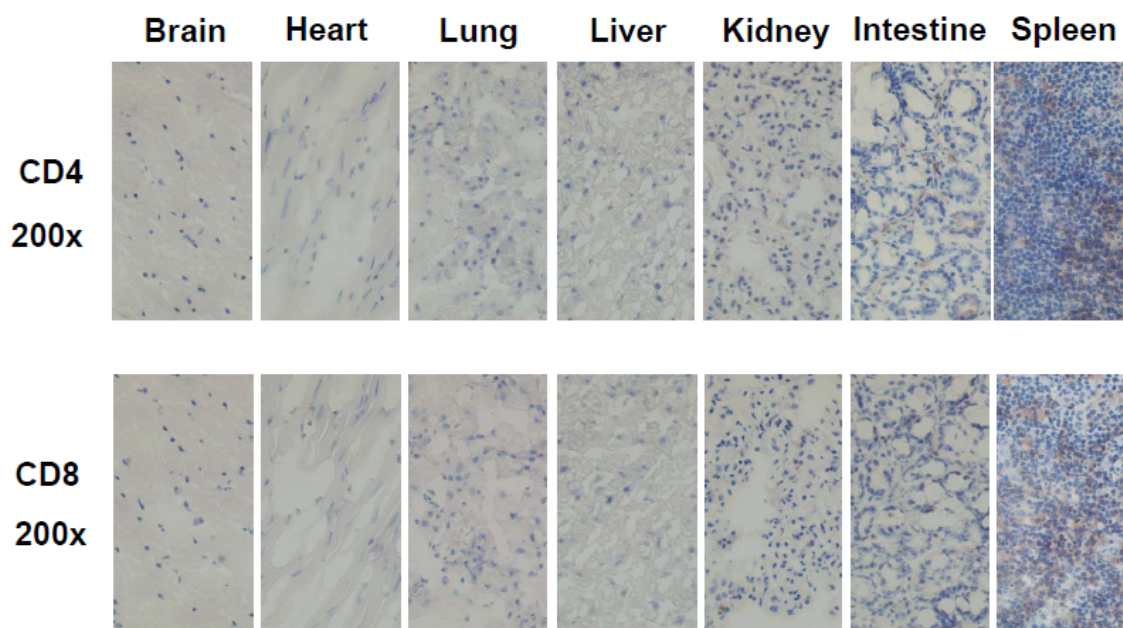


図 24. FOXM1 ペプチドを免疫された HLA-A2Tgm における
自己免疫現象の検討

FOXM1 ペプチドを負荷した BM-DC で 2 回免疫した 2 週間後に、腫瘍臓器を回収し CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の浸潤の有無を調べたが、これらの細胞浸潤は認めず自己免疫反応は生じていないものと判断した。

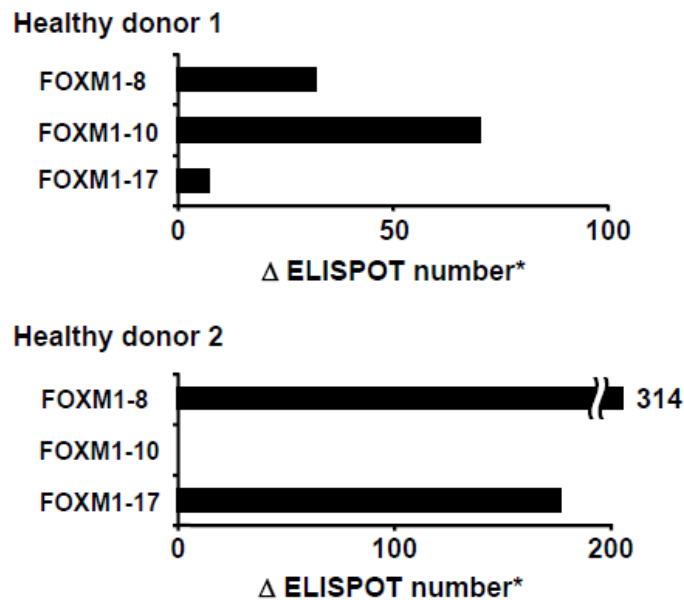
7-11) エピトープペプチドを用いた FOXM1 反応性ヒト CTL の誘導

上記の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチドを用いて、HLA-A2 陽性の健常人の PBMC から、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。図 25 A にペプチド特異的に CTL を誘導出来たデータを示す。健常人 1 においてはペプチド 8 およびペプチド 10 で誘導した CTL は、それぞれペプチド 8 およびペプチド 10 を負荷した T2 細胞に対して、ペプチドを負荷していないものに比べて明らかに強い細胞傷害活性を示した。健常人 2 においてはペプチド 8 およびペプチド 17 で誘導した CTL は、それぞれペプチド 8 およびペプチド 17 を負荷した T2 細胞に対して、ペプチドを負荷していないものに比べて明らかに強い細胞傷害活性を示した。

次に癌細胞を傷害する 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、該当 HLA-クラス I 分子と FOXM1 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した。FOXM1 は全ての癌細胞株に発現しているため、FOXM1 を発現し HLA-A2 陽性の膵癌細胞株 panc-1 をポジティブコントロールとして、FOXM1 を発現し HLA-A2 陰性の膵癌細胞株 PK-8 をネガティブコントロールとして、それぞれを標的細胞として用いた (図 25 B)。癌患者より、それぞれ 3 つのエピトープ候補のペプチドで誘導した CTL は、コントロールである PK-8 に比べ、panc-1 に対して強い細胞傷害活性を示した。この結果は、今回同定した FOXM1 由来の 3 つのエピトープペプチドが癌細胞内でプロセッシングを受けて産生されうることを示している。

図 25

A



B

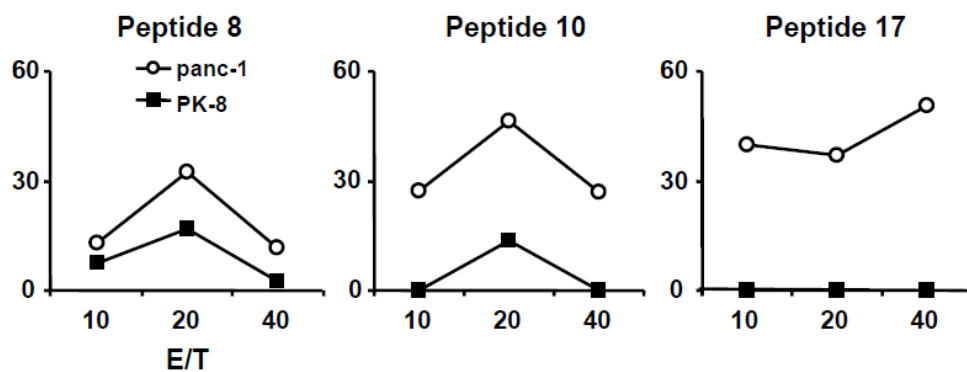


図 25. エピトープペプチドを用いた FOXM1 反応性 CTL の誘導

(A) ペプチド特異的に反応する CTL の確認を T2 細胞を標的とした ELISPOT 解析によって確認した。健康人 1 ではペプチド 8 とペプチド 10 において、健康人 2 では、ペプチド 8 とペプチド 17 においてペプチド特異的な CTL が誘導できていることが確認された。(B) 癌細胞株を標的にした⁵¹Cr 放出試験。癌患者の PBMC より、それぞれ 3 つのエピトープ候補のペプチドで誘導した CTL は、コントロールである PK-8 に比べ、panc-1 に対して強い細胞傷害活性を示した。この結果は、これら 3 つのエピトープペプチドが癌細胞内でプロセッシングを受けて産生されうることを示唆している。

8 考察

本研究では、HSP105 それ自体が癌免疫療法の標的抗原として有効な腫瘍特異的抗原であり、マウスにおいて HSP105 パルス骨髄由来樹状細胞ワクチンを投与することによって、HSP105 特異的な T 細胞を誘導し、HSP105 を発現している B16-F10、Colon26、さらには *Apc*^{Min/+}マウスより自然発症する腸管の腫瘍の増殖を、自己免疫反応を来たすことなく抑制させることができることを示した。また、肝内胆管癌の cDNA マイクロアレイ解析を用いて新規癌抗原として FOXM1 を同定した。さらに、FOXM1 由来の HLA-A2 (A*0201) 拘束性を示す 3 つのエピトープペプチドを同定し、これらのペプチドで誘導した CTL は FOXM1 陽性、HLA-A2 陽性の癌細胞株を選択的に傷害することを示した。

HSP105 を標的とした抗腫瘍免疫療法の効果の検討

HSP105 自体の腫瘍特異的抗原性について、Subjeck らは HSP105 と同義である HSP110 を用いた実験を基に否定的な見解を示している。すなわち、HSP110 に結合した何らかの腫瘍抗原と HSP110 の複合体が強い抗腫瘍免疫効果を示し、HSP110 自体には腫瘍特異抗原としての働きは示さないというものである (59, 60)。しかしながら、実際に HSP に腫瘍抗原ペプチドが結合しているというエビデンスは乏しい。一方で MHC 分子に結合する HSP 由来のペプチドがマスマススペクトロメトリーによる解析にて同定されており (61)、HSP70 由来のエピトープで刺激した CTL が HSP70 を高発現する癌細胞株に特異的な細胞障害性を示し、ヒトの乳癌の腫瘍内には、この HSP70 由来のエピトープを認識する CTL が健常人に比べて有意に多数存在したという報告 (62) は、HSP 自体が腫瘍特異的抗原として癌免疫療法の標的となる可能性を示唆する。本研究では、HSP105 由来のエピトープペプチドは同定できていないが、HSP105 自体が HSP105 特異的な CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を誘導できることを証明した。また、HSP105 は様々な癌細胞で発現しているが (31)、癌細胞株を HSP105 の small interfering RNA で処理することにより HSP105 の遺伝子発現を消失させると、癌細胞にアポトーシスが誘導されることが当研究室での報告より明らかとなっている (30)。この事実は、HSP105 が癌細胞の生存にとって必須の蛋白質であり、癌細胞が *HSP105* 遺伝子の発現を脱落させることにより免疫系による攻撃から逃避す

ることは難しいことを示唆している。以上より HSP105 は抗腫瘍免疫療法における、理想的な腫瘍特異的抗原であるといえる。

先も述べたように、HSP自体がDCを成熟させるという報告があるが (45-47)、その一方で、混入したエンドトキシンを除去したHSPをDCに投与すると、DCは成熟しないという報告もある (48)。本研究では、HSP105の投与によってDCが成熟するということとはなかった。本研究で用いたHSP105の抽出にはヒトの腫瘍からではなく、ヒトHSP105を遺伝子導入した大腸菌から抽出していることから、腫瘍由来のペプチドは存在せず、さらにエンドトキシンを徹底的に除去していることから、純度が高いものと推察される。これらの結果より、HSP105自体にはDCを成熟させる力はなく、腫瘍免疫を誘導する腫瘍特異的抗原としてはたらいっていると考えられた。

本研究より、HSP105の抗腫瘍免疫効果にはCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞のいずれも重要であることが示された。腫瘍免疫において、CD8陽性T細胞は腫瘍を直接攻撃する細胞であるのに対し、CD4陽性T細胞はCD8陽性T細胞の作用を助けるはたらきがある (63)。本研究では、MHCクラスIの発現が著明に減弱しているB16-F10に対し、抗腫瘍免疫効果が認められていることは興味深い。B16-F10の排除にはCD4陽性T細胞が重要な役割を担っているものと考えられる。すなわち、BM-DC上のMHCクラスIIとMHCクラスIIに結合したHSP105蛋白由来のペプチドの複合体がCD4陽性T細胞を活性化し、HSP105に特異的に反応するCD4陽性T細胞からIFN- γ が分泌される。そのIFN- γ によって、B16-F10上にMHCクラスI分子が発現し、HSP105に特異的な反応するCD8陽性T細胞がB16-F10上のMHCクラスIとMHCクラスIに結合したHSP105蛋白由来のペプチドの複合体を認識し、B16-F10の排除に働いているものと推測される。

MHCクラスIは一般的には細胞内で合成されたペプチドを提示するとされる。しかし、樹状細胞においては細胞外の外来抗原をMHCクラスI経路により提示するクロスプレゼンテーションと呼ばれる現象も観察される (64)。本研究では、in vitroにおいてCD4陽性T細胞が著しく減少しているマウスにHSP105蛋白パルス樹状細胞を免疫することによってHSP105特異的なCD8陽性T細胞を誘導することができた。この事実は、このHSP105特異的なCD8陽性T細胞はクロスプレゼンテーションによって誘導されていることを示唆するものである。このようにHSP105蛋白パルス樹状細胞ワクチンは、

HSP105特異的なCD4陽性T細胞を誘導するだけでなく、クロスプレゼンテーションの経路によってCD8陽性T細胞も誘導することができる。この点において蛋白パルス樹状細胞ワクチンはペプチドパルス樹状細胞ワクチンよりも有効性の高いワクチンであると考えられる。さらに、ペプチドパルス樹状細胞ワクチンの使用は、同ペプチドが結合できるHLAを有す患者に限定されるが、蛋白パルス樹状細胞ワクチンはHLAのタイプに関わらず全ての患者に使用可能であり、適応の幅が広いことも利点の一つといえる。

樹状細胞の投与経路も重要である。本研究においては簡便さを重視して腹腔内投与を行なった。腹腔内投与された樹状細胞の生体内での分布について、明確なエビデンスは得られていない。我々は、腹腔内に投与された樹状細胞はまず腸間膜のリンパ管に入り、一部は腸間膜のリンパ節に留まり、残りは胸管から大循環系に入り最終的に脾臓や骨髄に移動するものと考えている。腹腔内の樹状細胞がリンパ管から血管へと移動していることを示した報告もみられる (65)。経静脈、経皮、経口投与など他の投与経路との抗腫瘍免疫効果の比較は今後の課題である。

以上の結果より、HSP105蛋白パルス樹状細胞ワクチンを予防的に投与することによって、人工的に皮下注射された腫瘍の増殖を抑制させることができたが、さらに実際の発癌形式に似せたモデルとして腸管に腺腫を多発する *Apc*^{Min/+}マウスを用いて同様の実験を行った。実験を進めていくにあたり、*Apc*^{Min/+}マウスに発生した腺腫がHSP105を発現しているかどうか確認したところ、強い発現を認めた。ヒトにおいては、腺腫にはHSP105の発現はほとんど認められず、癌においてHSP105の発現を認めており (31)、今回の結果と異なっている。*Apc*^{Min/+}マウスはAPC遺伝子の変異が原因で腸管に腫瘍が多発する疾患であるFAP (Familial adenomatous polyposis) のモデルとして用いられているが、いくつかの相違点がある。FAPは主に下部大腸に後発し、癌化の危険性があるが (66)、*Apc*^{Min/+}マウスの腸管の腫瘍は主に小腸に多く認められ、腺腫であり悪性化することはないとされる (67)。さらに、*Apc*^{Min/+}マウスにもそのmutationの部位によっていくつかのvariantがあり、それぞれ腫瘍の発生時期、後発部位、個数などが異なる。これらのvariantによる違いを考慮すると、ヒトとマウスでのHSP105の発現様式が異なることは十分に考えられる (68)。また、ヒトの大腸癌の多くはAPC遺伝子の機能消失が原因であることより (69)、*Apc*^{Min/+}マウスを用いた抗腫瘍

免疫実験はヒト大腸癌における抗腫瘍免疫療法のモデルとしても有用な情報をもたらすものと考えられる。

Apc^{Min/+}マウスにおいても、HSP105パルス樹状細胞ワクチン投与によって、HSP105を特異的に認識するCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞が検出され、*Apc*^{Min/+}マウスの腸管に発生する腺腫の個数は有意に減少したが、腫瘍の発育を完全に抑えることはできなかった。樹状細胞を用いた腫瘍免疫効果を増強するために、我々は新たなプロトコルを検討中である。近年、樹状細胞に様々な遺伝子を導入することにより、樹状細胞の抗腫瘍免疫効果が著しく増強したという報告が見られる (70-72)。さらに、腫瘍免疫療法は放射線療法や化学療法と併用することで、その効果が増強するといった報告もみられることから (73-75)、HSP105パルス樹状細胞ワクチンと放射線療法あるいは化学療法を組み合わせることで抗腫瘍免疫効果が増加するか否かについては、今後の重要な検討事項である。

また、本研究ではHSP105パルス樹状細胞ワクチン投与によってマウスに自己免疫反応を生じさせることはなかった。マウスにおいては、我々の以前の検討でも、樹状細胞による免疫療法の際に自己免疫反応を生じさせることはなく (76)、今回も同様の結果であった。ヒトにおいても、いくつかの樹状細胞を用いた癌免疫療法の臨床試験が行なわれているが、いずれにおいても大きな自己免疫反応は認められていない (77-79)。これらの結果より、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法は、基本的には安全に施行できるものと考えられる。

HLA-A2拘束性FOXM1由来のCTLエピトープの同定

胆管癌は予後不良な癌のひとつであり (80)、免疫療法等、新たな治療法の確立が望まれる。しかしながら、腫瘍抗原は多数同定されているものの (81, 82)、胆管癌の腫瘍特異的抗原はあまり報告されていない (83, 84)。今回我々は、胆管癌 (肝内胆管癌) の新規癌抗原として、FOXM1を同定した。FOXM1は、細胞の増殖において重要な役割を担っており、G2/M期に特異的な遺伝子の発現への関与が明らかとなっている (55, 85)。癌細胞株においてFOXM1の発現を消失させると、細胞分裂がうまくいかなくなり、細胞死に陥る (55, 85)。これらの事実は、FOXM1の発現が癌細胞の増殖や生存に不可欠であり、癌細胞がFOXM1遺伝子の発現を脱落させることにより免疫系による攻撃から逃避することは難しいことを示唆している。さらにこれまでの報

告や今回のマイクロアレイを用いた解析により、FOXM1は様々な癌腫で高発現していることが確認され、FOXM1は腫瘍抗原の標的としてのよい条件を兼ね備えているといえる。

FOXM1を過剰発現させると、細胞の増殖速度が増すという報告や、グリオーマや非小細胞肺癌においては、癌組織でのFOXM1の発現と生存期間の相関を示した報告もあり (86, 87)、これらの事実はFOXM1が癌の発生および増殖において重要な役割を果たしていることを示している。本研究における、肝内胆管癌のマイクロアレイ解析においても、非癌部と比較したときの肝内胆管癌のFOXM1の発現が非常に大きい群と、そうでない群が存在していた。これらの群における生存期間の相関の有無については現在調査中である。

本研究においては、HLA-A2 (A*0201) 拘束性を示す3つのエピトープペプチドを同定し、これらのペプチドで誘導したCTLはFOXM1陽性、HLA-A2陽性の癌細胞株を選択的に傷害することを示した。HLA-A2は、全世界において発現が認められているMHCクラスI分子である。その中でも特にHLA-A2 (A*0201) は、あらゆる人種において高い比率で発現が認められており (88)、このエピトープペプチドを癌免疫療法において使用していく際に、世界中の多くの癌患者に使用可能となる。よって、HLA-A2 (A*0201) 拘束性を示すペプチドを同定することは重要であると考えられる。本研究では、HLA-A2 (A*0201) 拘束性を示すエピトープペプチドを同定する際にHLA-A2Tgmを使用した。HLA-A2TgmはHLA拘束性ペプチドを用いた免疫療法の動物モデルとして有用であることが報告されている (89) が、今回の研究によりHLA-A2拘束性CTLエピトープの決定に有用であることを確認した。HLA-A2Tgmを用いることにより、ヒトの血液を用いることなくHLA-A2拘束性CTLエピトープ候補を推定することができ、採血の負担を軽くすることが可能であると思われた。さらに、これらのペプチドがマウスとヒトにおいてアミノ酸配列が同じであれば、ヒトにおける自己免疫現象の有無も調べることが可能となる。本研究においても、マウスとヒトにおいてアミノ酸配列が同じであるペプチド8 (FOX M1₃₆₂₋₃₇₀) とペプチド10 (FOX M1₃₇₃₋₃₈₂) を投与し、自己免疫反応を生じないことを確認した。また、将来的にエピトープペプチドを用いたヒトへの免疫療法を行なう際に、癌の免疫逃避を考慮しなければならない。その中で、MHCクラスI発現の消失は、エピトープペプチドを用いたヒトへの免疫療法を行

なう上で大きな障害となる。本研究において、肝内胆管癌 25 例における癌部と非癌部の MHC クラス I 関連遺伝子の発現を調べたところ、これらの遺伝子の明らかな発現の低下は認められず、胆管癌（肝内胆管癌）において、このペプチドの効果は期待できるものと考えられた。

これら FOXM1 の癌細胞における重要性や癌細胞におけるはたらき、または癌細胞における発現増加の報告とともに、最近、FOXM1 を標的にした治療法が 2 つ報告されている。ひとつは、p19^{ARF}₂₄₋₄₉ ペプチドで、このペプチドは FOXM1 の C 末端に結合し、FOXM1 の転写活性を抑制する。マウスにおいて、このペプチドの投与により FOXM1 を過剰発現した肝細胞癌の増殖と血管新生が抑制されるというものである (90)。もうひとつは抗生剤のシオマイシン A が FOXM1 を遺伝子導入された細胞株をアポトーシスに導くというものである (91)。これらは有望な治療法となりうる可能性を秘めているが、これらは細胞株やトランスジェニックマウスにおける結果である。本研究はヒトの検体を用いており、共同研究を行なっている東京大学医科学研究所をはじめとする多施設において、cDNA マイクロアレイを用いた解析により同定された新たな腫瘍抗原を標的とした臨床試験が現在行なわれている最中である。*in vivo* における腫瘍拒絶実験等、もう少しつめていかねばならない点はあるが、本研究で同定した FOXM1 由来の 3 つのエピトープを用いて、近い将来、臨床試験を開始できるものと期待している。

9 結論

ヒトへの臨床応用を考えたときに、ワクチン療法の最も良い適応となるのは、手術後に高頻度で再発が予想される症例であろう。HSP105蛋白パルス樹状細胞ワクチンをマウスに予防的に投与することによって、HSP105を高発現する腫瘍の*in vivo*における増殖を抑制できることが本研究より明らかとなった。また、新規癌抗原としてFOXM1を同定し、さらにHLA-A2拘束性のヒトCTLエピトープペプチドを同定した。HSP105もFOXM1も多様な癌で高発現していることから、これらを標的としたワクチンの使用適応となる症例は多いと予想され、将来的に臨床の現場で使えるようになることを期待している。

10 参考文献

1. 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.
2. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299, 1994.
3. Berke, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphomolecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 735-773, 1994.
4. Lanier, L.L. and Phillips, J.H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol. Today* 17: 86-91, 1996.
5. 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.
6. Heemels, M. T. and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 463-491, 1995.
7. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition region of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987.
8. 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.
9. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovie, 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.

10. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 181-207, 1994.
11. Rammensee, H. G., Friede, T. and Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228, 1995.
12. Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 277-319, 1991.
13. Janeway, Jr. C. A. and Travers, P. 免疫生物学: 4. T リンパ球による抗原認識 (笹月健彦 監訳) pp.125-173, 南江堂, 1988.
14. Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39, 1993.
15. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221, 1994.
16. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 16-25, 2003.
17. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., et al. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin. Cancer Res.* 10: 6437-6448, 2004.
18. Old, L. J. Cancer immunology: the search for specificity-G.H.A.Lowe's Memorial Lecture. *Cancer Res.* 41: 361-375, 1981.
19. Utsumi, K. R., Yoshida, T. O., Sekikawa, M. and Klein, G. Antibodies to cell iraganoïds in the sera of nasopharyngeal carcinoma patients. *Scand. J. Immunol.* 2: 159-171, 1973.
20. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

- 92: 11810-11813, 1995.
21. Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 187: 265-270, 1998.
 22. Sahin, U. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709-716, 1997.
 23. 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.
 24. Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R. and Subject, J.R. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol. Chem.* 270: 15725-15733, 1995.
 25. Yasuda, K., Nakai, A., Hatayama, T. and Nagata, K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *J. Biol. Chem.* 270: 29718-29723, 1995.
 26. Yamagishi, N., Nishimori, H., Ishihara, K., Ohtsuka, K. and Hatayama, T. Modulation of the chaperone activities of Hsc70/Hsp40 alpha and Hsp105beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 850-855, 2000.
 27. Yamagishi, N., Ishihara, K., Saito, Y. and Hatayama, T. Hsp105 but not Hsp70 family proteins suppress the aggregation of heat-denatured protein in the presence of ADP. *FEBS Lett.* 555: 390-396, 2003.
 28. Hatayama, T., Yamagishi, N., Minobe, E. and Sakai, K. Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 528-534, 2001.
 29. Ishihara, K., Yamagishi, N., Saito, Y., et al. Hsp105 α suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J. Biol. Chem.* 278: 25143-25150, 2003.

30. Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H. and Nishimura, Y. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Science* 97: 623-632, 2006.
31. Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y. and Ogawa, M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol. Rep.* 10: 1777-1782, 2003.
32. Hwang, T. S., Han, H. S., Choi, H. K., Lee, YG., Kim, Y-J., Han, M-Y. et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18: 690-700, 2003.
33. Fong, L. and Engleman, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 245-273, 2000.
34. Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitsky, H. I. and Pardoll, D. M. CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 191: 541-550, 2000.
35. Logan, C. Y. and Nusse, R. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 781-804, 2004.
36. Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665-669, 1991.
37. Lammi, L., Arte, S., Somer, M., et al. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 1043-1050, 2004.
38. Giles, R.H., van Es, J.H. and Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.Res. Commun.* 1653: 1-24, 2003.
39. Miyoshi, Y., Ando, H. and Nagase, H. Germ-line mutations of APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 4452-4456, 1992.

40. Fearon, E.R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
41. Fearnhead, N.S., Britton, M. P. and Bodmer, W.F. The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* 10: 721-733, 2001.
42. Moser, A.R., Pitot, H.C. and Dove, W.F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247: 322-324, 1990.
43. Ishihara, K., Yasuda, K. and Hatayama, T. Phosphorylation of the 105-kDa Heat Shock Proteins, HSP105 and HSP105, by Casein Kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 927-931, 2000.
44. Nakatsura, T. Komori, H., Kubo, T. et al. 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.
45. Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N. et al. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30: 2211-2215, 2000.
46. Flohé, S. B., Brüggemann, J., Lendemanns, S. et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cell versus a Th1-promoting phenotype. *J. Immunol* 170: 2340-2348, 2003.
47. Binder, R. J., Anderson, K. M., Basu, S. and Srivastava, P. K. Cutting edge: Heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c⁺ cells in vivo. *J. Immunol* 165: 6029-6035, 2000.
48. Bausinger, H., Lipsker, D., Ziylan, U., et al. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur. J. Immunol.* 32: 3708-3713, 2002.
49. Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., et al. Identification of HLA-A2- or HLA-24-restricted CTL epitopes possibly useful for Glypican-3-specific

- immunotherapy of hepatocellular carcinoma. Clin. Cancer Res. 12: 2689-2697, 2006.
50. 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.
 51. Nakahara, S., Tsunoda, T., Baba, T., Asabe, S. and Tahara, H. Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. Cancer Res. 63: 4112-4118, 2002.
 52. Obama, K., Ura, K., Li, M., et al. Genome-wide analysis of gene expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 41: 1339-1348, 2005.
 53. Nakamura, T., Furukawa, Y., Nakagawa, H., et al. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. Oncogene 23: 2385-2400, 2004.
 54. Kim, I-M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., et al. The forkhead box m1 transcription factor stimulates the proliferation of cells during development of lung cancer. Cancer Res. 66: 2153-2161, 2006.
 55. Wonsey, D.R. and Follettie, M.T. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. Cancer Res. 65: 5181-5189, 2005.
 56. Kalin, T.V., Wang, I-C., Ackerson, T.J., et al. Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and Lady transgenic mice. Cancer Res. 66: 1712-1720, 2006.
 57. Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray:

- identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 61: 2129-2137, 2001.
58. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2: 533-543, 2001.
59. Wang, X.Y., Kazim, L., Repasky, E.A. and Subjeck, J.R. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J. Immunol.* 165: 490-497, 2001.
60. Wang, X.Y., Chen, X., Manjili, M.H., Repasky, E., Henderson, R. and Subjeck, J.R. Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Res.* 63: 2553-2560, 2003.
61. Hickman-Miller, H.D. and Hildebrand, W. H. The immune response under stress: the role of HSP-derived peptides. *Trends Immunol.* 25: 427-433, 2004.
62. Faure, O., Graff-Dubois, S., Bretaudeau, L. et al. Inducible HSP70 as target of anticancer immunotherapy: identification of HLA-A*0201-restricted epitopes. *Int. J. Cancer* 108: 863-870, 2004.
63. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. and Levitsky, H. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188: 2357-2368, 1998.
64. Albert, M.L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86-89, 1998.
65. Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Mazo, I.B., et al. Activating of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6: 1029-1037, 2005.

66. Fearnhead, N.S., Wilding, J.L. and Bodmer, W.F. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br. Med. Bull.* 64: 27-43, 2002.
67. Moser, A.R., Pitot, H.C. and Dove, W.F. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 247: 3220-3224, 1990.
68. Boivin, G.P., Washington, K., Yang, K., et al. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 124: 762-777, 2003.
69. Miyoshi, Y., Ando, H., Nagase, H., et al. Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4452-4456, 1992.
70. Park, D., Lapteva, N., Seethammagari, M., Slawin, K.M. and Spencer, D. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat. Biotechnol.* 24: 1581-1590, 2006.
71. Evel-Kabler, K., Song, X.T., Aldrich, M., Huang, X.F. and Chen, S.Y. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *J. Clin. Invest.* 116: 90-100, 2006.
72. Hanks, B.A., Jiang, J., Singh, R.A.K., et al. Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines in vivo. *Nat. Med.* 11: 130-137, 2005.
73. Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 203: 1259-1271, 2006.
74. Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* 202: 1691-1701, 2005.

75. Zhang, B., Bowerman, N.A., Salama, J.K., et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J. Exp. Med.* 204: 49-55, 2007.
76. Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reaction in mice. *Clin. Cancer Res.* 10: 8630-8640, 2004.
77. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4: 328-332, 1998.
78. Stift, A., Fried, J., Dubsky, P., et al. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J. Clin. Oncol.* 21: 135-142, 2003.
79. Yu, J.S., Liu, G., Ying, H., Yong, W.H., Black, K.L. and Wheeler, C.J. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T- cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 64: 4973-4979, 2004.
80. Khan, S.A., Thomas, H.C., Davidson, B.R. and Taylor-Robinson, S.D. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 366: 1303-1314, 2005.
81. Renkvist, N., Casteli, C., Robbins, P.F. and Parmiani, G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 50: 3-15, 2001.
82. Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, J.J. and Chen, Y.T. Cancer/Testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188: 22-32, 2002.
83. Swierczynski, S.L., Maitra, A., Abraham, S.C. et al. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum. Pathol.* 35: 357-366, 2004.

84. Watanabe, H., Enjoji, M., Nakashima, M., et al. Clinical significance of serum RCAS1 levels detected by monoclonal antibody 22-1-1 in patients with cholangiocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 39: 559-563, 2003.
85. Laoukili, J., Kooistra, M.R.H., Brás A., et al. FOXM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* 7: 126-136, 2005.
86. Takahashi, K., Furukawa, C., Takano, A., et al. The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 66: 9408-9419, 2006.
87. Liu, M., Dai, B., Kang, S-H., et al. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res.* 66: 3593-3602, 2006.
88. Browning, M. and Krausa, P. Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunol. Today* 17: 165-170, 1996.
89. Firat, H., Garcia-Pons, F., Tournet, S., et al. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur. J. Immunol.* 29: 3112-3121, 1999.
90. Gusarova, G.A., Wang, I-C., Major, M.L., et al. A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment. *J. Clin. Invest.* 117: 99-111, 2007.
91. Radhakrishnan, S.K., Bhat, U.G., Hughes, D.E., Wang, I-C., Costa, R.H. and Gartel, A.L. Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1. *Cancer Res.* 66: 9731-9735, 2006.