

博士（医学）論文

Doctor's Thesis

**新規ヒト食道癌抗原 Proliferation potential-
related protein (PP-RP)の同定と免疫学的解析**

(Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen
for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis)

吉武 義泰

Yoshihiro Yoshitake

指導教官

篠原 正徳 教授

熊本大学大学院医学研究科歯科口腔外科学

西村 泰治 教授

熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

2005 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+ 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+ 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活性化.....	15
5 - 3) 腫瘍拒絶抗原の同定.....	16
5 - 4) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍拒絶抗原の同定.....	17
図4 cDNA マイクロアレイ解析の概要.....	19
表1 cDNA マイクロアレイ解析を用いて同定された腫瘍抗原.....	20
5 - 5) 本研究の目的.....	21
6 実験方法.....	22
6 - 1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍抗原遺伝子の同定.....	22
6 - 2) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR).....	22
6 - 3) PP-RP の免疫組織化学的解析と細胞内局在.....	23
6 - 4) 末梢血単核細胞(PBMC)からの PP-RP 特異的 CTL 株の樹立.....	23
6 - 5) PP-RP 特異的 CTL 株の解析.....	24
6 - 6) 養子移植免疫療法モデル.....	25
6 - 7) PP-RP ノックダウン細胞の作成.....	25
図5 腫瘍抗原ペプチド特異的なCTL 株の樹立方法.....	27
表2 PP-RP 遺伝子のRT-PCR に用いたプライマー.....	28
表3 PP-RP のノックダウンに用いたsiRNA.....	28
7 実験結果.....	29
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出 ..	29
7 - 2) RT-PCR とノザンプロット解析による癌細胞株、癌組織 および正常組織における PP-RP 遺伝子の発現解析.....	29

図 6	食道癌のcDNA マイクロアレイデータの解析.....	30
図 7	cDNA マイクロアレイ解析による正常組織におけるPP-RP 遺伝子の発現解析	31
図 8	RT-PCR による癌細胞株および食道癌組織におけるPP-RP 遺伝子の発現解析	32
図 9	ノザンプロットによる正常組織におけるPP-RP 遺伝子の発現解析.....	33
7 - 3)	PP-RP 蛋白質の免疫組織化学的解析	34
7 - 4)	食道癌手術後 R1 症例における、PP-RP 遺伝子の発現量と予後の間 係	34
図 10	各組織におけるPP-RP 蛋白質の免疫組織化学的解析.....	35
表 4	食道癌の手術後、R1 であった15 症例の臨床病理学的特徴.....	36
図 11	食道癌の手術後R1 であった15 症例における、PP-RP 遺伝子の発現量と 予後の関係.....	37
7 - 5)	PP-RP 特異的CTL 株の樹立.....	38
表 5	合成PP-RP ペプチドで刺激したHLA-A24 陽性の食道癌患者および健常人の PBMC からのPP-RP 特異的CTL 株の誘導.....	40
図 12	CTL 株のHLA-A24 拘束性かつPP-RP ペプチド特異的な細胞傷害活性	41
図 13	PP-RP ペプチドで誘導したCTL 株の、癌細胞株に対する細胞傷害活性	42
図 14	PP-RP 発現抑制による、食道癌細胞株TE13 細胞に対するPP-RP 特異的CTL 株 の細胞傷害活性の減弱	43
7 - 6)	ヌードマウスに移植したヒト食道癌細胞株への、 PP-RP ペプチドで誘導したCTL 株の局所注入による増殖抑制.....	45
図 15	PP-RP-8 特異的CTL 株の養子免疫によるin vivo での抗腫瘍効果.....	46
図 16	PP-RP-8 特異的CTL 株の養子免疫による、担癌ヌードマウスの生存期間の延長...	47
7 - 7)	PP-RP ノックダウン食道癌細胞株における細胞増殖速度 の抑制.....	48
図 17	PP-RP 蛋白質のドメイン構成	49
図 18	PP-RP 蛋白質の細胞内局在の解析.....	49
図 19	RNAi によるTE13 細胞におけるPP-RP 遺伝子の発現抑制.....	50
図 20	TE13shPP-RP 細胞における増殖速度の抑制	51
8	考察	52
9	おわりに.....	55
10	参考文献	56

要旨

本研究は、食道癌において cDNA マイクロアレイ解析を行い、その結果をもとに理想的な腫瘍抗原を同定し、さらに抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチンとしての臨床医学への応用の可能性を探ることを目的とする。

まず、26 人の食道癌患者から摘出された腫瘍組織から Laser Capture Microdissection system を用い癌部と非癌部の組織をそれぞれ採取した。これらより RNA を抽出し、食道癌部における遺伝子発現プロファイリングを 9,216 種類の遺伝子について解析した。その結果、食道癌において非癌部と比べ癌部で発現が 5 倍以上高くなる遺伝子を 16 種類同定した。

23 種類の成人正常組織および 4 種類の胎児組織における、それらの遺伝子の発現を確認した結果、正常では胎盤のみで高発現しており、食道癌において発現が著明に増加する遺伝子、Proliferation potential-related protein (PP-RP) を同定した。PP-RP は第 16 染色体上に存在する 1792 個のアミノ酸をコードする遺伝子で、モチーフ検索の結果、Zn finger ドメイン、E3 ユビキチンリガーゼドメイン、さらに DNA トポイソメラーゼ I ドメインをもつことが分かった。RT-PCR 法を用いた解析では PP-RP は食道癌、頭頸部癌の組織で発現しており、また食道癌、頭頸部癌、胃癌、肺癌、悪性黒色腫などの癌細胞株においても発現が認められた。PP-RP の抗体を用いて癌および正常組織での PP-RP 蛋白質の発現を検討したところ、食道癌 22 症例中 20 症例において PP-RP 蛋白質の発現が確認された。PP-RP 蛋白質の細胞内局在を蛍光免疫染色法にて確認したところ、染色体と同じ局在を示しており DNA 結合蛋白質である可能性が示唆された。

食道癌の手術後に、組織診断にて癌細胞の残存が認められた 15 症例において PP-RP 遺伝子の発現量と予後の関係を調べたところ、PP-RP 遺伝子の発現が非常に高かった 5 症例では、それ以外の 10 症例と比べて有意に予後が不良であった。また、PP-RP を高発現している食道癌細胞株から RNAi により PP-RP 遺伝子の発現を抑制したところ、増殖速度が有意に遅くなった。

PP-RP の腫瘍拒絶抗原としての有用性を検討する目的で、日本人の約 6 割がもつ HLA-A24 により抗原提示を受けた PP-RP 特異的な CTL が誘導できるかについて検討した。HLA-A24 結合モチーフをもつ PP-RP 由来の 9 もしくは 10mer のペプチドを 10 種類合成し、食道癌患者 5 人および健常人 6 人の

PBMC より分離した CD8 陽性 T 細胞をペプチド存在下に各自己の樹状細胞を用いて刺激した結果、食道癌患者からのみ PP-RP ペプチド特異的に活性を示し、かつ PP-RP と HLA-A24 を共発現している癌細胞株に対してのみ細胞傷害活性を示す CTL 株を得ることができた。さらにヒト食道癌細胞株を皮下に生着させたヌードマウスの腫瘍内および周囲に PP-RP 特異的 CTL 株を養子免疫したところ、腫瘍の増殖抑制効果と生存期間の延長が認められた。

以上の結果、cDNA マイクロアレイ解析を用いて同定された新規食道癌抗原 PP-RP が、食道癌の悪性度を高め、手術後の予後予測因子として有用である事を示した。さらに、PP-RP が食道癌細胞のマーカーとなるとともに、PP-RP を標的とした抗腫瘍免疫療法の有効性を示唆するものである。

Summary

Purpose: To establish effective anti-tumor immunotherapy for esophageal cancer, we tried to identify an useful target antigen of esophageal cancer.

Experimental Design: We did cDNA microarray analysis to find a novel candidate antigen, proliferation potential-related protein (PP-RP). We examined cytotoxicity against tumor cells in vitro and in vivo of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) specific to PP-RP established from esophageal cancer patients.

Results: In 26 esophageal cancer tissues, an average of relative ratio of the expression of the PP-RP mRNA in cancer cells versus adjacent normal esophageal tissues was 396.2. Immunohistochemical analysis revealed that, in 20 of the 22 esophageal cancer tissues, PP-RP protein was strongly expressed only in the cancer cells, and not so in normal esophageal epithelial cells. PP-RP protein contains 10 epitopes recognized by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A24-restricted CTLs. These CTLs, generated from HLA-A24 positive esophageal cancer patients, had cytotoxic activity against cancer cell lines positive for both PP-RP and HLA-A24. Furthermore, adoptive transfer of the PP-RP specific CTL line inhibited the growth of a human esophageal cancer cell line engrafted in nude mice.

Conclusion: The expression of PP-RP in esophageal cancer cells was significantly higher than in normal cells, and the CTLs recognizing PP-RP killed tumor cells in vitro and also showed tumor rejection effects in a xenograft model. Therefore, PP-RP may prove to be an ideal tumor antigen useful for diagnosis and immunotherapy for patients with esophageal cancer. cDNA microarray analysis is a useful method to identify ideal tumor-associated antigens.

2 発表論文リスト

1. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Hirotake, T., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Itoh, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y.
Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis.
Clinical Cancer Research 10: 6437-48, 2004
2. Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Oagawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y.
Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice.
Clinical Cancer Research 10: 8630-40, 2004
3. Monji, M., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Sawatsubashi, M., Shinohara, M., Kageshita, T., Ono, T., Inokuchi, A., and Nishimura, Y.
Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses
Clinical Cancer Research 10: 6047-57, 2004
4. Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., Yoshitake, Y., Uemura, U., and Nishimura, Y.
Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein ; application to anti-tumor vaccination.
Journal of Immunology 172: 776-86, 2004
5. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y.
Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker.
Biochemical & Biophysical Research Communications 306: 16-25, 2003
6. Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., Yoshitake, Y., Fukuma, D., Motomura, Y., and Nishimura, Y.
Cancer immunotherapy by genetically modified embryonic stem cell-derived dendritic cells.
In immunology 2004 (The proceeding of the 12th International Congress of Immunology, ed. By Skamene, E.) Medimond S.r.l. (Bologna, Italy), p487-491, 2004
7. 吉武義泰, 中面哲也, 西村泰治
癌免疫療法研究の新展開 (New era of tumor immunotherapy)
日本臨床社 (東京), 2005 年 増刊 『臨床免疫学 (上) -基礎研究の進歩と最新の臨床- 』

3 謝辞

本研究を行なうにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授及び中面哲也助手に深く感謝いたします。また西村教授のもとで研究する機会を与えて頂いた、熊本大学大学院医学薬学研究部顎口腔病態学分野の篠原正徳教授に、深く感謝いたします。食道癌の cDNA マイクロアレイ解析のデータを御供与頂いた東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔教授、古川洋一教授、片桐豊雅助手に深く感謝いたします。また、癌患者検体を御供与頂いた熊本大学大学院医学薬学研究部顎口腔病態学分野の篠原正徳教授、伊東博美先生、消化器外消化器外科学（旧第 1、2 外科学）講座の先生方に深く感謝いたします。

4 略語一覽

cDNA; complementary DNA

CT; cancer-testis

CTL; cytotoxic T lymphocyte

DC; dendritic cell

DNA; deoxyribonucleic acid

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

IFN; interferon

Ig; immunoglobulin

IL; interleukin

MHC; major histocompatibility complex

mRNA; messenger ribonucleic acid

NOD/SCID; non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency

PBMC ; peripheral blood mononuclear cell

PBS; phosphate-buffered saline

RNAi; RNA interference

RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction

SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

shRNA; short(small) hairpin RNA

siRNA; small interfering RNA

TBS; tris-buffered saline

TCR; T cell receptor

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。

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、ウィ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、特定のウィ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 1 および 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 MIIIC (MHC class II compartments) や CIIV (class II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して

細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10~30 数個（多くは 15 個前後）のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している (12, 13)。MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の（通常 4 ~ 5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4 ~ 5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス II 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する (13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い (図 2A, B)。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

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

図 1

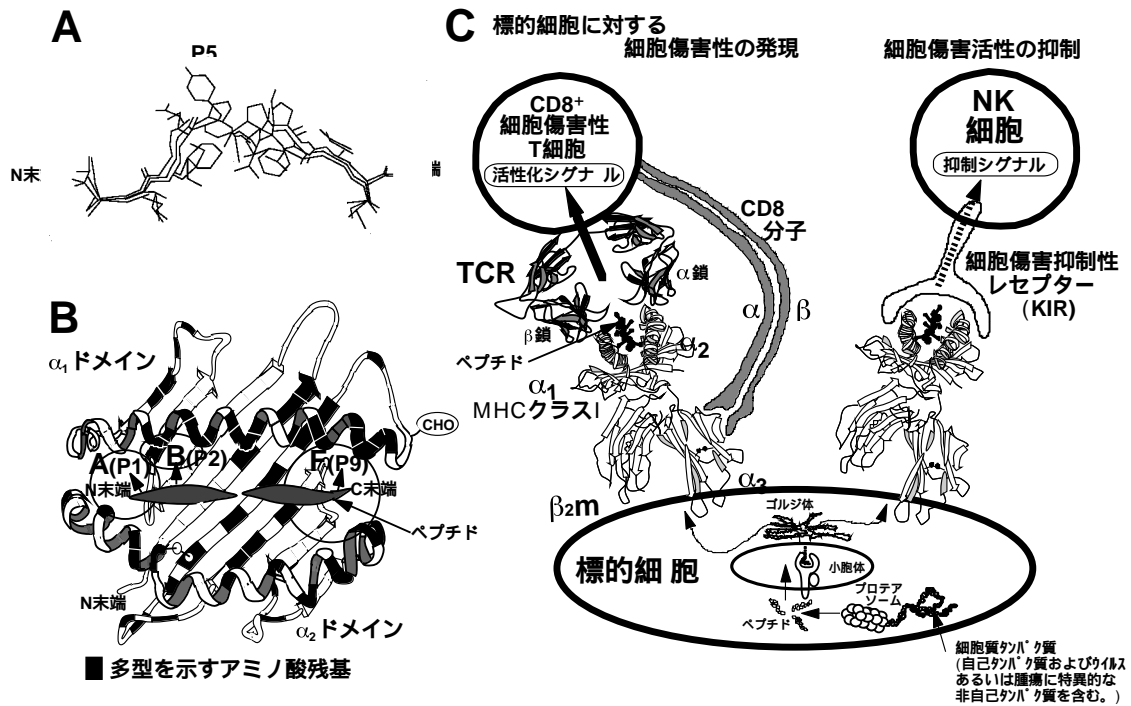


図 1. MHC クラス I による抗原ペプチドの CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) への提示

A. MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1 P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基 (P3 P7) の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの 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。1, 2, 3 および 2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび 2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター (killer-cell inhibitory receptor) を表す。

図 2

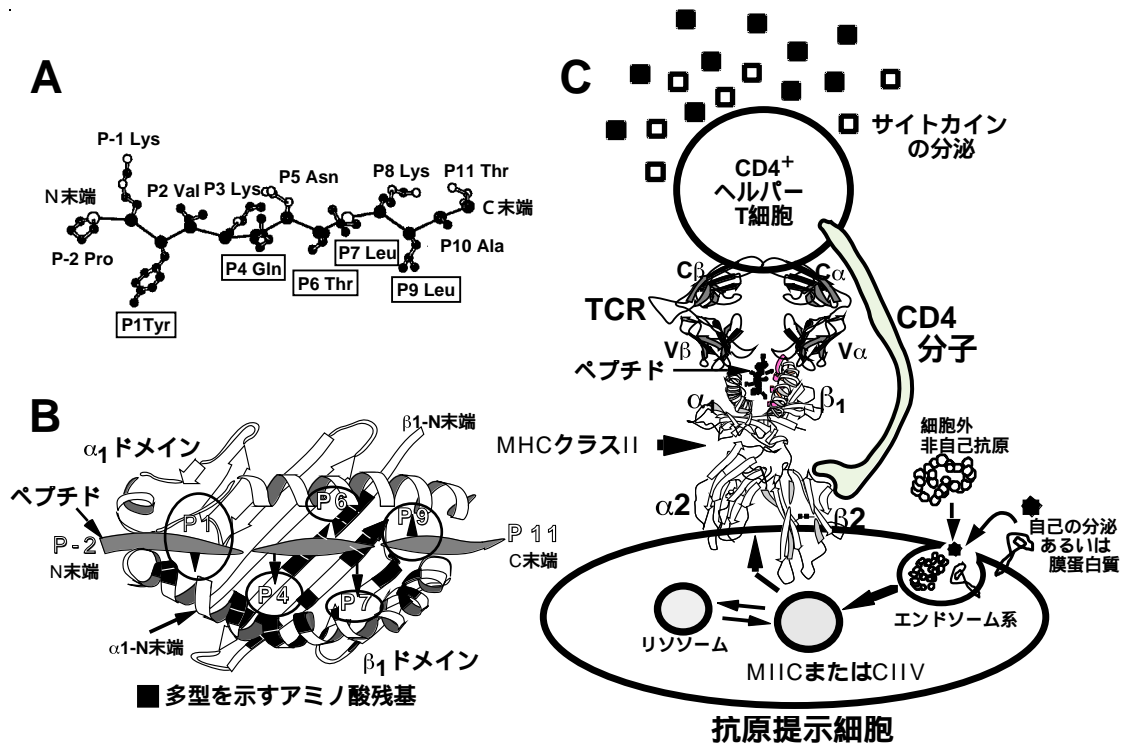


図 2. MHC クラス II 分子を介した抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパー T 細胞への提示

A. MHC クラス II 分子 (HLA-DR1) により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子はMHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子はMHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。B. HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上 (TCR 側) より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C. 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺T 細胞に提示される様子を示す。1, 2, 1 および 2 は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分の , は TCR の 鎖と 鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

5 - 2) 抗腫瘍免疫のあらまし

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

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

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

図 3

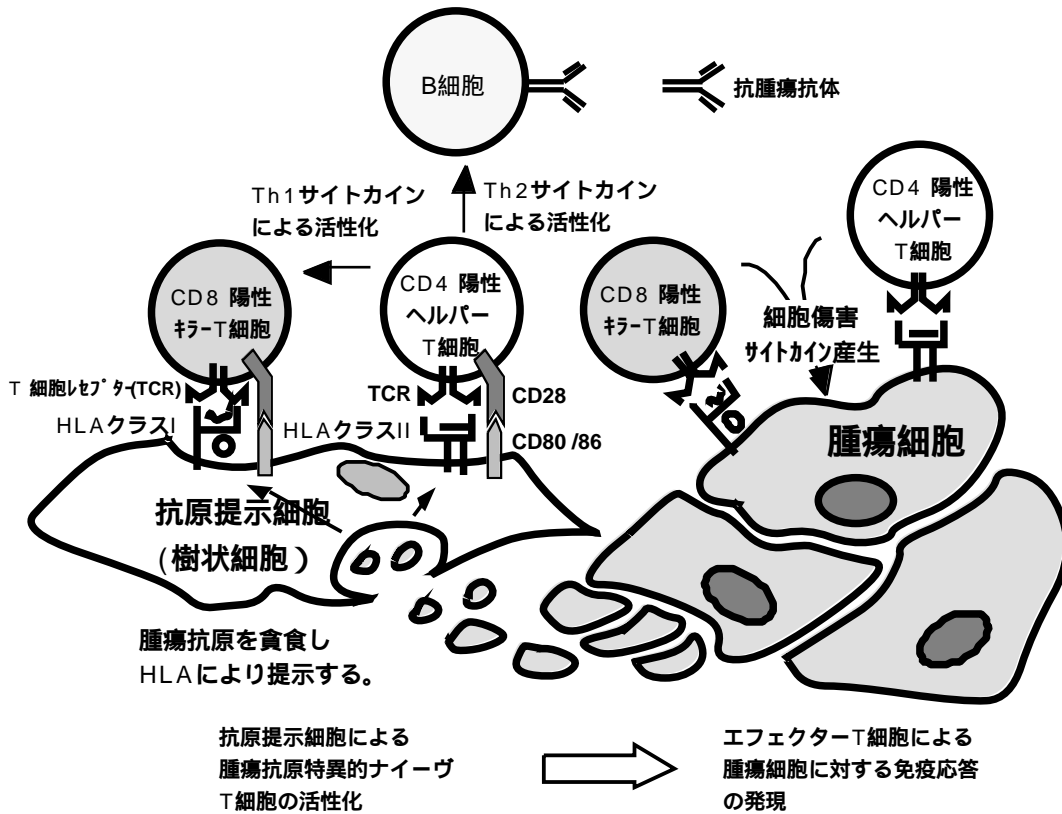


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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

5 - 3) 腫瘍拒絶抗原の同定

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

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

抗体を用いた腫瘍抗原同定の試みは、CTL による試みより長い歴史をもつ。特に腫瘍特異的モノクローナル抗体は大きな期待をもって迎えられた。しかし、作製された抗体の多くは分化抗原に対するもので、“癌特異的”な抗原は同定

されず、しかも癌免疫療法での抗体の有用性は特定の抗原を発現する癌に限定されたものとなっている。しかし、1995年にドイツ・Saarland大学のPfreundschuhら(27)により、癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が認識する腫瘍抗原を、遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)が確立された。SEREX法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでにSEREX法により同定された多数の腫瘍抗原(28-31)がデータベース化されている(<http://www2.licr.org/CancerImmuneDB>)。

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

5-4) cDNA マイクロアレイ解析を用いた 腫瘍拒絶抗原の同定

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に使えるという共通性(発現頻度)、腫瘍特異性、免疫原生、腫瘍拒絶能、抗原消失性、自己免疫などの副作用、などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。すなわち、理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として以下の3つが考えられる。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。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巢抗原(CT抗原)など。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。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、あるいはウィルス抗原に由来するペプチドを特異的に認識する T 細胞の証明 (変異 Ras、変異 p53、BCR/ABL、TEL/AML1 ほか)。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)。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)。cDNA microarray analysis による、遺伝子発現の組織特異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定と、その抗原性の解析 (PP-RP (32)、Glypican-3 (33) ほか)。

cDNA マイクロアレイ解析の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原候補の同定に cDNA マイクロアレイ解析を用いることの最大の利点は、一度に数千~数万種類の遺伝子の発現をスクリーニング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 の条件を満たす遺伝子を選出することができる。場合によっては の条件を満たす遺伝子を選出することもできる。さらに cDNA マイクロアレイ解析は患者毎に遺伝子発現を解析することができるため、各遺伝子の発現頻度も知ることができる。

今回われわれは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、食道癌に特異的に高発現する遺伝子を同定するために以下の 2 つの手順を踏み、上記の理想的な癌抗原としてふさわしい Proliferation potential-related protein (PP-RP) の同定に成功した。食道癌患者 26 例の癌部と非癌部における 9,216 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、多くの症例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を選ぶ。27 臓器 (胎生期の 4 臓器を含む) の正常組織における 9,216 種類の遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を選ぶ。

実際にはまず、食道癌患者 26 例の癌部と非癌部における 9,216 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、20 症例以上で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を 16 種類選び、次にそれらの各遺伝子について 27 臓器 (胎生期の 4 臓器を含む) の正常組織における 9,216 種類の遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を探し出した。今回われわれが腫瘍抗原として同定した PP-RP は、食道癌患者 26 例中 22 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上 (平均 396.2) で、胎盤に発現する以外は、ほとんどの正常臓器に発現を認めない遺伝子であった。

図 4

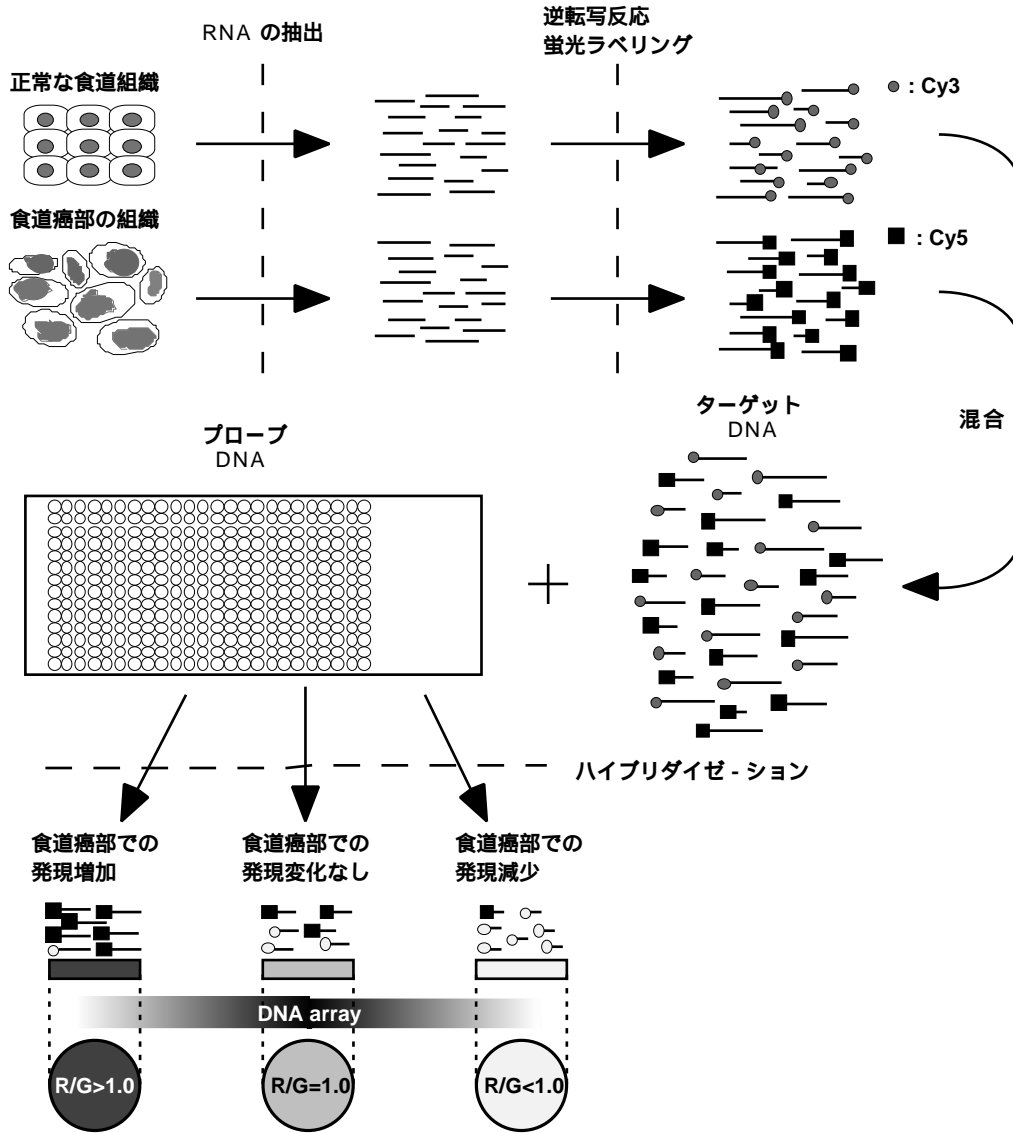


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

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。

表 1

cDNA マイクロアレイ解析を用いて同定された腫瘍抗原

抗原の特徴	抗原名	同定された腫瘍	文献
cancer-related autoantigen	Proliferation potential-related protein (PP-RP)	食道癌	Clinical Cancer Research
carcinoembryonic antigen	Glypican-3 (GPC3)	肝臓癌	Clinical Cancer Research
cancer-testis antigen	LEM domain-containing 1 (LEMD1)	大腸癌	Oncology Report

5 - 5) 本研究の目的

本研究は食道癌の cDNA マイクロアレイ解析より新たな腫瘍拒絶抗原を同定し、さらにその腫瘍の診断および抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を探ることを目的とする。

6 実験方法

6 - 1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた

腫瘍抗原遺伝子の同定

食道癌患者 26 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 9,216 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。その結果、正常食道組織（非癌部）では発現が低かったが、食道癌で発現が著明に増加する遺伝子 16 種類を選出した。

次に、それらの遺伝子の正常組織における発現を確認したところ、正常組織では胎盤のみに高発現しており、それ以外ではほとんど発現が認められない遺伝子、Proliferation potential-related protein (PP-RP) を同定した。PP-RP 遺伝子は、cDNA マイクロアレイ解析によると、食道癌患者 26 例中 22 例という高頻度で高発現している遺伝子だということが明らかになった。

6 - 2) ノザンプロット解析と Reverse

Transcription-PCR (RT-PCR)

TRIZOL reagent を用いて、様々な組織と細胞株から total RNA を抽出した。癌細胞株は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから供与頂いた。様々な癌組織、正常組織は熊本大学医学薬学研究部消化器外科学、顎口腔病態学より恵与された。いくつかの正常組織の total RNA は Biochain 社から購入した。ノザンプロット解析では、20 µg 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、もしくは Poly(A)⁺ RNA blots of human tissues (Human 12-Lane MTN Mlot, クロンテック社) に、PP-RP 特異的な約 1000bp の ³²P で標識したプローブをハイブリダイズさせ、PP-RP 遺伝子の発現を検出した。また、各 1 µg 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 1 分間、58 1 分間、72 1.5 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。比較対照のため アクチン特異的なプライマーも同時に用いた。プライマーのシーケンスは、表 2 に示す通りである。

6 - 3) PP-RP の免疫組織化学的解析と細胞内局在

ヤギ抗ヒト RBQ-1 ポリクローナル抗体 (サンタクルズ社) を用いて免疫組織化学解析を行った。vectastain ABC-PO (rabbit IgG, mouse IgG) キット (Vector Laboratories 社) を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法で、免疫染色を行った。一次抗体は、ヤギ抗ヒト RBQ-1 ポリクローナル抗体 (サンタクルズ社) を 200 倍希釈で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりパラフィンを除去して、正常ウサギ血清にて室温で 30 分間ブロックし、一次抗体を 4 で 14 時間反応させた後に phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した。さらにビオチン標識抗ヤギ IgG 抗体と室温で 1 時間反応させた後に PBS で洗浄し、ストレプトアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼと室温で 1 時間反応させて PBS で洗い、diaminobenzidine で発色させた。対比染色としてヘマトキシリンを使用した。

PP-RP の細胞内局在の解析も行った。PP-RP を高発現する食道癌細胞株 TE11 細胞を 35mm ペトリディッシュにまき、PBS 溶液で 2 回洗浄したあと、4%パラホルムアルデヒド溶液で 20 分間固定し、PBS 溶液で 3 回洗浄、その後 0.4% Triton-X/PBS にて 10 分間処理後、PBS 溶液で 3 回洗浄した。続いて 3% ウシ血清アルブミンにて 1 時間ブロッキングし、200 倍希釈した一次抗体 (ヤギ抗ヒト RBQ-1 ポリクローナル抗体 (サンタクルズ社)) を室温で 2 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体 (ジャクソンイムノリサーチラボラトリー社) を 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄し PBS で 10000 倍希釈した RNase を 20 分間反応させ RNA を分解した。PBS で 3 回洗浄し 0.25 μ g/ml の propidium iodide を 10 分間反応させ、DNA を染色した。PBS で 3 回洗浄しグリセロールを数滴落とし、カバーガラスをのせ、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV300 オリンパス社) で観察した。

6 - 4) 末梢血単核細胞(PBMC)からの PP-RP 特異的 CTL 株の樹立

PP-RPのアミノ酸配列について、日本人集団で一番頻度が高いHLA-A24 (HLA-A*2402)分子に結合するペプチドの構造モチーフを有する部分をモチーフ探索データベース (http://bimas.dcrt.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform)で検索し、10種類のペプチドを選択した(表5)。HLA-A24(A*2402)結合モチーフの概略は、P2にチロシン、フェニルアラニン、P9またはP10にロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファンが存在することである。これら10種類のペプチドをペプチド合成装置で作成し、食道癌患者5人、健常人6人の計11人のPBMCを刺激し、HLA-A*2402拘束性にペプチドを認識する細胞株を樹立した。具体的な方法は、(図5)に示した。

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)をもちいて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10%ウシ胎児血清入りRPMI1640メディウム中で培養して5日目にTNF- α を20 ng/mlになるように加えさらに2日培養し、成熟樹状細胞(DC)に分化させ、抗原提示細胞として使用した。CTLの誘導には10%自己血清入りRPMI1640メディウムを使用した。24穴プレートに1ウェルあたりDCを $1-2 \times 10^5$ 個と5 μ Mのペプチドを入れ2時間後に35Gyの放射線を照射した。その後に凍結保存しておいた 2×10^6 個のCD8陽性細胞を加え培養した。第1日目にIL-7(5 ng/ml)を加えた。またこの日から新しいDCの誘導を始めた。第8日第15日に同様のDCを準備し、CD8陽性細胞をRPMI1640で1回洗浄後、DCで再刺激した。この際にIL-7(5 ng/ml)とIL-2(10 U/ml)を加えた。

ペプチド特異的CTLの誘導の確認は、C1R-A*2402細胞を標的細胞にした ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験を指標として行った。C1R-A*2402細胞は本学滝口教授(ウイルス制御学)より供与頂いたもので、HLAをほとんど発現していないEBウイルス感染Bリンパ球株C1R細胞にHLA-A*2402を遺伝子導入した細胞である。また陰性対照群としてC1R細胞にペプチドを加えた群に対する反応も検討した。 ^{51}Cr 放出法による細胞傷害の定量はC1R-A*2402細胞を ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$)で1時間ラベルした後、96穴U底プレートに1ウェルあたり 1×10^4 個まき、その10、20、40、倍数の培養20日目のCTL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った。

6 - 5) PP-RP 特異的 CTL 株の解析

通常の癌細胞に対する細胞傷害活性を検討するために HLA-A24、PP-RP の両方を発現している食道癌細胞株 (TE-11、TE-13)、HLA-A24 は発現しているが PP-RP は発現していない肝臓癌細胞株 (SK-Hep-1)、PP-RP は発

現しているが HLA-A24 は発現していない食道癌細胞株 (TE-9) を用いて細胞傷害活性を測定した。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、 1×10^4 個まいた。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 を測定した。

さらに癌細胞を傷害する CTL 細胞株が PP-RP 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 PP-RP 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を検討するために、PP-RP を高発現している食道癌細胞株 TE13 に PP-RP の RNAi を用いて PP-RP をノックダウンした細胞を標的細胞として ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験を行った。

6 - 6) 養子移植免疫療法モデル

6 週齢のメスの BALB/c ノードマウスをチャールスリバー社より購入し、熊本大学の Center for Animal Resources and Development (CARD) にて飼育した。まず、 1×10^5 個のヒト食道癌細胞株 TE11 を BALB/c ノードマウス背部皮下に移植 (zenografting) する。TE11 が腫瘍を形成し、その大きさが 30mm^2 になったところで、 5×10^6 個の PP-RP ペプチド 8 特異的な CTL 細胞株、コントロールの CD8^+ T 細胞株もしくは PBS のみを腫瘍内およびその周辺に局所注入した。コントロールの CD8^+ T 細胞株として、食道癌患者の PBMC をペプチド 5 で刺激後に得たが、ペプチド 5 特異的な細胞傷害活性を示さず、さらに TE11 に対しても細胞傷害活性を全く示さなかった CD8^+ T 細胞株を用いた。Day0 と 7 に 2 回、各 T 細胞株を局所注入し、その後 3 日毎に腫瘍の大きさ (長径 \times 短径) を測定した。

6 - 7) RNAi による PP-RP ノックダウン細胞の作製

PP-RP の遺伝子発現を RNAi (RNA interference) により抑制するために、siRNA (small interfering RNA) を設計した。PP-RP の発現を減少させることのできた配列は、5'-GAACAGCACUCCUGGAAUC-3'であった。その配列をもとに、short hairpin RNA (shRNA) を作製した。これについては、Ambion (Austin, TX, USA) と NipponBioService (Asaka, Saitama, Japan) を参考にした。shRNA の配列は、センス 5'-GATCCCGAACAGCACTCCTGG AATCTTCAAGAGAGATTCCAGGAGTGCTGTTCTTTTTTGGAAA-3'、アンチセンス 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAACAGCACTCCTGGAATCTCTCT

TGAAGATTCCAGGAGTGCTGTTCGG-3'とし、shRNA 発現 vector を作成し、PP-RP を高発現している食道癌細胞株 TE13 に遺伝子導入した。PP-RP 蛋白質の発現が減少していることは、ウエスタンブロット解析と蛍光免疫染色にて確認した (図 14、19)。

図 5

末梢血単核細胞ドナー：HLA-A24陽性食道癌患者 & 健常人
 メディウム：10%自家血漿添加RPMI-1640

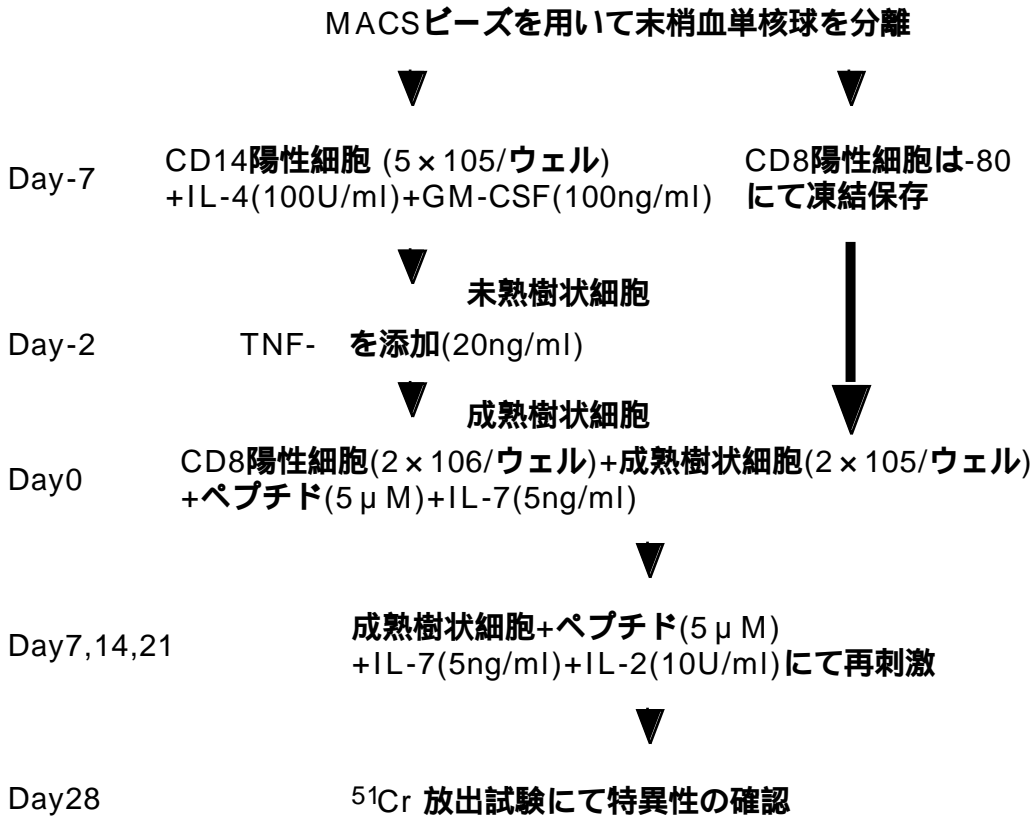


図 5. 腫瘍抗原ペプチドに特異的な CTL 株の樹立法

末梢血から Ficoll にて PBMC を分離し CD8 抗体と CD14 抗体を付着させた MACS ビーズで、それぞれ 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 陽性細胞は、GM-CSF と IL-4 を入れたメディウム中で 6 穴プレート 1 ウェルあたり 5 × 10⁵ 個でまいた。5 日目に TNF- を添加して、成熟樹状細胞に分化させた。一度洗浄した後、2 × 10⁵ 個の成熟樹状細胞と 5 μM のペプチドを 24 穴プレートにいれ、2 時間静置した後、35Gy の放射線を照射した。そこに 2 × 10⁶ 個の CD8 陽性細胞と IL-7 を加えた。その日から新たに樹状細胞の誘導を開始した。7 日と 14 日後に同様に樹状細胞とペプチドで再刺激した。その際、IL-2 もさらに加えた。18 日目以降の細胞を使用して、C1R-A*2402 細胞を標的細胞として ⁵¹Cr 放出試験にて CTL 株のペプチド特異性を確認した。

表 2

PP-RP 遺伝子の RT-PCR に用いたプライマー

腫瘍抗原	プライマーの塩基配列	
PP-RP	sense	5'-TGCTGTTGTGATTCCCTGCTG-3'
	antisense	5'-AGGAAACTGAGGAGAAAAGT-3'

表 3

PP-RP のノックダウンに用いた siRNA

siRNA	塩基配列	
PP-RP - siRNA	5'-GAACAGCACUCCUGGAAUC-3'	
short hairpin RNA (shRNA)	sense	5'-GATCCCGAACAGCACTCCTGGA ATCTTCAAGAGAGATTCCAGGAGT GCTGTTCTTTTTTGGAAA-3
	antisense	5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAACAGC ACTCCTGGAATCTCTTTGAAGAT TCCAGGAGTGCTGTTTCGG-3'

7 実験結果

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

食道癌患者 26 例の癌部と非癌部の RNA をそれぞれ抽出し、9,216 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行った。そのデータをわれわれは解析し、26 例中 20 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 16 種類選び出した (図 6)。選んだ 16 種類の遺伝子の正常組織での発現を確認後、proliferation potential-related protein (PP-RP) を腫瘍拒絶抗原候補として選んだ (図 7)。

その結果、PP-RP 遺伝子は 26 例中 22 例において、非癌部に比べて癌部で 5 倍以上の発現がみられる遺伝子であった。また、正常および胎生期の組織において PP-RP は、胎盤のみで高い発現が認められ、その他の組織ではほとんど発現が認められない遺伝子であった。

7-2) RT-PCR とノザンプロット解析による癌細胞株、 癌組織および正常組織における PP-RP 遺伝子 の発現解析

9 種類の食道癌細胞株と 3 例の食道癌患者での PP-RP 遺伝子の発現を RT-PCR (図 8) にて、また、13 種類の正常組織における PP-RP 遺伝子の発現をノザンプロット解析 (図 9) にて確認した。その結果、調べた 9 種類の食道癌細胞株と 3 例の食道癌患者すべてにおいて PP-RP 遺伝子は発現していた。また、PP-RP 遺伝子は正常組織において、胎盤と精巣に強い発現が認められ、脳、心臓、腎臓、肺、肝臓では弱い発現が認められた。正常な食道組織では発現は認められなかった。

図 7

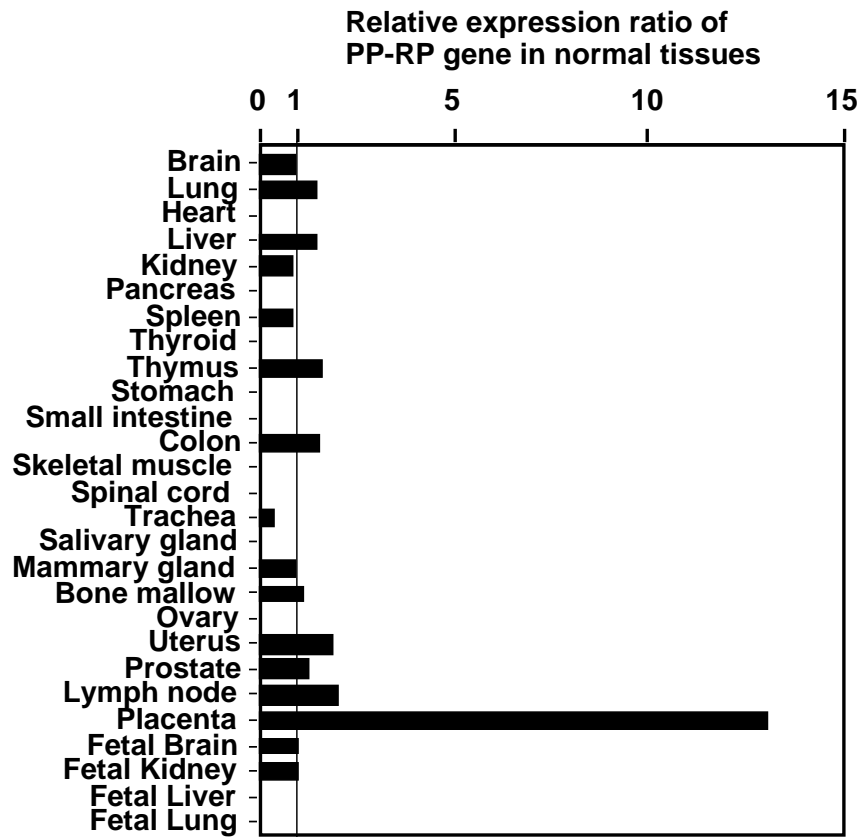


図 7. 正常組織での PP-RP 遺伝子の発現解析 (cDNA マイクロアレイ解析による)

正常および胎生期の組織における PP-RP 遺伝子の発現を cDNA 解析のデータより解析したところ、PP-RP 遺伝子は胎盤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 8

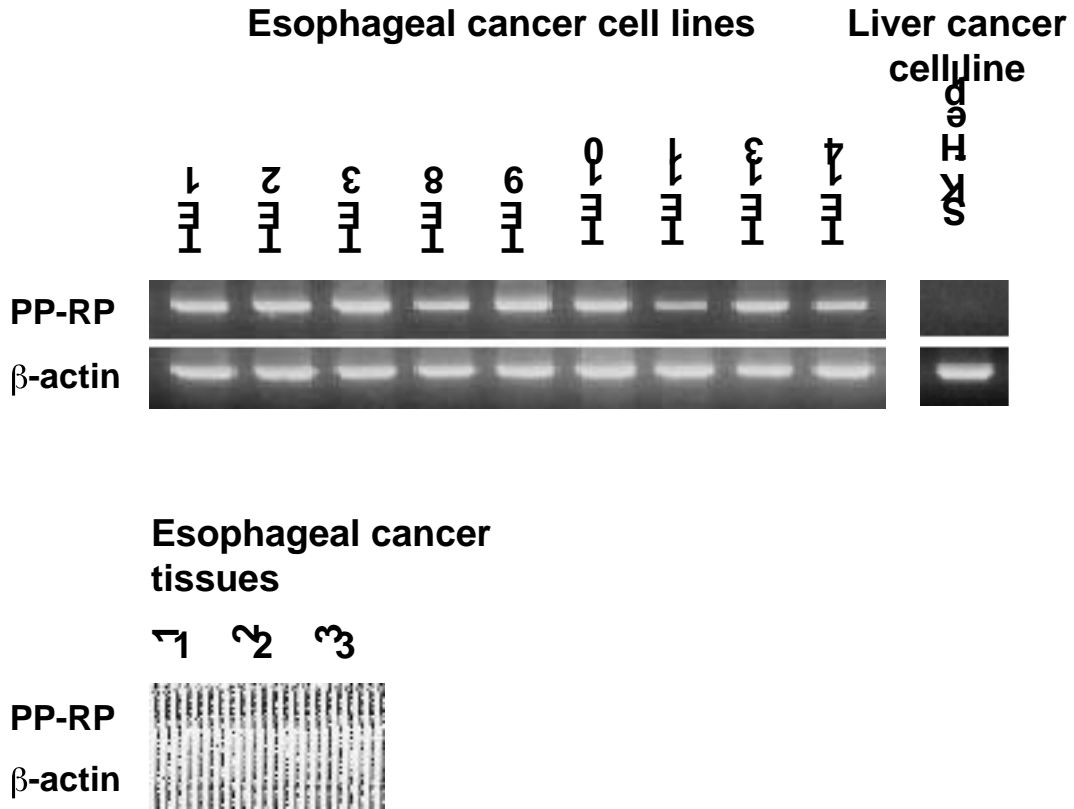


図 8. RT-PCR による癌細胞株および食道癌組織における PP-RP 遺伝子の発現解析

癌細胞株 10 種類、食道癌組織 3 例について PP-RP mRNA の発現を解析した。1 μ g の total RNA を用いて cDNA を合成した。PP-RP については 30 サイクルの PCR を行った。RNA 量のコントロールとして、 β -アクチンの PCR も行った(25 サイクル)。

図 9

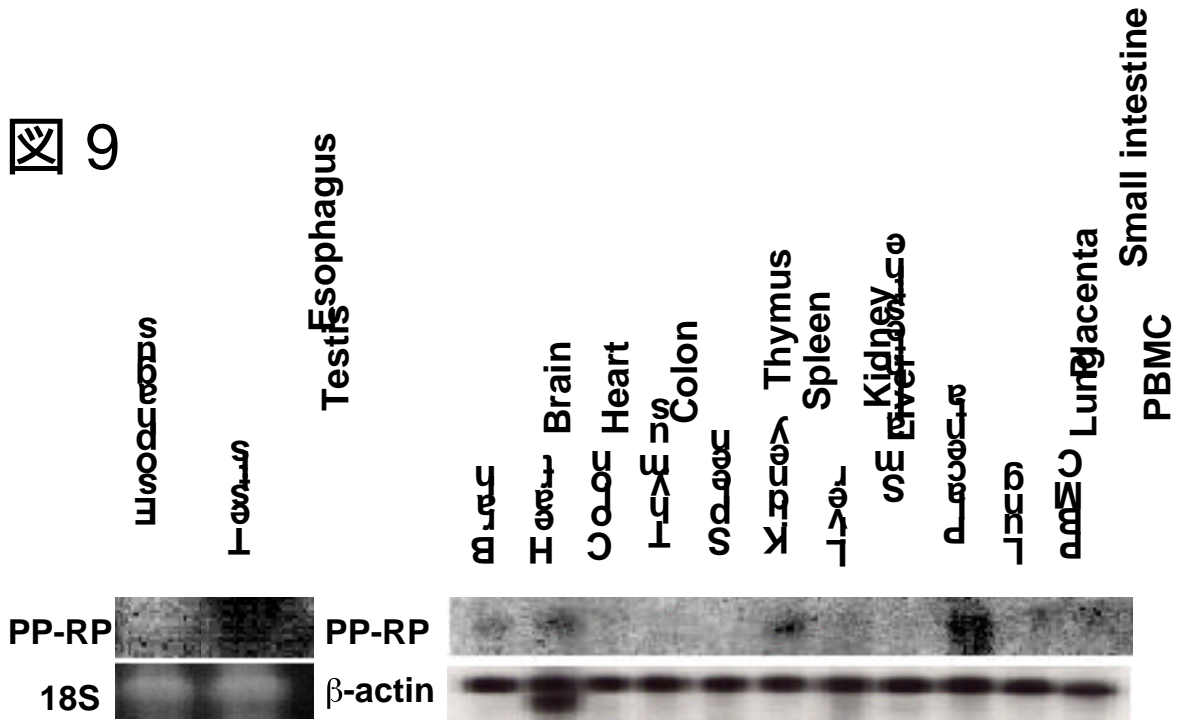


図 9. ノザンブロット解析による正常組織における PP-RP 遺伝子の発現解析

正常組織 13 種類について PP-RP mRNA の発現を解析した。PP-RP については 30 サイクルの PCR を行った。18S、 β -アクチンを RNA 量のコントロールとして検出した。

7 - 3) PP-RP 蛋白質の免疫組織化学的解析

正常胎盤、精巣、脾臓、リンパ節、脳、腎臓、肺、肝臓および食道癌組織についてパラフィン標本を用いて PP-RP 蛋白質の発現を検討した。正常組織においては、胎盤および精巣においてのみ PP-RP 蛋白質の発現が認められた(図 10A-D)が、脾臓、リンパ節、脳、腎臓、肺、肝臓では認められなかった(図 10E-P)。また、正常食道においても PP-RP 蛋白質の発現は認められなかった(図 10Q,R)が、食道癌患者 22 例においては、ほとんどの症例で PP-RP 蛋白質の発現が認められた(図 10S-V)。さらに高倍率で観察したところ、分裂期の細胞において染色体と一致して PP-RP 蛋白質の局在が認められた(図 10W,X)。

7 - 4) 食道癌手術後 R1 症例における、 PP-RP 遺伝子の発現量と予後の関係

食道癌の手術後、腫瘍の残存が認められない症例を R0、肉眼的に明らかに腫瘍の残存が認められる症例を R2 とした。R0 にも R2 にも含まれない症例を R1 とした。R0、R1、R2 はそれぞれ 26 例中 8 例、15 例、3 例であった。R1 の 15 例のうち、PP-RP の発現量が非癌部と比べ癌部で 1000 倍以上あった 5 症例を R1A、142.1 倍以下(2.1-142.1 倍)の 10 症例を R1B とした場合、R1A 群では全員が 25 カ月以内に死亡してしまったのに対して、R1B 群では 10 例中 7 例において 30 カ月以上(30-122 カ月)の生存が確認された(表 4)。また、R1A 群と R1B 群では生存期間に有意な差($p < 0.05$)が認められた(図 11)。

图 10

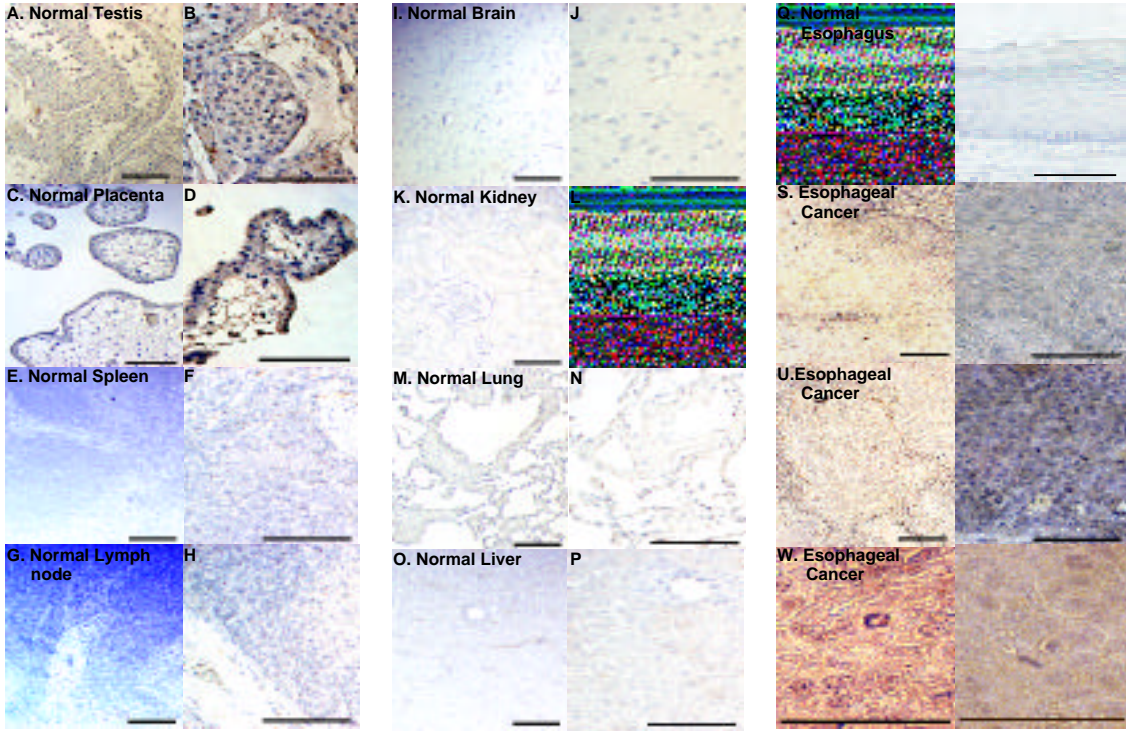


表 4

食道癌の手術後、R1 であった 15 症例の臨床病理学的特徴

性別	年齢(歳)	癌部・非癌部における PP-RPの発現量の 相対比	予後 ^a	生存期間 ^b (月)	TNM 分類	病理組織評価 ^c	腫瘍の残存 状態 ^d
男	43	>1000	死亡	24	IV	G2	R1
男	60	>1000	死亡	16	IV	G2	R1
男	55	>1000	死亡	16	IV	G1	R1
男	56	>1000	死亡	12	IV	G2	R1
男	60	>1000	死亡	4	IV	G1	R1
男	61	142.1	生存	>62	IV	G1	R1
男	61	48.6	生存	>98	IV	G2	R1
男	54	11	生存	>122	III	G2	R1
男	50	10.5	生存	>34	IV	G1	R1
男	58	10.2	死亡	19	IV	G2	R1
男	67	6.3	生存	>30	IV	G2	R1
男	67	6	生存	>30	IV	G2	R1
男	63	5	死亡	11	IV	G2	R1
男	57	2.2	生存	>30	IV	G2	R1
男	55	2.1	死亡	20	IV	G2	R1

^a 8名の患者が食道癌に関連する原因で、死亡した。

^b 追跡月数は、手術から死亡もしくは最終追跡日までの期間とした。

^c G1、G2、および G3 は、分化の度合いがそれぞれ高度、中等度、もしくは低いことを示す。

^d R0 は残存腫瘍がない状態を、R2 は肉眼で見える残存腫瘍がある状態を示しており、R1 とは R0 でも R2 でもない状態を示す。

図 11

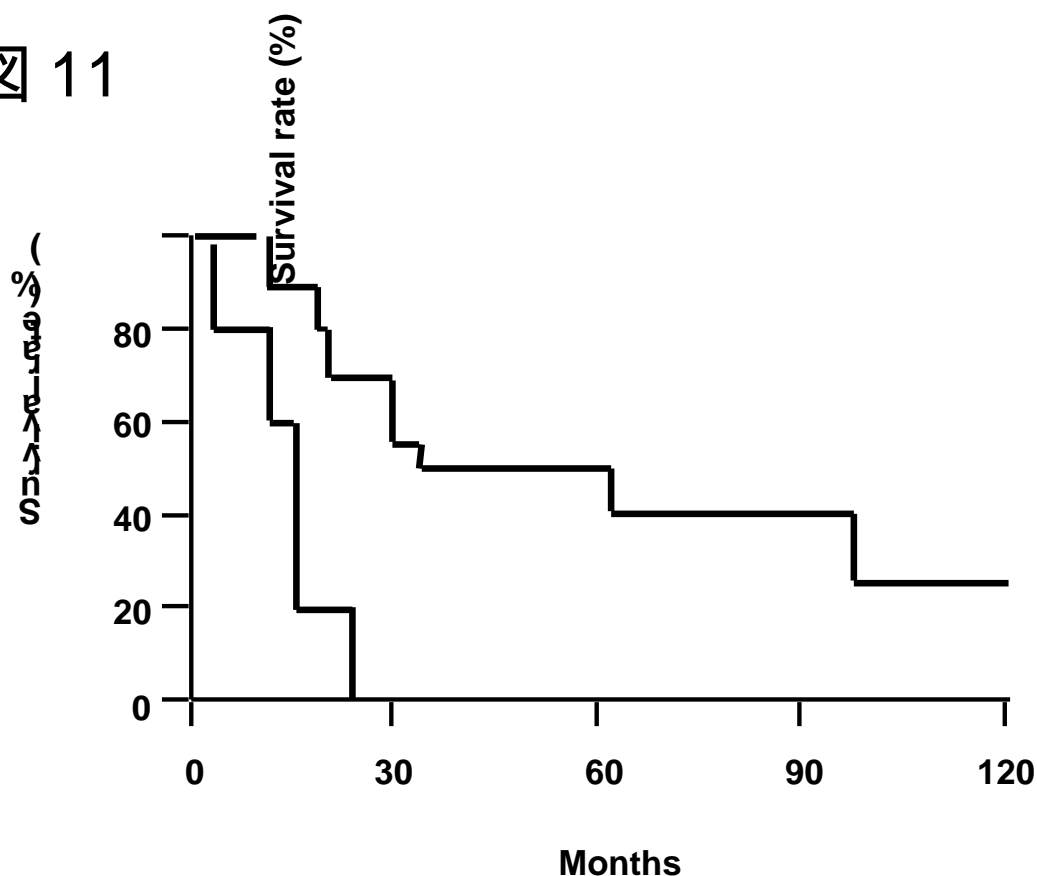


図 11. 食道癌の手術後 R1 であった 15 症例における、PP-RP 遺伝子の発現量と予後の関係

PP-RP が非癌部と比較して癌部で 1000 倍以上発現している 5 例では、すべての患者が 24 か月以内に死亡していた（ ）。一方、PP-RP の発現が 142 倍以下（2.1-142.1 倍）の 10 例中 7 例では、30 か月以上（30-122 か月）の生存が確認された（ ）。この 2 群間には、統計学的に有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。

7 - 5) PP-RP 特異的 CTL 株の樹立

HLA-A*2402 陽性の食道癌患者 5 人健常人 6 人の PBMC を、PP-RP ペプチドを添加した自己の樹状細胞 (DC) を用いて刺激することより、PP-RP 特異的 CTL 細胞株の樹立を試みたところ、C1R-A*2402 細胞に PP-RP ペプチドを添加した場合にのみ細胞傷害活性をもつ CTL 細胞株を誘導することができた。代表的な 4 つの CTL 細胞株について、図 12 にまとめた。これらの CTL 細胞株は C1R-A*2402 細胞に当該ペプチドを負荷したときにのみ細胞傷害活性を示し、HLA-A*2402 を発現していない親株の C1R 細胞に当該ペプチドを負荷しても細胞傷害活性を示さなかった。また、C1R-A*2402 細胞に HLA-A24 に結合できる HIV-1 ペプチドを添加えた場合には、細胞傷害活性を示さなかった (図 12)。これらの結果より、これらの CTL 細胞株は HLA-A24 拘束性に PP-RP ペプチドを認識できることが明らかとなった。

次に、これらの CTL 株が PP-RP を発現した食道癌細胞を傷害することができるか否かについて検討した。HLA-A24 の発現は、抗 HLA-A24 抗体 (One Lambda, Inc., USA) フロー・サイトメトリーを用い確認した (data not shown)。PP-RP の発現は RT-PCR で確認した (図 8)。TE11、TE13 と SK-Hep1 細胞は HLA-A24 を発現しているが、TE9 細胞は発現していなかった。また、TE11、TE13 と TE9 細胞は PP-RP を発現しているが、SK-Hep1 細胞は発現していなかった。4 つの CTL 細胞株は、HLA-A24 と PP-RP を両方とも発現している TE11、TE13 細胞に対して細胞傷害活性を示したが、片方しか発現していない TE9、Sk-Hep1 細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかった (図 13)。この結果より、PP-RP は HLA-A24-PP-RP ペプチド複合体として細胞表面上に提示されており、それを認識し、傷害活性を示すことのできる CTL 細胞株が存在することが明らかとなった。

今回、食道癌患者 5 人、健常人 6 人において 10 種類の PP-RP ペプチドを用い PP-RP 特異的な CTL 細胞株の誘導した結果を表 5 に示す。食道癌患者 5 人すべてにおいて PP-RP 特異的な CTL 細胞株の誘導できたが、健常人ではできなかった。また、10 種類の PP-RP ペプチドのすべてにおいて PP-RP 特異的な CTL 細胞株の誘導が可能であり、誘導されるペプチドの種類が人によって異なることも明らかとなった。

さらに誘導された CTL 細胞株の PP-RP 特異的な細胞傷害活性を確認するために、われわれは TE13 細胞に、PP-RP siRNA を発現する pSilencer vector

を遺伝子導入し、PP-RP をノックダウンした TE13shPP-RP 細胞を作製した。コントロールとして、TE13shGFP 細胞も作製した。TE13shPP-RP 細胞では TE13、TE13shGFP 細胞よりも PP-RP 蛋白質の発現量が減少していることを、ウエスタンブロット解析により確認した (図 14)。

そこでわれわれは、誘導した CTL 細胞株の標的細胞としてこれらの細胞を用いることにした。図 13、14 と同じ 4 つの CTL 細胞株について、図 15 に示した。これらの CTL 細胞株は、TE13、TE13shGFP 細胞に対して細胞傷害活性を示したが、TE13shPP-RP 細胞に対しては示さなかった。そこで TE13shPP-RP 細胞に当該ペプチドを加えると、細胞傷害活性を示すようになった。この結果より、これらの PP-RP ペプチドは、TE13 細胞中での自然なプロセッシングにより産生されることが明らかとなった。

表 5

合成 PP-RP ペプチドで刺激した HLA-A24 陽性の食道癌患者および健康人の PBMC からの、PP-RP 特異的 CTL 株の誘導

No.	PP-RP由来ペプチド		Binding ^a スコア	HLA-A24陽性食道癌患者からのCTLの誘導					それぞれ のペプチドからの CTL誘導	HLA-A24陽性健康人のPBMCからのCTLの誘導					それぞれ のペプチドからの CTL誘導	
	位置	ペプチド配列		1	2	3	4	5	率	1	2	3	4	5	6	率
PP-RP-1	137-146	KFLRQAVNNF	36	- ^b	-	-	-	+	1/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-2	151-160	GYTKRLRKQL	240	-	+	+	+	+	4/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-3	336-345	GYLVSPQI	90	-	+	-	+	+	3/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-4	379-388	VFVPVPPPL	36	-	-	+	-	+	2/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-5	388-396	LYPPPHL	360	+	-	+	-	-	2/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-6	420-428	GYSVPPGF	100	+	-	+	-	-	2/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-7	464-472	EFYREQRRL	36	+	-	-	+	-	2/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-8	484-493	EFTNDFAKEL	22	+	-	+	-	+	3/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-9	622-630	RYREVPY	20	+	-	+	+	+	4/5	-	-	-	-	-	-	0/5
PP-RP-10	634-642	AYYGRSVDF	100	+	-	-	+	-	2/5	-	-	-	-	-	-	0/5
それぞれのドナーにおける CTL誘導率				6/10	2/10	6/10	5/10	6/10		0/100	100/100	100/100	100/100	100/100	10/10	

^a http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/ :BIMAS (Dr.Kenneth Parker による HLA 結合予測) による HLA class I 分子とペプチドの結合の半減期の推定値を示す。

^b 標的細胞の C1R-A*2402 細胞に当該 PP-RP ペプチドを負荷しない場合よりも負荷した場合における細胞傷害活性が有意 (p<0.05) に高かった CTL 株を“+”と表した。細胞傷害活性は、当該ペプチドにて週 1 回の刺激を 4 回くり返した後得られた CTL 株を用いて検討した。

図 12

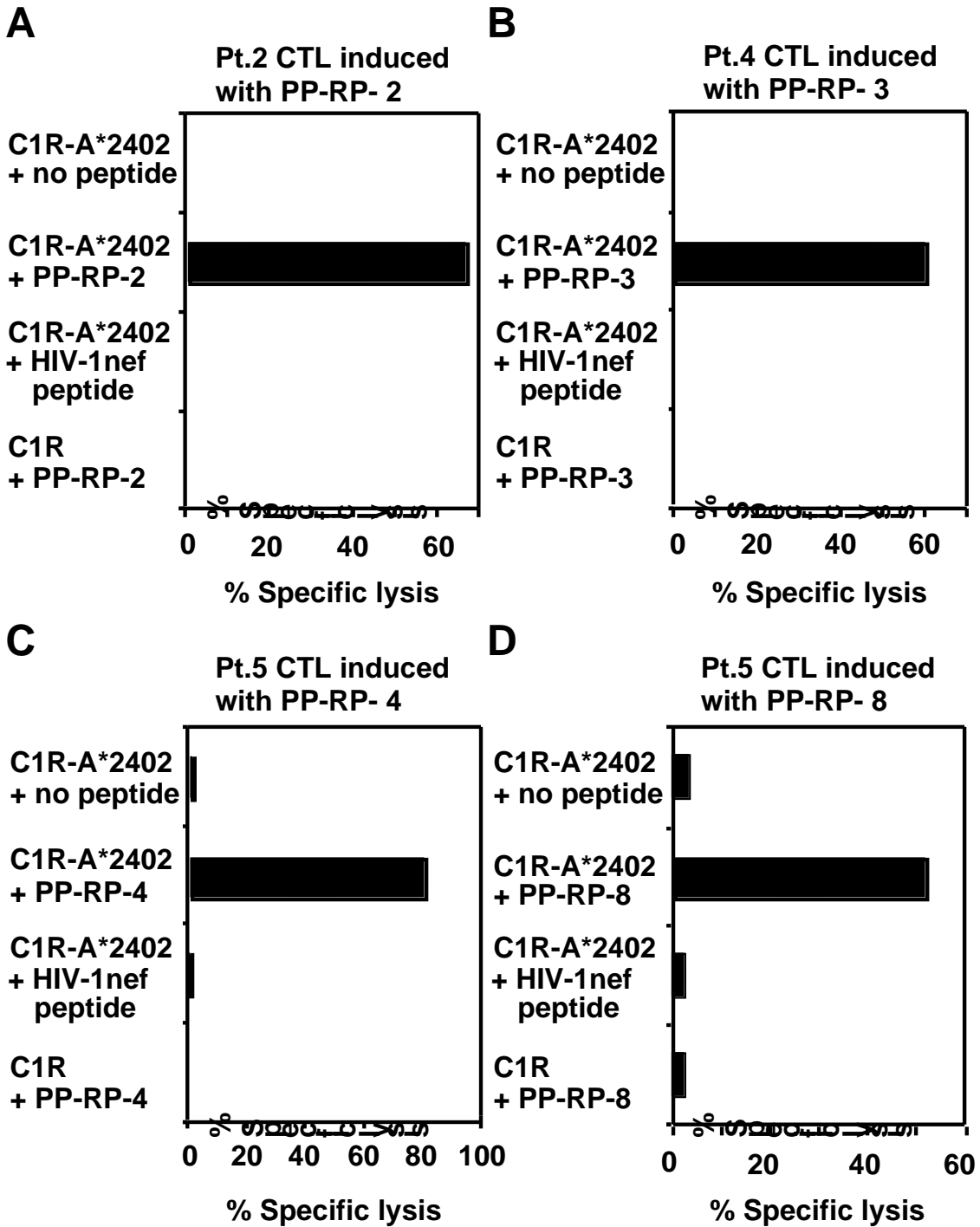


図 12. CTL 株の HLA-A24 拘束性かつ PP-RP ペプチド特異的な細胞傷害活性

PP-RP-2(A)、3(B)、4(C)、8(D)特異的な CTL 細胞株は、それぞれ食道癌患者 2、4、5、5 より誘導された。それぞれの細胞傷害活性は、E/T=20 で 4 時間の ⁵¹Cr.放出実験にて検討した。

図 13

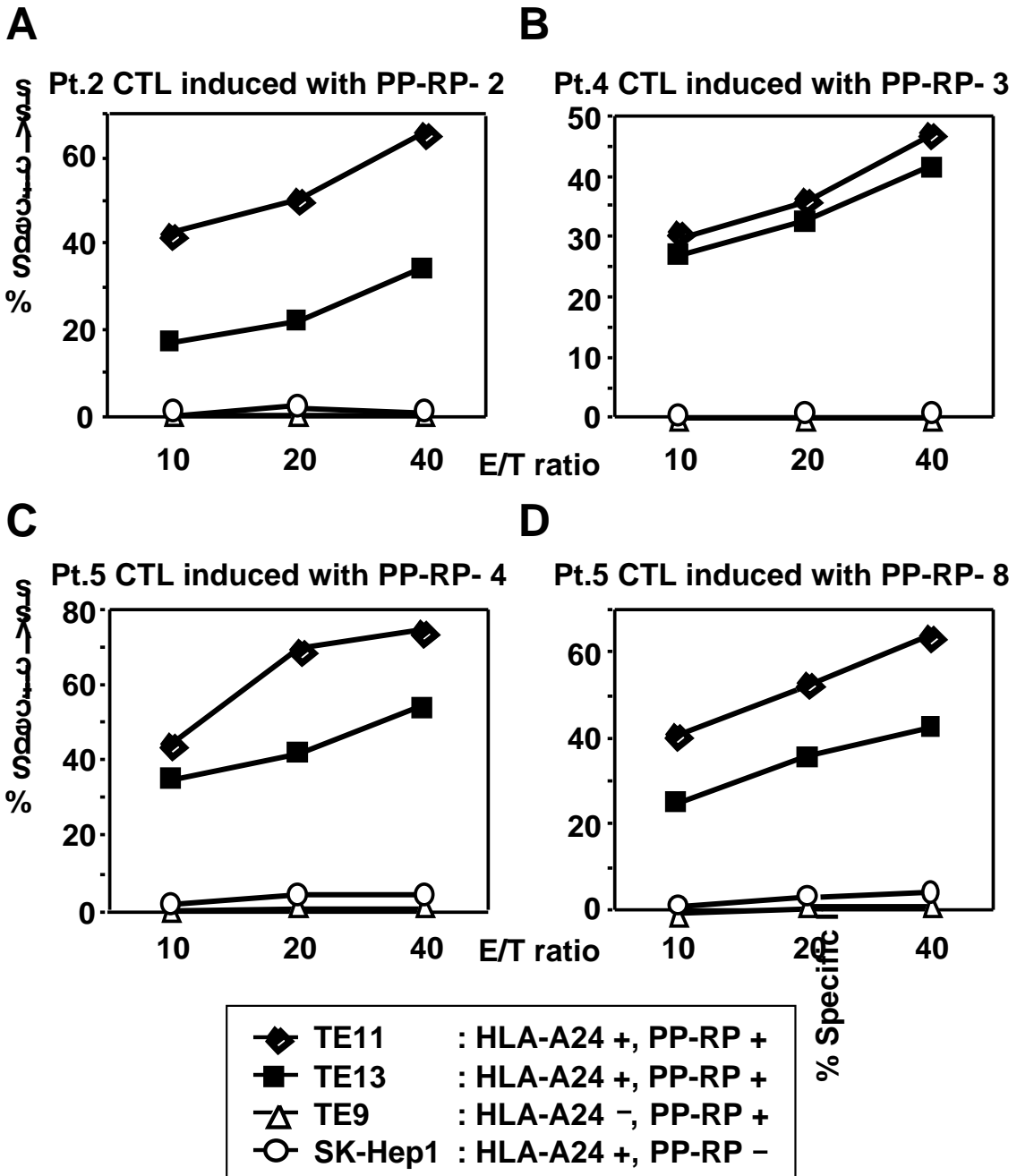


図 13. PP-RP ペプチドで誘導した CTL 株の、癌細胞株に対する細胞傷害活性

この実験で用いた CTL 細胞株は、図 12 と同様である。それぞれの細胞傷害活性は、E/T=10、20、40 で 4 時間の ⁵¹Cr. 放出実験にて検討した。

図 14

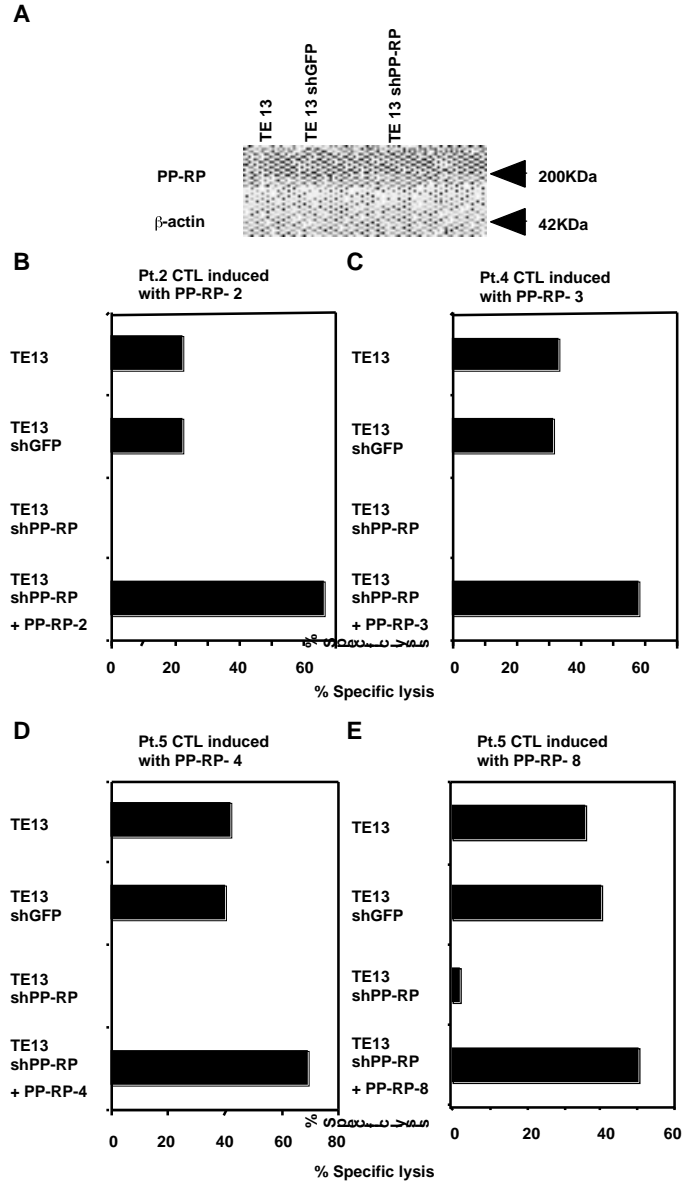


図 14. PP-RP 発現抑制による、食道癌細胞株 TE13 細胞に対する PP-RP 特異的 CTL 株の細胞傷害活性の減弱

まず、TE13 細胞に PP-RP siRNA を発現する pSilencer vector を遺伝子導入し作製した TE13shPP-RP 細胞、コントロールの TE13shGFP 細胞、TE13 細胞における PP-RP 蛋白質の発現をウエスタンブロット解析にて確認した。これにより、TE13shPP-RP 細胞では PP-RP 蛋白質の発現が抑制されていることが明らかになった。そこで、図 12、13 と同様の CTL 株を用い、TE13、TE13shGFP、TE13shPP-RP もしくは TE13shPP-RP に当該ペプチドを負荷した細胞を標的とし、E/T=20 で 4 時間の ^{51}Cr 放出実験を行い、細胞傷害活性を検討した。

7-6)ヌードマウスに移植したヒト食道癌細胞株への PP-RP ペプチドで誘導した CTL 株の局所注入による増殖抑制

BALB/c のヌードマウスにヒト食道癌細胞株 TE11 細胞を皮下注射して生着させた後に、PP-RP ペプチド 8 で刺激することにより誘導されたヒト CTL 株 (PP-RP-8 特異的 CTL 株) を養子免疫するという、実際の食道癌治療を念頭においた実験を行った。PP-RP ペプチドで刺激後に得られたが、ペプチド特異性を示さず、かつ TE11 細胞に対しても細胞傷害活性を示さない CD8 陽性 T 細胞株、あるいは PBS のみをコントロールとして用いた。ヌードマウスに生着した TE11 細胞の時間経過による大きさの変化を図 15 に示す。PP-RP-8 特異的 CTL 株を養子免疫したヌードマウスでは腫瘍の増殖抑制が明らかに認められたが、コントロールの T 細胞株もしくは PBS のみでは、腫瘍の成長を抑制できなかった。PP-RP-8 特異的 CTL 株を腫瘍局所に注入した腫瘍は、コントロールマウスの腫瘍よりも明らかに小さく、さらに 5 匹中 1 匹では、腫瘍の完全な拒絶が確認された。

また、PP-RP-8 特異的 CTL 株、コントロール T 細胞株、あるいは PBS のみを養子免疫したマウス群の生存曲線を図 16 に示す。PP-RP-8 特異的 CTL 株を養子免疫したマウス群とコントロールマウス群では、生存期間においても大きな差が生じた。コントロールマウスは、120 日以内にすべて死亡してしまったのに対し、PP-RP-8 特異的 CTL 株を養子免疫したマウス群では 120 日の時点ではすべてのマウスが生存しており、その後も長く生存を認めた ($p < 0.05$)。

図 15

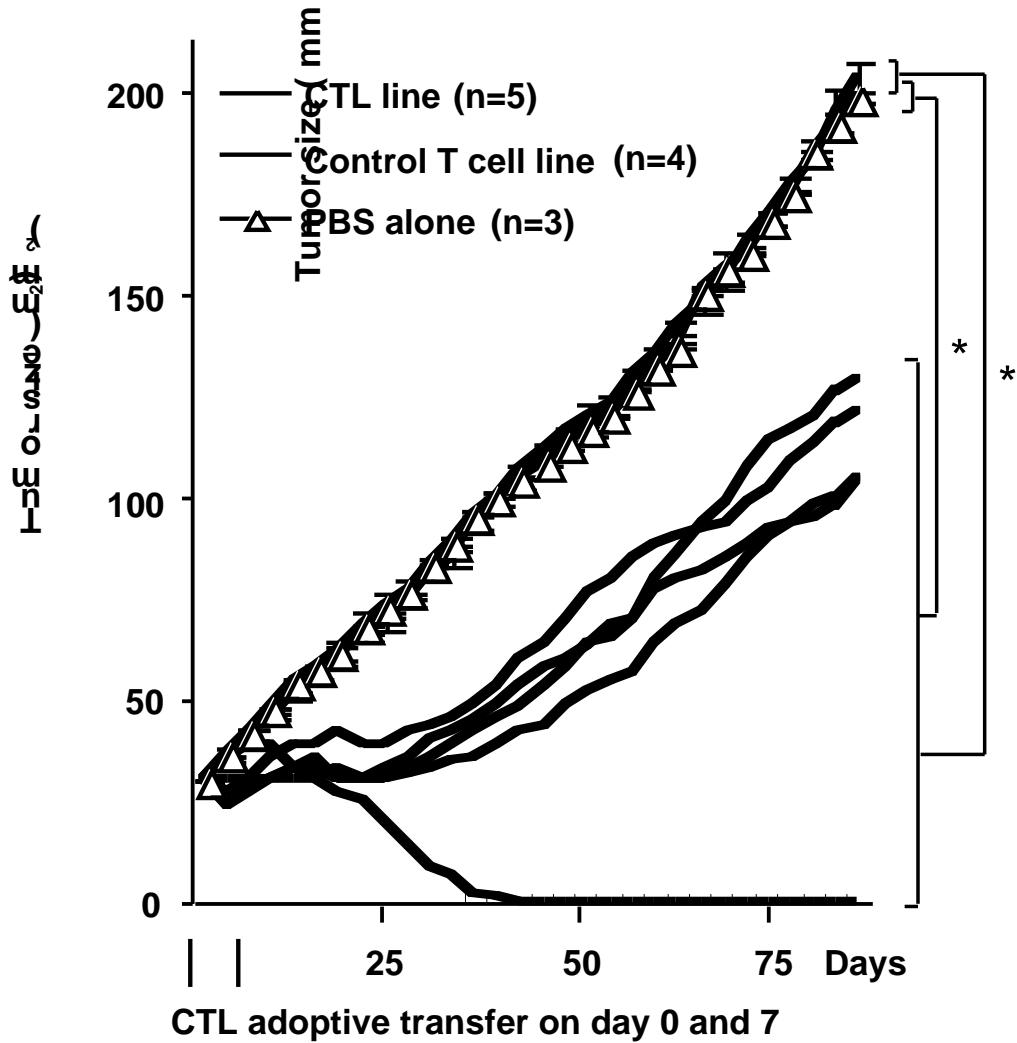


図 15. PP-RP-8 特異的 CTL 株の養子免疫による in vivo での抗腫瘍効果

ヒト食道癌細胞株 TE11 細胞を生着させたヌードマウスに、PP-RP 特異的 CTL 株を局所注入することにより、明らかに TE11 細胞の増殖が抑制された。TE11 細胞がヌードマウスの背部皮下で 30mm^2 大になった時に、 5×10^6 個の PP-RP-8 特異的 CTL 株を腫瘍局所に注入した (Day 0)。再度、Day 7 にも繰り返し CTL 株を局所注入した。コントロール群も同様に注入した。PP-RP-8 特異的 CTL 株 () コントロール CD8 陽性 T 細胞株 () PBS のみ () を注入した場合の腫瘍の大きさの変化を、図 15 に示した。コントロール () の腫瘍の大きさは平均 \pm SD で示し、PP-RP-8 特異的 CTL 株 () を注入した 5 匹のマウスでは、それぞれについて示した。腫瘍の大きさは長径 \times 短径で表し、週に 2 回測定した。それぞれの群間で t 検定をおこなった。* : $p < 0.05$

図 16

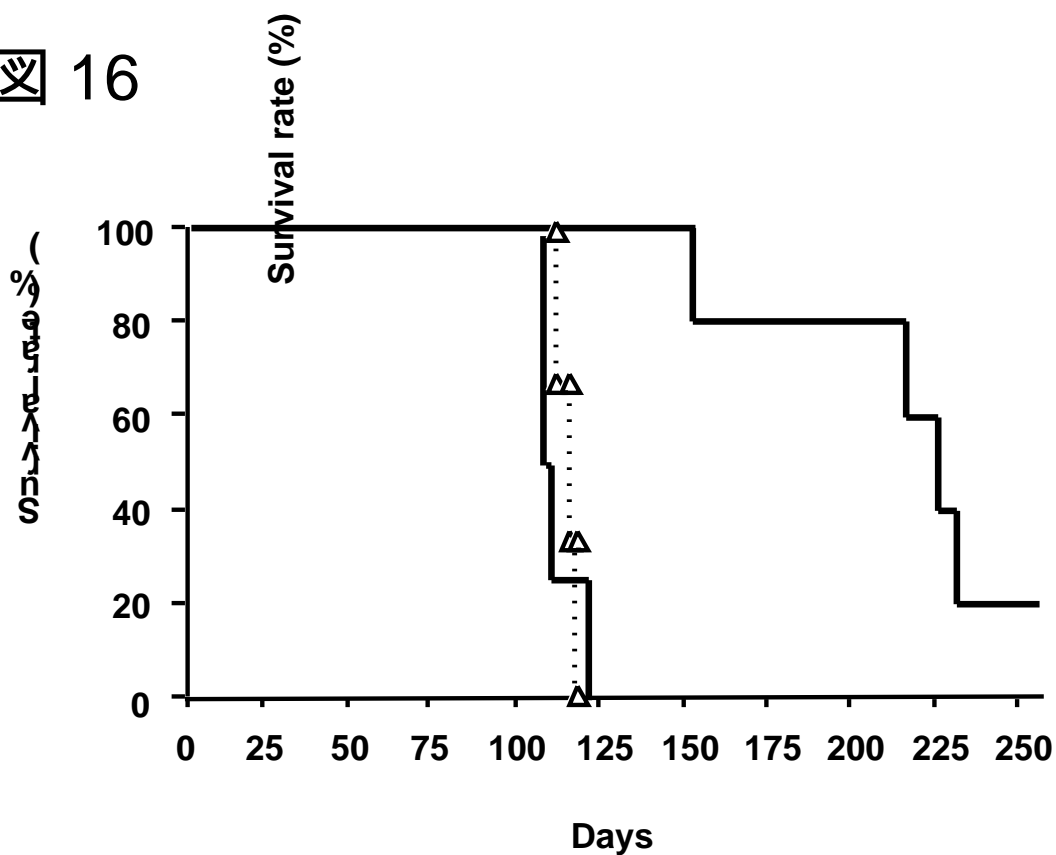


図 16. PP-RP 特異的 CTL 株の養子免疫による、ヒト食道癌細胞株 TE11 細胞を生着させたヌードマウスの生存期間延長

マウスは、PP-RP-8 特異的 CTL 株 ()、コントロール CD8 陽性 T 細胞株 () あるいは PBS のみ (& 破線) をそれぞれ 2 回腫瘍局所に注入した。PP-RP-8 特異的 CTL 株を注入したマウスは有意に生存期間が長かった ($p < 0.05$)。

7-7) PP-RP ノックダウン食道癌細胞株 TE13 細胞 における細胞増殖速度の抑制

PP-RP 遺伝子は、16 番染色体上に存在する。PP-RP 蛋白質は E3 ユビキチンリガーゼドメインと DNA トポイソメラーゼ I ドメインを含んでいる (図 17)。また、PP-RP は核に局在すると予測される (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)。PP-RP 蛋白質の細胞内における局在を確認するために PP-RP 遺伝子を発現している TE13 細胞を用い、蛍光免疫染色を行った。その結果、PP-RP 蛋白質は分裂期の 5 相にわたって、染色体とその周辺に局在していた (図 18)。間期においては核に強い発現を認め、また細胞質内にも弱い発現を認めた (図 19)。PP-RP 遺伝子の発現が認められない Sk-Hep1 細胞では、PP-RP 蛋白質は染色されなかった。

前述したように、われわれは PP-RP をノックダウンした TE13shPP-RP 細胞、およびコントロールの TE13shGFP 細胞を作製した。蛍光免疫染色により PP-RP の発現を確認したところ、図 19 のようであった。TE13、TE13shGFP 細胞と比較して、TE13shPP-RP 細胞では PP-RP 蛋白質の発現が明らかに減少していた。PP-RP 蛋白質の減少は、ウエスタンブロット解析でも確認した (図 14)。

そこで、PP-RP をノックダウンすることにより TE13 細胞の増殖速度に変化が生じないか、確認する実験を行った。さまざまな成長因子からの影響を少なくするために、細胞培養液中のウシ血清の濃度を低く (1 もしくは 5%) した。その結果、1%血清入りの培養液で細胞培養した場合には TE13shPP-RP 細胞は TE13、TE13shGFP 細胞と比較して明らかに増殖速度が遅くなった (1/2 倍) (図 20)。また、ウシ血清濃度が 5% の場合よりも 1% の場合の方が、増殖速度に大きな差が生じた。したがって、食道癌細胞株 TE13 細胞はウシ血清に含まれる成長因子に依存的に増殖しており、PP-RP は TE13 細胞の増殖に関して、重要な役割を果たしている分子である可能性が示唆された。

図 17



図 17 PP-RP 蛋白質のドメイン構成

PP-RP 蛋白質は、E3 ユビキチンリガーゼドメインと DNA トポイソメラーゼ I ドメインを有している。

図 18

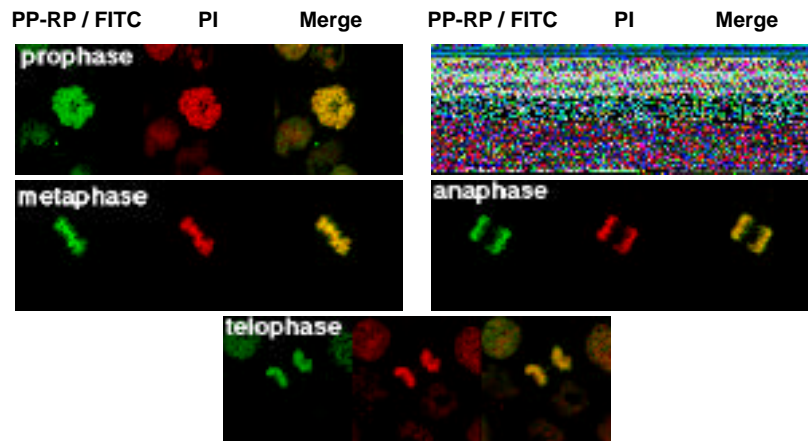


図 18 PP-RP 蛋白質の細胞内局在解析

PP-RP 遺伝子を高発現するヒト食道癌細胞株 TE13 細胞において蛍光免疫染色を行った。FITC 標識（緑色）した抗 PP-RP 抗体を用い PP-RP 蛋白質を、プロピジウムイオダイド（赤色）を用い染色体を染色した。分裂期のすべての相において、PP-RP は染色体と一致した局在を示した。

図 19

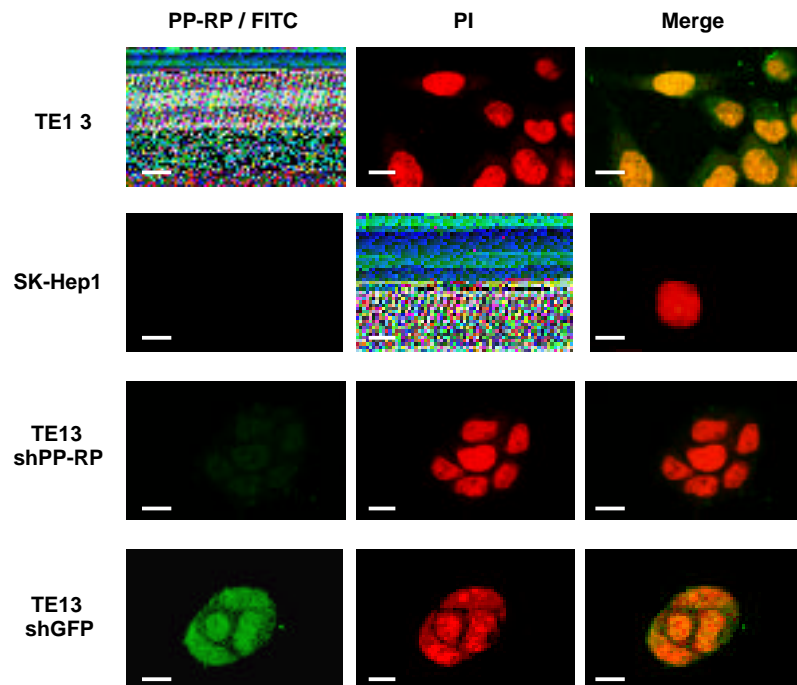


図 19 RNAi による TE13 細胞における PP-RP 遺伝子の発現抑制

PP-RP 蛋白質の蛍光免疫染色を行った。FITC 標識（緑色）した抗 PP-RP 抗体を用い PP-RP 蛋白質を、プロピジウムイオダイド（赤色）を用い染色体を染色した。Sk-Hep1 細胞はネガティブコントロールとして用いた。TE13、TE13shGFP 細胞と比べ、TE13shPP-RP 細胞では PP-RP 蛋白質の発現が減少していることが確認できた。スケールバーは共に 10 μ m。

図 20

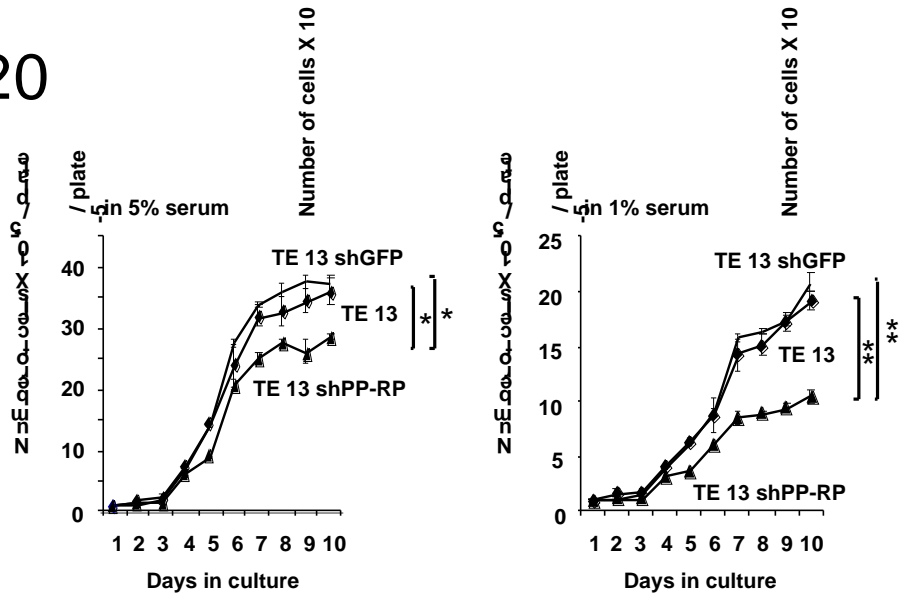


図 20 TE13shPP-RP 細胞の増殖速度の抑制

TE13、TE13shGFP および TE13shPP-RP 細胞は、5%あるいは 1%ウシ血清入りの RPMI1640 メディウム中で培養した。Day 0 に 1×10^5 個/dish でそれぞれの細胞を培養し、その後の細胞数を毎日測定した。それぞれの細胞群間で T 検定を行ったところ、有意差が認められた。*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

8 考察

腫瘍細胞中で自然にプロセッシングされ、細胞表面上に MHC 分子と共に提示される抗原分子を同定することが、腫瘍免疫療法を行う上で重要である。今回われわれは、食道癌の cDNA microarray analysis を用いて PP-RP を同定した。PP-RP 遺伝子は食道癌細胞、正常精巢および胎盤で強い発現を認めるだけで、その他の正常組織では、ほとんど発現が認められない遺伝子である。PP-RP 蛋白質の発現を免疫染色により確認したところ、食道癌細胞、正常精巢および胎盤で強い発現が認められた。正常精巢と胎盤は免疫細胞からの攻撃を受けない組織 (immuno-privilege site) と言われているので、PP-RP を標的とした免疫療法を行った場合でも、PP-RP 特異的 CTL 細胞は正常精巢と胎盤を攻撃することなく、食道癌細胞のみを攻撃することができ、自己免疫は生じないと考えられる。

われわれは食道癌免疫療法の標的分子を選出する際に、食道癌における発癌に関連した分子を選択することを考慮に入れた。癌の原因となっている、あるいは悪性度を高めている分子を標的抗原とすることにより、免疫療法後の癌細胞にしばしば生じる抗原の消失、抗原分子の低発現、突然変異といった免疫逃避の危険性を最小限にすることができると考えた。そこで PP-RP の機能を調べたところ、PP-RP は網膜芽細胞腫蛋白質 (pRB) と結合するという報告があった (34)。pRB は細胞周期を制御する蛋白質の一つである。PP-RP 蛋白質は pRB との結合に関与する SRS、YRE、VPPP という小さな領域をその中央部に持っていた。さらに、PP-RP 蛋白質は、E3 ユビキチンリガーゼドメインと DNA トポイソメラーゼ I ドメインを有しており、分裂細胞の染色体に一致して局在することが明らかとなった。

ヒト PP-RP のマウスホモログとして proliferation potential protein-related (P2P-R) と p53-associated cellular protein (PACT) が報告されている。P2P-R は pRB と結合し (35)、分裂細胞において染色体と一致した局在がみられる (36)。また、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞に P2P-R を高発現させると、カンプトセシンによるアポトーシスの誘導が促進されることが確認されており、そのアポトーシスを引き起こす特異的領域は P2P-R の 1156-1314 a.a.中に存在する (37)ことが報告されている。PACT はマウス正常精巢に高発現しており、p53 および pRB と結合する (38)。PP-RP は低いレベル

ではあるが MDM2 蛋白質と相同性が認められる。MDM2 蛋白質は核に局在し、p53 を分解に導く E3 ユビキチンリガーゼであり、細胞周期を進行させる機能を持つ蛋白質である (39, 40)。DNA トポイソメラーゼ I は DNA の間違っただ組み合わせを修復する際に重要な機能をもつ蛋白質である。DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトセシンを大腸癌、胃癌細胞に投与すると DNA 複製がうまくいかずに、アポトーシスが誘導されるという報告がある (41, 42)。今回われわれは、PP-RP をノックダウンすることで食道癌細胞の増殖速度が遅くなるという結果を得た (図 20)。以上のことを考え合わせると、PP-RP は食道癌の細胞周期の進行に重要な役割をもつ分子と考えられ、今後 PP-RP の機能の本質を明らかにするためにさらなる研究が必要であろう。

食道癌の手術後 R1 であった 15 症例において、PP-RP が高発現している 5 症例ではそうでない 10 症例と比較して予後が不良であった。これにより、食道癌組織における PP-RP の発現量が、術後患者の予後を予測するのに役立つマーカーとなる可能性が示された。さらにこの結果は PP-RP が食道癌の進行度と関連していることをも示唆しており、PP-RP を標的とした免疫療法を行うことは、予後の悪い食道癌患者に効果的であるかもしれない。

本研究で、われわれは MHC 拘束性に PP-RP 特異的に腫瘍細胞株を傷害することのできる CTL 細胞の存在を明らかにした。PP-RP 特異的な CTL 株は *in vitro* において食道癌患者からは誘導できたが、健常人からは誘導できなかった。このことは、健常人に比べ食道癌患者では PP-RP 特異的 CTL 細胞の前駆細胞が多く存在していることを示している。

一般的に NY-ESO-1 や melan-A/MART-1 のように、腫瘍拒絶抗原は MHC 拘束性の CTL エピトープを 2、3 種類有していることが多い (17, 43-46)。一方 PP-RP は 5 人の食道癌患者から 10 種類すべての PP-RP ペプチドにおいて、PP-RP 特異的な CTL 株の誘導ができた (表 5)。この結果は、PP-RP が食道癌患者に対して、抗腫瘍免疫反応を引き起こす“引き金”となりうる可能性が高いことを示唆している。

HLA-A24 (HLA-A*2402) 結合モチーフをもつ PP-RP 由来ペプチドを 10 種類合成し、CTL 株を誘導することのできる CTL エピトープを同定した。HLA-A24 は日本人における HLA クラス II 遺伝子の中で最も高頻度(約 60%)な対立遺伝子であり、中国人では 33%、白人でも 20%が陽性である (47)。癌に対する細胞免疫療法として、ペプチドワクチン (23)、CTL エピトープペプチドあるいは腫瘍細胞からの抽出物を添加した樹状細胞の投与療法 (48)、腫

瘍特異的 CTL の養子免疫療法 (49)、などがある。これまでに、ヌードマウスに移植したヒト肺癌細胞株に WT-1 特異的 CTL 細胞を養子免疫することにより腫瘍増殖抑制効果がみられた、との報告がある (50)。そこでわれわれも PP-RP 特異的 CTL 株のヌードマウスに生着したヒト食道癌細胞株に対する効果を確認したところ、明らかに腫瘍増殖抑制効果がみられた。実際に、食道癌患者において *in vitro* で培養した CTL 株を腫瘍局所に注入するという臨床試験が行われており、効果が確認されている (51, 52)。PP-RP は食道癌患者の 85%以上という高頻度で発現しており (図 6) 免疫原性も有している (表 5、図 12-14) ことから、腫瘍免疫療法において効果的な標的抗原となる可能性があり、さらにヌードマウスの結果より内視鏡を使った PP-RP 特異的 CTL 株の腫瘍局所注入療法が有効である可能性も示唆された。

今回われわれは、cDNA マイクロアレイ解析を用いて同定した分子 PP-RP に関して、食道癌患者から PP-RP 特異的 CTL 株が誘導でき、腫瘍拒絶抗原として有効であることを示したが、今後 cDNA マイクロアレイ解析を用いて、さらなる有効な腫瘍拒絶抗原が同定されることを期待する。PP-RP は、これまでのように腫瘍反応性 T 細胞や癌患者血清中の抗癌抗体を用いて同定された抗原ではなく、cDNA マイクロアレイ解析の結果から抗原となりそうな候補分子を推測し、その分子のアミノ酸配列から CTL エピトープを予測していくという "reverse immunology" (53)法によって同定された腫瘍拒絶抗原である。この様な方法で同定された抗原の免疫原性については十分に確認する必要があるが、癌細胞における発現が非常に高く、また癌患者における発現頻度も高い分子を選択できるという利点がある。当然自己免疫が生じないように、正常組織での発現が認められない分子を選択するべきである。また その分子の機能を知っておくことも治療の標的分子として臨床的に利用する際には必要であり、その解析も行うべきであろう。

最後に、本研究で同定した腫瘍拒絶抗原 PP-RP は食道癌の治療や予後予測において有用である、とわれわれは考えている。

9 おわりに

食道癌の cDNA マイクロアレイ解析を用いて、新規腫瘍拒絶抗原 PP-RP を同定し、その抗原性および機能を解析した。PP-RP は正常食道組織では発現していないが癌になると高発現するようになる分子であるが、手術後の切除組織における PP-RP の発現量により予後を予測できる可能性が示された。また、食道癌患者の PBMC から PP-RP 特異的に腫瘍細胞を傷害できる CTL 細胞を誘導でき、ヌードマウスの実験から食道癌における PP-RP 特異的 CTL 株の局所注入療法の効果も確認できたことから、PP-RP が免疫療法の標的分子になりうる可能性が示唆された。さらに、PP-RP 蛋白質の機能については、PP-RP をノックダウンすることにより細胞の増殖速度が遅くなったことから、食道癌の悪性度と関連している分子である可能性が示唆された。

機能解析については今後のさらなる検討に期待するところだが、今回の研究により PP-RP が腫瘍免疫療法の標的分子になりうる可能性、ならびに予後予測因子として利用できる可能性が示された。今後 *in vivo* における抗腫瘍ワクチンとしての有用性などを検討し、また当教室で進めている樹状細胞療法と組み合わせ、腫瘍免疫療法の一翼を担えればと期待している。

10 参考文献

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

- Immunol 1997;9:684-93.
17. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3515-9.
 18. Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997;16:313-39.
 19. Cox AL, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994;264:716-9.
 20. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:277-88.
 21. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999;284:1351-4.
 22. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, et al. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1999;189:757-66.
 23. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4:321-7.
 24. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:143-50.
 25. Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219-30.
 26. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-32.
 27. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11810-3.
 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* 2001;281:936-44.
 29. Monji M, Senju S, Nakatsura T, et al. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:734-41.
 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* 2002;32:826-36.

31. Monji M, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, et al. Identification of a novel cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 2004; in press.
32. Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, et al. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis. *Clin Cancer Res* 2004; in press.
33. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; in press.
34. Sakai Y, Saijo M, Coelho K, Kishino T, Niikawa N, Taya Y. cDNA sequence and chromosomal localization of a novel human protein, RBQ-1 (RBBP6), that binds to the retinoblastoma gene product. *Genomics* 1995;30:98-101.
35. Witte MM, Scott RE. The proliferation potential protein-related (P2P-R) gene with domains encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein association and Rb1 binding shows repressed expression during terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1212-7.
36. Gao S, Witte MM, Scott RE. P2P-R protein localizes to the nucleolus of interphase cells and the periphery of chromosomes in mitotic cells which show maximum P2P-R immunoreactivity. *J Cell Physiol* 2002;191:145-54.
37. Gao S, Scott RE. Stable overexpression of specific segments of the P2P-R protein in human MCF-7 cells promotes camptothecin-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 2003;197:445-52.
38. Simons A, Melamed-Bessudo C, Wolkowicz R, et al. PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb. *Oncogene* 1997;14:145-55.
39. Argentini M, Barboule N, Wasyluk B. The contribution of the RING finger domain of MDM2 to cell cycle progression. *Oncogene* 2000;19:3849-57.
40. Kawai H, Wiederschain D, Yuan ZM. Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2003;23:4939-47.
41. Jacob S, Aguado M, Fallik D, Praz F. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:6555-62.
42. Zhang ZW, Patchett SE, Farthing MJ. Topoisomerase I inhibitor (camptothecin)-induced apoptosis in human gastric cancer cells and the role of wild-type p53 in the enhancement of its cytotoxicity. *Anticancer Drugs* 2000;11:757-64.
43. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, 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* 1998;187:265-70.
44. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2

- melanomas. *J Exp Med* 1994;180:35-42.
45. Schneider J, Brichard V, Boon T, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T. Overlapping peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1. *Int J Cancer* 1998;75:451-8.
 46. Castelli C, Storkus WJ, Maeurer MJ, et al. Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995;181:363-8.
 47. Date Y, Kimura A, Kato H, Sasazuki T. DNA typing of the HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens* 1996;47:93-101.
 48. Geiger J, Hutchinson R, Hohenkirk L, McKenna E, Chang A, Mule J. Treatment of solid tumours in children with tumour-lysate-pulsed dendritic cells. *Lancet* 2000;356:1163-5.
 49. Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, et al. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 1999;94:1201-8.
 50. Makita M, Hiraki A, Azuma T, et al. Antitumor cancer effect of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2002;8:2626-31.
 51. Toh U, Yamana H, Sueyoshi S, et al. Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:4663-73.
 52. Toh U, Sudo T, Kido K, et al. Locoregional adoptive immunotherapy resulted in regression in distant metastases of a recurrent esophageal cancer. *Int J Clin Oncol* 2002;7:372-5.
 53. Schultze JL, Vonderheide RH. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. *Trends Immunol* 2001;22:516-23.