

**膵癌細胞株由来 cDNA 発現ライブラリーの免疫スクリーニングによる
膵癌抗原の同定と解析**

(Expression cDNA cloning and analyses of the human pancreatic cancer
antigens recognized by the humoral immune system)

中面 哲也 Tetsuya Nakatsura

指導教官: 熊本大学大学院医学研究科外科学第2講座 小川 道雄 教授
熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座 西村 泰治 教授

目次

目次.....	1
1 要旨.....	3
2 発表論文リスト	4
3 謝辞.....	4
4 略語一覧.....	4
5 研究の背景と目的.....	5
5-1) HLA 分子によるT細胞への抗原提示	6
5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし.....	9
5-3) 腫瘍拒絶抗原の同定	9
5-4) SEREX 法の特徴	11
5-5) SEREX 法で同定された腫瘍抗原	14
5-6) 本研究の目的.....	17
6 実験方法.....	17
6-1) SEREX 法による腫瘍抗原遺伝子の単離.....	17
6-2) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)	18
6-3) ノザンプロット解析	18
6-4) 免疫組織化学的解析	22
6-5) 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 由来CTL 株によるSEREX 同定抗原 認識の解析.....	22

6-6)	末梢血単核細胞(PBMC)からの腫瘍抗原特異的CTL 株の樹立と スクリーニング.....	23
6-7)	腫瘍抗原特異的CTL 株の継代培養と解析.....	25
6-8)	KM-PA-2 のシーケンス解析.....	26
7	実験結果.....	26
7-1)	腫瘍抗原遺伝子の同定.....	26
7-2)	腫瘍抗原遺伝子の発現.....	28
7-3)	膵癌における腫瘍抗原の免疫組織化学的解析.....	33
7-4)	他の癌におけるhsp105 の免疫組織化学的解析.....	33
7-5)	様々な正常組織におけるhsp105 の免疫組織化学的解析.....	33
7-6)	腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 由来CTL 株により認識される腫瘍抗原の 同定.....	33
7-7)	大腸癌患者PBMC より樹立された腫瘍抗原特異的CTL 株の解析.....	37
7-8)	膵癌患者および健常人PBMC より樹立された腫瘍抗原特異的CTL 株の解析.....	37
7-9)	抗原特異的CTL 株の特異性の解析.....	37
7-10)	KM-PA-2 のシーケンス解析.....	37
8	考察.....	47
9	おわりに.....	49

1 要旨

近年、癌患者血清中の抗腫瘍抗体を用いた腫瘍組織由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングにより腫瘍抗原を同定するという SEREX 法が開発され成果を納めている。本研究は治療成績が極めて悪く、しかも癌抗原の同定が遅れている膵癌を対象として SEREX 法により腫瘍抗原を同定し、さらに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。

アロ膵癌細胞株から樹立された 30 万個の cDNA クローンを含む ZAP cDNA 発現 ライブラリーより、1 例の膵癌患者血清に反応する 63 個の陽性クローンを得た。各クローンの塩基配列を解析し、既知の遺伝子 13 種、および未知の遺伝子 5 種の合計 18 種類の遺伝子を同定した。

cDNA ライブラリーが由来する細胞株を含む 8 種類の膵癌細胞株と正常膵臓組織の mRNA を用いて、上記の遺伝子の発現を RT-PCR およびノザン解析により検討した。解析できた 16 種類のうち 14 種の遺伝子は、膵癌細胞株で正常膵臓組織より強く発現していた。このうち hsp105 に関しては、ノザン解析で正常大腸組織と比較して大腸癌で高発現していることを確認した。膵癌の 4 例につき、同定した 4 種類の遺伝子産物に対する抗体を用いて免疫組織化学的解析を行なった。hsp105 は主に細胞質に発現し、癌細胞特異的に著明な高発現を認めた。さらに、それぞれ 4 例の大腸癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌における hsp105 の発現を検討したところ、胃癌、食道癌、肝細胞癌の 2 例でも、癌において正常組織よりも強い hsp105 の発現を認めた。さらに驚くべき事に、大腸癌の全例で癌特異的に膵癌を上まわる非常に強い hsp105 の発現を認めた。食道・胃の上皮・平滑筋、肺、肝臓、心筋、および精巣などの正常組織にも、hsp105 蛋白の発現を認めたが、その発現レベルは癌より明らかに低かった。

SEREX で同定した抗原の腫瘍拒絶抗原としての有用性を検討する目的で、抗原特異的な CTL の存在の有無を検討した。KM-PA-2 あるいは CLP 遺伝子を HLA-A2 遺伝子と共に発現する COS-7 細胞に対して大腸癌浸潤細胞より樹立された CTL 株が免疫応答を示すことを発見し、さらに CTL が認識するエピトープペプチドをそれぞれ 3 種および 1 種同定した。これらのペプチドで、同大腸癌患者の末梢血単核細胞を刺激して誘導された CTL 株は、HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膵癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した。このような CTL 株は、膵臓癌患者、および健康対照のいずれにおいても、その 25-50%において樹立できた。

以上の結果は、本研究において SEREX 法で同定した腫瘍抗原遺伝子が、膵癌のみならず大腸癌などの癌細胞のマーカー、さらには抗腫瘍免疫療法に利用できる可能性を示すものである。同定した遺伝子と癌化との関連ならびに腫瘍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などについては、今後の検討を要する。

2 発表論文リスト

1. Tetsuya Nakatsura, Satoru Senju, Masaaki Ito, Yasuharu Nishimura*, and Kyogo Ito* (*equal contribution); Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method *Eur. J. Immunol.* 32: 826-836, 2002
2. Tetsuya Nakatsura, Satoru Senju, Kazuhiro Yamada, Toko Jyotsuka, Michio Ogawa, and Yasuharu Nishimura. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 281:936-944, 2001
3. Kazuhiro Yamada, Satoru Senju, Tetsuya Nakatsura, Yasuhiro Murata, Mami Ishihara, Satoshi Nakamura, Shigeki Ohno, Akira Negi, and Yasuharu Nishimura. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 280:1169-1176, 2001
4. Tetsuya Nakatsura, Takahiro Hasebe, Yoshitaka Tsubono, Munemasa Ryu, Taira Kinoshita, Noriaki Kawano, Masaru Konishi, Tomoo Kosuge, Yae Kanai, and Kiyoshi Mukai. Histological prognostic parameters for adenocarcinoma of the pancreatic head. Proposal for a scoring system for prediction of outcome. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 4:441-448, 1997.
5. 小田 竜也, 竜 崇正, 中面 哲也, 向井 清, 長谷部 孝裕. 「膵臓癌の分子生物学的, 病理学的予後予測指標」 **肝胆膵** 第 34 巻, 第 3 号, pp:319-323, 1997 年

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研究科免疫識別学講座西村泰治教授、同外科学第二講座小川道雄教授、久留米大学医学部免疫学講座伊東恭悟教授、同七條茂樹助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熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座千住覚助手に深く感謝いたします。

4 略語一覧

cDNA; complementary DNA
CLP; coactosin like protein
CT; cancer - testis
CTL; cytotoxic T cell
DNA; deoxyribonucleic acid
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay
HLA; human histocompatibility leukocyte antigens
Hsc; heat shock cognate
Hsp105; heat shock protein 105
IFN; interferon
Ig; immunoglobulin
IL; interleukin
MHC; major histocompatibility complex
PBMC ; peripheral blood mononuclear cell
PBS; phosphate-buffered saline
RT-PCR; reverse transcription-PCR
SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries
TBS; tris-buffered saline
TIL; tumor infiltrating lymphocyte

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

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

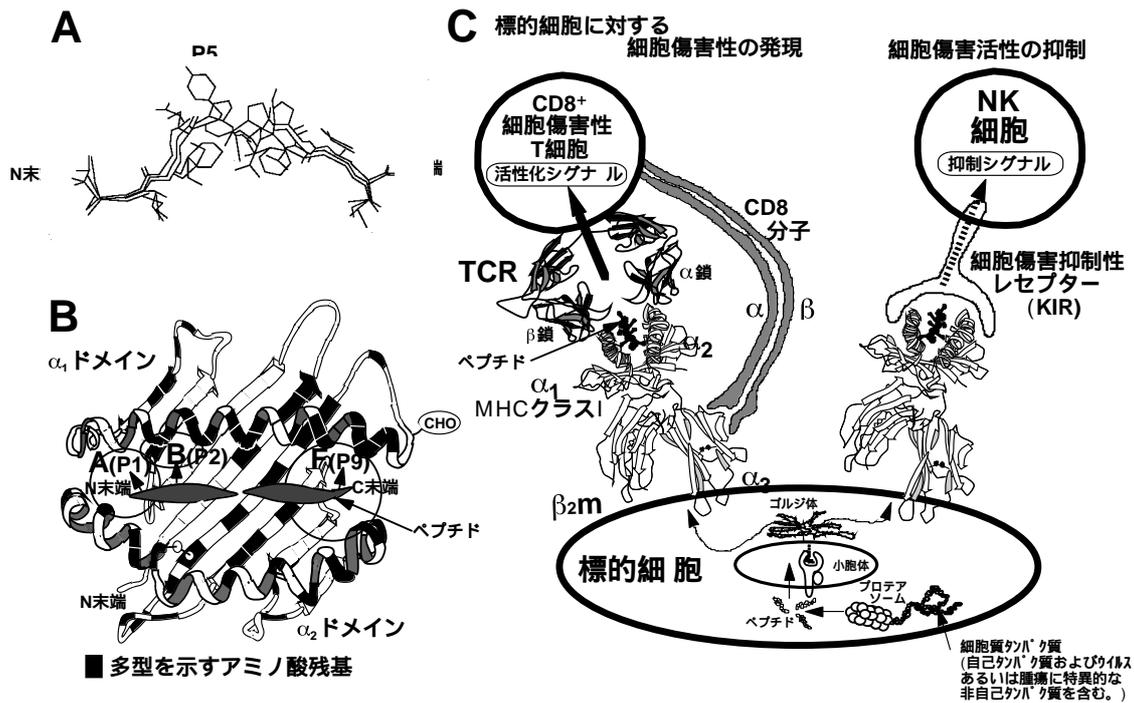


図1. MHC クラスI による抗原ペプチドの CD8⁺ 細胞傷害性T細胞(CTL)への提示

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。1, 2, 3 および β_2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび β_2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター (killer-cell inhibitory receptor) を表す。

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

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つ CD4 分子を発現する T 細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインは B 細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T 細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する (12)。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 MHC (MHC class II compartments) や ClIV (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 (13、14)。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 (14)。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 (12)。

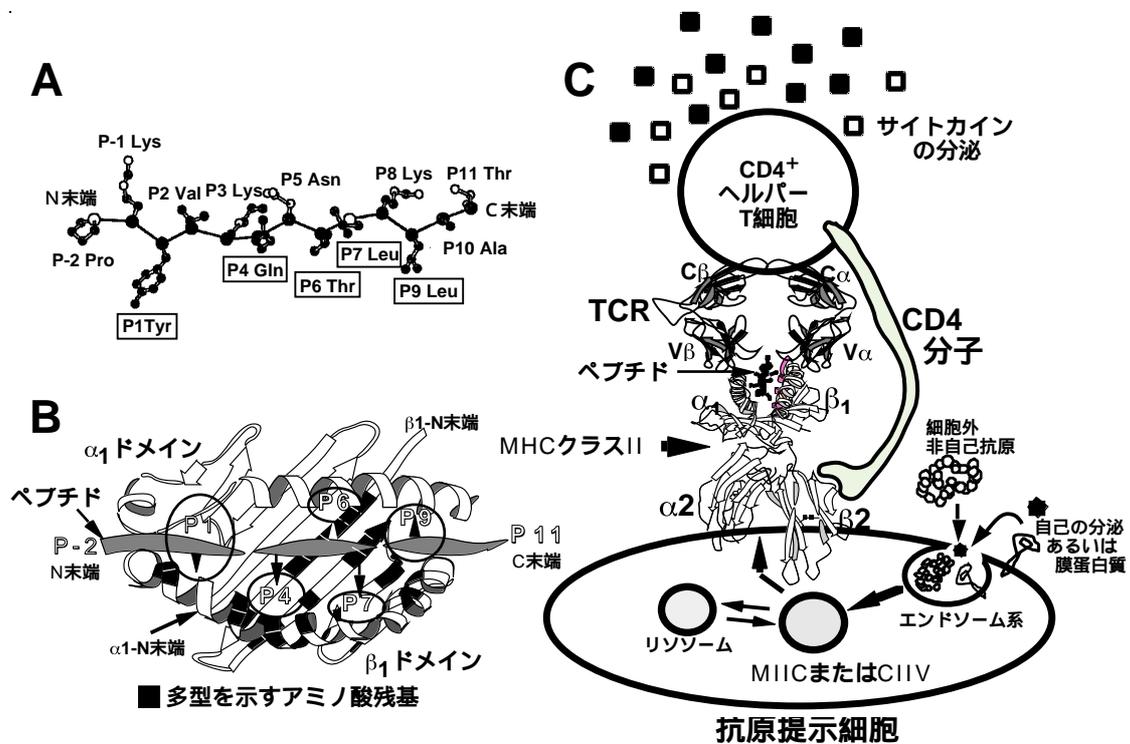


図2 MHC クラス II 分子を介した抗原ペプチドの CD4⁺T 細胞への提示

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 (T C R 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 分子を発現する抗原提示細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパーT細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブT細胞が活性化されてエフェクターT細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくてもT細胞レセプター(TCR)が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、T細胞はこれを認識して免疫応答を示す(15)。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。

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(16)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

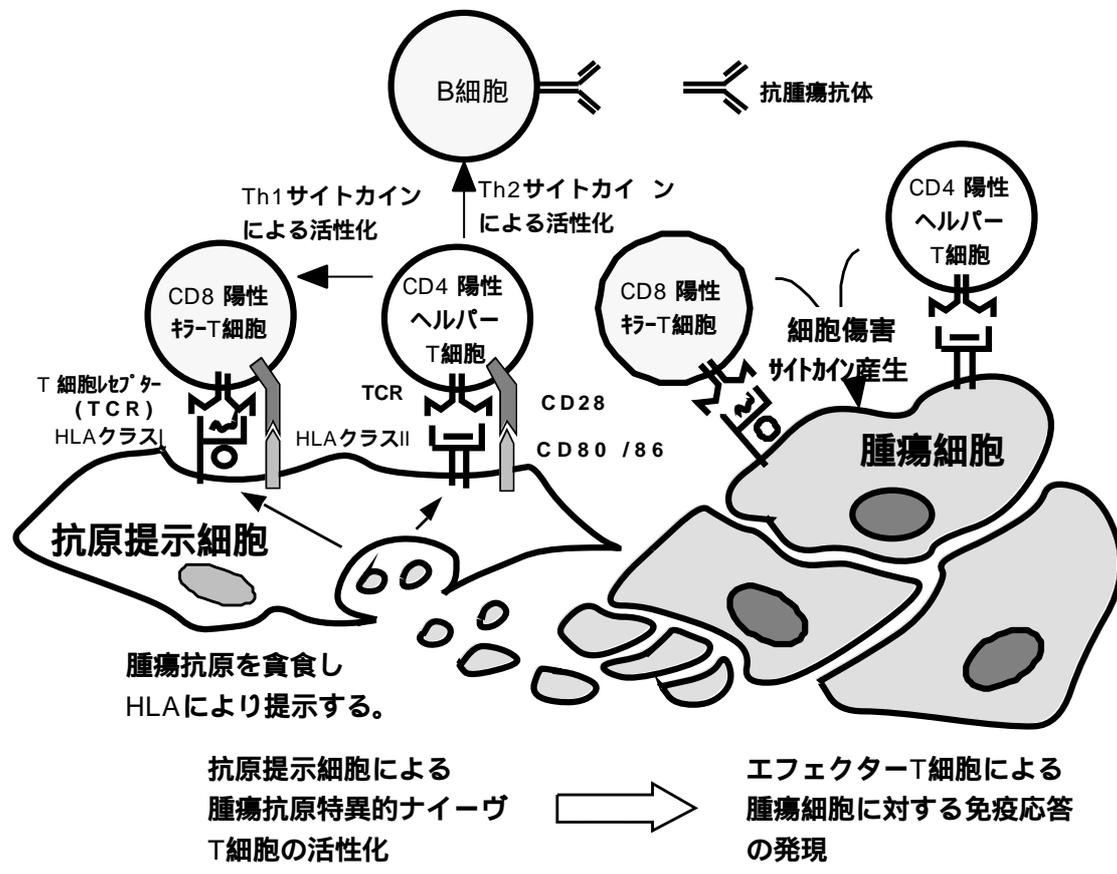


図3 抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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抗原提示細胞は、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 陽性キラー T 細胞あるいは CD4 陽性ヘルパー 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 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。

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)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 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 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(17-21)。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(22、23)。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(24-27)。しかし、以下に述べるように、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。とく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(28)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がデータベース化されている。さらにその一部をターゲットにして抗腫瘍免疫療法の臨床試験も開始されている。

5-4) SEREX 法の特徴

癌患者の血清中の抗体と同一患者由来の癌細胞との反応を検索し、腫瘍抗原を同定しようという試みが Old ら(29)によって、1970 年代半ばより開始された。またそれ以前にも、わが国の吉田孝人ら(30)により、癌患者が産生する抗体の癌細胞に対する反応性の検索がおこなわれている。このようにいわゆる「Autologous Typing 法」により、糖鎖抗原などの重要な腫瘍抗原が同定された。しかし、当初は細胞表面に発現する腫瘍抗原に検索をかぎっていたため、また当時はまだ各種の分子生物学的方法も確立されておらず、得られた成果は限られたものであった。Autologous Typing 法に遺伝

子発現クローニングを取り入れて開発されたのが SEREX 法である。方法の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原同定における SEREX 法の最大の利点は、その簡便性にある。つまり SEREX 法では、癌細胞の培養株の樹立を必要とせず、T 細胞培養株の樹立も必要としないため、あらゆる癌での腫瘍抗原の検索に応用が可能である。さらに、癌患者の血清中の抗腫瘍抗体を利用するため、あらかじめ *in vivo* において抗腫瘍免疫を誘導することがわかった抗原を同定できるという特色がある。また、抗原の同定と遺伝子の同定が直結しており抗原の一次構造を直ちに決定できることも利点のひとつである。したがって、抗原の種々の正常あるいは癌組織における発現を調べることも容易である。

CTL もしくはヘルパー T 細胞、いずれの T 細胞による腫瘍抗原ペプチドの認識にも MHC 拘束性の制約があり、T 細胞が細胞を認識するためには T 細胞とターゲット腫瘍細胞との間に HLA 対立遺伝子が共有されている必要がある。さらに癌患者の癌に対する免疫応答を正確に解析するためにも、アロ反応が生じない Autologous の細胞培養系で検討する必要がある、T 細胞と癌細胞を同じ患者から培養株化することが不可欠である。しかし、癌細胞を試験管内で培養することは容易ではない。患者から抽出した癌組織から一定以上の確率で培養株を樹立できるのは、メラノーマ、腎癌、脳腫瘍、血液細胞腫瘍などに限られる。CTL による腫瘍抗原同定の研究がメラノーマで先行したのは、培養株の樹立が容易であったからである。その点、SEREX 法は患者血清と抽出した癌組織あるいはすでに樹立されたアロ腫瘍細胞株があれば、腫瘍細胞株の樹立を一切必要とせず、あらゆる腫瘍で腫瘍抗原の同定に利用が可能である。

腫瘍特異的 T 細胞株の樹立と解析には、高度な技術が必要である。さらに、T 細胞株を樹立しても、その抗原をコードする遺伝子を同定するためには、T 細胞応答を指標とした標的細胞由来 cDNA の発現クローニングや T 細胞が認識する HLA 結合性抗原ペプチドの単離および同定などの実験をおこなう必要がある。一方、SEREX 法で同定された抗原は、これをコードする遺伝子がすでに cDNA としてファージにクローン化されており、その塩基配列を決定するだけで一次構造の決定が可能である。

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

一般的に、CTL のほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性をもつと信じられている。SEREX 法の欠点は、同定された抗原が CTL のターゲットとなる保証がないことである。癌抗原を認識するヘルパー T 細胞が共存するほうが CTL はより効率よく誘導されるが、ヘルパー T 細胞の存在は CTL の存在を保証するものではない。しかし、現実には CTL で同定された腫瘍抗原を SEREX 法でも検出できること、また逆に SEREX 法で同定された腫瘍抗原が抗体産生と CTL を同時に誘導することも、すでに報告されている (31、32)。

メラノーマを対象におこなった SEREX 法による腫瘍抗原の最初の検索で、新しい抗原に加えて CTL で同定された MAGE-1 や tyrosinase の抗原も SEREX 法で検出できることが報告され、その実用性が

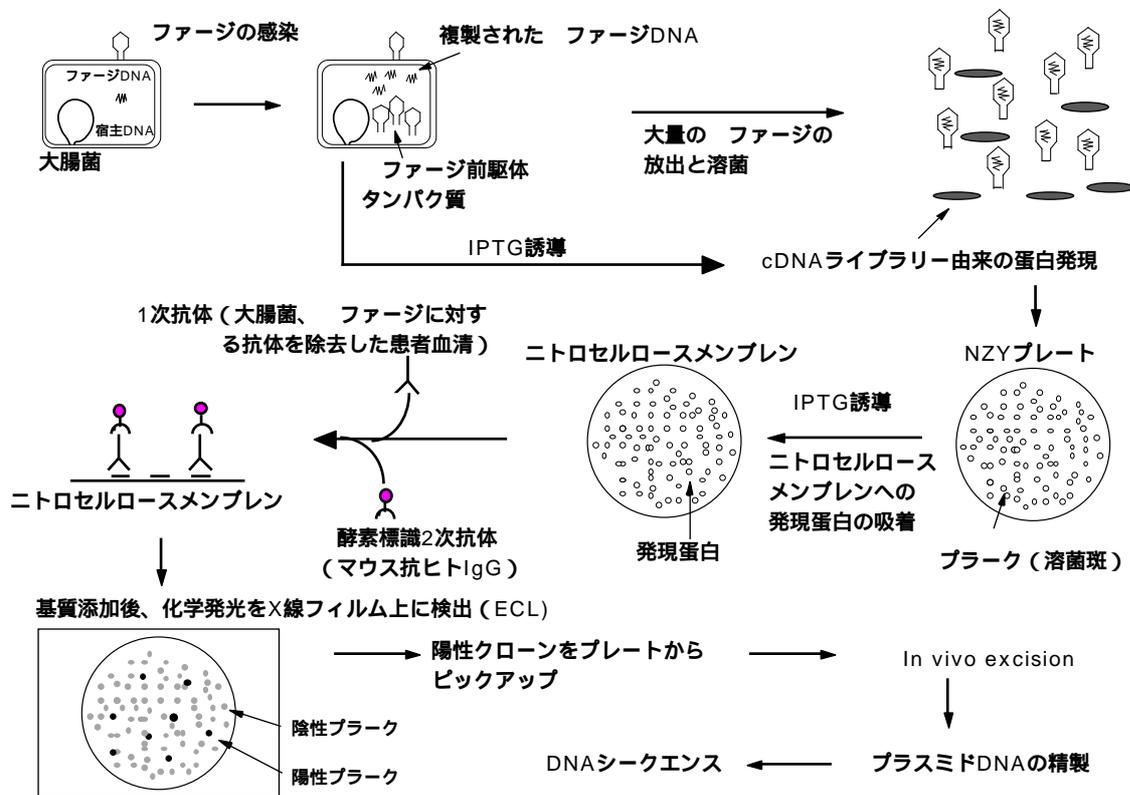


図4 SEREX法の概要

大腸菌 (XL-1blue MRF[']) に感染させた ファージを NZY プレート培地上で 42 °C で培養し溶菌斑 (ブランク) を作らせた。IPTG を浸透させたニトロセルロースメンブレンでプレートを 37 °C で覆うことにより、ブランク中で ファージに組み込んだ膀胱癌細胞株 CFPAC-1 由来の cDNA がコードする蛋白を作らせ、この蛋白をニトロセルロースメンブレン上に転写した。血清サンプルから、大腸菌とファージの溶解物とセファロース 4B が充填されたカラムを用いて大腸菌と ファージに対する抗体を除去した後、100~800 倍に希釈した。ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを洗浄し、準備した血清サンプルと反応させた。洗浄した後、2 次抗体として HRP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を反応させた。洗浄した後にニトロセルロースメンブレンを ECL と反応させ、血清中の抗体が反応するファージブランクの示す強い化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真とプレートを照らし合わせ、陽性ブランクを周囲の陰性ブランクらとともにピックアップした。

示された(28)。その後、胃癌、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌、乳癌など種々の癌において、SEREX法による腫瘍抗原の同定の試みが開始された(33、34)。強調すべき点は、これらの抗原は癌患者の免疫系が自己の癌に反応して産出した抗体によって同定されたということであり、in vivo において患者の免疫系が癌に対してきわめて活発な応答をしていることを示している。

5-5) SEREX 法で同定された腫瘍抗原

癌患者の癌細胞に対する免疫応答は予想以上に活発であり、核内蛋白、細胞骨格、代謝酵素、膜蛋白など多種多様な蛋白質に対して IgG 抗体が産生されていることが判明した。癌組織の破壊に伴い、細胞断片や細胞内分子がマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、その細胞表面に発現する HLA クラス II・抗原ペプチド複合体を認識して活性化された CD4⁺T 細胞が B 細胞の活性化を促し、抗体が産生されるものと考えられる。癌患者では自己免疫疾患ですでに報告されている自己抗原も検出されているが、それらが同定された抗原の大半を占めるという危惧された現象は観察されていない。

これまでに SEREX 法で同定された主な抗原は、1) Cancer-testis(CT)抗原、2) 分化抗原、3) 遺伝子増幅/過剰発現抗原、4) 突然変異抗原、5) 融合蛋白抗原、6) スプライシング異常により産生された抗原、7) レトロウイルス抗原の 7 グループに分類できる(表 1)。以下に各グループの詳細について述べる。

1) Cancer-testis(CT)抗原

CT 抗原と総称される抗原は、名前が示すとおり種々の癌組織および正常組織では testis(睾丸)、卵巣、胎盤のみに発現する抗原群で、ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原 MAGE が CT 抗原の代表である(16)。発現パターンから免疫療法の理想的なターゲットと考えられており、同定された CT 抗原をターゲットとした抗腫瘍免疫療法の臨床試験がすでにおこなわれている(25、26)。CTL で同定された MAGE、BAGE、GAGE などの CT 抗原(35、36)に加えて、SEREX 法でも CT 抗原である NY-ESO-1 と SSX-2 が、それぞれ食道癌(31)とメラノーマ(28、37)より、自家血清を用いて同定された。また SCP-1 が腎癌より(38)、CT-7 がメラノーマ細胞株より(39)、アロ血清(癌細胞のドナーとは異なる患者の血清)を用いて同定された。現在も、新たな CT 抗原を同定しようという試みが継続されている。効率よく SEREX 法で CT 抗原を同定する工夫として、testis cDNA ライブラリー、testis 特異的に発現する遺伝子を濃縮したライブラリー、既知の CT 抗原を数多く発現するメラノーマ培養細胞株のライブラリーなどの検索がおこなわれている。

CT 抗原がなぜ癌患者の免疫系に認識され、またなぜ免疫療法の理想的なターゲットなのだろうか？生殖系の細胞には MHC 分子の発現がないか非常に少なく、T 細胞に抗原を提示する能力が小さい。結果として、生殖細胞は免疫系から“隔離”されている状態にあり、生殖系細胞のみに発現する分子は免疫系に認識されることもなく、トレランスも誘導されていない。しかし、生殖系細胞のみに発現する分子がいったん癌細胞に発現すると、そのペプチド断片が MHC 分子と結合して T 細胞に提

表 1

これまでに SEREX 法で同定された主な抗原

抗原の特徴	抗原名	発現する腫瘍
CT 抗原	NY-ESO-1	食道癌
	SSX-2(HOM-MEL-40)	メラノーマ
	CT7	メラノーマ
分化抗原	tyrosinase	メラノーマ
	galectin4	大腸癌
増幅/過剰発現した 遺伝子産物	AKT	胃癌
	carbonic anhydrase XII	腎癌
	KOC	メラノーマ、肝癌
突然変異抗原	p53	大腸癌
融合蛋白	E-cadherin/novel gene	胃癌
スプライシング異常 に由来する分子	NY-CO-37/38	大腸癌
	Restin	Hodgkin リンパ腫
レトロウイルス抗原	HERV-K10	腎癌

示され、免疫反応を惹起すると考えられている。抗腫瘍免疫療法においては、CT 抗原に対する CTL は MHC 分子が存在しない生殖系細胞を攻撃することなく、癌細胞のみを選択的に攻撃すると考えられる (35)。

CT 抗原は、もともと同定された癌に限らず、さまざまな癌に発現する。食道癌より同定された NY-ESO-1 は、メラノーマの約 40%に、また乳癌の 30%にも発現する。また、メラノーマで同定された SSX-2 が乳癌にも発現していることも確認されている。この事実は、CT 抗原が抗腫瘍免疫の標的として多くの癌に応用できる可能性を示しており、その有用性を高めている。しかし、胃癌や、大腸癌などの消化器系癌では、CT 抗原の発現頻度はきわめて低く、CT 抗原のみをターゲットにしてすべての癌で免疫療法を施行することはできない。

さらに CT 抗原に対する抗体は、CT 抗原を発現する癌をもつ患者のすべてに検出されるものではない。MAGE-1 や MAGE-3 は種々の癌における発現頻度は高いものの、抗原陽性癌患者における抗体陽性頻度は低い。一方、NY-ESO-1 はその逆で、発現頻度は低いものの抗体陽性率は高い。これは NY-ESO-1 の免疫原性が高いことを示しており、免疫療法の有望なターゲットと考えられている (40、41)。

2) 分化抗原

癌細胞と癌が発生した正常組織に特異的に発現する分化抗原が、癌患者の免疫系によって抗原として認識されることがある。たとえば、正常メラノサイトにも発現している tyrosinase, gp100, Melan-A(MART-1)などを認識する CTL が、メラノーマ患者から樹立されている。SEREX 法によっても、メラノーマ患者が tyrosinase に対する抗体を産生すること (28) また消化管の分化抗原である galectin-4 に対する抗体を大腸癌患者が産生することが示されている (42)。分化抗原由来のペプチド、もしくは MHC クラス I 分子への結合親和性を高めるように改変されたペプチドを用いたワクチン療法が、メラノーマの患者で有効であったと報告されている (24、27)。ほかの癌でも、転移癌 (たとえば胃全摘出をおこなった胃癌患者の転移癌) に対する免疫療法のターゲットとして分化抗原を選択することはきわめて理論的であり、有効な治療効果を期待できる。今後、さらに種々の癌の分化抗原を同定することが必要である。

3) 遺伝子異常に由来する抗原

癌は遺伝子異常が蓄積して起きる病気である。起きた遺伝子異常が癌細胞の生存に必須である場合もある。癌細胞特異的に発生する遺伝子異常を免疫療法のターゲットにできれば理想的である。また、癌細胞の不死化に必須である、癌遺伝子や癌抑制遺伝子などの異常をターゲットとして免疫を成立させることができれば、大きな治療効果が期待できる。これまで、変異遺伝子の産物に対して癌患者の免疫系が応答を示すか否かということに関して、多くの研究がなされてきた。T 細胞応答を指標にした検索、ならびに SEREX 法でも遺伝子異常に起因するいくつかの腫瘍抗原が同定されており、ヒトの免疫系が癌関連変異遺伝子の産物を認識して反応することを示している (19、22、23)。これまで SEREX 法により 1) 点突然変異遺伝子産物、2) 増幅あるいは過剰発現した遺伝子産物 (HER2/c-erbB2 や AKT)、3) スプライシング異常産物 (restin や NY-CO-8 および NY-CO-38) さらに 4)

融合遺伝子産物（E-cadherin と未知の遺伝子との融合）としての性格を持つ腫瘍抗原が同定されている。問題は、特定の遺伝子異常が癌において発生する頻度と、癌細胞の生存に必須である遺伝子異常が免疫原性を有するか否かということである。発生頻度の低い遺伝子異常は、いくらその遺伝子産物の免疫原性が強くても汎用性という面から有用性に乏しい。仮に癌細胞の生存に必須である異常遺伝子の産物が強い免疫原性をもっていれば、そのような遺伝子異常をもつ癌細胞は免疫監視機構によって除かれるはずである。したがって、出来上がってしまった癌に存在する異常遺伝子の産物の免疫原性はきわめて弱いにちがいないという仮説も妥当である。異常遺伝子産物に由来する抗原が、免疫療法のターゲットとなりうるか否か、今後の解析が待たれる。

5 - 6) 本研究の目的

本研究は治療成績が極めて悪く、しかも腫瘍抗原の同定が遅れている膵癌を対象として SEREX 法により腫瘍抗原を同定し、さらにその腫瘍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) SEREX 法による腫瘍抗原遺伝子の単離

アロ膵癌細胞株 CFPAC-1 から樹立された 200 万個の独立のクローンを含む cDNA 発現 ライブラリー(ZAP Expression Vector)を Stratagene 社から購入し、スクリーニングに用いた。

SEREX は過去に報告された方法を参考にして行った(28、42)(図 4)。ファージ 1×10^4 pfu /NZY プレート(15cm)となるように、大腸菌(XL-1blue MRF')に感染させたファージを NZY プレート培地上で 42℃ で 6 時間培養し溶菌斑(プラーク)を作らせた。isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)を浸透させた Amersham 社のニトロセルロースメンブレン Hybond-c extra でプレートを 37℃ で 3 時間覆うことにより、プラーク中でファージに組み込んだ膵癌細胞株 CFPAC-1 由来の cDNA がコードする蛋白を作らせると同時に、この蛋白をニトロセルロースメンブレン上に転写した。このニトロセルロースメンブレンを 0.5%のスキムミルクを含んだ tris-buffered-saline (TBS)で 4℃ で 16 時間ブロックした。実験に使用するまで -80℃ で保存しておいた血清サンプルから、5 Prime 3 Prime 社の大腸菌とファージの溶解物とセファロース 4B が充填された BNN97 カラムを用いて大腸菌とファージに対する抗体を除去した後、1%ウシ血清アルブミン含有 TBS で最終的に 100 ~ 800 倍に希釈した。ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを Tween 20 含有 TBS (TBS-T) で洗浄し、準備した血清サンプルと 4℃ で 15 時間反応させた。TBS-T で洗浄した後、2 次抗体として Southern Biotechnology Associates 社の Horseradish Peroxidase (HRP)標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体を 1%ウシ血清アルブミン含有 TBS で 2000 倍に希釈してニトロセルロースメン

ブレンと室温で 1 時間反応させた。TBS と TBS-T で洗浄した後にニトロセルロースメンブレンを Amersham 社の ECL RPN 2106 と 1 分間反応させ、血清中の抗体が反応するファージプラークの示す強い化学発光を X 線フィルム上で検出し、写真とプレートを照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークらとともにピックアップした (図 5)。

ついで二次スクリーニングとして 10 cm プレートに一次スクリーニングで拾ったものを 200 個まき、陽性のプラークをクローンとしてピックアップした (図 6A)。さらに三次スクリーニングとして 10 cm プレートに 100 個の陽性クローンと 200 個の陰性クローンをまき、メンブレンを 4 つに切り、1 つにはスクリーニングに用いた患者血清を陽性対照としてあてた。残りの 3 つには他の患者や健常人の血清をあて、陽性対照と同じ反応を示したものを陽性と判定した (図 6B)。

血清中の抗体が反応したファージプラークから得られた ファージを ExAssist helper phage/SOLR strain system (Stratagene 社) を用いて in vivo excision を行うことによりプラスミドにリクローニングした。プラスミド DNA を ABI Prism Miniprep Kits (PE Applied Biosystems 社) を用いて精製した後、挿入されている cDNA の塩基配列を自動 DNA シークエンス装置 (Perkin Elmer 社) を使用して決定した。得られた塩基配列の検索は BLAST software を用いて行った。

6-2) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

TRIZOL reagent を用いて、様々な組織と細胞株から総 RNA を抽出した。膵癌細胞株の CFPAC-1, Capan-2, HPAF-II, BxPC-3, と MIA-PaCa-2 は ATCC から購入し、SUIT-2 (43) は熊本大学医学部第 2 外科より、PaCa-2 と Panc-1 は久留米大学医学部免疫学の伊東恭悟教授より恵与されたものを利用した。様々な癌組織、正常組織は熊本大学医学部第 2 外科より恵与された。いくつかの正常組織の総 RNA は Clontech 社から購入した。各 2 μ g の総 RNA からランダムヘキサマープライマーを用いて Superscript reverse transcriptase (GIBCO/BRL 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ゲノム DNA を増幅しないように設計して作成し、PCR 反応は 95 1 分間、55 1 分間、72 1 分間で 30-35 サイクル行い、PCR 産物を 1.5% 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。各プライマーのシーケンスは、表 2 に示す通りである。

6-3) ノザンプロット解析

膵癌細胞株の CFPAC-1, PaCa-2, Panc-1 と正常膵臓の総 RNA を各レーンに 20 μ g ずつプロットし、各遺伝子に特異的な cDNA プローブを 32 P で標識して、42 でハイブリダイズさせた。また、Human Colon Tumor Multi-Sample Total RNA Northern Blot (Biochain 社) を用いて、hsp105 の大腸癌と正常大腸組織での mRNA の発現を比較した。オートラジオグラフィーを行った後にフィルターを一端ストリップし、コントロールとして 18s リボソーム RNA を再度ハイブリダイズした。

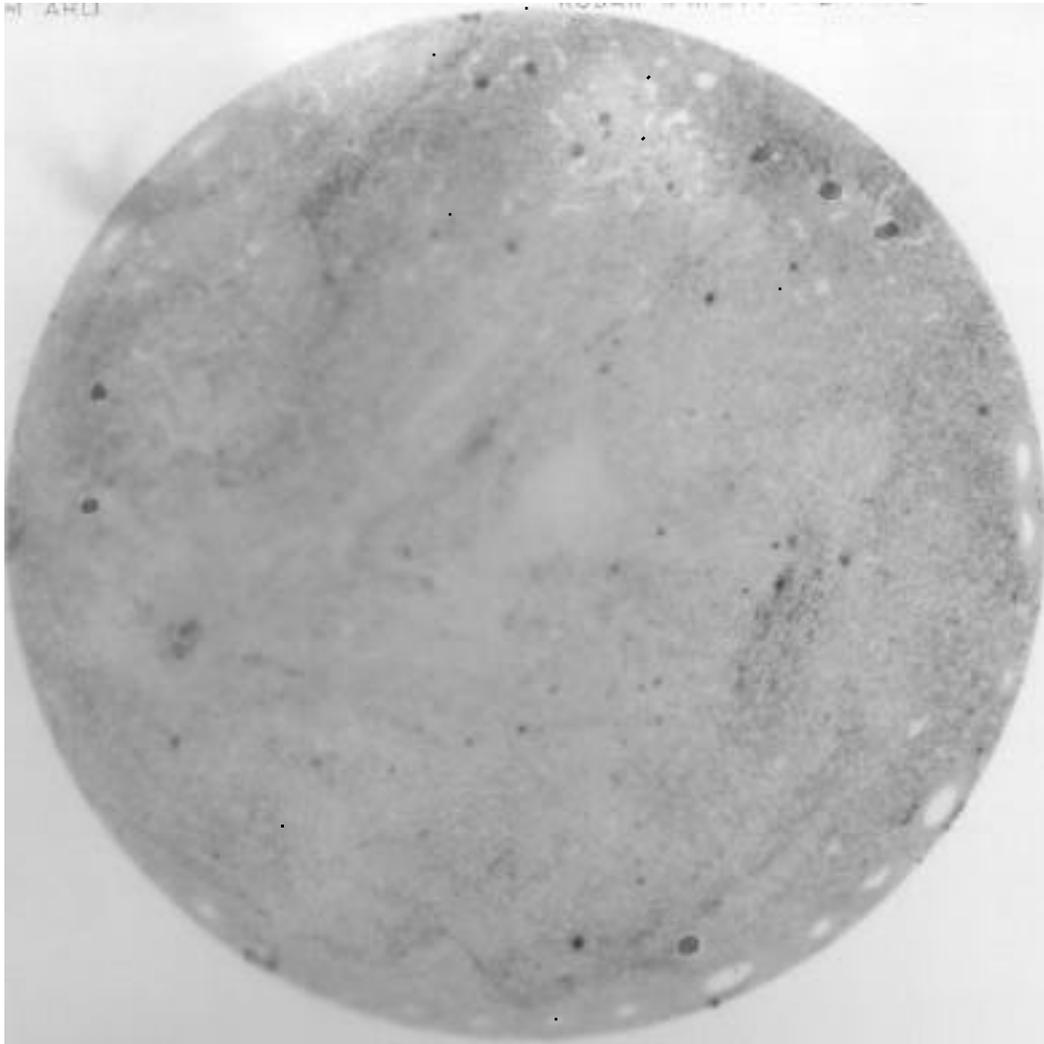
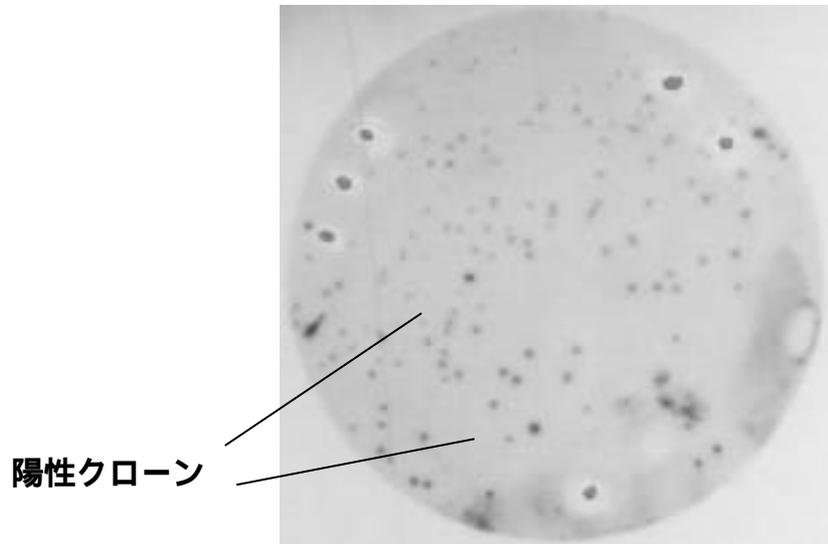


図5 膵癌患者1名の血清を用いて行なったSEREX法の第1次スクリーニングの結果（矢印は患者抗体が反応した陽性クローンを示す。）

A. 2次スクリーニング



B. 3次スクリーニング

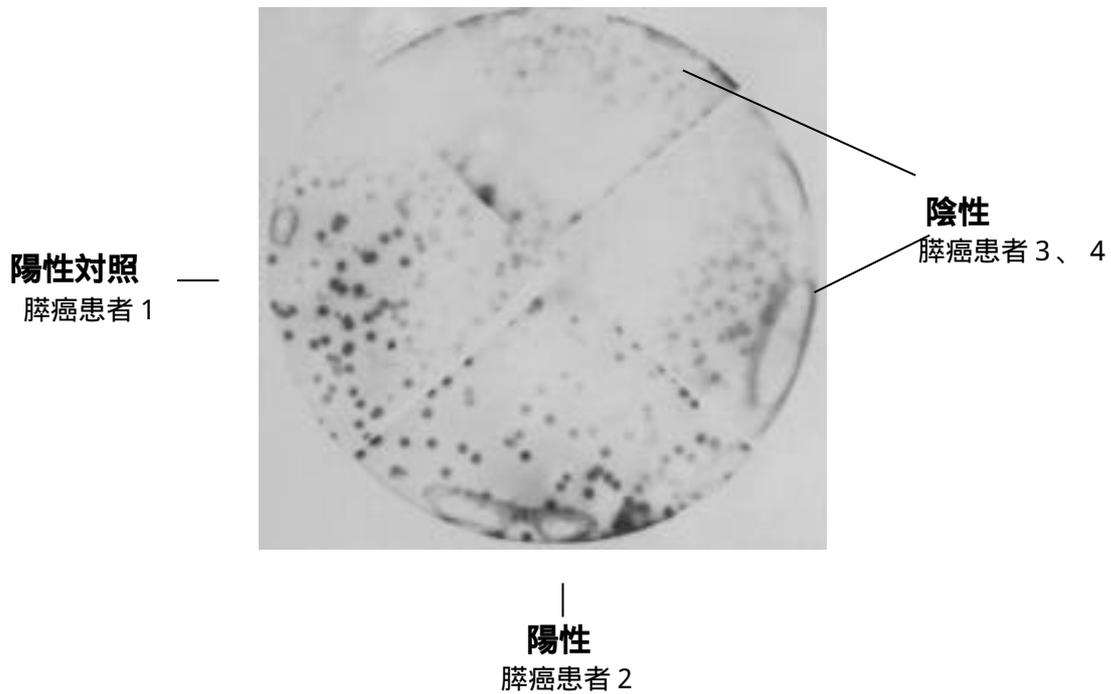


図 6 膵癌患者の血清を用いて行った SEREX 法による第 2 次および第 3 次スクリーニングの結果

表 2

腫瘍抗原遺伝子の 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
KM-PA-1/apg-2	sense	5'-CTGTGTTGTTTCGGTTCCTTG-3'
	antisense	5'-ATTGGCTCCTCATTTCCTCA-3'.
KM-PA-3/ -actinsense		5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
	antisense	5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGT-3'.
KM-PA-4/CLP	sense	5'-GCCATGAGCAAGAGGTCCAAGT-3'
	antisense	5'-ACCTTTGCCCTTCTCTGTGTCA-3'.
KM-PA-5/HALPHA44	sense	5'-TCTGTGAAACTGGTGCTGGAAA-3'
	antisense	5'-GCTCGTGGTATGCCTTTTCTGC-3'.
KM-PA-6/unknown	sense	5'-ACCTCCCCTTATTTCTACAAC-3'
	antisense	5'-TTTTTATTGAACTGCCTATTT-3'.
KM-PA-8/cytokeratin18	sense	5'-CTGAGTCCTGTCCTTTCT-3'
	antisense	5'-CCATCTGTAGGGCGTAGC-3'.
KM-PA-9/ polyA binding protein	sense	5'-CCGAGATGAACCCAGTGC-3'
	antisense	5'-GGAGAAACATACAAAACCA-3'.
KM-PA-10/VLCAD	sense	5'-TCCATCCGAACCTCTGCTGTGC3'
	antisense	5'-ATCCCCTTCTTGTGTTTTATCA-3'.
KM-PA-13/unknown	sense	5'-AGAAACTGGTAAAAGAGAAAA-3'
	antisense	5'-ATGAATACACAGCAGCAAGAA-3'.
KM-PA-14/CGI55 protein	sense	5'-GGCAGCAGAGAACAAGAAAA-3'
	antisense	5'-CACATCAGGAGCAGAAGCACT-3'.
KM-PA-16/unknown	sense	5'-CTTTAGCAGCCTTACAAC-3'
	antisense	5'-CCTCAAGTGATTCTCCTG-3'.
KM-PA-17/dbpA	sense	5'-GCCCCAGTATCGCCCTCAG-3'
	antisense	5'-CCTGCTTTTTGCTTTATTTTC-3'.
KM-PA-18/hsp105	sense	5'-TCAGTCCCCTCCTTCTTTACAG-3'
	antisense	5'-AGATGCCGTAGAGATGGTGAAA-3'.

6-4) 免疫組織化学的解析

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、マウス抗ヒト α -アクチンモノクローナル抗体 (SIGMA 社) を 3400 倍希釈で、マウス抗ヒトサイトケラチン 18 モノクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Apg-2 ポリクローナル抗体、ウサギ抗ヒト Hsp105 ポリクローナル抗体 (SANTA CRUZ 社) を 80 倍希釈で使用した。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、正常ウマあるいはヤギ血清にて室温で 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) で洗った。さらにビオチン標識抗マウスあるいはウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間反応させた後に PBS で洗い、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。対比染色にメチルグリーンを使用した。

6-5) 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 由来 CTL 株による SEREX 同定抗原認識の解析

SEREX 法で同定した抗原遺伝子のうち、ノザン解析において、正常膵臓に発現が認められず、複数の膵癌細胞株において高い発現を示したものの中から、6 種類 (KM-PA-2/EST, KM-PA-4/CLP, KM-PA-5/HALPHA44, KM-PA-14/CGI55 protein, KM-PA-15/GIF, KM-PA-18/hsp105) を選択した。これらを哺乳動物細胞発現ベクター (PVMV-SPORT) に組み込み、COS-7 細胞に HLA-A2(A*0207) 遺伝子あるいは HLA-A24(A*2402) 遺伝子とともに導入した。これらの一過性遺伝子発現細胞が、HLA-A2(A*0207/3101) の大腸癌患者の TIL より樹立された HLA-A2 拘束性 CTL 株により認識されるか否かを IFN- γ 産生を指標にして検討した。この CTL 株は久留米大学免疫学講座 (現国立がんセンター東病院外科) の伊藤雅昭先生が樹立したもので、これを用いたスクリーニングにより、HLA-A2(A*0201) の膵癌細胞株 panc-1 と大腸癌細胞株 sw620 より多数の腫瘍抗原が同定されている。今回は、TIL を CTL 培養用培地 (10%FCS/45%RPMI/45%AIM-V に 100IU/ml のヒト rIL-2 と 1% の non essential amino acid (NEAA) と抗生剤を添加したもの) で 55 日間培養し続けた HLA-A2(A*0201, A*0206, A*0207) 拘束性 CTL 株を用いた。

まず、96 穴平底培養プレートに COS-7 細胞を 5×10^3 個/well でまき、37℃, 5%CO₂ の条件下、10%FCS/RPMI で 18 時間培養し、リポフェクション法で遺伝子導入を行った。1well あたり、50 μ l の無血清 OPTI-MEM 培地、100ng の HLA-A2(A*0207) あるいは HLA-A24(A*2402) 遺伝子、0-200ng の間で濃度を変化させた種々の抗原遺伝子、200 倍希釈の濃度になるようリポフェクタミンを加え、37℃, 5%CO₂ で 6 時間培養後、150 μ l の 10%FCS/RPMI を各 well に加え、さらに 48 時間培養した。さらに培地を捨て、1well あたり 200 μ l の 10%FCS/RPMI で $1-2 \times 10^5$ 個の CTL を加えて 18 時間培養し、培養上清 100 μ l を採取して、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) にて IFN- γ を定量した。

ELISA は、96 穴平底プレートにマウス抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体(IgG1) (久留米大学免疫学講座で作成) を 4 オーバーナイトでコートし、プレートを 0.05% Tween 20 含有 PBS (PBS-T) で洗浄した後に 10% ブロックエース含有 PBS で 4 オーバーナイトでブロックした。プレートを洗浄後、培養上清を室温で 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄後に 1% bovine serum albumin(BSA) 含有 PBS-T(1%BSA/PBS-T) で 2.5 μ g/ml に希釈したポリクローラルウサギ抗ヒト IFN- γ 抗体 (久留米大学免疫学講座で作成) を室温で 1 時間反応させた。さらに、PBS-T で洗浄後に 1%BSA/PBS-T で 200 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体 (DAKO 社) と室温で 1 時間反応させ、PBS-T で洗浄後、過酸化水素を含む TMB ペルオキシダーゼ基質液 (KPL 社) を加え、発色後に H₃PO₄ (1M) を加えて反応を停止させ、ELISA reader により波長 450/630nm の吸光度を測定した。IFN- γ 濃度を定量するために、コントロールとして、段階希釈したリコンビナントヒト IFN- γ 蛋白を反応させた。得られた吸光度より標準曲線を作成し、IFN- γ 濃度を算出した。

6 - 6) 末梢血単核細胞(PBMC)からの腫瘍抗原特異的 CTL 株の樹立とスクリーニング

大腸癌の TIL 由来 CTL が HLA-A2 拘束性に反応した抗原(CLP, KM-PA-2)について、そのアミノ酸配列中の HLA-A2(A*0201)結合モチーフに合致する部分をモチーフ探索データベース (http://bimas.dcr.t.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform) で検索し各々 8 および 30 種のペプチドを選択した。HLA-A2(A*0201)結合モチーフの概略は、P2 にロイシン、バリン、メチオニン、P9 にロイシン、バリンが存在することである。これらの合成ペプチド (サワデー社より購入) を用いて同大腸癌患者の PBMC を刺激し、HLA-A2(A*0201)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 7) に示した。96 穴 U 底プレートに、1 ウェルあたり、200 μ l の CTL 培養用培地に、 1×10^5 個の PBMC と 10 μ g/ml のペプチドを加え、3 日目、6 日目、9 日目に培養上清 100 μ l を捨てて 20 μ g/ml のペプチド添加培地を 100 μ l 加え再刺激した。10-13 日目に培養細胞をエフェクター細胞として回収し、腫瘍抗原ペプチドをパルスした T2 細胞あるいは HLA-A2 陽性の膀胱癌細胞株 panc-1 と共培養し、免疫応答を後述する ELISA で定量した IFN- γ 産生を指標にして検出した。

用いた T2 細胞は、HLA-A2 遺伝子を発現するが TAP 遺伝子の欠損により自己ペプチドを結合できないために細胞表面に HLA クラス I 分子を発現しない。T2 細胞を 26 で培養するとペプチドを結合しない HLA クラス I 分子が細胞表面に発現するようになり、HLA-A2 結合性ペプチドを加えてやるとこれを結合して分子が安定化し 37 で培養しても同分子が細胞表面に発現する。

T2 細胞の場合、培養に用いたペプチドをパルスした T2 細胞に対する IFN- γ 産生と、関係ない HIV のペプチドをパルスした T2 細胞に対する IFN- γ 産生の差により、抗原特異的 CTL の HLA-A2 拘束性免疫応答の有無を判定した。具体的には、26 で一夜培養した T2 細胞を 96 穴平底プレートに、1 ウェルあたり 1×10^4 個まき、10 μ g/ml のペプチドを加え 37 で 2 時間培養後に約 1×10^5 個の CTL

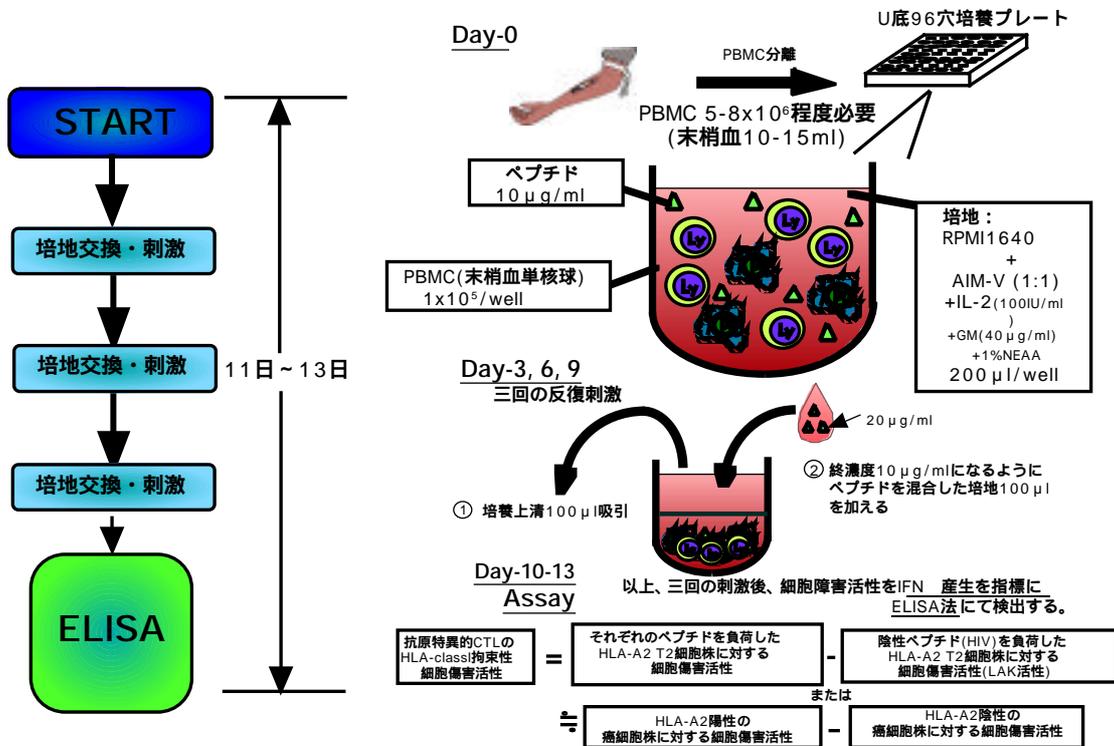


図7 腫瘍抗原ペプチド特異的な CTL 株の樹立法

96 穴 U 底プレートに、1 ウェルあたり、200 µl の CTL 培養用培地に、 1×10^5 個の PBMC と 10 µg/ml のペプチドを加え、3 日目、6 日目、9 日目に培養上清 100 µl を捨てて 20 µg/ml のペプチド添加培地を 100 µl 加え再刺激した。10-13 日目に培養細胞をエフェクター細胞として回収し、腫瘍抗原ペプチドをパルスした T 2 細胞あるいは HLA-A2 陽性の膀胱癌細胞株 panc-1 と共培養し、免疫応答を ELISA で定量した IFN 産生を指標にして検出した。T 2 細胞の場合、培養に用いたペプチドをパルスした T 2 細胞に対する IFN 産生と、関係ない HIV のペプチドをパルスした T 2 細胞に対する IFN 産生の差により、抗原特異的 CTL の HLA-A2 拘束性免疫応答の有無を判定した。

上記方法にて得られた抗原特異的 CTL 株をアロの HLA-A2 陽性由来のパフィーコートより分離した PBMC に放射線照射したものと 4 週間共培養し増やした後に CTL を回収し、HLA-A2 陽性癌細胞株に対する免疫応答を ELISA による IFN 産生と ^{51}Cr -release assay による細胞傷害活性を観察することにより検出した。

を加え、18時間後に ELISA 法により培養上清中に分泌された IFN- γ を定量した。panc-1 の場合、panc-1 に対する IFN- γ 産生と、HLA-A2 陰性癌細胞株に対する IFN- γ 産生の差により、抗原特異的 CTL の HLA-A2 拘束性免疫応答を判定した。癌細胞を 96 穴平底プレートに、1 ウェルあたり、 1×10^4 個まき、37 °C で一夜培養後、約 1×10^5 個の CTL を加え、18時間後に ELISA 法により IFN- γ 産生量を定量した。T2 細胞、panc-1 のいずれにおいても HLA-A2 拘束性の免疫応答を認めた抗原特異的 CTL に関しては、下記の方法により HLA-A2 陽性の 3 人のパフィーコートより分離した PBMC に放射線照射したものをフィーダー細胞としてさらに約 4 週間培養して細胞数を増やした後に、これらの細胞株が当該抗原と HLA-A2(A*0201)を発現する膵癌細胞株を認識することを、後述する ELISA 法による IFN- γ 産生量の測定および ^{51}Cr -release 法による細胞傷害試験により確認した。

同様に、膵癌患者 4 例と健常人 4 例の末梢血単核球を (6-6) で同定したペプチドで刺激して、当該抗原と HLA-A2 を発現する膵癌細胞株を認識しうる CTL 株が樹立できたか否か、ELISA 法による IFN- γ 産生量の測定および ^{51}Cr -release 法による細胞傷害試験により検討した。

6 - 7) 腫瘍抗原特異的 CTL 株の継代培養と解析

CTL の継代培養は以下のおこなった。まず、96 穴 U 底プレートに、1 ウェルあたり、200 μl の培地に、 1×10^4 個の CTL と 2×10^5 個の前述した HLA-A2 陽性のフィーダー細胞に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドを加えて培養した。その後、3-4 日目に培地を半分交換し、7-10 日目に 4 ウェルを 24 穴プレート 1 ウェルに移した。さらに 3-4 日に 1 度培地を半分交換し、細胞がウェルいっぱいになったらスプリットした。4週間後には、96 穴 U 底プレート 1 枚の CTL が 24 穴プレート 4 枚くらいに増えた。

ELISA 法による IFN- γ 産生量の測定の実験には、ターゲット細胞として、HLA-A2 陽性の膵癌 (panc-1, YPK-3)、大腸癌 (SW620)、HLA-A24 陽性膵癌 (PaCa-2, YPK-1)、HLA-A11 陽性肺癌 (RERF-LC-MS)、HLA-A26 陽性肺癌 (QG56) を用いた。1 日目にターゲット細胞を 96 穴培養プレートに 1 ウェルあたり、 1×10^4 個まき、2 日目に 1×10^5 個の CTL を加え、3 日目に培養上清を採取して、ELISA 法により IFN- γ を定量した。

^{51}Cr -release 法による細胞傷害試験には、ターゲット細胞として、HLA-A2 陽性膵癌 (panc-1, YPK-3)、HLA-A24 陽性膵癌 (PaCa-2, YPK-1)、HLA-A2 陽性 EBV-B lymphoblastoid cell (OKAB2)、HLA-A2 陽性 PHA blastoid cell、HLA-A 陰性白血病 (K562) を用いた。1 日目に付着性の panc-1, YPK-3, PaCa-2, YPK-1 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 個まき、オーバーナイト培養した。2 日目に浮遊細胞の OKAB2, PHA blast, K562 を ^{51}Cr で 1 時間ラベルした後、96 穴プレートに 1 ウェルあたり 1×10^4 個まき、以上のターゲット細胞に対して、10 倍、20 倍、40 倍、80 倍の数の CTL を加え、6 時間後に培養上清をとって死細胞より放出された ^{51}Cr を測定した。

HLA-A2(A*0201)陽性膵癌細胞株 panc-1 に対する各 CTL 株の IFN- γ 産生を指標とした免疫応答

におけるクラス I 拘束性をみるために、抗クラス I 抗体(W6/32, IgG2a)、抗クラス II 抗体(H-DR-1, IgG2a) (久留米大学免疫学教室)、抗 CD 4 抗体(Nu-Th/i, IgG1) (久留米大学免疫学教室)、抗 CD 8 抗体(Nu-Ts/c, IgG2a) (久留米大学免疫学教室)、抗 CD 1 3 抗体(MSC-2, IgG1) (久留米大学免疫学教室)、抗 CD 1 4 抗体(JML-H14, IgG2a) (久留米大学免疫学教室)、抗 HLA-A2 抗体(BB7.2, IgG2b)(ATCC)を用いて阻害実験を行った。また、HLA-A2 発現 T2 細胞にペプチドを段階希釈してパルスし、各 CTL 株の IFN- γ 産生におけるペプチド濃度依存性を ELISA 法にて解析した。

樹立した CTL 株の細胞表面マーカー(CD4, CD8)の検索は以下のようにしておこなった。1X10⁶個の細胞に、一次抗体として前述の抗 CD 4 抗体(Nu-Th/i, IgG1)、抗 CD 8 抗体(Nu-Ts/c, IgG2a)を加え 4 30分反応させ、洗浄後、二次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を加え、4 30分反応させた。洗浄後、1%ホルマリン含有 PBS に浮遊させ、FACS で解析した。

6 - 8) KM-PA-2 のシーケンス解析

KM-PA-2 はヒト骨髄芽球から単離された KIAA0124 とは第 465 コドンにおいて、それぞれ CGC(Arg)および CAC(His)と 1 塩基 (1 アミノ酸) の相違を認めた。これが変異か多型かを確認するために、当該部位前後の領域を RT-PCR で増幅し、制限酵素切断片長多型 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)を試みたが、多型を識別できなかったため、TA クローニングを行った後にシーケンス解析をして比較した。

7 実験結果

7-1) 腫瘍抗原遺伝子の同定

アロ腫瘍細胞株から樹立された独立した 200 万個のクローンを含む cDNA 発現ライブラリー(ZAP Expression Vector)より、1例の腫瘍患者血清を用いて約 30 万クローンをスクリーニングし 63 個の陽性クローンを得た。各クローンの塩基配列を解析し、18 種類の遺伝子を同定した。その内訳は、既知の遺伝子が 13 種類、expressed sequence tag (EST)が 1 種類、未知の遺伝子が 4 種類であった(表 3)。

13 種の既知の遺伝子のうち KM-PA-1 は熱ショック蛋白質 (hsp) 110 ファミリーに属する apg-2 (44) であり、SEREX データベースにも、大腸癌、胃癌のスクリーニングで同定された NY-CO-32、NY-CO-40、NGO-St-81 として登録されていた。KM-PA-2 は、かずさ DNA 研究所が KIAA0124 として遺伝子バンクに登録している EST と第 465 コドンにおいてそれぞれ CGC(Arg)および CAC(His)と 1 塩基 (1 アミノ酸) の相違を認めた。また、マウスの Block of proliferation 1 (Bop1) と 90% 以上の相同性を認めた。Bop1 はその名の通り、増殖を阻害する遺伝子として同定されたものである (45)。KM-PA-4 は coactosin-like protein(CLP)で Smith-Magenis Syndrome(SMS)という顔面 (頭

表 3

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

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

頸部) 奇形と精神発育不全を伴う常染色体劣性遺伝性疾患の遺伝子欠失領域上に遺伝子がマップされている(46)。Coactosin は粘菌の一種である Dictyostelium discoideum のアクチン結合蛋白で、それと相同性を有することから CLP と命名された。KM-PA-8/サイトケラチン 18 は、サイトケラチン 8 とともに腺管や腺上皮に発現する細胞骨格蛋白である。ほとんどの腺癌はサイトケラチン 18 を発現するが扁平上皮癌はほとんど発現せず、腺癌のマーカーになっている(47、48)。KM-PA-12/HLA-Cw 重鎖(MHC クラス I) は SEREX データベース上に、乳癌のスクリーニングで LONY-BR-26 として同定されている。KM-PA-15/glycosylation-inhibiting factor(GIF)は IgE の合成を制御する免疫抑制性のサイトカインである(49)。KM-PA-17/DNA 結合蛋白 A(dbpA)は翻訳制御因子の cold-shock domain を含む核酸結合蛋白のファミリーに属する(50)。KM-PA-18/熱ショック蛋白質 105(hsp105)(51)は SEREX データベースにも大腸癌のスクリーニングで NY-CO-25 として同定されている。4 つの未知遺伝子のうち、KM-PA-16 は SEREX データベース上の胃癌で同定された未知遺伝子と部分的に相同性を有していた。

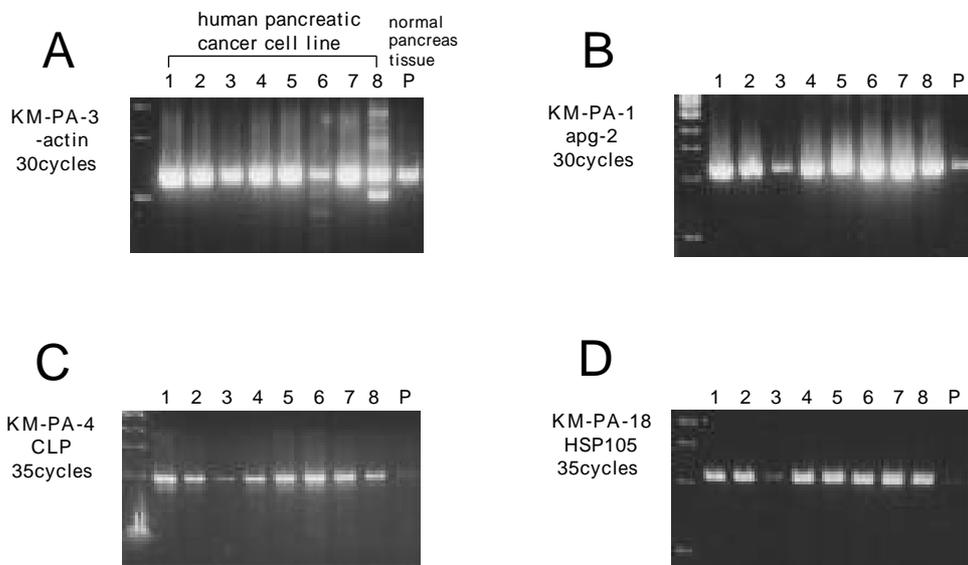
7-2) 腫瘍抗原遺伝子の発現

cDNA ライブラリーのもとになった膵癌細胞株 CFPAC-1 を含む 8 種類の膵癌細胞株と正常膵臓組織の mRNA を用いて、これらの遺伝子の膵癌細胞株と正常膵臓とでの発現を RT-PCR で検出し比較した。解析できた 13 種類のうち 10 種類の遺伝子において、多くの膵癌細胞株で正常膵臓より強い発現を認めた(図 8)(表 4)。

図 8 に示したように、KM-PA3/ β -actin は、膵癌細胞株と正常膵臓組織で同等の発現を示した。KM-PA-14/CGI55 protein と KM-PA-17/DNA binding protein A も同様の結果を示した。しかしながら、KM-PA-1/apg-2、KM-PA-4/CLP、KM-PA-18/hsp105 は膵癌細胞株で正常膵臓組織より強い発現を認め、さらに KM-PA-5/ HALPHA44、KM-PA-6/ unknown、KM-PA-8/ cytokeratin 18、KM-PA-9/ poly A binding protein、KM-PA-10/ VLCAD、KM-PA-13/ unknown、KM-PA-16/ unknown も同様の結果を示した。

さらに 9 つの遺伝子に関してノザン解析により、3 種類の膵癌細胞株と正常膵臓組織での mRNA の発現を比較した。図 9 に示すように KM-PA-2/KIAA0124、KM-PA-4/CLP、KM-PA-5/ HALPHA44、KM-PA-11/unknown、KM-PA-14/ CGI 55 protein、KM-PA-15/GIF は膵癌細胞株にのみ発現を認めた。同様に KM-PA-6/unknown、KM-PA-16/unknown、KM-PA-18/hsp105 も膵癌細胞株にのみ発現を認めた。Hsp105 に関しては市販のメンブレンを購入し、4 例の大腸癌組織と正常大腸組織での mRNA の発現を比較した結果、4 例中 3 例において大腸癌での高発現を認めた(図 10)。

KM-PA-2/KIAA0124 と KM-PA-18/hsp105(KIAA0201)に関しては、かずさ DNA 研究所のホームページ(<http://www.kazusa.or.jp/>)上に様々な正常組織におけるノザン解析の結果が公表されている。KM-PA-2/KIAA0124 は主に平滑筋、精巣、大腸に高発現しており KM-PA-2/hsp105 は精巣、脳、肺に高発現している。KM-PA-4/CLP はノザン解析により、主に胎盤、肺、肝臓、腎臓に高



Lane 1, CRPAC-1; lane 2, Capan-2; lane 3, HPAC-1; lane 4, BxPC-3; lane 5, SUI-2; lane 6, MIA-PaCa-2; lane 7, Paca-2; lane 8, Panc-1; lane P; normal pancreas tissue

図 8 RT-PCR による腫瘍抗原 mRNA の発現解析

KM-PA3/ -actin は、膵癌細胞株と正常膵臓組織で同等の発現を示した。しかしながら、KM-PA-1/apg-2、KM-PA-4/CLP、KM-PA-18/hsp105 は膵癌細胞株（レーン 1-8）で正常膵臓組織（P）より強い発現を認めた。

表 4

RT-PCR による正常膵組織と 8 種類の膵癌細胞株における腫瘍抗原 mRNA の発現解析

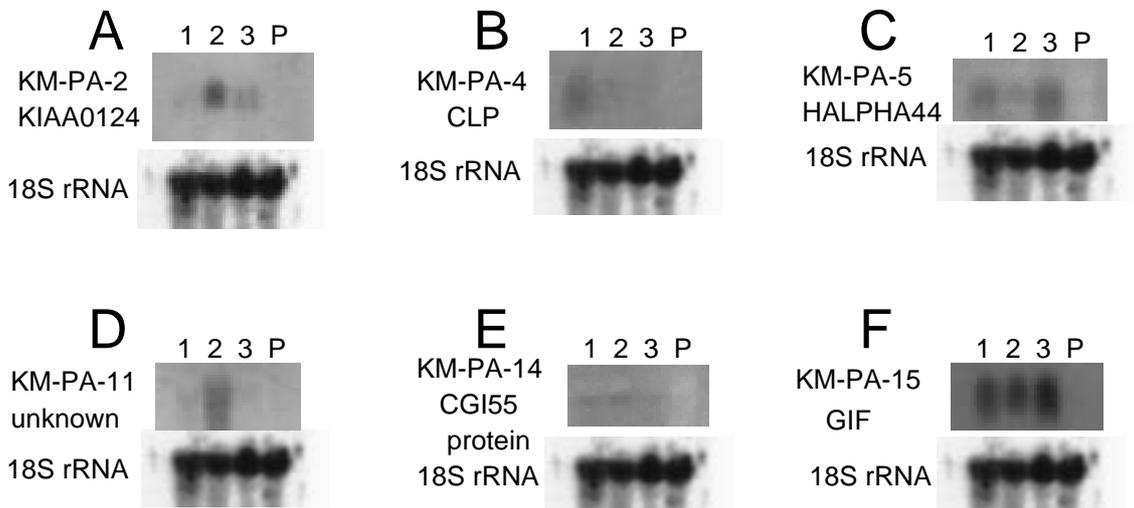
	膵癌細胞株								正常膵臓
	1	2	3	4	5	6	7	8	
PA-1	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+
PA-3	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
PA-4	++	++	+	++	++	++	++	++	+
PA-5	+++	++	+	++	++	+	+++	+	+
PA-6	+	+	+	++	+	+	++	+	-
PA-8	++	++	+++	+++	-	+	++	+++	+
PA-10	++	++	+	+	++	++	+	++	+
PA-13	++	+	-	++	+	+	+	++	+
PA-14	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PA-16	+	-	-	++	+	++	++	++	+
PA-17	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PA-18	++	++	+	++	++	++	++	++	+

発現の強さを 4 段階で示した。+++：強、++：中、+：弱、-：なし

解析した膵癌細胞株の名称は以下のとおりである。

1: CFPAC-1, 2: Capan-2, 3: HPAF-II, 4: BxPC-3, 5: SUIT-2, 6: MIA-PaCa-2, 7: PaCa-2, 8: Panc-1

KM-PA3/ β -actin は、膵癌細胞株と正常膵臓組織で同等の発現を示した。KM-PA-14/CGI55 protein と KM-PA-17/DNA binding protein A も同様の結果を示した。しかしながら、KM-PA-1/apg-2、KM-PA-4/CLP、KM-PA-18/hsp105 は膵癌細胞株で正常膵臓組織より強い発現を認め、さらに KM-PA-5/ HALPHA44、KM-PA-6/ unknown、KM-PA-8/ cytokeratin 18、KM-PA-9/ poly A binding protein、KM-PA-10/ VLCAD、KM-PA-13/ unknown、KM-PA-16/ unknown も同様の結果を示した



Lane 1, CFPAC-1; lane 2, Panc-1; lane 3, PaCa-2; lane P, normal pancreatic tissue

図9 ノザン解析による腫瘍抗原 mRNA の発現解析

KM-PA-2/KIAA0124、KM-PA-4/CLP、KM-PA-5/HALPHA44、KM-PA-11/unknown、KM-PA-14/ CGI 55 protein、KM-PA-15/GIF は正常膵臓組織（レーン P）にはほとんど発現しておらず膵癌細胞株（レーン 1-3）にのみ発現を認めた。

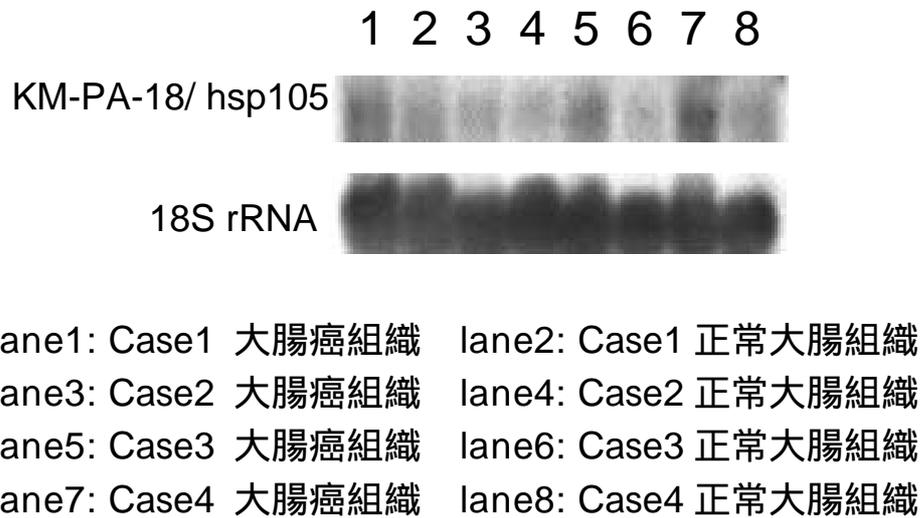


図 1 0 4 例の大腸癌と正常大腸組織におけるノザン解析による hsp105 mRNA 発現の比較

Hsp105 に関しては市販のメンブレンを購入し、4 例の大腸癌組織と正常大腸組織での mRNA の発現を比較した結果、4 例中 3 例(Case1, 3, 4)において大腸癌での高発現を認めた。

発現することが報告されている(46)。上記3つの腫瘍抗原遺伝子の正常膵臓での発現はいずれも低かった。

7-3) 膵癌における腫瘍抗原の免疫組織化学的解析

膵癌の4症例につき、その癌組織を4種類の抗体を用いて免疫組織化学的に検索した。 α -actinは、膵癌でも周囲の正常膵組織でも高発現していた。Cytokeratin18は、癌よりも正常膵に発現が高かった。apc-2は、癌と正常膵で同等の発現を示した。いっぽう、hsp105は正常組織にも弱く発現していたが、癌細胞特異的に著明な高発現を認め、主に細胞質に発現していた。(図11)

7-4) 他の癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

大腸癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌のそれぞれ4例における hsp105 の発現を免疫染色で検討した。胃癌、食道癌、肝細胞癌の2例でも、癌において正常組織よりも強い hsp105 の発現を認めたが、驚くべきことに大腸癌において4例とも、癌特異的に膵癌以上の非常に強い hsp105 の発現を認めた。(図12)

7-5) 様々な正常組織における hsp105 の免疫組織化学的解析

hsp105はRT-PCRでは脳、肺、心臓、胃、胸腺、精巣に発現しており、またノザン解析では脳、肺、精巣に高発現していた。そこでさらに免疫染色により hsp105 の蛋白レベルでの発現を調べた。食道の扁平上皮、胃の腺上皮、消化管の内臓筋、肺、肝、心筋、精巣で発現していた。しかし、その発現レベルは癌での発現より明らかに低かった。さらに脳、小腸、大腸、膵臓、脾臓、胸腺にも発現が認められたが、発現レベルはさらに低かった(図13)。

7-6) 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)由来 CTL 株により認識される腫瘍抗原の同定

膵癌細胞のライブラリーから SEREX 法で得られた6種類の抗原のうち2種類(CLP, KM-PA-2)が、大腸癌の TIL から得られた CTL 株により HLA-A2 拘束性に認識された(図14)。すなわち、COS-7細胞に CLP あるいは KM-PA-2 遺伝子を HLA-A2 遺伝子あるいは HLA-A24 遺伝子とともに導入した際に、これらの一過性遺伝子発現細胞と共培養した CTL 株による IFN- γ 産生が、HLA-A24 遺伝子を導入したものに比べて HLA-A2 遺伝子を導入したもののほうが高く、しかも IFN- γ 産生量は導入した CLP あるいは KM-PA-2 遺伝子の濃度に依存していた。なお用いた TIL 由来の CTL 株の60-70%が CD8⁺T 細胞であった。

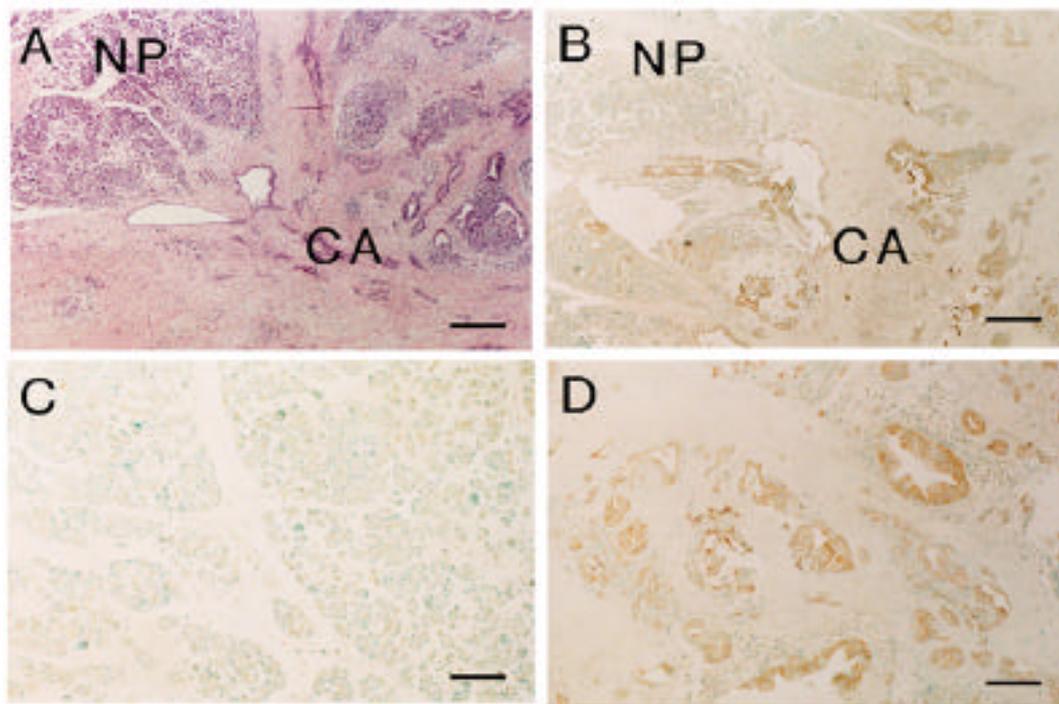


図 1 1 膵癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

51. 膵癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、 NP:非癌部。癌部は癌細胞、間質細胞、炎症細胞を含む。非癌部は腺細胞、島細胞、膵管細胞を含む。
- B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。
- C. 非癌部の強拡大。細胞質に弱い hsp105 蛋白の発現を認める。
- D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。
- 倍率 ; x 18 (A, B) , x 45 (C, D).
- スケールバー-500 μ m (A, B), 200 μ m (C, D).

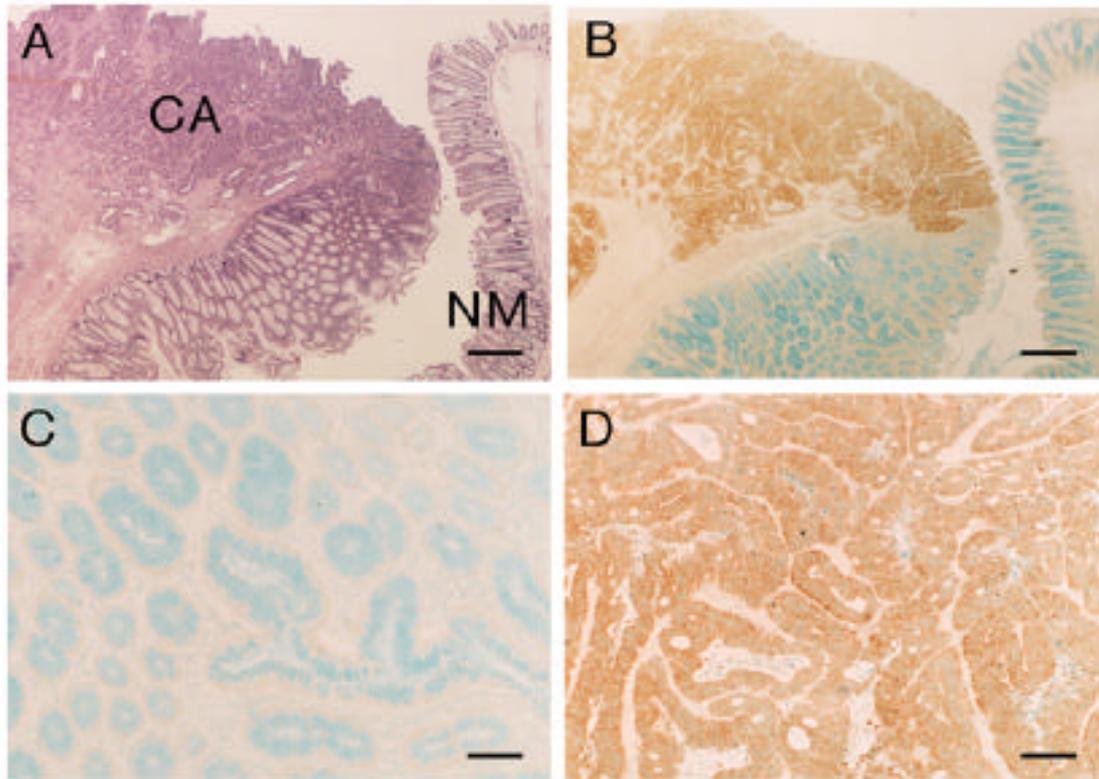


図 1 2 大腸癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

A. 大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、NM: 非癌部

B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C. 非癌部の強拡大。弱い hsp105 蛋白の発現を認める。

D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。核にも弱い発現を認める。

倍率 ; x 9 (A, B) , x 90 (C, D).

スケールバー 1mm (A, B), 100 μ m (C, D).

Donor of TIL; HLA-A2(A*0207)/A31(A*3101)

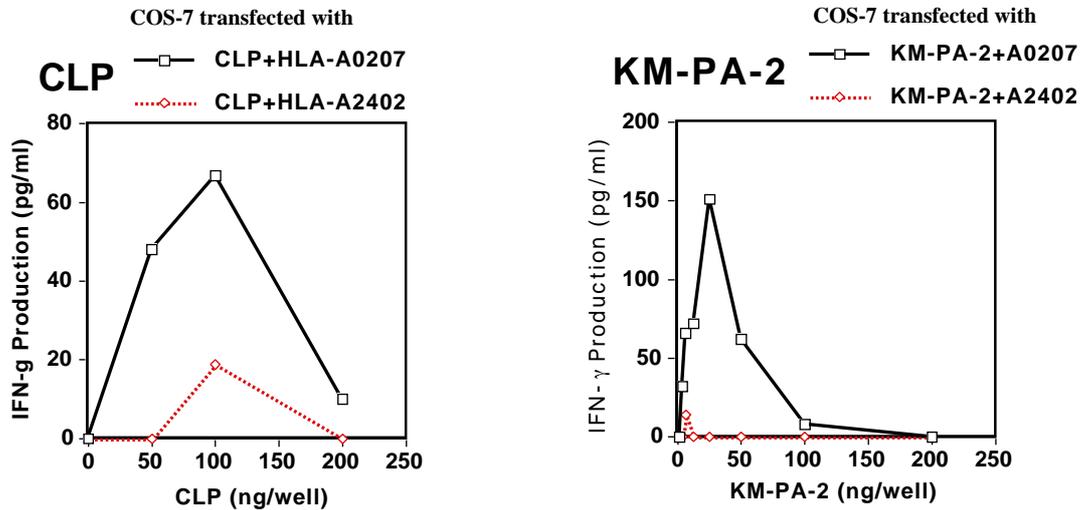


図 14 大腸癌患者の癌浸潤リンパ球由来の CTL による HLA-A2 および CLP あるいは KM-PA-2 を発現する COS-7 細胞の認識

膀胱癌細胞のライブラリーから SEREX 法で得られた 6 種類の抗原のうち 2 種類 (CLP, KM-PA-2) が、大腸癌の TIL から得られた CTL 株 により HLA-A2 拘束性に認識された。すなわち、COS-7 細胞に CLP あるいは KM-PA-2 遺伝子を HLA-A2 遺伝子あるいは HLA-A24 遺伝子とともに導入した際に、これらの一過性遺伝子発現細胞と共培養した CTL 株による IFN- γ 産生が、HLA-A24 遺伝子を導入したものに比べて HLA-A2 遺伝子を導入したものの方が高く、しかも IFN- γ 産生量は導入した CLP あるいは KM-PA-2 遺伝子の濃度に依存していた。

7-7) 大腸癌患者 PBMC より樹立された腫瘍抗原特異的 CTL 株の解析

CLP と KM-PA-2 に関して HLA-A2 との結合モチーフを有するアミノ酸配列を各々 8 および 30 種選択し、その合成ペプチドを用いて同大腸癌患者の PBMC を刺激して CTL の誘導を試みた。その結果、T2 細胞、panc-1 のいずれに対しても HLA-A2 拘束性に免疫応答を示す抗原特異的 CTL が各々 7 および 9 種のペプチドに対して誘導された(表 5)。これらのエピトープペプチドで刺激して誘導した CTL 株が、当該抗原と HLA-A2 を発現する膀胱癌細胞株を認識するかどうか、ELISA 法による IFN- γ 産生の定量および ^{51}Cr -release 法による細胞傷害試験により検討した。その結果 CLP ペプチド 1 種と KM-PA-2 ペプチド 3 種で誘導した CTL 株について HLA-A2 拘束性に腫瘍細胞を認識することが確認された(表 6)。これらの CTL 株はその 80% が CD8 $^{+}$ T 細胞であり、HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膀胱癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した。また、HLA-A2 陽性の PHA 芽球には細胞傷害活性を示さなかったが、EBV でトランスフォームした自己の B リンパ芽球様細胞株に弱い細胞傷害活性を示した(図 15, 16)。

7-8) 膀胱癌患者および健常人 PBMC より樹立された腫瘍抗原特異的 CTL 株の解析

同定した 4 種類のエピトープペプチドを用いて、HLA-A2 陽性の膀胱癌患者 4 名と健常人 4 名について、その PBMC より抗原特異的 CTL の誘導を試みた。4 種類のペプチドとも、膀胱癌患者および健常人のそれぞれについて 1-2 名より抗原特異的 CTL 株が樹立された(表 7)。これらの CTL 株は、HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膀胱癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した(図 17, 18)。

7-9) 抗原特異的 CTL 株の特異性の解析

4 種類のペプチドで膀胱癌患者および健常人から誘導された CTL 株が抗原特異的に示した IFN- γ 産生は、抗クラス II 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD13 抗体、抗 CD14 抗体のいずれによっても阻止されなかった。いっぽう抗クラス I 抗体、抗 CD8 抗体、あるいは抗 HLA-A2 抗体で阻止されたため、IFN- γ 産生細胞は主に HLA-A2 拘束性の CD8 $^{+}$ CTL であると考えられた(図 19)。また IFN- γ 産生は、各ペプチドの濃度に依存性を示すことも明らかになった(図 20)。

7-10) KM-PA-2 のシーケンス解析

ヒト骨髄芽球からとられた KIAA0124 は 1466 番目の塩基が A と報告されているが、今回我々が CFPAC-1 から単離した KM-PA-2 は、1466 番目の塩基が G であった。そのため、両者は第 465 コドンにおいてそれぞれ CAC(His)および CGC(Arg)と相違を認める。この部位は、今回同定した HLA-A2 結合モチーフをもつ CTL エピトープには含まれていない。これが、膀胱癌細胞に発生した変異か、

表 5

CTL の誘導に用いるために合成した HLA-A2 結合モチーフを有する CLP および KM-PA-2 由来のペプチド

ペプチドの由来		アミノ酸配列
CLP	p15-24	NLVRDDGSAV
	p48-56	FIQQCTDDV
	p57-65	RLFAFVRFT
	p69-77	AMSKRSKFA
	p81-89	WIGENVSGL
	p104-113	VVQNFAKEFV
	p105-113	VQNFAKEFV
KM-PA-2	p29-38	LEWYDDDFPHV
	p115-124	FSGDVMIHVP
	p172-180	WAQEDPNAV
	p179-188	AVLGRHKMHV
	p326-335	RLWEVATARC
	p348-356	VAWNPSPAV
	p585-593	DLLQNPLL
	p586-595	LLQNPLLVPV
p612-621	VIFHPTQPWV	

表 6

CLP あるいは KM-PA-2 由来のペプチド刺激で大腸癌患者の PBMC から誘導した CTL による HLA-A2 陽性癌細胞株の認識

ペプチド	腫瘍細胞株 との共培養によりCTLが産生したIFN- (pg/ml)						
	Panc1 膵癌 (HLA-A2)	YPK-3 膵癌 (HLA-A2)	SW620 大腸癌 (HLA-A2)	PaCa-2 膵癌 (HLA-A24)	YPK-1 膵癌 (HLA-A24)	RERF-LC-MS 肺癌 (HLA-A11)	QG56 肺癌 (HLA-A26)
CLP	0	14	30	69	0	0	0
p15-24							
p48-56	0	0	0	0	0	0	21
p57-65	508	181	237	126	19	98	67
p69-77	0	0	0	0	0	0	0
p81-89	83	0	0	0	0	0	0
p104-113	49	55	13	0	0	0	0
p105-113	95	0	0	0	0	0	7
KM-PA-2	56	0	0	0	0	24	0
p29-38							
p115-124	68	0	0	21	0	38	80
p172-180	950	2124	803	616	0	8	281
p179-188	266	0	127	26	0	77	33
p326-335	168	28	120	0	0	0	0
p348-356	0	0	0	0	0	0	0
p585-593	13297	1398	1520	600	0	0	0
p586-595	742	431	428	335	36	302	200
p612-621	106	0	0	0	0	545	38

CLP ペプチド 1 種と KM-PA-2 ペプチド 3 種で誘導した CTL 株について HLA-A2 拘束性に腫瘍細胞を認識することが確認された。

CLP p57-65/OK-PBMC-CTL

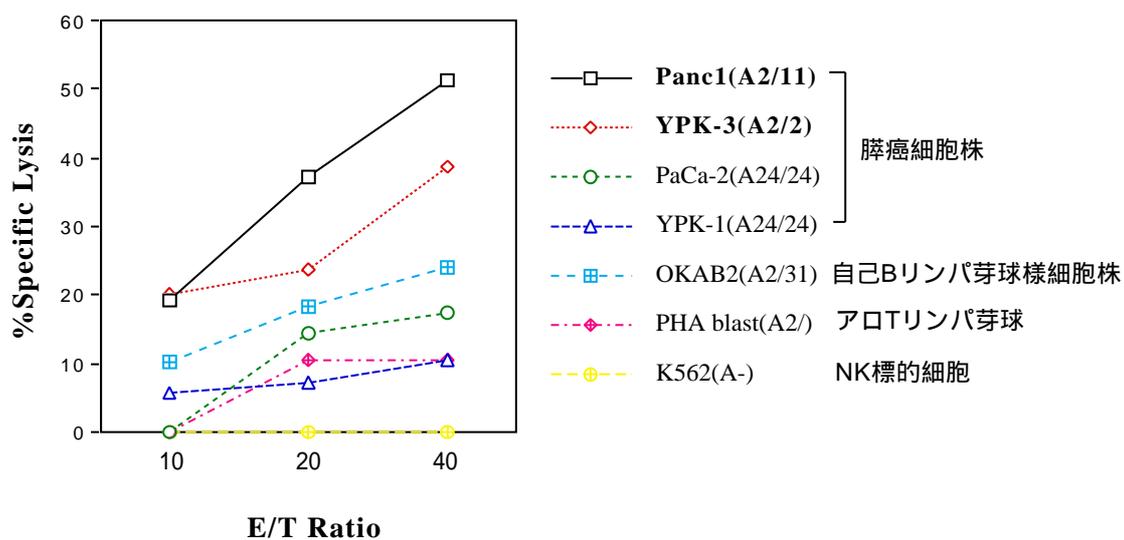


図 15 CLP ペプチド刺激で大腸癌患者の PBMC より誘導した CTL 株による膵癌細胞株に対する細胞傷害活性の発現

CLP ペプチド刺激で大腸癌患者の PBMC より誘導した CTL 株は HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膵癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した。また、HLA-A2 陽性の PHA 芽球には細胞傷害活性を示さなかったが、EBV でトランスフォームした自己の B リンパ芽球様細胞株に弱い細胞傷害活性を示した。

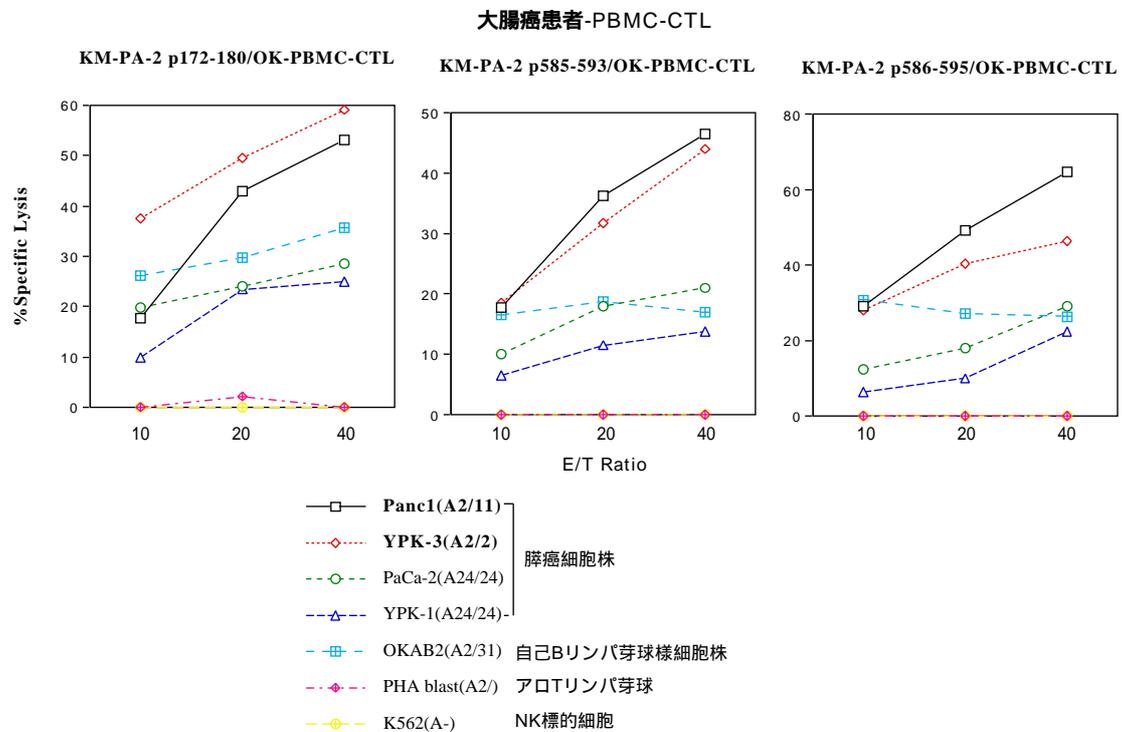


図 1 6 KM-PA-2 ペプチド刺激で大腸癌患者の PBMC より誘導した CTL 株による 腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性の発現

KM-PA-2 ペプチド刺激で大腸癌患者の PBMC より誘導した CTL 株は HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する 腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を示した。また、HLA-A2 陽性の PHA 芽球には細胞傷害活性を示さなかった が、EBV でトランスフォームした自己の B リンパ芽球様細胞株に弱い細胞傷害活性を示した。

表 7

膵癌患者 4 例および健常人 4 例における抗原特異的 CTL の誘導率

ドナー	CLP p57-65 RLFAFVRFT	KM-PA-2 p172-180 WAQEDPNAV	KM-PA-2 p585-593 DLLQNPLLV	KM-PA-2 p586-595 LLQNPLLVPV
膵癌 1	+	+	+	+
膵癌 2	-	-	-	+
膵癌 3	-	-	-	-
膵癌 4	-	-	-	-
誘導率	1/4	1/4	1/4	2/4
健常人 1	+	+	+	-
健常人 2	+	-	-	+
健常人 3	-	-	-	+
健常人 4	-	-	-	-
誘導率	2/4	1/4	1/4	2/4

同定した 4 種類のエピトープペプチドを用いて、HLA-A2陽性の膵癌患者 4 例と健常人 4 例について、そのPBMCより抗原特異的CTLの誘導を試みた。4 種類のペプチドとも、膵癌患者および健常人のそれぞれについて25-50%の割合で抗原特異的 CTL 株が樹立された。

膵癌患者-PBMC-CTL

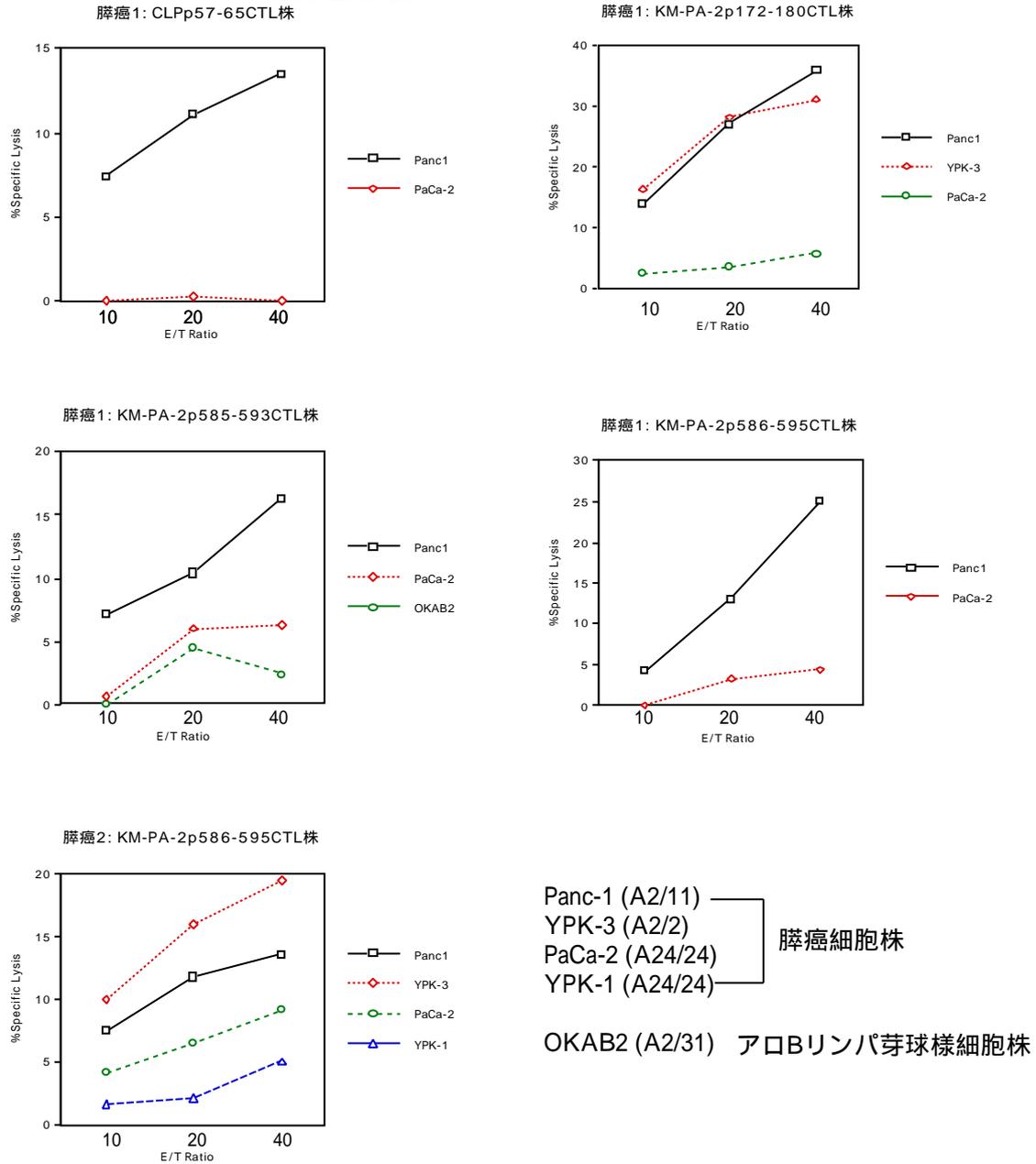


図 17 CLP および KM-PA-2 ペプチド刺激で膵癌患者の PBMC より誘導した CTL 株による膵癌細胞株に対する細胞傷害活性の発現

CLP および KM-PA-2 ペプチド刺激で膵癌患者の PBMC より誘導した CTL 株は HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膵癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した。

健常人-PBMC-CTL

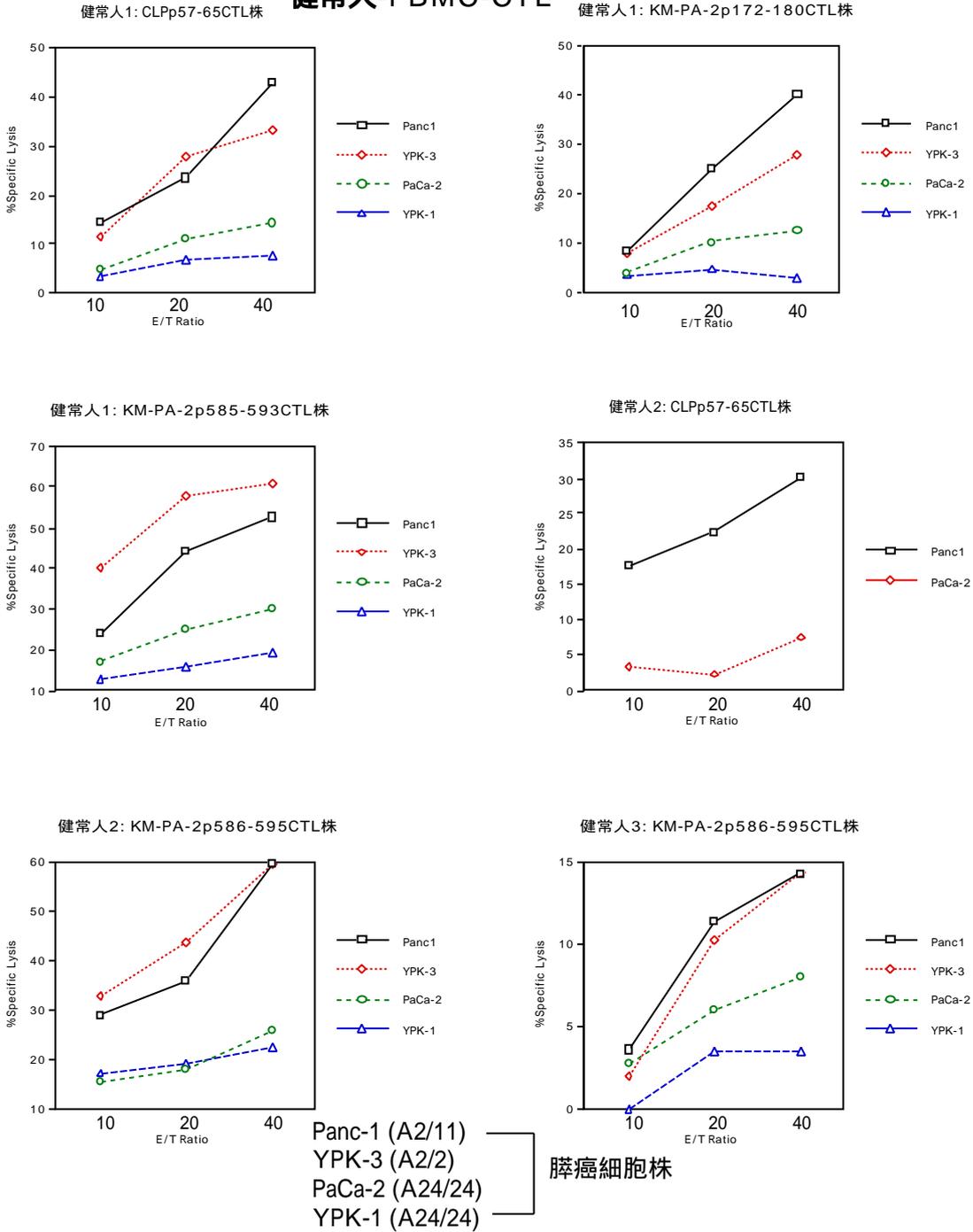


図 18 CLP および KM-PA-2 ペプチド刺激で健常人の PBMC より誘導した CTL 株による膵癌細胞株に対する細胞傷害活性の発現

CLP および KM-PA-2 ペプチド刺激で健常人の PBMC より誘導した CTL 株は HLA-A2 および当該腫瘍抗原を発現する膵癌細胞株に対して細胞傷害活性を示した。

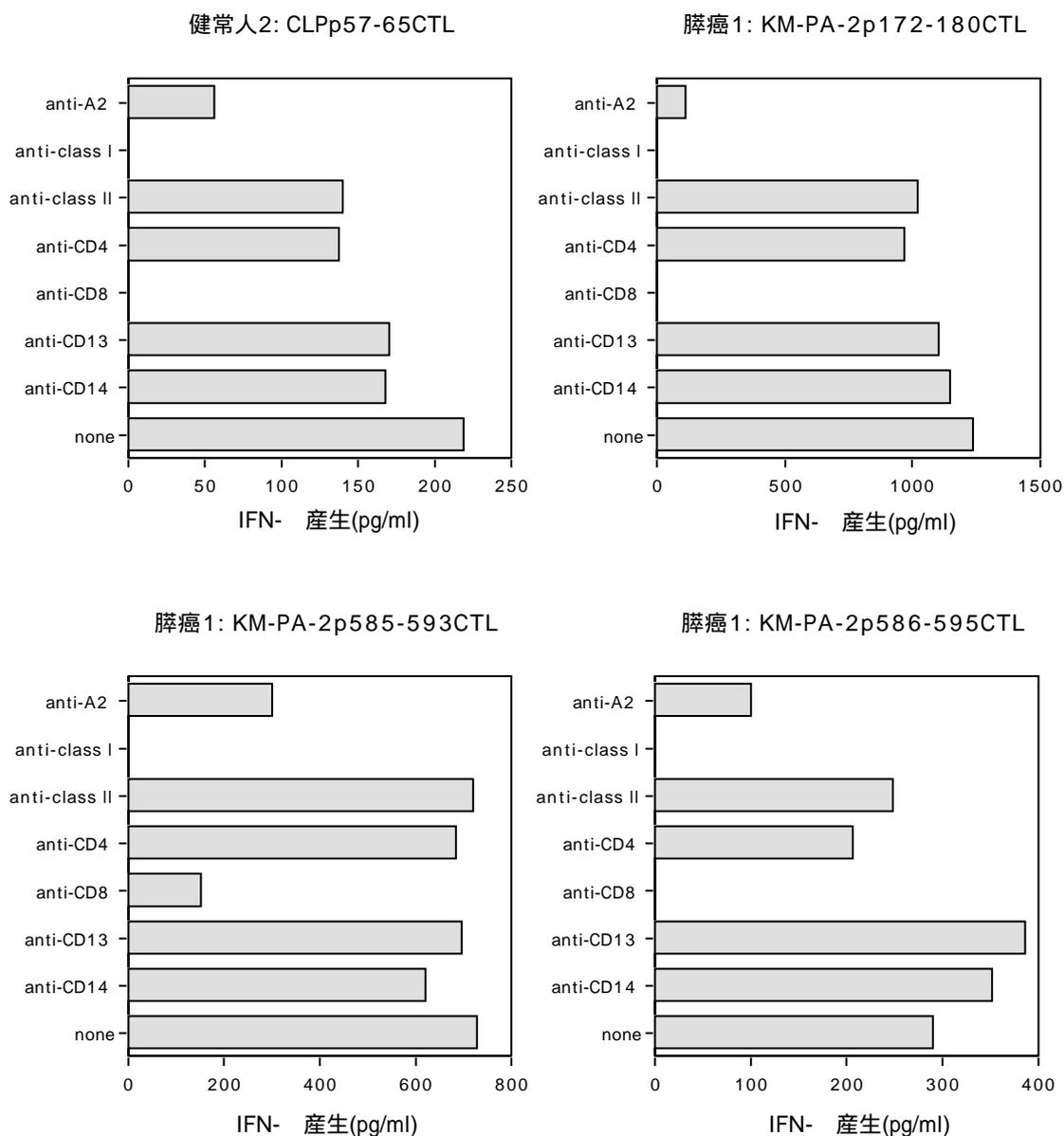


図 19 CTL 株が示す細胞傷害活性の抗体による阻止実験；細胞傷害活性が HLA-A2 拘束性の CD8⁺T 細胞に由来することの確認

4 種類のペプチドで膵癌患者、健康人から誘導された CTL 株が抗原特異的に示した IFN- γ 産生は、抗クラス II 抗体、抗 CD 4 抗体、抗 CD 1 3 抗体、抗 CD 1 4 抗体のいずれによっても阻止されなかった。いっぽう抗クラス I 抗体、抗 CD 8 抗体、あるいは抗 HLA-A2 抗体で阻止されたため、CTL は HLA-A2 拘束性の CD8⁺T 細胞であることが示された。なお、各 IFN- γ 産生値は各 CTL 株のターゲット細胞がない場合の IFN- γ 産生値を差し引いたものである。

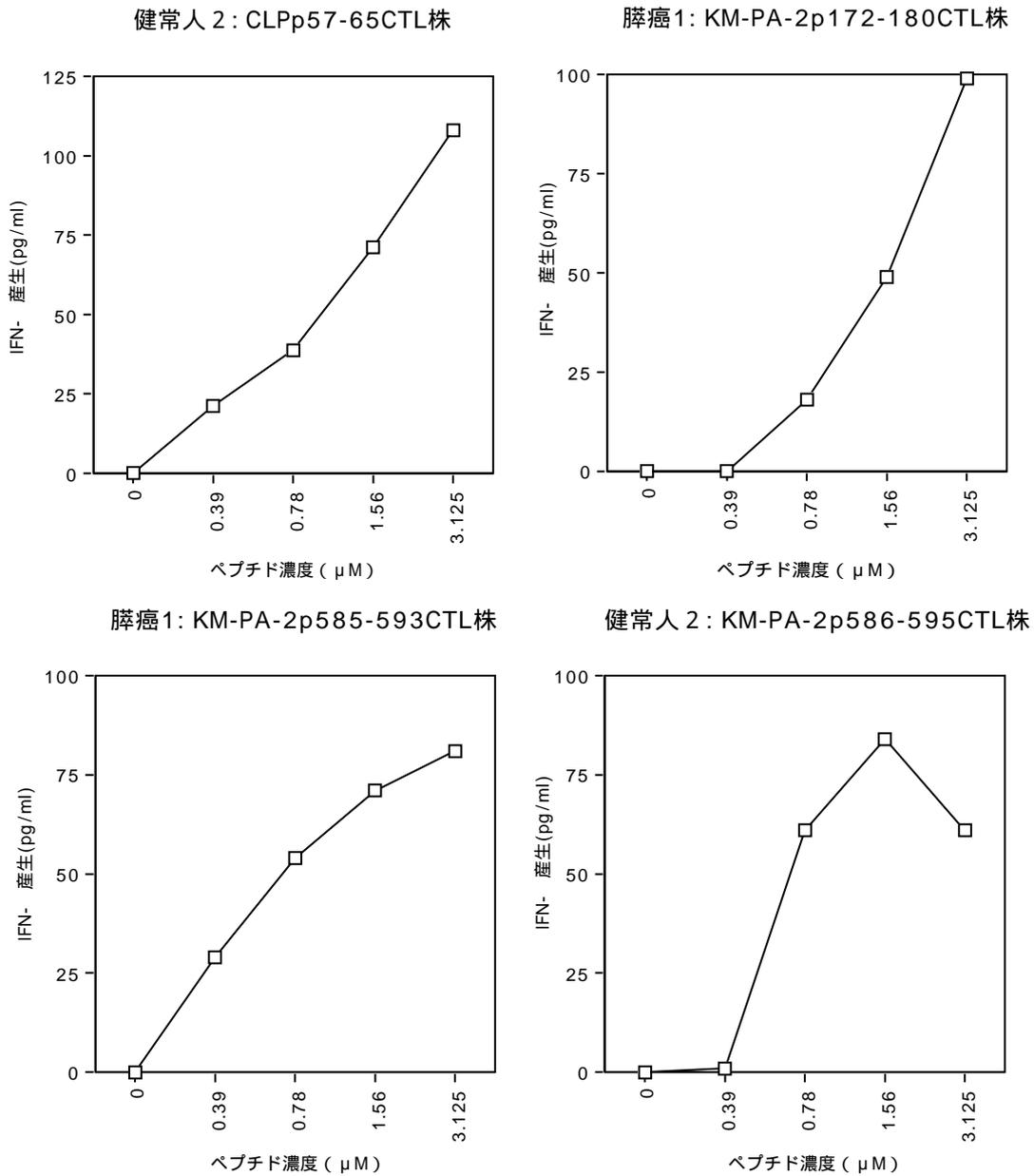


図 20 CTL 株が示す抗原特異的 IFN- 産生のペプチド濃度依存性

4 種類のペプチドで膀胱癌患者、健康人から誘導された CTL 株が抗原特異的に示した IFN- 産生は、各ペプチドの濃度に依存性を示すことが明らかになった。

それとも人類集団中に存在する多型であるのかを確認するために、2種類の膵癌細胞株 (CFPAC-1、panc-1)、2例の膵癌組織および2例の正常膵臓組織から作製した cDNA より、当該部位前後の領域を RT-PCR で増幅し、制限酵素切断片長多型 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) により、両者の識別を試みたが、はっきりとした差が判別できなかった。そこで TA クローニングを行った後にシーケンス解析をして比較した。その結果、1466番目の塩基が、2種類の膵癌細胞株 (CFPAC-1、panc-1)、2例の膵癌組織および2例の正常膵臓組織はいずれも G であった。この結果より、少なくとも変異である可能性は否定された。多型もしくは、ヒト骨髄芽球からとられた KIAA0124 の読み間違いが考えられる。

8 考察

本研究では膵癌を対象として SEREX 解析を行い、18種類の抗原を同定した。その中には CT 抗原は認めなかった。しかし、それらのうちのいくつかは正常組織にも発現するが、癌細胞で発現が増強する遺伝子であった。特に hsp105 は膵癌と大腸癌で高発現を認めた。腫瘍抗原が正常組織にも発現するからといって癌の免疫療法の候補にならないわけではない。例えば、腺癌、扁平上皮癌において CTL を誘導できるエピトープをもつ SART-1 (21)、SART-3 (52)、CypB (53) は mRNA レベルでは正常組織に発現する。メラノーマに関しては、多くの CTL エピトープが正常メラノサイトにも発現する MART-1、gp100、チロシナ - ゼなどに由来している。これらの正常自己ペプチドと IL-2 を併用した免疫療法の結果、自己免疫現象により白斑の出現をみた例もあったが、劇的な治療効果がみられた症例が報告されている (54)。

HER-2/neu は正常組織に発現しているが乳癌や消化器癌で高発現している別の腫瘍抗原である。これを用いた免疫療法の結果、ほとんど副作用もなく治療効果が得られている (55、56)。これらの結果は本研究で同定された、ある種の腺癌細胞に高発現する抗原のあるものは癌免疫療法の標的抗原の候補となりうる可能性を示している。これらの抗原が臨床的に癌の免疫療法において有用であるかどうかについて、ヒトを対象とした研究のみならずマウスなどを用いた動物実験で確認する必要がある。

同定した 18種類の抗原の中で高分子量の熱ショック蛋白質が 2種類あった。1つは apg-2 でもう1つは hsp105 である。両者は hsp110/105 ファミリーに属し、hsp105 は apg-2 とシーケンス上 68%の相同性がある。Apg-2 はマウスではあらゆる臓器に発現しているが特に精巣と卵巣に高発現しており、非ストレス下でも働いている。Hsp105 は hsp105 と 105 からなり、105 は 105kDa の熱ショック蛋白質で、様々なストレスで誘導される。一方 105 は 90kDa で 42 に特異的な熱ショックで誘導される。105 は 105 の mRNA がスプライシングにより産生される 105 より分子量の小さな蛋白である (38)。Hsp105 はマウスでは、ほとんどの臓器で発現しているが特に脳に高発現している (57)。マウスでは胎生期に hsp105 が高発現するため、胎児の発生に何か重要な機能を担っているのかもしれない (58)。またマウスでは hsp105 は hsc70/hsp70 と複合

体を形成しており、これらの蛋白質と何らかの協調的な働きをしている可能性もある(59)。しかしながら apg-2 と hsp105 の働きについてはまだ十分にはわかっていないのが現状である。

一方で hsp70、hsp90、gp96 などの熱ショック蛋白質は、ユビキチン-プロテアソーム系でプロセスされた腫瘍抗原ペプチドなどのペプチドを結合して輸送するシャペロンとしての機能があるため、癌免疫療法に応用できることが示されている。たとえばマウスでは、自己の癌細胞から精製された hsp-ペプチド複合体による免疫療法により、腫瘍反応性 CTL が誘導され治療効果も認められているが自己免疫現象の誘導などの副作用は観察されていない(60)。この結果は、apg-2 や hsp105 もこのような方法で腫瘍免疫療法に使える可能性を示している。

我々は、正常の大腸、膵臓にはほとんど発現していない hsp105 蛋白質が、癌になると驚くほど発現が増強することを発見した。この結果は hsp105 の大腸癌、膵臓における腫瘍マーカーとしての有用性を示している。これを確かめるためには、癌患者と健常人の血清中の hsp105 あるいは抗 hsp105 抗体を ELISA で測定する実験を考慮する必要がある。また、hsp105 蛋白質の癌における発現の増強と発癌との関連性についても今後の検討課題として、興味のもたれるところである。

一般的に、CTL のほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性をもつと信じられている。SEREX 法の欠点は、同定された抗原が CTL のターゲットとなる保証がないことである。IgG クラス抗体の産生にはヘルパーT細胞の関与が必要であり、したがって同定された腫瘍抗原は *in vivo* で少なくともヘルパーT細胞には認識されることが保証されている。腫瘍抗原を認識するヘルパーT細胞が共存するほうが CTL はより効率よく誘導されるが、ヘルパーT細胞の存在は CTL の存在を保証するものではない。しかし、現実には CTL で同定された腫瘍抗原(MAGE-1, tyrosinase)を SEREX 法でも検出できること、また逆に SEREX 法で同定された腫瘍抗原(NY-ESO-1)が抗体産生と CTL を同時に誘導することも、すでに報告されている(31、32)。

今回、SEREX 法により膵臓細胞株由来の cDNA ライブラリーから単離された 2 種類の抗原 (CLP, KM-PA-2) について、大腸癌腫瘍浸潤リンパ球および大腸癌・膵臓癌患者あるいは健常人の PBMC 中にこれらを認識する CTL が存在することが確認された。さらに、これらの抗原中に HLA-A2 拘束性の主要なエピトープを同定した。また、樹立した CTL 株は、膵臓癌細胞を *in vitro* で HLA-A2 拘束性に傷害する活性を有していた。これは、NY-ESO-1 に次いで、SEREX で同定した抗原遺伝子から CTL エピトープを見いだした世界で 2 番目の報告である。今後これらのペプチドを臨床応用にもっていくためには、これらが自己の正常細胞を傷害せず、癌細胞だけを特異的に傷害するかどうかの問題になってくる。今回、自己の PHA 芽球には細胞傷害活性を示さなかったが、自己の B リンパ芽球様細胞株にはある程度の細胞傷害活性を示した。この点に関しては今後 CTL クローンを樹立して、腫瘍抗原ペプチドに反応性を示す CTL クローンが、同時に B 細胞株にも反応するか否かについて検討する必要がある。これらは増殖細胞であるために、正常細胞として正しいコントロールになるかどうかは明らかではないが、現時点では自己反応性の検証として参考になるデータであると考えられる。

今回、CTL エピトープを同定できた 2 種類の腫瘍抗原は、ともに正常組織にも発現している自己抗原であった。さらに、健常人の PBMC 中にもこれらのエピトープを認識する CTL が存在することも

示された。したがって少なくとも、健常人の正常細胞の表面にこれらのペプチドを結合する HLA クラス I 分子が多数存在し、CTL がこれを認識して自己免疫を刺激しているということは考えにくい。一方、癌細胞株がこれらの CTL により傷害を受けるのも事実である。久留米大学で進行癌患者に対するペプチドワクチンによる抗腫瘍免疫療法の臨床試験が進んでいるが、すべて自己抗原ペプチドである。しかし現在までのところ、明らかな臨床効果はみられていないものの重篤な有害事象も観察されていない。ただしペプチドワクチンにより、末梢血中のペプチド特異的 CTL の数は明らかに増加している。

元来、SEREX 法は癌患者の血清中の抗体を利用して癌抗原を同定しようという試みであるが、その研究成果として膜蛋白質のみでなく、細胞質や核内の蛋白質、すなわち、あらゆる蛋白質に対して抗体が産生されることが示された。癌細胞が常に破壊され、細胞内の蛋白質が免疫系に暴露され、免疫応答を惹起している可能性が考えられる。この現象が、生体にとってどういう意味をもつのかについては、今後の重要な検討課題として残された。

以上の結果は、本研究で同定した腫瘍抗原が将来的に癌の診断や治療において有用となる可能性を示すものである。

9 おわりに

アロ腫瘍細胞株から樹立された cDNA 発現ライブラリーを、1 例の腫瘍患者に由来する血清を用いてスクリーニングすることにより、18 種の腫瘍抗原遺伝子を同定することができた。これらはいずれも正常腫瘍にも発現するものであったが、多くの遺伝子において腫瘍細胞株における発現が正常腫瘍よりも強かった。なかでも、hsp105 は、免疫組織化学的検索により、腫瘍細胞に特異的に高発現を認め、同様の現象は大腸癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌などの消化器癌においても観察された。とりわけ、大腸癌においては、癌特異的な hsp105 の高発現を認めた。これらの結果は、この方法で同定した癌抗原が、腫瘍のみならず、大腸癌、胃癌、食道癌、肝細胞癌における腫瘍細胞の同定や免疫療法に有用である可能性を示している。さらには、血中に漏出した腫瘍由来の hsp105 あるいは抗 hsp105 抗体の測定により、腫瘍の存在や治療への反応を検出できる有望な腫瘍マーカーとなりうる可能性が期待できる。また、モノクローナル抗 hsp105 抗体による癌の進展範囲や転移の診断といった癌の診断に利用できる可能性をも示している。2 種類の抗原 (CLP, KM-PA-2) については、大腸癌腫瘍浸潤リンパ球および大腸癌あるいは腫瘍患者と健常人の PBMC 中にこれらを認識する CTL が存在することが確認され、樹立した CTL 株は、腫瘍細胞を *in vitro* で HLA-A2(A*0201)拘束性に傷害する活性を有していた。本研究で同定したこれらの抗原中の HLA-A2 拘束性の CTL エピトープは、今後、ペプチドワクチンとしての抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を期待させる。

今後、これらの抗原の癌の診断ならびに抗腫瘍免疫療法への応用の可能性について、さらに検討していきたいと考えている。

12 参考文献

1. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287-299, 1994
2. Berke, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphomolecular and cellular aspects. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 735-773, 1994
3. Lanier, L.L. and Phillips, J.H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol. Today* 17:86-91, 1996.
4. York, I. A. and Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 369-396, 1996
5. Heemels, M. T. and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 463-491, 1995
6. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition region of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518, 1987
7. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R. and Wiley, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353: 326-329, 1991
8. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296, 1991
9. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 181-207, 1994
10. Rammensee, H. G., Friede, T. and Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228, 1995
11. Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 277-319, 1991
12. Janeway, Jr. C. A. and Travers, P. 免疫生物学: 4. T リンパ球による抗原認識 (笹月健彦 監訳) pp.125-173, 南江堂, 1988
13. Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39, 1993
14. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221, 1994
15. Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. and Levitsky, H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264: 961-965, 1994
16. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
17. van den Eynde, B. J. and van der Bruggen, P. T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 684-693, 1997
18. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T. and Rosenberg, S. A. Cloning of the gene for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cell infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3515-3519, 1994
19. Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. Human tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Res.* 16: 313-339, 1997
20. Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F. and Slingluff, C. L. Identification of a peptide recognized by five melanoma specific human cytotoxic T cell

lines. *Science* 264: 716-719, 1994

21. Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H. and Itoh, K. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 277-288, 1998
22. Wang, R. F., Wang, X., Atwood, A. C., Topalian, S. L. and Rosenberg, S. A. Cloning genes encoding MHC classII-restricted antigens : mutated CDC 27 as a tumor antigen. *Science* 284: 1351-1354, 1999
23. Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F. and Topalian, S. L. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4 (+) T cells. *J. Exp. Med.* 189: 757-766, 1999
24. Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. and White, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med.* 4: 321-327, 1998
25. Jager, E., Jager, D. and Knuth, A. CTL-defined cancer vaccines : perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev.* 18: 143- 150, 1999
26. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, N. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bours, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauvain, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P. and Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A 1. *Int. J. Cancer* 80: 219-230, 1999
27. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4: 328-332, 1998
28. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 11810-11813 , 1995.
29. Old, L. J. Cancer immunology : the search for specificity-G.H.A. Lowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 41: 361-375, 1981
30. Utsumi, K. R., Yoshida, T. O., Sekikawa, M. and Klein, G. Antibodies to cell iraganooids in the sera of nasopharyngeal carcinoma patients. *Scand. J. Immunol.* 2: 159-171, 1973
31. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1914-1918, 1997
32. Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J. and Knuth, A. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 187: 265-270, 1998
33. Sahin, U. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709-716, 1997
34. Tureci, O., Sahin, U. and Pfreundschuh, M. Serological of human tumor antigens : molecular definition and implications. *Mol. Med. Today* 3: 342-349, 1997
35. Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 337-365, 1994
36. Huang, L. Q., Brasseur, F., Serrano, A., De Plaen, E., van der Bruggen, P., Boon, T. and Van Pel, A. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A 10 on a human melanoma. *J Immunol.* 162: 6849-6854, 1999

37. Tureci, O., Sahin, U., Schobert, I., Koslowski, M., Scmitt, H., Schild, H. J., Stenner, F., Seitz, G., Rammensee, H. G., and Pfreundschuh, M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res.* 56: 4766-4772, 1996
38. Tureci, O., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., and Pfreundschuh, M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5211-5216, 1998
39. Chen, Y. T., Gure, A. O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A. and Old, L. J. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6919-6923, 1998
40. Stockert, E., Jager, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., and Old, L. J. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187: 1349-1354, 1998
41. Jager, E., Stockert, E., Zidianakis, Z., Chen, Y. T., Karbach, J., Jager, D., Arand, M., Ritter, G., Old, L. J. and Knuth, A. Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1 : correlation with clinical events. *Int J Cancer* 84: 506-510, 1999
42. Scanlan, M. J., Chen, Y. T., Williamson, B., Gure, A. O., Stockert, E., Gordan, J. D., Tureci, O., Sahin, U., Pfreundschuh, M. and Old, L. J. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int. J. Cancer* 76: 652-658, 1998
43. Iwamura, T., Taniguchi, S., Kitamura, N., Yamanari, H., Kojima, A., Hidaka, K., Setoguchi, T. and Katsuki, T. Correlation between CA19-9 production in vitro and histological grades of differentiation in vivo in clones isolated from a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2). *J. Gastroenterol .Hepatol.* 5: 512-519, 1992
44. Kaneko, Y., Kimura, T., Kishishita, M., Noda, Y. and Fujita, J. Cloning of apg-2 encoding a novel member of heat shock protein 110 family. *Gene* 189: 19-24, 1997
45. Pestov, D.G., Grzeszkiewicz, T.M. and Lau, L.F. Isolation of growth suppressors from a cDNA expression library. *Oncogene* 17:3187-97, 1998
46. Chen, K. S., Manian, P., Koeuth, T., Potocki, L., Zhao, Q., Chinault, A. C., Lee, C. C. and Lupski, J. R. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat. Genet.* 17: 154-163, 1997
47. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24, 1982
48. Debus, E., Moll, R., Franke, W. W., Weber, K. and Osborn, M. Immunohistochemical distinction of human carcinomas by cytokeratin typing with monoclonal antibodies. *Am.J. Pathol.* 114: 121-130, 1984
49. Mikayama, T., Nakano, T., Gomi, H., Nakagawa, Y., Liu, Y. C., Sato, M., Iwamatsu, A., Ishii, Y., Weiser, W. Y. and Ishizaka, K. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding glycosylation-inhibiting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10056-10060, 1993
50. Kudo, S., Mattei, M. G. and Fukuda, M. Characterization of the gene for dbpA, a family member of the nucleic-acid-binding proteins containing a cold-shock domain. *Eur. J. Biochem.* 231: 72-82, 1995
51. Ishihara, K., Yasuda, K. and Hatayama, T. Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochim. Biophys. Acta* 1444: 138-142, 1999
52. Yang, D., Nakao, M., Shichijo, S., Sasatomi, T., Takasu, H., Matsumoto, H., Mori, K., Hayashi, A., Yamana, Y., Shirouzu, K. and Itoh, K. Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res.* 59: 4056-4063, 1999
53. Gomi, S., Nakao, M., Niiya, F., Imamura, Y., Kawano, K., Nishizaka, S., Hayashi, A., Sobao, Y., Oizumi, K. and Itoh, K. A cyclophilin B gene encodes antigenic epitopes recognized by HLA-A24-restricted and tumor-specific CTLs. *J. Immunol.* 163: 4994-5004, 1999
54. Kawakami, Y. Identification of human melanoma antigens recognized by tumor infiltrating T lymphocytes and their use for immunotherapy. *In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy,"* ed. K. Kikuchi, B. J. van den Eynde and N. Sato, pp. 179-189 1999. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

55. Baselga, J. and Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 29: 127-138, 1994
56. Disis, M. L. and Cheever, M. A. Oncogenic proteins as tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 637-642, 1996
57. Yasuda, K., Nakai, A., Hatayama, T. and Nagata, K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *J. Biol. Chem.* 270: 29718-29723, 1995
58. Yasuda, K., Ishihara, K., Nakashima, K. and Hatayama, T. Genomic cloning and promoter analysis of the mouse 105-kDa heat shock protein (HSP105) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 75-80, 1999
59. Hatayama, T., Yasuda, K. and Yasuda, K. Association of HSP105 with HSC70 in high molecular mass complexes in mouse FM3A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 395-401, 1998
60. Udono, H., Suto, R., Tamura, Y., Matsutake, T. and Srivastava, P. K. Heat shock proteins in cancer immunotherapy. *In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy,"* ed. K. Kikuchi, B. J. van den Eynde and N. Sato, pp. 201-209, 1999. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.