

学位論文
Doctor's Thesis

膵癌の免疫療法に有用な新規腫瘍関連抗原の同定と
免疫学的解析

**(Identification and characterization of novel tumor-associated antigens
useful for anticancer immunotherapy of pancreatic cancer)**

今井 克憲
Katsunori Imai

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

西村 泰治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻免疫識別学

2009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) HLA 分子による T 細胞への抗原提示 | 10 |
| 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 | 13 |
| 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 | 14 |
| 5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし | 15 |
| 図 3 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導 | 16 |
| 5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定 | 17 |
| 5-4) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定 | 19 |
| 図 4 cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の同定法の概要 | 21 |
| 5-5) 樹状細胞を用いた癌の免疫療法 | 22 |
| 5-6) 本研究の目的 | 24 |
| 6 実験方法 | 25 |
| 6-1) マウス | 25 |
| 6-2) 細胞株 | 25 |
| 6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取 | 25 |
| 6-4) REVERSE TRANSCRIPTION-PCR (RT-PCR) と NORTHERN BLOT 法 | 26 |
| 6-5) WESTERN BLOT 法 | 27 |
| 6-6) 免疫組織化学的解析 | 27 |
| 6-7) レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入 | 28 |
| 6-8) 使用したペプチド | 28 |
| 表 1 ヒト CDH3 由来で HLA-A2 (HLA-A*0201)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト | 29 |
| 表 2 ヒト RAB6KIFL 由来で HLA-A2 (HLA-A*0201)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト | 30 |
| 6-9) HLA-A2 トランスジェニックマウス (TGM)を用いた CTL エピトープの決定 | 31 |
| 図 5 HLA-A2 TGMを用いた CTL エピトープの決定 | 32 |
| 6-10) HLA-A2 TGMを用いた自己免疫反応の検討 | 32 |
| 6-11) 健常人、癌患者 PBMC からの CDH3 および RAB6KIFL 反応性 CTL の誘導 | 33 |
| 図 6 腫瘍抗原ペプチド特異的 CTL 株の樹立法 | 34 |
| 6-12) 細胞傷害活性の検討 | 34 |
| 6-13) CTL の HLA 拘束性の検討 | 35 |
| 6-14) NOD/SCID マウスを利用した養子移植免疫療法モデル | 35 |
| 図 7 NOD/SCID マウスを利用した養子移植免疫モデル療法のプロトコール | 36 |
| 7 実験結果 | 37 |
| 7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍拒絶抗原候補遺伝子の選定 | 37 |
| 図 8 cDNA マイクロアレイ解析による、隣癌細胞で高発現している遺伝子のリスト | 38 |
| 図 9 cDNA マイクロアレイによる、正常組織における CDH3 と RAB6KIFL 遺伝子の発現解析 | 39 |
| 表 8 様々な悪性腫瘍における CDH3 遺伝子の発現 | 40 |
| 表 9 様々な悪性腫瘍における RAB6KIFL 遺伝子の発現 | 40 |
| 7-2) 癌細胞株、癌組織および正常組織における CDH3 および RAB6KIFL の発現解析 | 41 |
| 図 10 癌細胞株、癌組織および正常組織における CDH3 の発現解析 | 42 |
| 図 11 癌細胞株、癌組織および正常組織における RAB6KIFL の発現解析 | 43 |
| 7-3) CDH3 および RAB6KIFL 蛋白の免疫組織化学的解析 | 43 |
| 図 12 CDH3 蛋白の免疫組織学科学的解析 | 45 |

| | |
|--|----|
| 図 13 RAB6KIFL 蛋白の免疫組織学科学的解析 | 46 |
| 7-4) HLA-A2 TGM を用いたヒト CDH3 および RAB6KIFL 由来 HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの同定 | 46 |
| 図 14 HLA-A2 TGM を用いた、CDH3 由来 HLA-A2 (A*0201)拘束性エピトープの同定..... | 47 |
| 図 15 HLA-A2 TGM を用いた、RAB6KIFL 由来 HLA-A2 (A*0201)拘束性エピトープの同定..... | 48 |
| 7-5) RAB6KIFL ペプチドを免疫された HLA-A2TGM には自己免疫現象は観察されない..... | 48 |
| 図 16 RAB6KIFL-8 ₈₀₉₋₈₁₇ ペプチドを負荷したBM-DCで免疫したHLA-A2 TGM における自己免疫現象の検討..... | 49 |
| 7-6) HLA-A2 陽性の健常人あるいは非癌患者の PBMC からの CDH3 および RAB6KIFL 特異的 CTL の誘導 | 50 |
| 図 17 健常人および癌患者における、CDH3 特異的 CTL の誘導 | 52 |
| 図 18 健常人における、RAB6KIFL 特異的 CTL の誘導 | 53 |
| 7-7) CDH3 および RAB6KIFL 特異的 CTL の HLA 拘束性の証明 | 54 |
| 図 19 CDH3 特異的ヒト CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明..... | 54 |
| 図 20 RAB6KIFL 特異的ヒト CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明 | 55 |
| 7-8) CDH3 特異的 CTL の NOD/SCID マウスへの I.V. TRANSFER による、 <i>IN VIVO</i> における抗腫瘍効果 | 55 |
| 図 21 NOD/SCID マウスにおける CDH3 特異的 CTL 株の養子免疫による、 <i>IN VIVO</i> における抗腫瘍効果 | 56 |
| 8 考察 | 57 |
| 9 結論 | 60 |
| 10 参考文献 | 61 |

1 要旨

【目的】 膵癌は消化器癌の中で最も予後不良な癌の一つであり、5 年生存率は約 5%である。手術、化学療法や放射線療法を中心とした治療が行われているが、進行癌に対しては治療が困難な例も多く、免疫療法を含めた新たな治療法の確立が望まれている。本研究は膵癌における新規の腫瘍関連抗原を同定し、抗腫瘍免疫応答を誘導する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。

【方法】 膵癌 16 症例の腫瘍組織から Laser Capture Microdissection system を用いて癌組織と正常膵組織を分離した。これらの組織を用いて 27,648 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行い、癌部と非癌部での発現を比較、正常組織と比較して癌部で 5 倍以上高発現する遺伝子を同定した。これらの遺伝子の 25 種類の成人正常組織および 4 種類の正常胎児組織における遺伝子発現を、cDNA マイクロアレイ解析により検討し、正常組織における発現の低いものを候補とした。その結果、Cadherin 3(CDH3) / P-cadherin と RAB6KIFL / KIF20A を、新規腫瘍関連抗原として同定した。そのアミノ酸配列を BIMAS 解析ソフトウェアを用いて解析し、HLA-A2 (A*0201) に対し高い結合能を持つと予想される構造モチーフを有するペプチドを選択、合成した。これらのペプチドを数種類ずつ混合して、HLA-A2 (HHD) トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) の骨髄細胞より誘導した樹状細胞 (DC) にパルスし、1 週間おきに 2 回腹腔内投与し免疫した。その後脾細胞を採取し、*in vitro* で 6 日間培養し、IFN- γ ELISPOT 法でペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の免疫応答を観察し、それぞれ 2 種類、3 種類の CTL エピトープ候補を決定した。これらのペプチドを健常人ならびに膵癌患者の PBMC から分離した CD14 陽性細胞から誘導した DC にパルスして、CD8 陽性細胞を 3 回刺激して CTL を誘導し、IFN- γ ELISPOT 法と Cr 放出試験で抗原特異的 CTL 応答の評価を行った。

【結果】 cDNA マイクロアレイ解析により、新規腫瘍関連抗原として CDH3 と RAB6KIFL を同定した。CDH3 は膵癌 16 例中全例、RAB6KIFL は 6 例中全例に、癌部において高発現していた。また、CDH3 は大腸癌や胃癌、肺癌に、RAB6KIFL は肺癌や膀胱癌にも高発現していた。HLA-A2 Tgm を用いた実験により、HLA-A2 のマウス CTL エピトープを、CDH3 では 2 種類、RAB6KIFL では 3 種類同定した。いずれにおいても自己免疫現象は認められなかった。それぞれのペプチドを用い、健常人および膵癌患者の PBMC から、抗原特異的

な HLA-A2 拘束性 CTL を誘導することができた。これらの CTL は、*in vitro* で癌細胞株に対して抗原特異的かつ HLA-A2 拘束性の細胞傷害活性を示すのみでなく、*in vivo* においても著明な抗腫瘍効果を示した。

【結論】 膵癌に高発現する新規腫瘍関連抗原として、CDH3 と RAB6KIFL を同定した。それらの HLA-A2 拘束性 CTL エピトープを同定し、これを用いて誘導した CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、癌細胞株に対して抗原特異的な細胞傷害活性を示した。以上より、CDH3 および RAB6KIFL を標的とした抗腫瘍免疫療法の有用性が示された。

Summary

Purpose: Pancreatic cancer is one of the common cancers worldwide and shows the worst mortality among malignancies. In spite of recent advances in surgery, chemotherapy and radiotherapy, the prognosis remains poor. Hence, the development of novel therapeutic modalities is an issue of great importance. To establish anticancer immunotherapy, it is important to identify the tumor-associated antigens (TAAs) that are strongly expressed in the tumor cells but not in the normal cells. In this study, to establish an effective anticancer immunotherapy, we tried to identify the useful TAAs of pancreatic cancer.

Experimental design: Based on a previous genome-wide cDNA microarray analysis of pancreatic cancer containing 27,648 genes, we focused on Cadherin 3 (CDH3)/P-cadherin and RAB6KIFL/KIF20A as novel candidate TAAs for anticancer immunotherapy. To identify the HLA-A2 (A*0201)-restricted CTL epitopes of CDH3 and RAB6KIFL, we used HLA-A2.1 (HHD) transgenic mice (Tgm). Furthermore, we examined the cytotoxicity against the tumor cells *in vitro* and *in vivo* of CTLs specific to CDH3 and RAB6KIFL induced from HLA-A2-positive healthy donors and cancer patients.

Results: The expressions of the CDH3 and RAB6KIFL gene in pancreatic cancer tissues were markedly enhanced in all of the pancreatic cancer patients tested (average of the relative expression ratio, 1,900,000 and 32,000; range, 94,900 - 4,890,000 and 15 - 72,000, respectively) and various malignancies including gastric, colorectal, lung, and bladder cancers, but not in their counterparts or in many normal adult tissues based on cDNA microarray analysis. In the experiment using HLA-A2.1 Tgm, we found that the CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (FILPVLGAV) and CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ (FIENLKAA) peptides, and three RAB6KIFL-derived peptides could induce HLA-A2-restricted CTLs without causing autoimmunity in HLA-A2.1 Tgm. In addition, peptide-reactive CTLs were successfully induced from peripheral blood mononuclear cells by *in vitro* stimulation with the autologous peripheral monocyte-derived dendritic cells pulsed with these peptides in HLA-A2-positive healthy donors and cancer patients, and these CTLs exhibited cytotoxicity specific to cancer cells expressing both HLA-A2 and CDH3 or RAB6KIFL. Furthermore, the adoptive transfer of the CDH3-specific CTLs could inhibit the tumor growth of human cancer cells engrafted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice.

Conclusions: These results suggest that CDH3 and RAB6KIFL are novel TAAs useful for immunotherapy against a broad spectrum of malignancies including pancreatic cancer. Based

on the findings of this study, we are now planning to take this study forward to the next stage, a phase I clinical trial of peptide-based anticancer immunotherapy.

2 発表論文リスト

1. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tsunoda, T., Nakatsuru, S., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y.: Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 14: 6487-6495, 2008.
2. Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tomita, Y., Tsunoda, T., Nakagawa, H., Nakamura, Y., Baba, H., and Nishimura, Y.: Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumor-associated antigen, RAB6KIFL/KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *Submitted*
3. Harao M., Hirata S., Irie A., Senju S., Nakatsura T., Komori H., Ikuta Y, Yokomine K., Imai K., Inoue M., Harada K., Mori T., Tsunoda T., Nakatsuru S, Daigo Y., Nomori H., Nakamura Y., Baba H, and Nishimura Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int J Cancer.* 123: 2616-2625, 2008.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部、感染・免疫学講座、免疫識別学分野の西村泰治教授ならびに消化器外科分野の馬場秀夫教授に深く感謝いたします。またcDNAマイクロアレイ解析データを御恵与いただいた、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの角田卓也先生、中川英刀先生および中村祐輔教授に深謝いたします。さらに、研究方法に関して直接御指導を頂いた免疫識別学分野平田真哉助教、入江厚講師、千住覚准教授に深く感謝いたします。組織の免疫染色に御協力いただきました分子病理学分野の山本哲郎先生、久保多津子さんに深く感謝いたします。検体の提供に御協力いただきました癌患者の皆様はじめ諸先生方に深く感謝いたします。HLA-A2 Tgmを御提供いただきましたパスツール研究所のF.A. Lemonnier博士および埼玉医科大学の松井政則教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

BM-DC; bone marrow cell-derived dendritic cell

CDH3; cadherin 3

cDNA; complementary DNA

CTL; cytotoxic T lymphocyte

DC; dendritic cell

DNA; deoxyribonucleic acid

ELISPOT; enzyme-linked Immunospot

GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor

HLA; human histocompatibility leukocyte antigens

HLA-A2 Tgm; HLA-A2 transgenic mouse

IFN; interferon

Ig; immunoglobulin

IL; interleukin

MHC; major histocompatibility complex

mAb; monoclonal antibody

mRNA; messenger ribonucleic acid

PBMC; peripheral blood mononuclear cell

PBS; phosphate-buffered saline

RT-PCR; reverse transcription-PCR

TAAs; tumor-associated antigen

TAP; transporter associated with antigen processing

TCR; T cell receptor

Tgm; transgenic mouse

TIL; tumor infiltrating lymphocyte

TNF; tumor necrosis factor

5 研究の背景と目的

5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示

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

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

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム(proteasome)あるいは LMP(large multifunctional protease)と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体によりエネルギー(ATP)依存性に分解されてできたものである [4,5]。最近、細胞質内で mRNA が翻訳されてきたばかりの蛋白質のうち 30%にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing)分子により、エネルギー(ATP)依存性に小胞体の内腔へと導かれ、そこで HLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する(図 1)[6]。このペプチド収容溝には、A-F ポケットと呼ばれる 6 個のポケットが存在する。MHC クラス I 結合ペプチドは 9 個のアミノ酸(N 末端側より position-1 (P1) -

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

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

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドは MIIC (MHC class II compartments)や CIIV (class II vesicles)と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10-30 数個(多くは 15 個前後)のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している[12,13]。MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチ

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

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

図 1

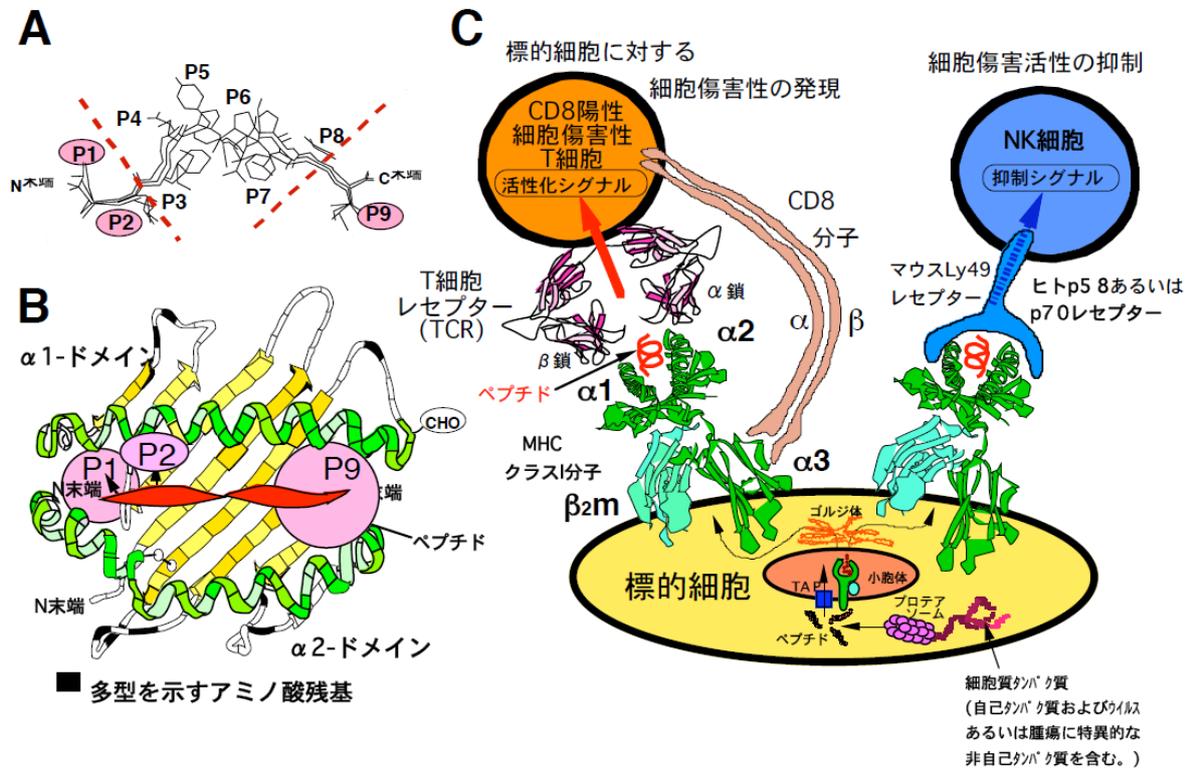


図 1. MHCクラスI による抗原ペプチドのCD8⁺ 細胞傷害性T細胞 (CTL) への提示

(A) MHCクラスI(ヒトのHLA-A2分子)に結合性を示す、ウイルス由来の5種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドはP1-P9で示した9個のアミノ酸からなり、両端(NおよびC末端)のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖がMHCクラスIのペプチド収容溝にある3つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基(P3~P7)の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がりTCRにより認識される。(B) MHCクラスI(HLA-A2分子)のペプチド収容溝を、TCR側より見た図。溝は相対する2つのαヘリックス(右巻きらせん)構造に囲まれている。丸はA、BおよびFポケットの位置を示し、()内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分はMHCクラスI(ヒトのHLAクラスI)で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHOは糖鎖を示す。(C) MHCクラスIにより提示された抗原ペプチドの認識によるCTLの活性化およびNK細胞の細胞傷害活性の抑制。α1、α2、α3およびβ2mは、それぞれMHCクラスIの細胞外ドメインおよびβ2ミクログロブリンを表し、KIRは細胞傷害抑制性レセプター(killer-cell inhibitory receptor)を表す。

図 2

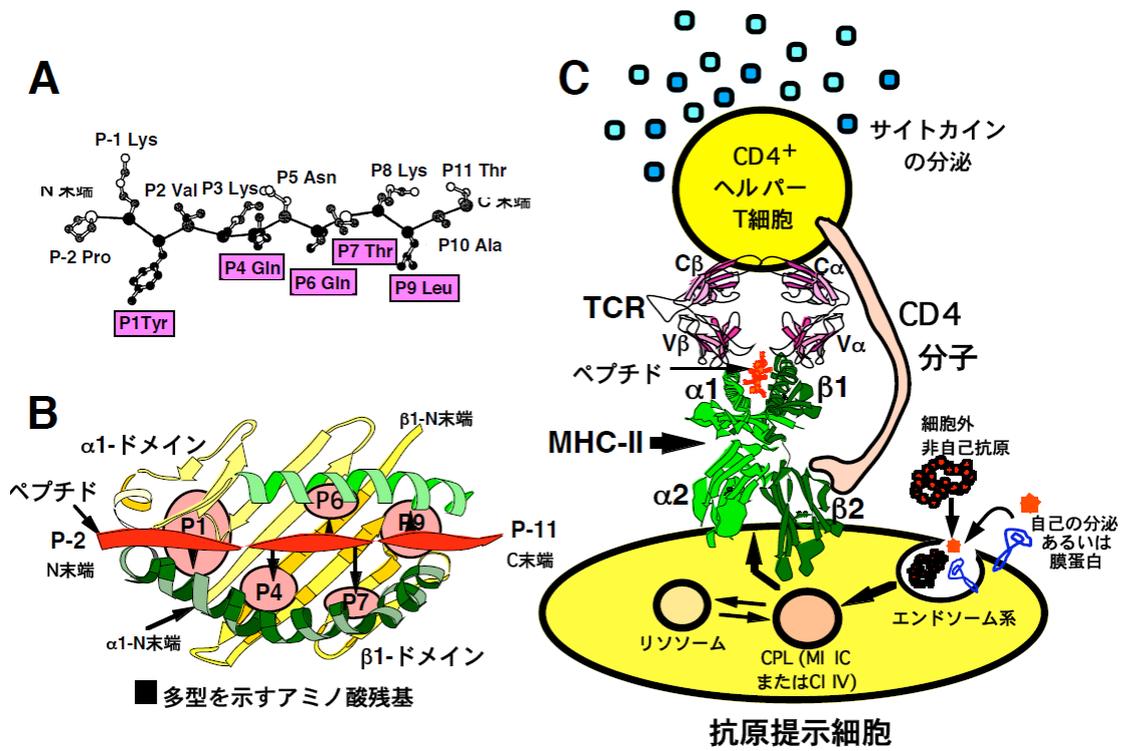


図 2. MHCクラスII分子による抗原ペプチドのCD4⁺ヘルパーT細胞への提示

(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αβはTCRのα鎖とβ鎖を、またCとVは定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし

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

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

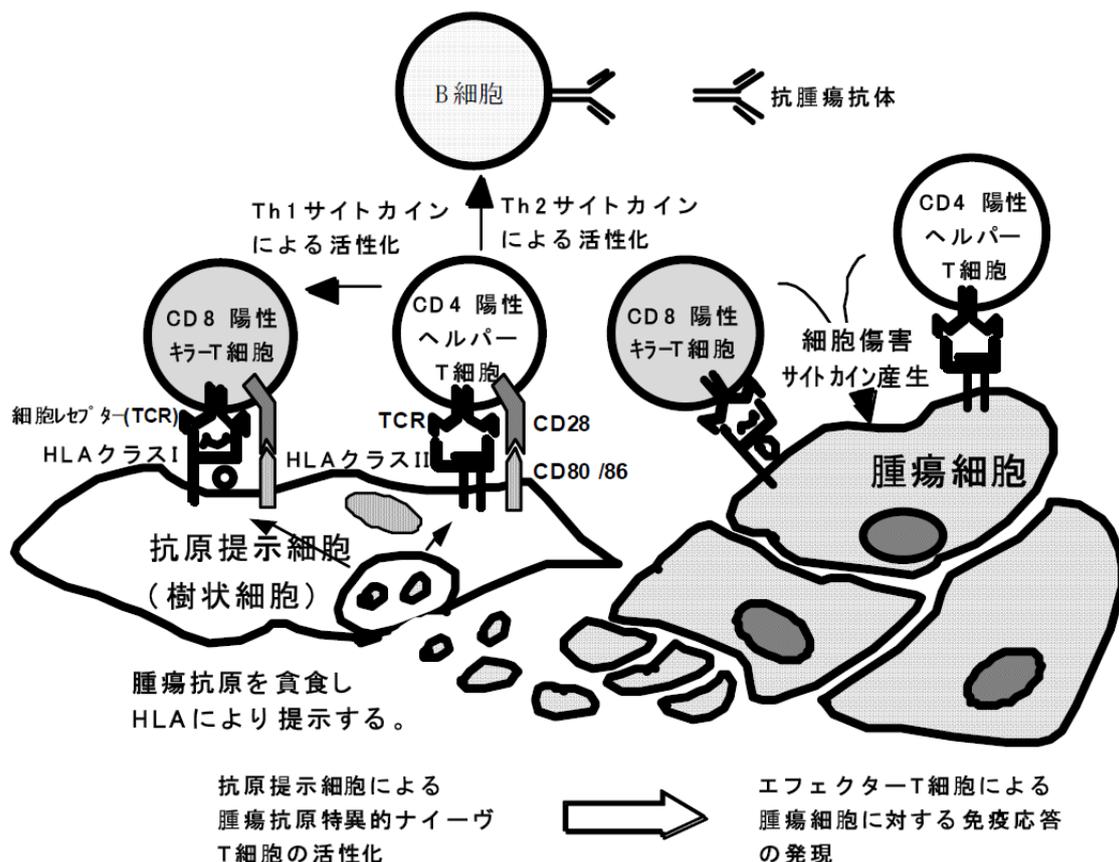


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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。IL-2 使用による CTL のクローン化と長期培養と遺伝子の発現クローニング法という二つのよく確立された技術を組み合わせたことと、T 細胞による抗原認識の分子機構の解明という学問的進展がこれを可能ならしめた。CTL は抗原丸ごとを認識するのではなく、抗原蛋白質由来の 8-12 個のアミノ酸から成るペプチドと、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の遺伝子産物である MHC クラス I 分子とが結合した複合体を認識する [2]。MHC 分子の役割は、ペプチド(抗原)を T 細胞に提示することである。したがって、抗原蛋白そのものが細胞表面に存在する必要はなく、核や細胞質に存在する分子も適切にペプチドに分解され MHC 分子に結合すれば、細胞表面に移動して T 細胞に認識される。この画期的な発見は、それまで主に抗体を用いて検出することにより細胞表面分子に限定して考えられていた腫瘍抗原の概念を大きく変え、腫瘍抗原となりうる分子の種類と数を飛躍的に拡大させた。

Boon らの発表後、癌患者由来の CTL が認識するメラノーマやほかの癌の腫瘍抗原が、分子生物学的な方法、もしくは生化学的方法を用いて同定されている [16-20]。最近、抗腫瘍免疫における CD4⁺ヘルパー T 細胞の重要性が指摘され、これが認識する腫瘍抗原も分子生物学的な方法や生化学的方法を用いて同定されるようになってきた [21,22]。同定された抗原をターゲットにした癌の免疫療法の臨床

試験が、欧米でもわが国でもすでに開始されている[23-26]。しかし、T細胞の活性化を指標にした癌抗原の遺伝子発現クローニングによる同定には技術的な制約が多く、これまで同定された腫瘍抗原はメラノーマに関連するものが主であり、他の種々の癌における腫瘍抗原の同定にまでは普及しなかった。

抗体を用いた腫瘍抗原同定の試みは、CTL による試みより長い歴史をもつ。特に腫瘍特異的モノクローナル抗体は大きな期待をもって迎えられた。作製された抗体の多くは分化抗原に対するもので、“癌特異的”な抗原は同定されず、しかも癌免疫療法での抗体の有用性は特定の抗原を発現する癌に限定されたものとなっている。しかし、抗 Her2 抗体(Transtuzumab)や抗 CD20 抗体(Rituximab)などは、正常組織に抗原が発現しているにも関わらず、それぞれ乳癌あるいは B リンパ腫の治療において優れた効果を示している。さらに、1995 年にドイツ Saarland 大学の Pfreundschuh ら[27]により、癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が認識する腫瘍抗原を、遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)が確立された。SEREX 法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでに SEREX 法により同定された多数の腫瘍抗原[28-31] がデータベース化されている (<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB>)。

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

5-4) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定

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

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

織特異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定とその抗原性解析 [32-37]。

cDNA マイクロアレイ解析の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原候補の同定に cDNA マイクロアレイ解析を用いることの最大の利点は、一度に数千から数万種類の遺伝子の発現をスクリーニングすることができるところである。そこでまず理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質のうちの、発現の組織特異性が優れた抗原を満たす遺伝子を選出することができる。場合によっては免疫系からの逃避が起こりにくい抗原遺伝子を選出することもできる。さらに cDNA マイクロアレイ解析は患者毎に遺伝子発現を解析することができるため、各遺伝子の発現頻度も知ることができる。

我々は、これまでに東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により、cDNA マイクロアレイ解析を用いて、肝臓癌に特異的に高発現する遺伝子として Glypican-3 (GPC3)[38]を、食道癌に特異的に高発現する遺伝子として Proliferation potential-related protein (PP-RP)[37]を、肺癌に特異的に高発現する遺伝子として Cell division cycle associated 1 (CDCA1)[39]を同定し、腫瘍免疫療法の理想的な抗原となりうる可能性について報告してきた。これらの抗原について、当該抗原を発現する腫瘍細胞を傷害する CTL を誘導できるペプチドを同定し、GPC3 に関しては肝細胞癌の免疫療法に関する第 1 相臨床試験を開始している。

図 4

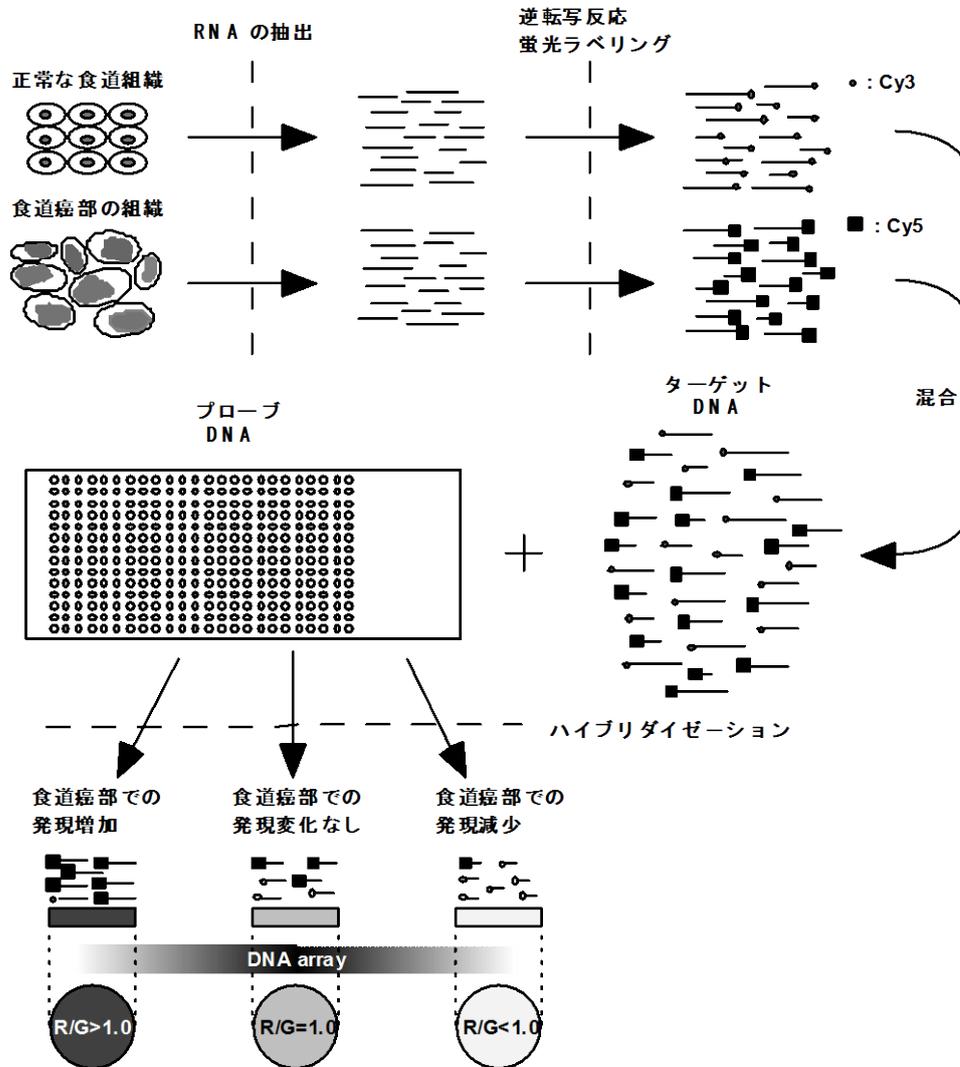


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

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

5-5) 樹状細胞を用いた癌の免疫療法

前述のように癌特異抗原の同定が進むにつれて、特定の癌抗原を投与することによって癌特異的な免疫反応を誘導しようという方向に研究が発展していった。近年、強力な抗原提示細胞である樹状細胞(dendritic cell; DC)の研究が急速に進むにつれて、この細胞に癌抗原を加えて、提示させれば強力な抗腫瘍免疫反応を誘導できるのではないかと考えられるようになった[40,41]。

ナイーブ T 細胞を活性化するためには、DC からの T 細胞に対する MHC・ペプチド複合体の提示による TCR を介するシグナルとともに、共刺激と総称されるシグナルを送ることが必要である。DC は成熟してはじめて CD80、CD86 などの共刺激分子を強発現するため、有効な抗原特異的免疫反応を誘導するためには、DC を成熟させることが重要となる。この役割を担うのが自然免疫反応である。病原微生物が Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)などを介して自然免疫系を強く活性化することにより産生される炎症性サイトカインや、菌体成分そのものの刺激を受けてDCが成熟し、その結果、微生物に対する有効な獲得免疫反応が誘導されるわけである。これに対し、通常癌細胞は自然免疫系を強く活性化するような分子を発現していないことから、何もしなければ DC は活性化されず有効な抗腫瘍免疫反応は起こりえない。このような癌細胞の免疫原性の欠如を補うために、癌抗原を加えた DC を *in vitro* で活性化し、自然免疫反応によって DC に生じる変化をあらかじめ人為的に起こしてから *in vivo* に戻すことにより、腫瘍特異的な T 細胞を強く活性化しようとするのが、DC を用いた癌免疫療法の基本的な考え方である。

癌細胞を殺す最も重要なエフェクター細胞は CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞(cytotoxic T lymphocytes; CTL)であることから、DC 療法でも CTL を活性化することに主眼が置かれている。しかしそれだけでなく、CD4 陽性のヘルパーT 細胞が DC を活性化したり種々のサイトカインを産生したりすること

によって、CTL の誘導や活性維持に重要な役割を果たすとともに、マクロファージ、好中球、ナチュラルキラー細胞といった自然免疫系の細胞も幅広く活性化することで効果をもたらす[42]。したがって、CTL のみならず CD4 陽性 T 細胞も活性化することが、強力な免疫反応を誘導するうえで重要である。

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

5-6) 本研究の目的

本研究は、膀胱癌組織に高発現する新規腫瘍関連抗原を同定し、その腫瘍免疫療法への応用を目指すことを目的とする。このため、HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いて、自己免疫現象を誘導しない HLA-A2 拘束性の腫瘍関連抗原由来の CTL エピトープを同定し、このペプチドを用いて、健常人および癌患者の末梢血単核細胞から、HLA-A2 と腫瘍関連抗原を発現する癌細胞を傷害する CTL を誘導できるか否か検討する。さらに、誘導した CTL の、免疫不全マウスの *in vivo* における抗腫瘍効果を検討する。

6 実験方法

6-1) マウス

HLA-A2 (HHD) トランスジェニックマウス(HLA-A2 Tgm)[43,44]は、フランスのパスツール研究所のLamonnier博士より恵与されたマウスで、埼玉医科大学松井政則教授が繁殖させたマウスの譲渡を受けて、6 週齢のものを用いた。*HLA-A*0201* の発現はRT-PCR法にてmRNAの発現を確認した。このHLA-A2 Tgmは、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインがHLA-A2 に由来し、 $\alpha 3$ ドメインがマウスH-2D^bに由来する異種キメラMHCクラスI分子 (HLA-A2 (HHD))で、N末端にリンカーを介してヒト $\beta 2$ ミクログロブリンを共有結合した分子を発現する。さらに、マウス $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子およびマウスH-2D^b遺伝子が標的破壊されていることにより、マウス固有のMHCクラスI分子を発現することなく、HLA-A2 (HHD) を発現する遺伝子改変マウスである。Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウスは日本チャールズリバーより購入し、6 週齢のものを用いた。

6-2) 細胞株

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

6-3) 血液サンプルおよび癌組織の採取

ヒト血液検体およびDNAを用いた研究に際しては、熊本大学医学薬学研究部の倫理委員会の承認を経た後に実施した。健常人は HLA-A2 陽性のボラン

ティアからインフォームドコンセントを得た後に採取した。癌患者からの血液サンプルは、2006年9月から2007年10月までの間に、熊本大学消化器外科にて治療中の癌患者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。末梢血サンプル 50ml から、先に報告した Ficoll-Conray 密度勾配遠心法[30]によって、末梢血単核球細胞(PBMC)を単離した。各患者が HLA-A2 を有しているか否かは、PBMC を抗 HLA 抗体と FITC 抗マウス IgG 抗体により間接蛍光染色し、フローサイトメトリー (FACScan, Becton Dickinson)を用いて検討した。癌組織および非癌部組織についても同様に、インフォームドコンセントを得た後に採取した。全ての患者サンプルは、符号をつけて匿名化し、実験時まで-80°C で保管し、その後に使用した。

6-4) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) と Northern blot 法

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。Northern blot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、*CDH3* 特異的な³²Pで標識したプローブをハイブリダイズさせ、*CDH3* 遺伝子の発現を検出した[38]。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°C 1分間、58°C 1分間、72°C 1分間で 30-35 サイクル行い、PCR産物を 1%アガロースゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色し特異的バンドを検出した。プライマーのシーケンスは、以下に示した。

CDH3: sense 5'- GTCCCTTCCCCAGAGACTGAA -3', antisense 5'- CCTCAAAATCCAAACCCTTCC -3'

RAB6KIFL: sense 5'- CTACAAGCACCCAAGGACTCT -3', antisense 5'- AGATGGAGAAGCGAATGTTT -3'。

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

6-5) Western blot 法

目的の細胞をホモジナイザーを用いてホモジナイズし、溶解バッファー (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 1mM sodium orthovanadate (和光社), 1mM EDTA, plus a protease inhibitor tablet (Amersham Bioscience 社)) を用いて溶解した。その上清サンプルを、10% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、ニトロセルロースメンブレン(BIO-Rad 社)に転写した。5% スキムミルクを加えた 0.2% Tween 20-TBS 溶液を用いて、4°C で 16 時間ブロッキングした。検出には、マウス抗 CDH3 モノクローナル抗体(BD transduction laboratories 社)およびラビット抗 RAB6KIFL ポリクローナル抗体(Bethyl laboratories 社)を一次抗体として使用した。HRP 標識抗マウス IgG 抗体もしくは抗ラビット抗体(Amersham Bioscience 社)を 2 次抗体として使用した。

6-6) 免疫組織化学的解析

EnVision+システム キット(DAKO 社)を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法により、免疫組織学化学的解析を行った。一次抗体は、上述のマウス抗 CDH3 モノクローナル抗体(BD transduction laboratories 社)およびラビット抗 RAB6KIFL ポリクローナル抗体(Bethyl laboratories 社)を用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりパラフィンを除去して、正常ヤギ血清にて室温で 60 分間ブロックした後に、一次抗体を 4°C で 14 時間反応させ、phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した。さらにビオチン標識抗マウス IgG 抗体と室温で 1 時間反応させた後に PBS で洗浄し、ストレプトアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼと

室温で1時間反応させてPBSで洗い、diaminobenzidineで発色させた。対比染色としてヘマトキシリン染色を行った[37]。

6-7) レンチウイルスベクターを利用した遺伝子導入

レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った[45]。17 μ gのCDH3 cDNAおよびRAB6KIFL cDNAをいれたCSII-CMV-RfAとCSII-EF-RfAの自己不活化ベクターと、10 μ gのpCMV-VSV-G-RSV -RevとpCAG-HIVgpを、10cm培養ディッシュで培養した293T細胞にLipofectamine 2000 (インビトロジェン)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入の60時間後にメディアウムを交換し、viral particleを超遠心(50000g \times 2時間)でペレットにした。そのペレットを50 μ lのRPMI1640で溶解し、ターゲット細胞を 5×10^4 と10 μ lのviral suspensionを加えU底96穴のプレートで培養した。遺伝子の発現は、Western blot法で確認した。

6-8) 使用したペプチド

特定のHLAに結合するペプチドの構造モチーフ探索データベース(<http://bimas.dcrt.nih.gov/>)を利用して、ヒトのCDH3 およびRAB6KIFL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それぞれ18種類と36種類選択(表1および2)し、American Peptide Company社に合成を委託し購入した。

表 1. ヒト CDH3 由来で HLA-A2 (*HLA-A*0201*)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト

| | A2-binding peptide | Position | Subsequence residue listing | HLA-A2 binding score ^a |
|--------|--------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 9-mer | CDH3-1 | 659-667 | VLGAVLALL | 83.5 |
| | CDH3-2 | 629-637 | QLTVIRATV | 69.6 |
| | CDH3-3 | 602-610 | VVLSLKKFL | 64.7 |
| | CDH3-4 | 655-663 | FILPVLGAV | 48.7 |
| | CDH3-5 | 419-427 | KLPTSTATI | 36.5 |
| | CDH3-6 | 564-572 | VLNITDKDL | 36.3 |
| | CDH3-7 | 757-765 | FIIENLCAA | 29.6 |
| | CDH3-8 | 187-195 | AVSENGASV | 25.0 |
| | CDH3-9 | 152-160 | SPPEGVFAV | 24.8 |
| 10-mer | CDH3-10 | 228-237 | VLPGTSVMQV | 271.9 |
| | CDH3-11 | 500-509 | TLDREDEQFV | 153.0 |
| | CDH3-12 | 419-428 | KLPTSTATIV | 99.8 |
| | CDH3-13 | 440-449 | FVPPSKVVEV | 64.4 |
| | CDH3-14 | 66-75 | FSTDNDDFTV | 49.7 |
| | CDH3-15 | 2-11 | GLPRGPLASL | 49.1 |
| | CDH3-16 | 101-110 | ILRRHKRDWV | 24.2 |
| | CDH3-17 | 223-232 | SVLEGVLPGT | 22.8 |
| | CDH3-18 | 655-664 | FILPVLGAVL | 20.5 |

BIMAS ソフトウェアを用いて HLA-A2 (*A*0201*)に親和性が高いと推測される CDH3 由来のペプチドを 18 種類選択し、HLA-A2.1 (HHD) Tgm に免疫するエピトープ候補ペプチドとした(Purity > 95%)。

表 2. ヒト RAB6KIFL 由来で HLA-A2 (*HLA-A*0201*)に親和性を有すると推測されるペプチドのリスト

| | A2-binding peptide | Position | Subsequence residue listing | HLA-A2 binding score * |
|--------|--------------------|----------|-----------------------------|------------------------|
| 9-mer | RAB6KIFL-1 | 204-212 | LLSNEVIWL | 459.4 |
| | RAB6KIFL-2 | 12-20 | LLSDDDDVVV | 198.8 |
| | RAB6KIFL-3 | 715-713 | KMLEPPPSA | 190.5 |
| | RAB6KIFL-4 | 750-758 | KLGESLQSA | 164.0 |
| | RAB6KIFL-5 | 38-46 | NLLSDCSVV | 105.5 |
| | RAB6KIFL-6 | 688-696 | QLQEVKAKL | 87.6 |
| | RAB6KIFL-7 | 695-793 | KLQQCKAEL | 74.8 |
| | RAB6KIFL-8 | 809-817 | CIAEQYHTV | 58.8 |
| | RAB6KIFL-9 | 11-19 | GLLSDDDDVV | 51.7 |
| | RAB6KIFL-10 | 436-444 | TLGRCIAAL | 49.1 |
| | RAB6KIFL-11 | 179-187 | ILPRSLALI | 40.8 |
| | RAB6KIFL-12 | 183-191 | SLALIFNSL | 40.6 |
| | RAB6KIFL-13 | 625-633 | KLNILKESL | 36.6 |
| | RAB6KIFL-14 | 781-789 | ILIKQDQTL | 36.30 |
| | RAB6KIFL-15 | 231-239 | GLQEEELST | 30.6 |
| | RAB6KIFL-16 | 494-502 | TLHVAKFSA | 28.8 |
| | RAB6KIFL-17 | 556-564 | SMYGKEELL | 24.2 |
| | RAB6KIFL-18 | 788-796 | TLAELQNNM | 20.4 |
| | RAB6KIFL-19 | 209-217 | VIWLDSKQI | 20.2 |
| 10-mer | RAB6KIFL-20 | 654-663 | LLQEARQQSV | 484.8 |
| | RAB6KIFL-21 | 788-797 | TLAELQNNMV | 285.2 |
| | RAB6KIFL-22 | 742-731 | RLLRTELQKL | 181.8 |
| | RAB6KIFL-23 | 39-48 | LLSDCSVVST | 119.5 |
| | RAB6KIFL-24 | 11-20 | GLLSDDDDVVV | 105.5 |
| | RAB6KIFL-25 | 400-409 | KISELSLCDL | 96.9 |
| | RAB6KIFL-26 | 573-582 | LLLKERQEKL | 65.8 |
| | RAB6KIFL-27 | 97-106 | VLQAPKDSFA | 46.5 |
| | RAB6KIFL-28 | 284-293 | AQPDTAPLPV | 28.9 |
| | RAB6KIFL-29 | 132-141 | GQASFFNLTV | 26.8 |
| | RAB6KIFL-30 | 625-634 | KLNILKESLT | 26.0 |
| | RAB6KIFL-31 | 382-391 | SIFSIRILHL | 25.0 |
| | RAB6KIFL-32 | 203-212 | PLLSNEVIWL | 22.0 |
| | RAB6KIFL-33 | 455-464 | NLVVFRDSKL | 21.4 |
| | RAB6KIFL-34 | 506-515 | QLVHAPPMQL | 21.4 |
| | RAB6KIFL-35 | 98-107 | LQAPKDSFAL | 21.4 |
| | RAB6KIFL-36 | 66-75 | KVYLRVRPLL | 21.0 |

BIMAS ソフトウェアを用いて HLA-A2 (*A*0201*)に親和性が高いと推測される RAB6KIFL 由来のペプチドを 36 種類選択し、HLA-A2.1 (HHD) Tgm に免疫するエピトープ候補ペプチドとした(Purity > 95%)。

6-9) HLA-A2トランスジェニックマウス(Tgm)を用いた CTL エピトープの決定

HLA-A2 (HHD) トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm)の骨髄細胞から DC (BM-DC)を誘導した。誘導法に関しては、先に報告した方法を用いた[33]。HLA-A2 Tgmの骨髄細胞 2×10^6 個にマウスのGM-CSFを 5 ng/mlの濃度で加え、10 cm培養プレート内で1週間培養して誘導した。このようにして得られたBM-DCを、上記の解析により同定し合成したペプチドのうち、2-3種類ずつの混合物(各 10 μ M)と2時間インキュベートした後に、HLA-A2 Tgm 1匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与(免疫)した。1週間の間隔をおいて2回免疫した後、マウスの脾細胞を回収して Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)の誘導に用いた。CD4 陽性T細胞による非特異的反応の影響を除外するため、脾細胞よりMACS Beadsを用いて、CD4 陽性T細胞を取り除いたものを用いた。

免疫されたマウスの CD4 陰性脾細胞を、試験管内でペプチドを負荷した BM-DC により再刺激した。培養 6 日目に再び、ペプチドを負荷した BM-DC およびペプチドを負荷していない 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。IFN- γ 産生 CTL の数に相関するスポット数の検出は、検出キット(BD Biosciences ELISPOT Set)のプロトコールに準じて行った。前日から IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレートに培養液にて洗浄後、エフェクター細胞(100 μ L/well)と標的細胞(100 μ L/well)を混合し、37°C で 22 時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と 2 時間、さらにstreptavidin-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[46]。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置を用いて行った。

図 5

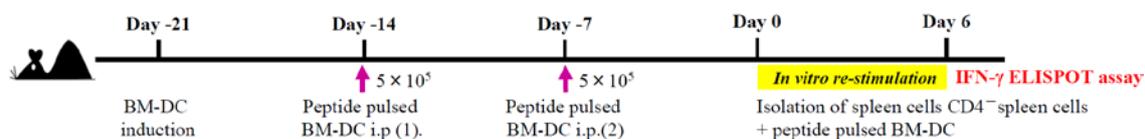


図 5. HLA-A2 Tgm を用いた CTL エピトープの決定

HLA-A2 Tgmの骨髓細胞 2×10^6 個にマウスのGM-CSFを 5 ng/mlの濃度で加え、10cm培養プレート内で1週間培養してBM-DCを誘導した。これに各々のペプチドをパルスし2時間インキュベートした後に、HLA-A2 Tgm 1匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内投与して免疫した。1週間の間隔をおいて2回免疫した後、マウスの脾細胞を回収してCTLの誘導に用いた。CD4陽性T細胞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細胞を取り除いたものを用いた。免疫されたマウスのCD4陰性脾細胞を、試験管内でペプチドを添加した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。

6-10) HLA-A2 Tgm を用いた自己免疫反応の検討

前項に示したCDH3およびRAB6KIFLペプチド負荷BM-DCを免疫したHLA-A2 Tgmのうち、ヒトとマウスでアミノ酸配列が完全に一致するRAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇ペプチドで免疫したTgmの重要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胃、大腸、皮膚)に対する自己免疫現象の有無を、2回目の免疫の1週間後に各臓器におけるCD8およびCD4 T細胞の浸潤の有無により検討した。免疫したHLA-A2 Tgmの各臓器を採取し、抗CD8抗体および抗CD4抗体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[32]。

6-11) 健常人、癌患者 PBMC からの CDH3 および RAB6KIFL

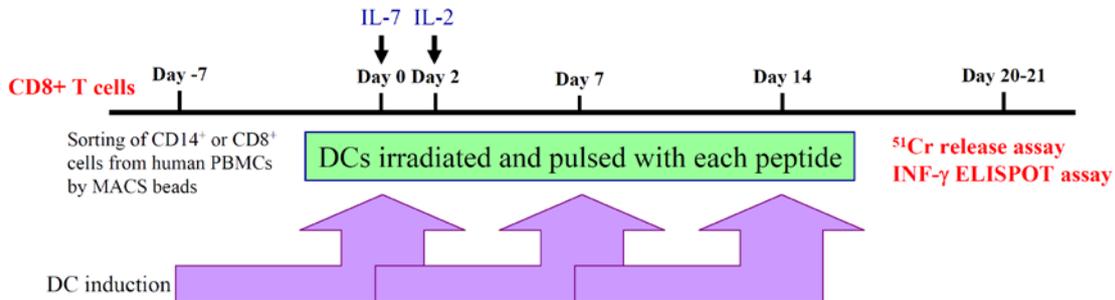
反応性 CTL の誘導

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

HLA-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[30]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)。腫瘍抗原ペプチド特異的なCTL株の樹立法を、図6および以下に示す[32,37,39]。

まず全血よりFicollにてPBMCを分離した後、マイクロビーズ(Miltenyl Biotec社)を用いてCD8陽性細胞とCD14陽性細胞を分離した。CD8陽性細胞は凍結保存した。CD14陽性細胞をGM-CSF (100 ng/ml) とIL-4 (100 U/ml)を加えた2% AIM-Vメディウムで培養して5日目にOK432 (0.1 KE/ml)を加えさらに2日培養し、成熟DCに分化させて抗原提示細胞として使用した。CTLの誘導には2%自己血清添加AIM-Vメディウムを使用した。このDCに20 mMのペプチドと4 mg/mlの β 2ミクログロブリンを加え、2時間後に40 Gyの放射線を照射した。細胞を洗浄しペプチドを取り除いた後、24穴プレートに1ウェルあたり凍結保存しておいた 2×10^6 個のCD8陽性細胞と、ペプチドパルスした 1×10^5 個のDCを加え培養した。第0日目にIL-7 (5 ng/ml)を加え、また同日より新しいDCの誘導を始めた。第3日目にはIL-2 (20 U/ml)を加えた。第7日および第14日に同様のDCを準備し、CD8陽性細胞をAIM-Vで1回洗浄後、DCで再刺激した。この際にIL-7 (5 ng/ml) とIL-2 (20 U/ml)を加えた。第20-21日目にIFN- γ ELISPOT assayもしくは⁵¹放出試験を行った。

図 6



DC preparation: CD14⁺ cells were cultured with GM-CSF and IL-4. Maturation of DCs were induced by OK432 on day 5.

図 6. 腫瘍抗原ペプチド特異的 CTL 株の樹立法

全血よりFicollにてPBMCを分離した後、マイクロビーズ(Miltenyl Biotec社)を用いてCD8 陽性細胞とCD14 陽性細胞を分離した。CD14 陽性細胞をGM-CSF (100 ng/ml) とIL-4 (100 U/ml)を加えた2% AIM-Vメディウムで培養して5日目にOK432 (0.1 KE/ml) を加えさらに2日培養し、成熟DCに分化させて抗原提示細胞として使用した。成熟DCに20 mMのペプチドと4 mg/mlのβ2 ミクログロブリンを加え、2時間後に40Gyの放射線を照射した。細胞を洗浄しペプチドを取り除いた後、24穴プレートに1ウェルあたり凍結保存しておいた 2×10^6 個のCD8 陽性細胞と、ペプチドパルスした 1×10^5 個のDCを加え培養した。第0日目にIL-7 (5 ng/ml) を加え、また同日より新しいDCの誘導を始めた。第3日目にはIL-2 (20 U/ml) を加えた。第7日および第14日に同様のDCを準備し、CD8 陽性細胞をAIM-Vで1回洗浄後、DCで再刺激した。この際にIL-7 (5 ng/ml) とIL-2 (20 U/ml) を加えた。

6-12) 細胞傷害活性の検討

ペプチド特異的CTLの誘導の確認は、TAP欠損細胞株T2細胞(HLA-A*0201 陽性)を標的細胞にした⁵¹Cr放出法による細胞傷害試験を指標として行った。T2細胞を26°Cで16時間培養後、⁵¹Cr (Na₂⁵¹CrO₄)でラベルし、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倍のCTLを加え、6時間後に培養上清を採取して、死細胞より放出された⁵¹Crの放射活性を測定することにより行った。

通常の癌細胞に対する細胞傷害活性を検討するため、CDH3 もしくはRAB6KIFLとHLA-A2 の両方を発現している癌細胞株、HLA-A2 は発現しているがCDH3 あるいはRAB6KIFLを発現していない癌細胞株、CDH3 あるいは

RAB6KIFLを発現しているがHLA-A2を発現していない細胞株を用いて、それらに対する細胞傷害活性を検討した。さらに癌細胞を傷害するCTLが抗原特異的に反応しており、またCTLの誘導に用いたペプチドが癌細胞内でプロセッシングを受け、HLA-A2 と抗原ペプチドの複合体として癌細胞表面に提示されているかを検討するため、CDH3 あるいはRAB6KIFLを発現していない細胞株に、上述したレンチウイルスを用いて各々の抗原遺伝子を遺伝子導入した細胞株を標的として、⁵¹Cr放出試験を行った。⁵¹Cr放出法による細胞傷害の定量は、1日目に細胞を⁵¹Crで1時間ラベルした後に、96穴平底プレートに1ウェルあたり、 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CTLを加え、6時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された⁵¹Crを測定することにより行った。

6-13) CTL の HLA 拘束性の検討

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

6-14) 養子移植免疫療法モデル

6週齢のメスのNOD/SCIDマウスをチャールズリバー社より購入し、熊本大学のCenter for Animal Resources and Development (CARD) にてSPF 環境下に飼育した。まず、ヒト大腸癌細胞株HCT116 4×10^6 個をNOD/SCIDマウスの背部皮下に移植した。プロトコールを図7に示す。HCT116が腫瘍を形成し、その大きさが 25mm^2 になったところで、 4×10^6 個のCDH3特異的なCTL細胞株をマウスの尾静脈より投与した。コントロールとして、HLA-A2拘束性のHIV由来ペプチド(SLYNTYATL)で誘

導したT細胞株、あるいはPBSのみをマウスに静脈内投与した。移植後7日目と14日目に2回、各T細胞株を投与し、その後週2回腫瘍の大きさ(長径 × 短径)を測定した。

図 7

Protocol of adoptively transfer model

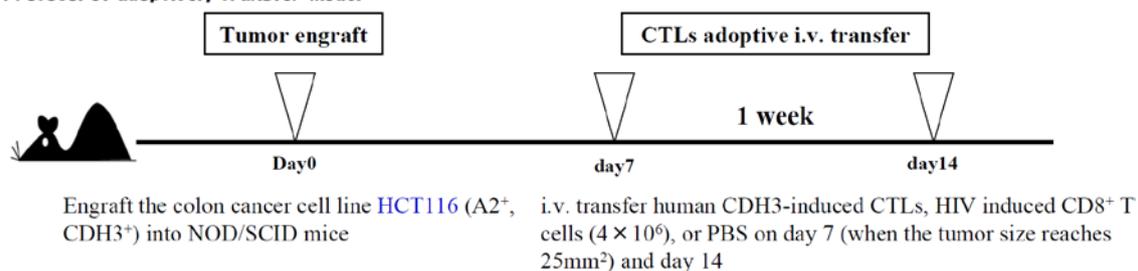


図 7. 養子移植免疫療法モデルのプロトコール

ヒト大腸癌細胞株HCT116 4×10^6 個をNOD/SCIDマウスの背部皮下に移植し、その大きさが 25mm^2 になったところで、 4×10^6 個のCDH3 特異的なCTL細胞株をマウスの尾静脈より投与した。コントロールとして、HLA-A2 拘束性のHIV由来ペプチド(SLYNTYATL)で誘導したT細胞株、あるいはPBSのみをマウスに静脈内投与した。移植後7日目と14日目に2回、各T細胞株を投与し、その後週2回腫瘍の大きさ(長径 × 短径)を測定した。

7 実験結果

7-1) cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍関連抗原遺伝子の選定

膵癌患者16例の癌部と非癌部のRNA をそれぞれ抽出し、27,648種類の遺伝子についてcDNA マイクロアレイ解析を行った。そのうち、非癌部より癌部で5倍以上発現が増加している遺伝子を6種類選り出した(図8)。これら6種類の遺伝子の正常組織での発現を確認後、*CDH3*と*RAB6KIFL*を膵癌における腫瘍関連抗原として選り出した (図9)。*CDH3*遺伝子は膵癌16例中16例全例において、非癌部と比して癌部で5倍以上の発現を認め、癌部の非癌部に対する比の平均は約1,900,000倍と非常に高値であった。*RAB6KIFL*遺伝子は6例中6例全例で高発現を認め、平均31,900倍とこちらも高値であった。正常および胎生期の組織においては、*CDH3*は卵巣と乳腺で、また*RAB6KIFL*は精巣と胸腺でやや高い発現が認められたが、その発現は癌と比べると著しく低いものであった。また、同様の手法で膵癌以外の様々な癌種におけるこれらの遺伝子の発現を解析すると、*CDH3*は大腸癌や胃癌、肝内胆管癌、肺癌、*RAB6KIFL*は肺癌や膀胱癌で高発現を認めた (表3および表4)。

図 8

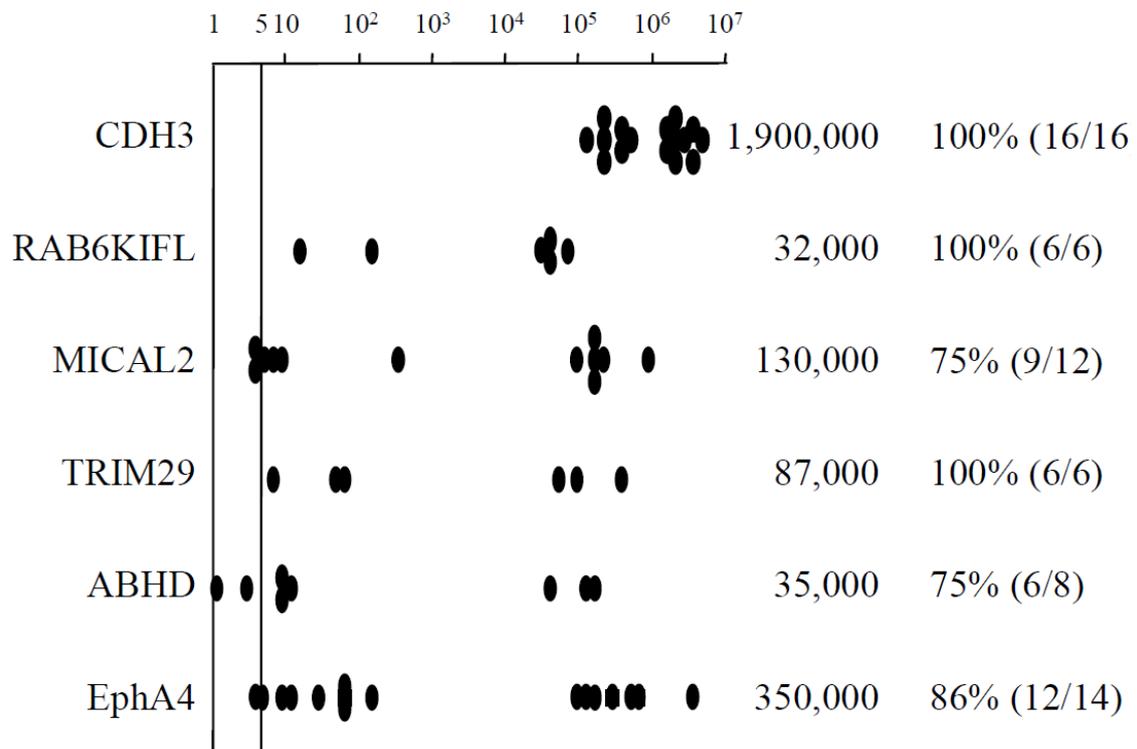


図8. cDNAマイクロアレイ解析による、膵癌細胞で高発現している遺伝子のリスト

これらの6種類の遺伝子は、膵癌において非癌部より癌部で5倍以上の発現増加がみられる遺伝子である。この中から、*CDH3*と*RAB6KIFL*を免疫療法の標的抗原の候補として選択した。

図 9

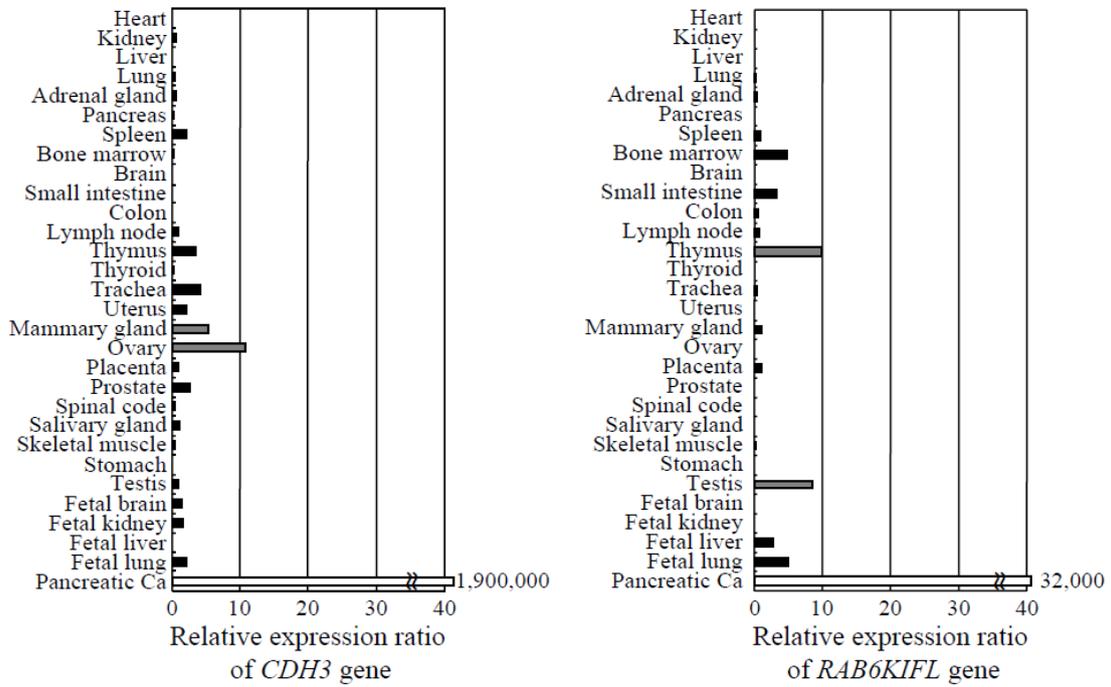


図 9. cDNA マイクロアレイ解析による、正常組織における *CDH3* と *RAB6KIFL* 遺伝子の発現解析

CDH3 は卵巣と乳腺で、*RAB6KIFL* は精巣と胸腺で癌組織と比べると、はるかに弱い発現を認めたが、他の正常成人組織における発現はいずれも低かった。

表 3. 様々な悪性腫瘍における *CDH3* 遺伝子の発現

| | n | Positive rate (%) | Relative expression ratio (mean) |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------------------|
| <u>Pancreatic cancer</u> | <u>16/16</u> | <u>100</u> | <u>1,900,000</u> |
| Testicular cancer | 10/10 | 100 | 400,000 |
| Soft tissue tumor | 21/21 | 100 | 250,000 |
| Cholangiocellular carcinoma | 19/19 | 100 | 3,600 |
| Non-small cell lung cancer | 35/37 | 95 | 73,000 |
| Colorectal cancer | 31/34 | 91 | 84,000 |
| Cervical cancer | 14/19 | 74 | 1,500 |
| Gastric cancer | 20/28 | 71 | 35,000 |
| Urinary bladder cancer | 24/34 | 71 | 30 |
| Small cell lung cancer | 3/14 | 21 | 7 |
| Breast cancer | 5/81 | 6 | 1 |
| Prostate cancer | 2/57 | 4 | 1,500 |
| Renal cell carcinoma | 0/20 | 0 | 0 |
| Esophageal cancer | 0/19 | 0 | 2 |

表 4. 様々な悪性腫瘍における *RAB6KIFL* 遺伝子の発現

| | n | Positive rate (%) | Relative expression ratio (mean) |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| <u>Pancreatic cancer</u> | <u>6/6</u> | <u>100</u> | <u>32,000</u> |
| Small cell lung cancer | 15/15 | 100 | 22 |
| Bladder cancer | 30/31 | 97 | 21,000 |
| Non-small cell lung cancer | 20/22 | 91 | 26,000 |
| Cholangiocellular carcinoma | 7/11 | 64 | 3,800 |
| Breast cancer | 29/61 | 44 | 320 |
| Prostate cancer | 11/36 | 31 | 4 |
| Renal cell carcinoma | 3/11 | 27 | 5 |
| Esophageal cancer | 13 | 15 | 3 |
| Colorectal cancer | 2/31 | 3 | 2 |
| Gastric cancer | 0/4 | 0 | 0 |

7-2) 癌細胞株、癌組織および正常組織における CDH3 および

RAB6KIFL の発現解析

胎生臓器2種類を含む16種類の正常組織における*CDH3*遺伝子発現をRT-PCR (図10A)にて、また重要臓器9種類における*CDH3*遺伝子の発現をNorthern blot解析 (図10B)にて解析した。その結果、正常組織にはほとんど*CDH3*遺伝子の発現は認められなかった。26種類の膵癌を含む様々な癌種の細胞株における*CDH3*遺伝子の発現をRT-PCRにて解析したところ、多くの細胞株で*CDH3*遺伝子の高発現を認めた (図10C)。さらに、手術検体を用いたRT-PCRでは、膵癌8例中6例、胃癌4例中2例、大腸癌7例中6例において、その癌部で*CDH3*遺伝子の高発現を認めたが、非癌部においてはほとんど発現を認めなかった(図10D)。また、膵癌の皮膚転移巣や腹膜播種巣においても*CDH3*遺伝子の高発現を認めた。

同様に、胎生臓器2種類を含む16種類の正常組織における*RAB6KIFL*遺伝子の発現をRT-PCRにて解析したところ、精巣に発現を認め、胸腺において弱い発現を認めた(図11A)。続いて、膵癌細胞株9種類における*RAB6KIFL*遺伝子の発現をRT-PCRにて、HLA-A2陽性癌細胞株9種類における*RAB6KIFL*蛋白の発現をWestern blotにて解析したところ、調べた癌細胞株全てにおいて、強弱の差はあるものの発現を認めた(図11B)。手術検体を用いたRT-PCRでは、*RAB6KIFL*遺伝子は膵癌8例中5例でその癌部に高発現を認めたが、非癌部において発現はほとんど認めなかった(図11C)。また、膵癌の皮膚転移巣や腹膜播種巣においても高発現を認めた。

図 10

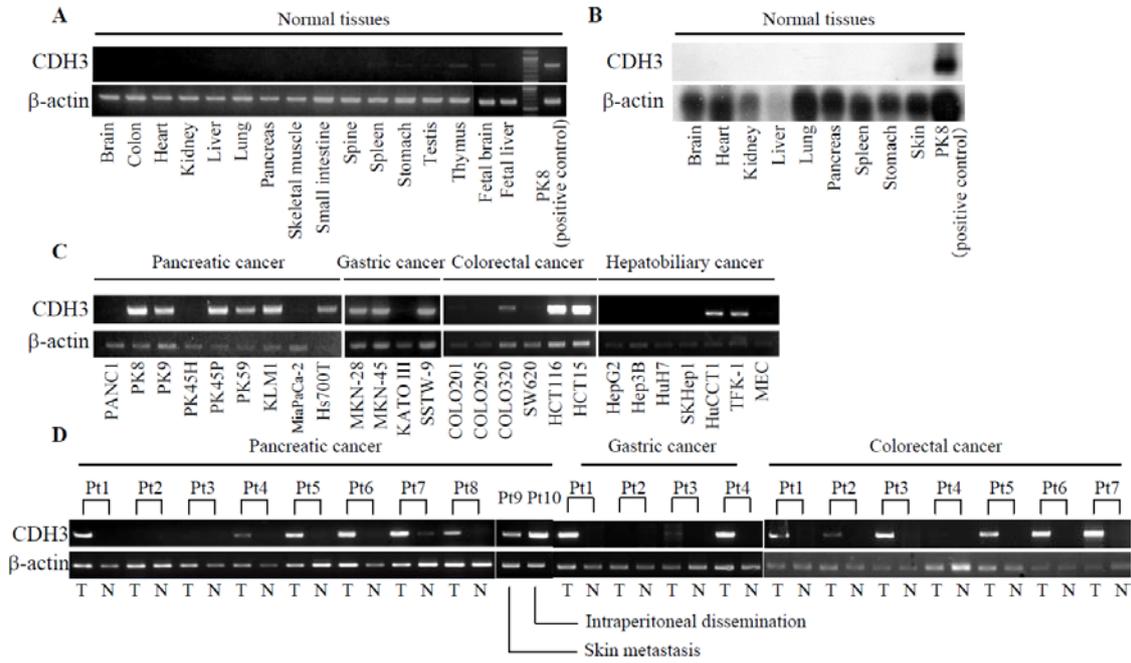


図 10. 癌細胞株、癌組織および正常組織における *CDH3* の発現解析

A, B: RT-PCR (A)および Northern blot (B)による、正常組織における *CDH3* mRNA の発現解析。正常組織にはほとんど発現を認めなかった。C: 癌細胞株の RT-PCR 解析。様々な癌腫の癌細胞株において発現が認められた。D: 膵癌、胃癌および大腸癌組織における *CDH3* mRNA の発現解析。癌部においては高頻度に発現が認められたが、非癌部ではほとんど発現を認めなかった。

図 11

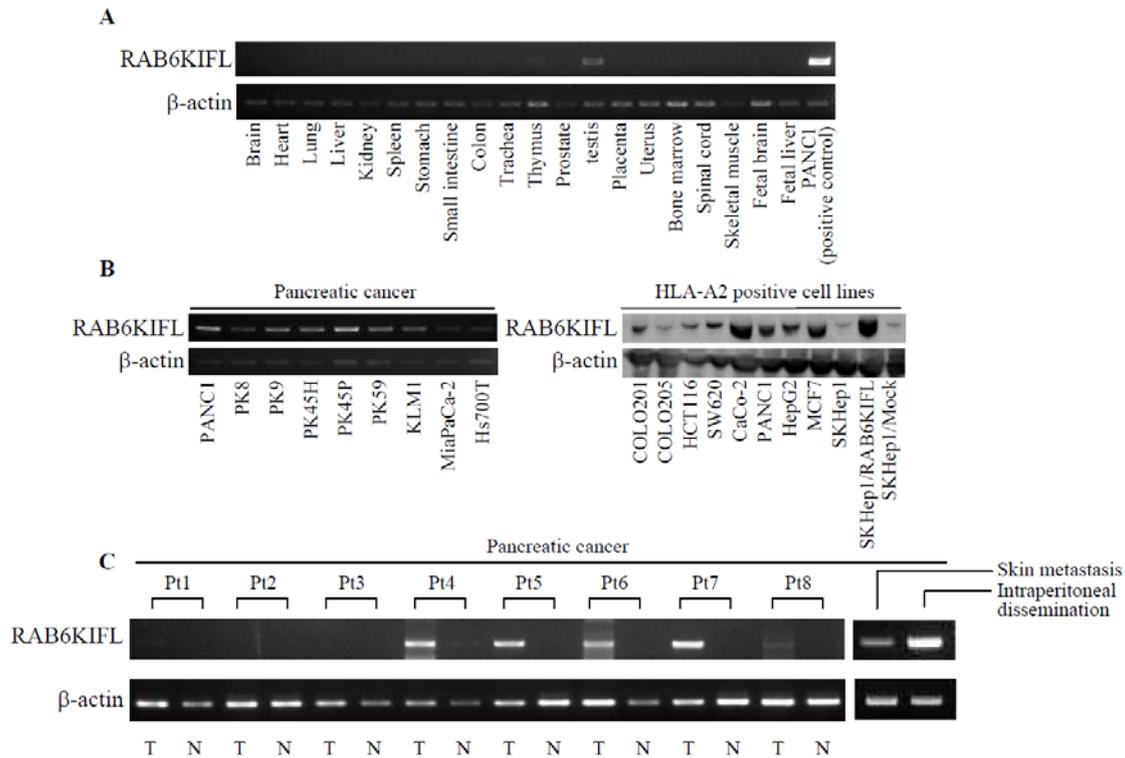


図 11. 癌細胞株、癌組織および正常組織における RAB6KIFL の発現解析

A, B: RT-PCR による、正常組織における RAB6KIFL mRNA の発現解析。精巣と胸腺にのみ弱い発現を認めた。B: 癌細胞株の RT-PCR および Western blot 解析。様々な癌細胞株において発現が認められた。C: 膵癌組織における RAB6KIFL mRNA の発現解析。癌部においては高頻度に発現が認められたが、非癌部ではほとんど発現を認めなかった。

7-3) CDH3 および RAB6KIFL 蛋白質の免疫組織化学的解析

13 種類の正常組織および膵癌、胃癌、大腸癌、肺癌組織についてパラフィン標本を用いて、CDH3 蛋白質の発現を免疫組織化学的解析により検討した (図 12)。正常組織においては、調べたいずれの組織においても、CDH3 蛋白質の発現は認められなかった。腫瘍形成性膵炎組織においても、CDH3 蛋白質の発現は認められなかった。膵癌組織においては、21 例中 16 例に、癌部の細胞膜を中心として

CDH3 蛋白の発現を認め、また、腭癌の皮膚転移巣や腹膜播種巣にも強い発現を認めた。この他、胃癌や大腸癌、肺癌組織においても、その癌部に発現を認めた。

続いて、12 種類の正常組織および腫瘍形成性腭炎、腭癌組織についてパラフィン標本を用いて、RAB6KIFL 蛋白の発現を免疫組織化学的解析により検討した (図 13) 。正常組織においては、精巣、胸腺を含めいずれの組織においても、RAB6KIFL 蛋白の発現は認められなかった。腫瘍形成性腭炎組織においても、RAB6KIFL 蛋白の発現は認められなかった。腭癌組織においては 9 例中 6 例において、その癌部の細胞質と一部核に、RAB6KIFL 蛋白の発現を認めた。腹膜播種巣においても同様に発現を認めた。

図 12

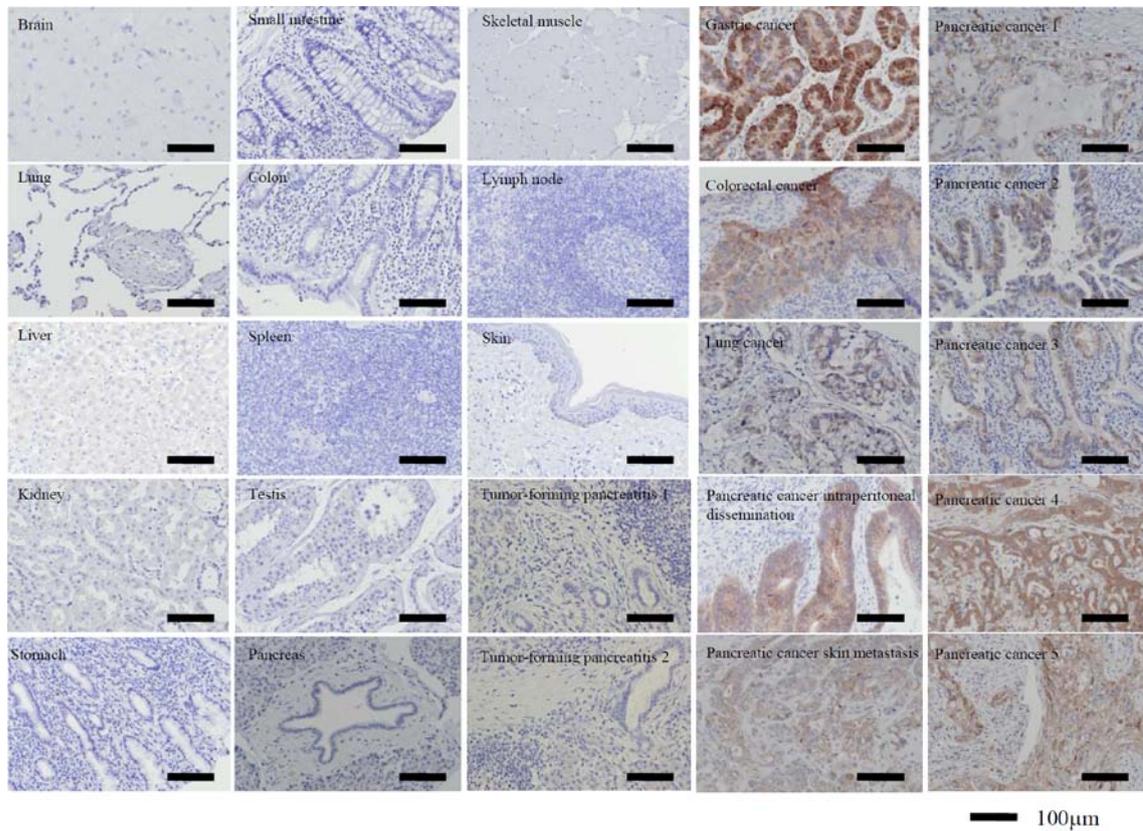


図 12. CDH3 蛋白質の免疫組織学科学的解析

正常組織および腫瘍形成性膵炎組織において、CDH3 蛋白質の発現は認められなかった。膵癌や胃癌、大腸癌、肺癌組織においては、癌部の細胞膜を中心に発現を認めたが、周囲の非癌部組織には発現は認められなかった。

図 13

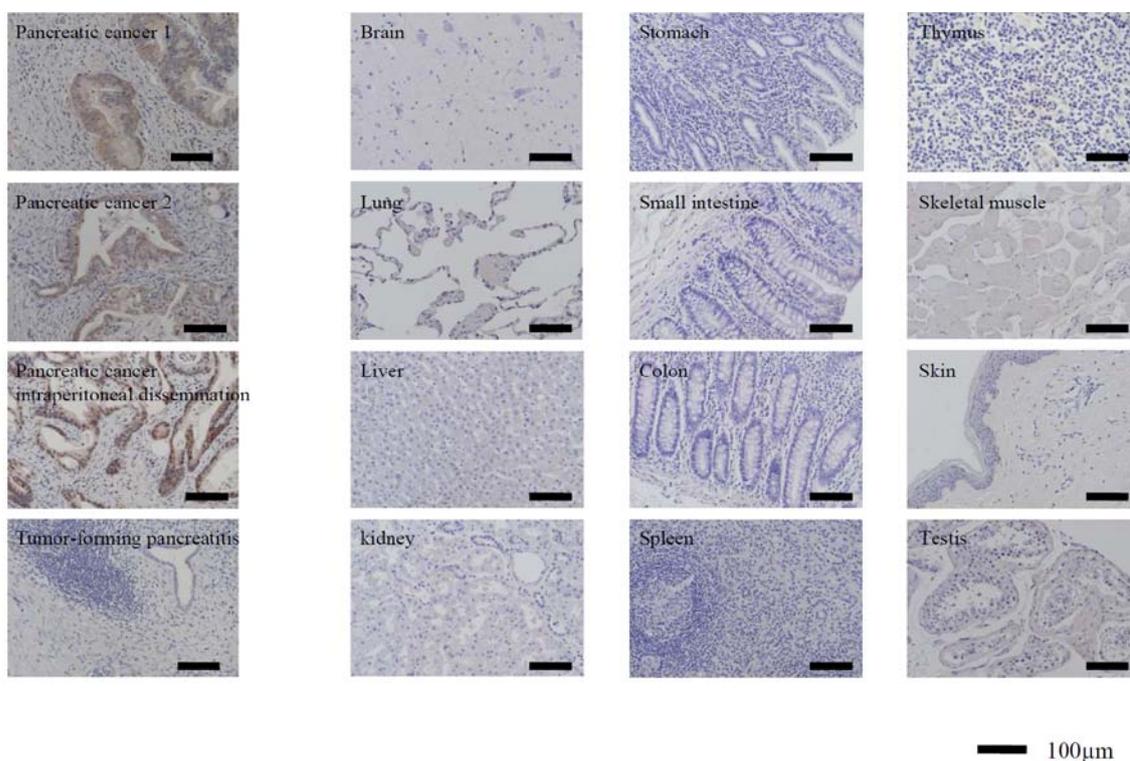


図 13. 図 12. RAB6KIFL 蛋白質の免疫組織学科学的解析

正常組織および腫瘍形成性膵炎組織において、RAB6KIFL 蛋白質の発現は認められなかった。腫瘍組織においては、癌部の細胞質と一部核に発現を認めたが、周囲の非癌部組織には発現は認められなかった。

7-4) HLA-A2 Tgm を用いたヒト CDH3 および RAB6KIFL 由来の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの同定

ヒトCDH3 およびRAB6KIFLのアミノ酸配列の中から、BIMASソフトウェアプログラムを用いて、HLA-A2 (A*0201)に高親和性を示すと推定される9個あるいは10個のアミノ酸により構成されるペプチドを、binding scoreの高いものからそれぞれ18種類、36種類選択した(前述、表1および表2)。BM-DCにペプチドを負荷したものをHLA-A2 Tgmに2回腹腔内投与にて免疫し、脾細胞を採取、CD4 陽性細

胞を除いた後、これを各ペプチドを負荷したBM-DCで*in vitro*において刺激し、抗原ペプチド特異的にCTLを誘導できるエピトープペプチドをELISPOT法にて解析した。結果を図 14 (CDH3)および図 15 (RAB6KIFL)に示す。CDH3 についてはペプチド 4; CDH3-4₆₅₅₋₆₆₃ (FILPVLGAV) およびペプチド 7; CDH3-7₇₅₇₋₇₆₆ (FIENLKAA) が、RAB6KIFL についてはペプチド 2; RAB6KIFL-2₁₂₋₂₀ (LLSDDDVVV)、ペプチド 8; RAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇ (CIAEQYHTV)、および RAB6KIFL-28₂₈₄₋₂₉₃ (AQPDTAPLPV)を用いた場合に、ペプチド特異的なCTL応答としてNF- γ の産生を認め、これらのCDH3 では2種類、RAB6KIFLでは3種類のペプチドが、それぞれのHLA-A2 拘束性CTLエピトープの候補として同定された。

図 14

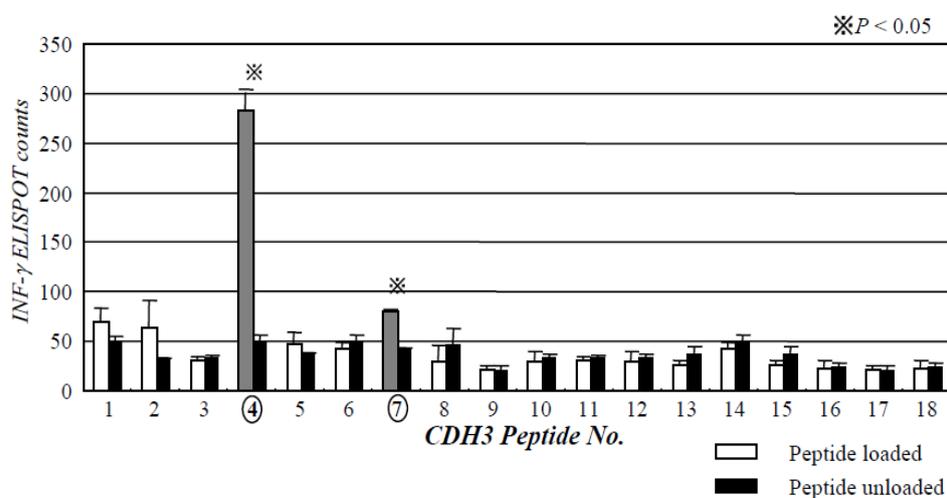


図 14. HLA-A2 Tgm を用いた、CDH3 由来の HLA-A2 (A*0201)拘束性エピトープの同定

HLA-A2 (A*0201) に結合親和性を示すと推定された CDH3 由来のペプチド 18 種類のうち、ペプチド 4 と 7 において CDH3 ペプチド特異的な CTL の誘導が認められ、これら 2 種類のペプチドをエピトープ候補として選択した。

図 15

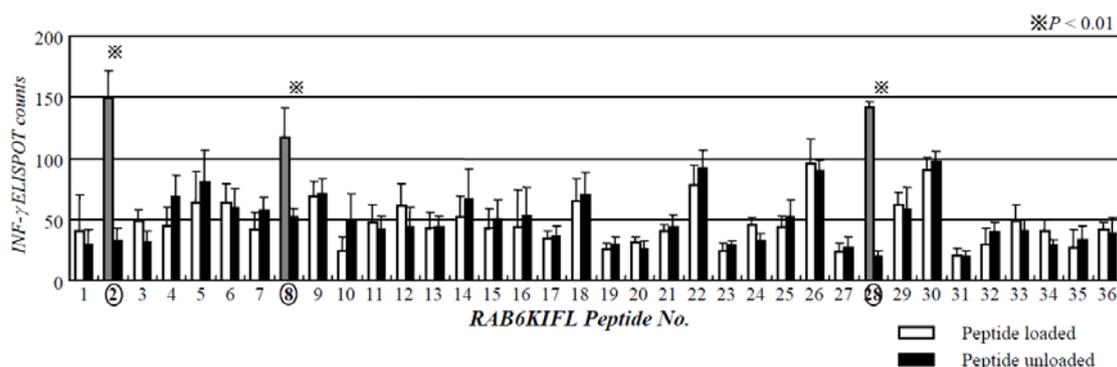


図 15. HLA-A2 Tgmを用いた、RAB6KIFL 由来の HLA-A2 (A*0201)拘束性エピートープの同定

HLA-A2 (A*0201) に結合親和性を示すと推定された RAB6KIFL 由来のペプチド 36 種類のうち、ペプチド 2、8 および 28 において RAB6KIFL ペプチド特異的な CTL の誘導が認められ、これら 3 種類のペプチドをエピートープ候補として選択した。

7-5) RAB6KIFL ペプチドを免疫された HLA-A2Tgm には自己免疫

現象は観察されない

腫瘍免疫療法の臨床応用を目指す際に、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する必要がある。例えば、良く知られているメラノーマの分化抗原のMART-1やgp100 はメラノーマの免疫療法に有用であるが、自己免疫反応として白斑やブドウ膜炎を誘導する場合がある。今回同定されたエピートープ候補ペプチドのうち、ヒトとマウスでそのアミノ酸配列が完全に一致する RAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇をパルスしたDCで2 回免疫したHLA-A2 Tgm について、重要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胃、大腸、皮膚)へのCD8陽性細胞とCD4陽性細胞の浸潤を免疫染色にて検討した。その結果、リンパ球浸潤や組織破壊等は認められず、自己免疫反応は生じていないものと判断した(図16)。また、マウスの体重減少や下痢、毛並みの乱れなどの、自己免疫疾患の発症を推測させる異常も観察されなかった。

図16

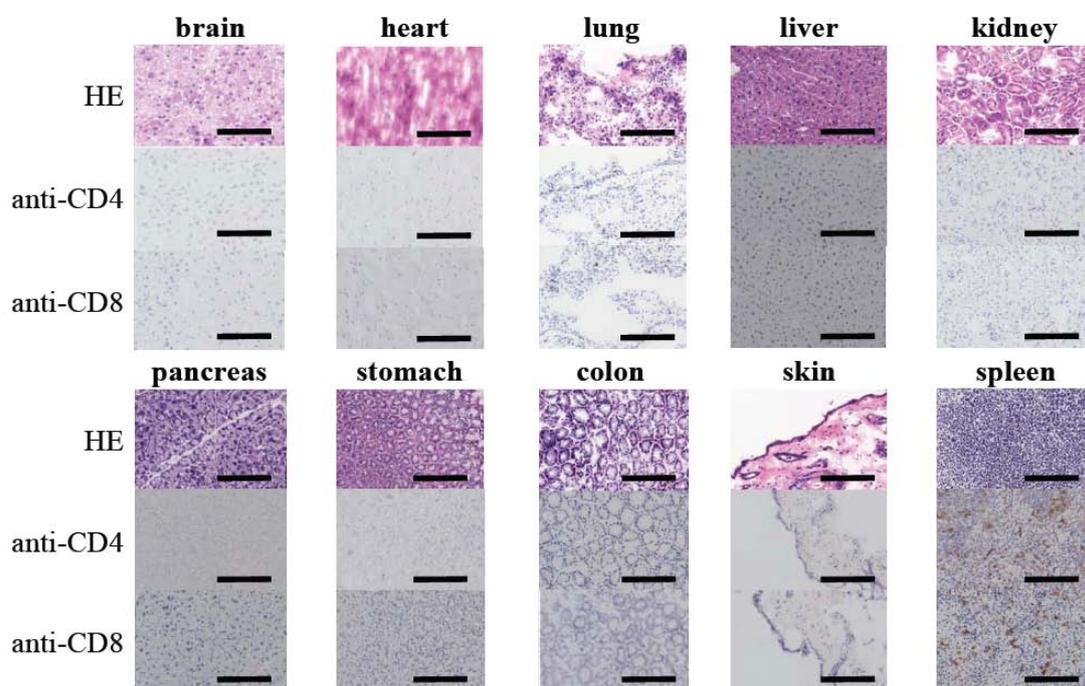


図16. RAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇ペプチドを負荷したBM-DCで免疫したHLA-A2 Tgmにおける自己免疫現象の検討

ヒトとマウスでアミノ酸配列が完全に一致するRAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇をBM-DCに負荷し免疫したHLA-A2 Tgmの重要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、胃、大腸、皮膚)を採取し、抗CD8抗体、抗CD4抗体の免疫染色にて、これらの臓器へのリンパ球の浸潤の有無を検討した。明らかなリンパ球浸潤や組織破壊像は認められなかった。

7-6) HLA-A2 陽性の健常人あるいは癌患者の PBMC からの CDH3

および RAB6KIFL 特異的 CTL の誘導

上記の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープ ペプチド (CDH3; 2 種類、RAB6KIFL; 3 種類) を用いて、HLA-A2 陽性の健常人あるいは癌患者の PBMC から、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。HLA-A2 陽性の健常人より得られた PBMC から CD8 陽性細胞を分離し、CDH3-4₆₆₅₋₆₆₃ あるいは CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ ペプチドを負荷した自己の DC で 3 回刺激して得られた CTL は、これらのペプチドを負荷した T2 細胞に対して、ペプチドを負荷していない T2 細胞に比べて、明らかに強い細胞傷害活性を示した (図 17A)。また、誘導された CTL は、CDH3 および HLA-A2 を発現している大腸癌細胞株 HCT116 や口腔癌細胞株 HSC3 に対して細胞傷害活性を示したが、CDH3 を発現していない HLA-A2 陽性の膵癌細胞株 PANC1 や肝癌細胞株 SKHep1、および CDH3 は発現しているが HLA-A2 陰性の膵癌細胞株 PK8 に対しては細胞傷害活性を示さなかった。また、HLA-A2 陽性で CDH3 陰性の PANC1 に CDH3 を遺伝子導入した PANC1/CDH3 に対しては、強い細胞傷害活性を示した (図 17B)。さらに、同様の抗原特異的かつ HLA-A2 拘束性の細胞傷害活性は、癌患者の PBMC から得られた CTL においても同様に観察された (図 17C)。

続いて、RAB6KIFL についても同様に CTL の誘導を試みた。HLA-A2 陽性の健常人より得られた PBMC から、RAB6KIFL-2₁₂₋₂₀、RAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇ および RAB6KIFL-28₂₈₄₋₂₉₃ ペプチドを用いて誘導した CTL は、これらのペプチドを負荷した T2 細胞に対して、irrelevant な HIV ペプチドを負荷した T2 細胞やペプチドを負荷していない T2 細胞に比べて、明らかに強い細胞傷害活性を示した (図 18A)。また、誘導された CTL は、RAB6KIFL および HLA-A2 を発現している膵癌細胞株 PANC1 や大腸癌細胞株 CaCo-2 に対して細胞傷害活性を示したが、RAB6KIFL を発現しているが HLA-A2 陰性の膵癌細胞株 PK9 に対しては細胞傷害活性を示さなかった (図 18B)。また、HLA-A2 陽性で RAB6KIFL が陰性の肝癌細胞株 SKHep1 に対しては細胞傷害活性を示さなかったが、これに RAB6KIFL を遺伝子導入した SKHep1/RAB6KIFL に対しては強い細胞傷害活性を示した (図 18C)。

以上より、今回同定した CDH3 2 種類、RAB6KIFL 3 種類のエピトープペプチドは、癌細胞内で当該蛋白質が自然なプロセッシングを受け、HLA-A2 分子と複合体を形成して癌細胞表面へ提示されていることが明らかとなった。

図 17

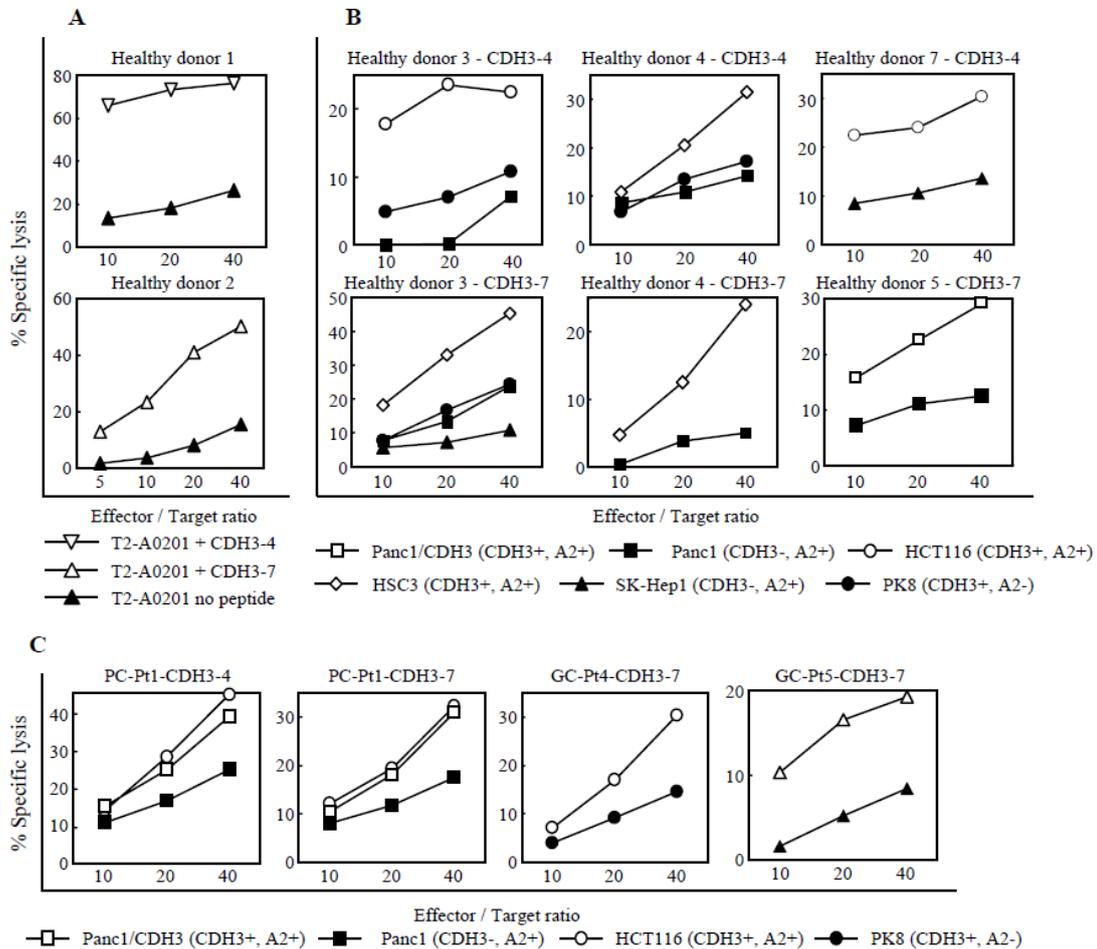


図 17. 健常人および癌患者における、CDH3 特異的 CTL の誘導

健常人および癌患者のPBMCより、CDH3ペプチドを用いてCDH3ペプチド特異的に細胞傷害活性を示すCTLを誘導した。A: CDH3-4₆₆₅₋₆₆₃あるいはCDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ペプチドを負荷したDCでCD8陽性細胞を3回刺激することにより誘導されたCTLは、CDH3ペプチドを負荷したT2細胞に対して強い細胞傷害活性を示したが、ペプチドを負荷していないT2細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかった。B: 健常人のPBMCより誘導したCTLはCDH3陽性、HLA-A2陽性の細胞株HCT116およびHSC3に対して細胞傷害活性を示したが、CDH3を発現していないHLA-A2陽性のPANC1やSKHep1、CDH3は発現しているがHLA-A2陰性のPK8に対しては細胞傷害活性を示さなかった。また、HLA-A2陽性でCDH3陰性のPANC1にCDH3を遺伝子導入したPANC1/CDH3に対しては、強い細胞傷害活性を示した。C: 癌患者のPBMCから誘導したCTLも同様に、CDH3特異的かつHLA-A2拘束性に細胞傷害活性を示した。

図 18

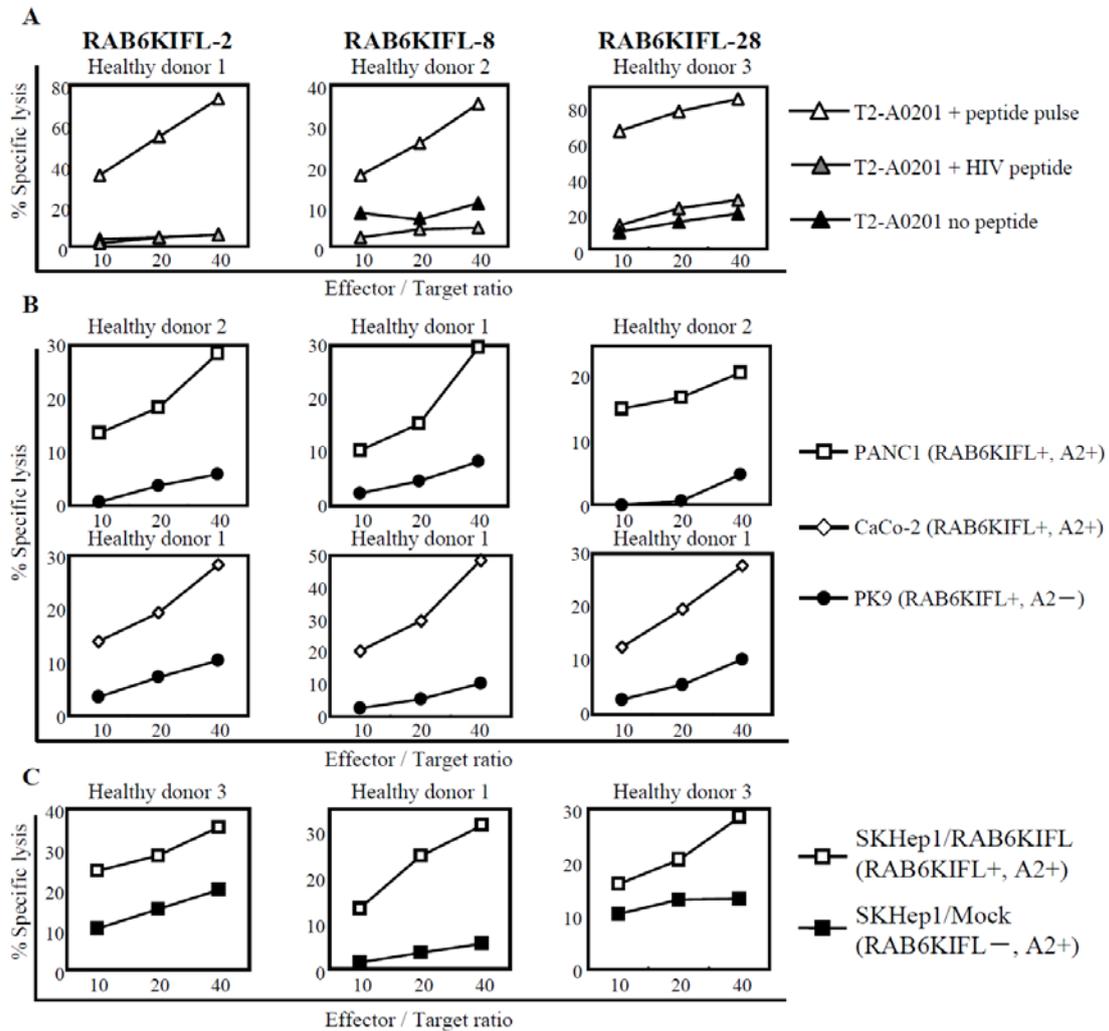


図 18. 健康人における、RAB6KIFL 特異的 CTL の誘導

健康人のPBMCより、RAB6KIFLペプチドを用いてRAB6KIFLペプチド特異的に細胞傷害活性を示すCTLを誘導した。A: RAB6KIFL-2₁₂₋₂₀、RAB6KIFL-8₈₀₉₋₈₁₇およびRAB6KIFL-28₂₈₄₋₂₉₃ペプチドを用いて誘導したCTLは、これらのペプチドを負荷したT2細胞に対して、irrelevantなHIVペプチドを負荷したT2細胞やペプチドを負荷していないT2細胞と比較して強い細胞傷害活性を示した。B: 誘導されたCTLは、RAB6KIFLおよびHLA-A2を発現しているPANC1やCaCo-2に対して細胞傷害活性を示したが、RAB6KIFLを発現しているがHLA-A2陰性のPK9に対しては細胞傷害活性を示さなかった。C: HLA-A2陽性でRAB6KIFLが陰性の肝癌細胞株SKHep1に対しては細胞傷害活性を示さなかったが、これにRAB6KIFLを遺伝子導入したSKHep1/RAB6KIFLに対しては強い細胞傷害活性を示した。

7-7) CDH3 および RAB6KIFL 特異的 CTL の HLA 拘束性の証明

CDH3およびRAB6KIFLペプチド特異的ヒトCTL がHLA拘束性に細胞傷害活性を示すか否かを、抗体によるHLA-クラスI の阻止実験により検討した。HLA-A2陽性の健常人のPBMCより誘導したCDH3特異的CTLは、CDH3を発現するHLA-A2陽性細胞株SKHep1/CDH3 (CDH3を発現していないHLA-A2陽性肝癌細胞株SKHep1にCDH3を遺伝子導入したもの)、HSC3およびHCT116に反応してIFN- γ を産生あるいは細胞傷害活性を示したが、この反応は抗HLA-クラスI抗体であるW6/32により抑制された(図19)。この反応は、抗HLA-クラスII抗体であるH-DR-1では抑制されなかった。

同様に、HLA-A2 陽性の健常人の PBMCより誘導した RAB6KIFL 特異的 CTL は、RAB6KIFL を発現する HLA-A2 陽性膵癌細胞株 PANC1 に反応して IFN- γ を産生するが、この反応は W6/32 により抑制された(図 20)。

図 19

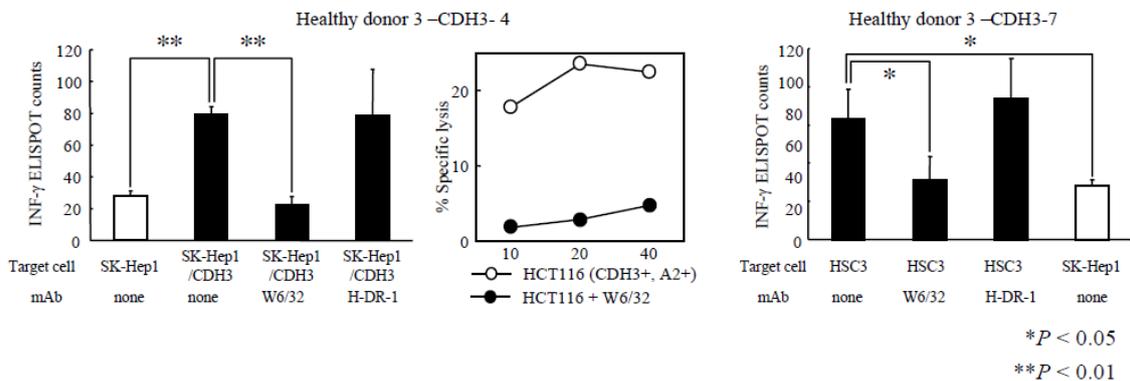


図 19. CDH3 特異的ヒト CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明

CDH3 特異的ヒト CTL の細胞傷害活性が HLA-クラス I 拘束性か否かを、HLA-クラス I 抗体を用いた HLA-クラス I 阻止実験により検証した。CDH3 特異的 CTL は、CDH3 を発現する HLA-A2 陽性細胞株 SKHep1/CDH3、HSC3 および HCT116 に反応して IFN- γ を産生もしくは細胞傷害活性を示すが、これは抗 HLA-クラス I 抗体である W6/32 により抑制された。この反応は、抗 HLA-クラス II 抗体である H-DR-1 では抑制されなかった。

図 20

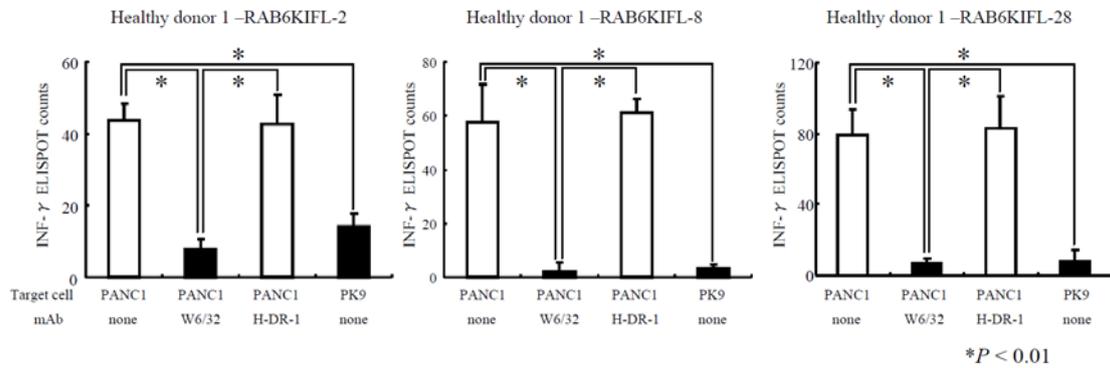


図 20. RAB6KIFL 特異的 CTL の HLA-クラス I 拘束性の証明

RAB6KIFL 特異的 CTL は、RAB6KIFL を発現する HLA-A2 陽性膵癌細胞株 PANC1 に反応して IFN- γ を産生するが、これは抗 HLA-クラス I 抗体である W6/32 により抑制された。この反応は、抗 HLA-クラス II 抗体である H-DR-1 では抑制されなかった。

7-8) NOD/SCID マウスにおける CDH3 特異的 CTL の i.v. transfer

による、*in vivo* における抗腫瘍効果

NOD/SCID マウスに CDH3 を発現する HLA-A2 陽性ヒト大腸癌細胞株 HCT116 を皮下接種して生着させた後に、CDH3-4₆₆₅₋₆₆₃ もしくは CDH3-7₇₅₇₋₇₆₅ ペプチドで刺激して誘導したヒト CTL 株を、尾静脈より静脈注射にて養子免疫した。HIV 蛋白由来のペプチドで刺激した CD8 陽性 T 細胞株投与群、あるいは PBS のみの投与群をコントロールとして用いた。NOD/SCID マウスに生着した HCT116 細胞が形成した腫瘍の大きさの経時的変化を図 21 に示す。CDH3 のエピトープペプチドにて誘導した CTL 株を養子免疫した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは PBS のみを投与した群と比較して、有意に腫瘍の増殖抑制が認められた。

図21

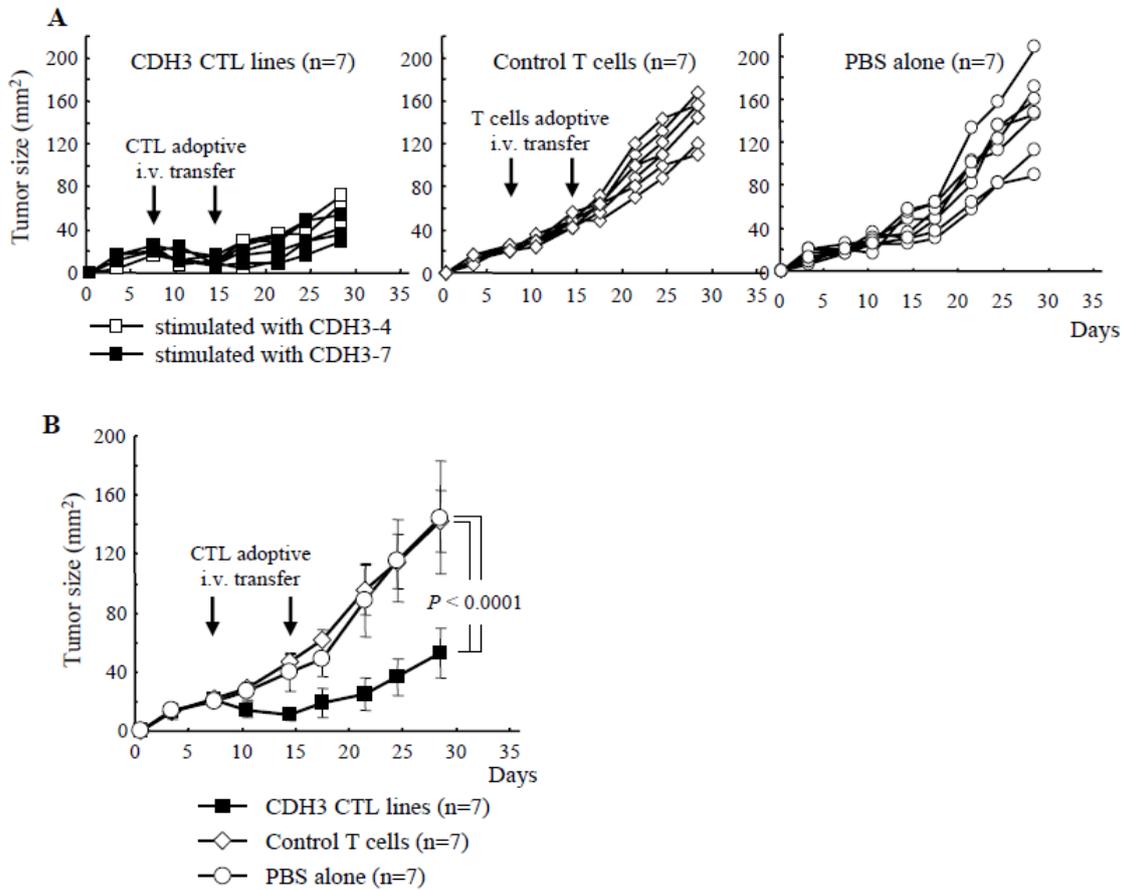


図21. NOD/SCIDマウスにおける、CDH3特異的CTL株の養子免疫による、*in vivo*における抗腫瘍効果

ヒト大腸癌細胞株HCT116細胞を生着させたNOD/SCIDマウスに、CDH3特異的CTL株を静脈注射することにより、有意にHCT116細胞の増殖が抑制された。A: Day 0にHCT116細胞を 4×10^6 個皮下へ移植し、腫瘍が $5 \times 5 = 25 \text{ mm}^2$ となったところで、 4×10^6 個のCDH3特異的CTL株(■)を尾静脈よりi.v.にて投与した(Day 7)。再度、Day 14にも繰り返しCTL株を局所注入した。コントロールとして、HLA-A2拘束性HIVペプチドで誘導したCD8陽性T細胞(◇)あるいはPBS (○)も同様に投与した。B: 各群における腫瘍の大きさの平均を示す。CDH3のエピトープペプチドにて誘導したCTL株を養子免疫したNOD/SCIDマウスでは、コントロールのT細胞株あるいはPBSのみを投与した群と比較して、有意差に腫瘍の増殖抑制が認められた($P < 0.0001$)。

8 考察

今回我々は膵癌における cDNA マイクロアレイ解析より、膵癌に高発現する新規腫瘍関連抗原として CDH3 と RAB6KIFL の 2 種類を同定した。さらに、HLA-A2 (*HLA-A*0201*)拘束性の CDH3 および RAB6KIFL 抗原由来のヒト CTL エピトープを同定し、これらのペプチドを用いて、抗原特異的、HLA-A2 拘束性に癌細胞を傷害する CTL を誘導することができた。

腫瘍関連抗原を腫瘍免疫療法に利用するにあたり、腫瘍抗原が、免疫系からの逃避が起こりにくい抗原であること、つまり癌細胞の悪性形質転換、細胞増殖、組織浸潤や転移に重要な役割を担っている分子で、癌細胞がその発現を失うと癌の悪性形質を失ってしまうようなものが望ましい[18,47]。CDH3 はカドヘリンスーパーファミリーの一つで、その発現は皮膚の基底膜層など非常に限られており、細胞の増殖や分化に関わっているといわれている[48]。近年 Taniuchi らは、膵癌細胞において、CDH3 の発現が p120ctn の細胞質への集積と Rho GTPase である Rac1、Cdc42 の活性化を介して細胞の運動能を亢進させることを報告した[49]。この他、CDH3 の高発現が乳癌[50-52]や子宮体癌[53]において、悪性度や予後不良と相関することが報告されている。RAB6KIFL は、キネシンスーパーファミリーに属するモーター蛋白質で、細胞内膜輸送に関わる small-ras 関連蛋白質である Rab に結合する蛋白質として同定され、ゴルジ装置から小胞体への膜輸送に関与している[54]。有糸分裂細胞に集積し、RAB6KIFL の機能を抑えると 1 回の細胞分裂後に 2 核化し、分裂溝が形成されずに細胞質の分裂が起こらない[54]。近年、膵癌細胞において RAB6KIFL 遺伝子の発現を siRNA で抑制すると、DLG5 (Disc Large Homologue 5)の膜輸送の阻害を介して、癌細胞の増殖が抑制されることが報告された[55]。以上より、CDH3 および RAB6KIFL はいずれも癌細胞の浸潤転移や増殖、生存に重要な役割を果たしているといえる。さらに本研究において、CDH3 は乳腺と卵巣、RAB6KIFL は精巣と胸腺に弱い発現を認めたが、いずれも

蛋白レベルでは検出できない程度であった。これは、CDH3 および RAB6KIFL をターゲットとした腫瘍免疫療法を行うにあたって、正常組織を傷害することなく、つまり副作用を惹起することなく、癌組織のみを傷害することができることを示唆する。以上の結果より、我々はこの CDH3 と RAB6KIFL を腫瘍免疫療法における腫瘍関連抗原の候補として選択した。

本研究では、HLA-A2 拘束性エピトープ同定のため HLA-A2 (HHD) Tgm を実験に用い、CDH3 で 2 種類、RAB6KIFL で 3 種類のエピトープ候補を同定した。HLA-A2 (A*0201) は全世界で最も頻度の高い HLA 対立遺伝子の一つであり[56]、HLA-A2 拘束性の CTL エピトープの同定は、世界中の多くの癌患者にとって有益となる可能性がある。今回我々は HLA-A2 (A*0201) に親和性が高いと推定される抗原由来ペプチドを、BIMAS ソフトウェアの解析結果より選択した。そのうちいくつかのペプチドが有するアミノ酸配列は、ヒトとマウスの間で完全には保存されていなかった。本研究でも、CDH3 は 2 種類のペプチドのいずれも、RAB6KIFL は 3 種類のうち 2 種類が、ヒトとマウスでそのアミノ酸配列が保存されていなかった。その違いからヒトとマウスの間で抗原性に違いが出てくるのが危惧されたが、本研究において、マウスを用いて同定されたエピトープ候補のペプチドは全て、ヒト PBMC から CTL を誘導することができた。HLA-A2 Tgm を用いることの利点は、ヒトの血液を用いる必要がなく、採血の負担を軽減できるのみではない。ヒトとマウスの間で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検討も行うことができる。本研究においても、ヒトとマウスでアミノ酸配列が完全に保存されている RAB6KIFL-8₈₀₉₋₉₁₇ でマウスを免疫後、マウスの組織を採取、検討し、自己免疫現象が起こっていないことを確認できた。

我々は、HLA-A2 Tgm の実験より同定したエピトープ候補ペプチドを用いて健常人および癌患者の PBMC を *in vitro* で刺激することにより、CDH3 および RAB6KIFL 反応性 CTL を誘導することができた。この CTL は、*in vitro* で抗原特異的、HLA-A2 拘束性に癌細胞を傷害した。さらに、NOD/SCID マウスに CDH3 を

高発現する HLA-A2 陽性大腸癌細胞株である HCT116 を皮下に移植し、CDH3 反応性 CTL を養子免疫することにより、*in vivo* においても著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。しかしながら、2 度目の養子免疫以降腫瘍は再度増殖をはじめ、養子免疫の際は可能な限り何度でも繰り返し行う必要性が示唆された。

本研究によって、CDH3 および RAB6KIFL は、膵癌を含む様々な癌腫における腫瘍免疫療法のターゲットとして有用であることが示された。この結果を基に、今後我々は次のステップ、つまりこれらのペプチドを用いた腫瘍免疫療法の臨床試験を行いたいと考えている。

9 結論

cDNA マイクロアレイ解析を用いて、膵癌における新規腫瘍関連抗原として CDH3 および RAB6KIFL を同定した。HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた実験より、CDH3 で 2 種類、RAB6KIFL で 3 種類の HLA-A2 拘束性エピトープ候補を同定し、これを用いて健常人および癌患者の PBMC よりペプチド反応性 CTL を誘導することができた。さらに、誘導した CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、抗原特異的かつ HLA-A2 拘束性に腫瘍細胞を傷害できることが示された。CDH3 および RAB6KIFL はともに膵癌のみでなくその他様々な癌腫においても発現しており、これを標的とした腫瘍免疫療法の適応は非常に多いものと予想される。将来的に臨床の現場において、CDH3 や RAB6KIFL を標的としたペプチドワクチンや樹状細胞ワクチン等の腫瘍免疫療法が、癌治療の一翼を担えればと期待している。

10 参考文献

1. Germain RN: MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287-299.
2. Berke G: The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-773.
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;14:369-396.
5. Heemels MT, Ploegh H: Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995;64:463-491.
6. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al.: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-518.
7. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, et al.: Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326-329.
8. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, et al.: Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290-296.
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, Stevanoviic 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;368:711-718.
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;368:215-221.
14. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, et al.: Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961-965.
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;254:1643-1647.
16. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P: T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:684-693.
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;91:3515-3519.
18. Kawakami Y, Rosenberg SA: Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997;16:313-339.
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;264:716-719.

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;187:277-288.
21. Wang RF, Wang X, Atwood AC, et al.: Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999;284:1351-1354.
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;189:757-766.
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;4:321-327.
24. Jager E, Jager D, Knuth A: CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:143-150.
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;80:219-230.
26. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al.: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-332.
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;92:11810-11813.

28. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, et al.: Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:936-944.
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;294:734-741.
30. Nakatsura T, Senju S, Ito M, et al.: Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol* 2002;32:826-836.
31. Monji M, Nakatsura T, Senju S, et al.: Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 2004;10:6047-6057.
32. Komori H, Nakatsura T, Senju S, et al.: Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:2689-2697.
33. 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* 2004;10:8630-8640.
34. Suda T, Tsunoda T, Uchida N, et al.: Identification of secernin 1 as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray. *Cancer Sci* 2006;97:411-419.
35. Uchida N, Tsunoda T, Wada S, et al.: Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:8577-8586.

36. Watanabe T, Suda T, Tsunoda T, et al.: Identification of immunoglobulin superfamily 11 (IGSF11) as a novel target for cancer immunotherapy of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas. *Cancer Sci* 2005;96:498-506.
37. 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* 2004;10:6437-6448.
38. 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* 2003;306:16-25.
39. Harao M, Hirata S, Irie A, et al.: HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int J Cancer* 2008;123:2616-2625.
40. Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, et al.: Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1994;12:337-365.
41. Fong L, Engleman EG: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000;18:245-273.
42. Lu Z, Yuan L, Zhou X, et al.: CD40-independent pathways of T cell help for priming of CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2000;191:541-550.
43. Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot 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* 1999;29:3112-3121.
44. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, et al.: HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes from β 2 microglobulin (β 2m)

- HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db β 2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-2051.
45. Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, et al.: Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34⁻ hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2002;30:11-17.
 46. Bourgault Villada I, Moyal Barracco M, Ziol M, et al.: Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64:8761-8766.
 47. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al.: Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:614-620.
 48. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, et al.: Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 1989;49:2128-2133.
 49. Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, et al.: Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases. *Cancer Res* 2005;65:3092-3099.
 50. Peralta Soler A, Knudsen KA, Salazar H, et al.: P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. *Cancer* 1999;86:1263-1272.
 51. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, et al.: P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2005;11:5869-5877.

52. Palacios J, Benito N, Pizarro A, et al.: Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am J Pathol* 1995;146:605-612.
53. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA: Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1242-1252.
54. Echard A, Jollivet F, Martinez O, et al.: Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 1998;279:580-585.
55. Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, et al.: Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Res* 2005;65:105-112.
56. Browning M, Krausa P: Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunol Today* 1996;17:165-170.

