

19980390

ヒト癌拒絶抗原遺伝子同定と  
癌ワクチン開発

(H10-ゲノム-003)

平成10年度厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)  
研究成果報告書

平成11年3月

主任研究者 伊東恭悟  
(久留米大学医学部教授)

## はしがき

本研究では、平成10年度厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）をうけ、ヒト癌拒絶抗原遺伝子同定と癌ワクチン開発の研究がなされた。

本報告書は、これまでに得られた研究成果をまとめたものである。

### 研究組織

主任研究者：伊東恭悟（久留米大学医学部免疫学・教授）

分担研究者：山名秀明（久留米大学医学部外科学・助教授）

### 補助金交付額

平成10年度 金30,000,000円

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総括研究報告書

ヒト癌拒絶抗原遺伝子同定と癌ワクチン開発

主任研究者 伊東恭悟 久留米大学医学部免疫学

研究要旨 日本人に多発するヒトHLA-クラス I 拘束性上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌拒絶抗原遺伝子をクローニングした。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるin vitroにおけるキラーT細胞誘導能を解析した。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子（SART-1～SART-3は新規、SART-4は既知）一方、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子（2つは新規、1つは既知の遺伝子）をクローニングし、それらのコードする蛋白を解析し、CTL誘導能を持つペプチドを10種類以上同定した。SART-1抗原は扁平上皮癌の60～80%、乳癌を除く腺癌の40～50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍に発現していた。一方、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていなかった。SART-1、SART-2及びSART-3抗原の中に患者リンパ球よりCTL誘導可能なペプチド分子を各々2個、2個及び3個同定した。また、腺癌より同定したサイクロフィリンB分子、ART-1、ART-4分子もSART抗原と同様に上皮性癌に高発現していた。サイクロフィリンB分子中CTL誘導可能な分子を2か所同定した。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A2402は日本人の60%が保有している。これらより、本邦における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられた。山名秀明分担研究者を中心に本久留米大学において平成11年度より上記ペプチドを用いての第1相臨床試験を計画中である。

分担研究者

山名秀明（久留米大学医学部外科学 助教授）

A.研究目的

本研究の主目的はヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングし、上皮性癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異免疫療法の標的分子を開発することである。本邦において多発する癌、即ち肺癌、消化管癌（食道、胃、大腸癌）、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病を主な対象とし、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌に絞って研究する。上皮性癌は我が国における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみでなく世界にも最も頻発する癌である。またHLAとしては本邦でも発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、及びHLA-A26（約2割）抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定を目指す。次いでHLA-A11（2割）、-A31（2割弱）、-A33（2割弱）

を対象とする。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有するのみならず、上記HLAアレルは人種をこえて広く認められる。したがって本研究により癌拒絶抗原遺伝子が同定され宿主によって認識されるペプチド抗原分子機構解明に大きく貢献するものと考えられる。さらに本研究で開発された癌ワクチンが臨床応用された場合、世界レベルで、上皮性癌特異免疫療法として活用されるものと考えられる。

B.研究方法

1) 癌局所浸潤Tリンパ球のIL-2存在下での大量培養、もしくは末梢Tリンパ球を自家癌にて刺激することによりヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングした。遺伝子クローニングにはT. Boonらの開発したgene-expression cloning法の改良法を用いた。  
2) 癌腫としては日本人に多発する上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）を主な対象とし、HLAとしてはHLA-クラス I 抗原を主対象と

して、その中で本邦で発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、HLA-A26（約2割）拘束性のCTL認識性癌退縮抗原とペプチドの同定を実施中である。

3) 上記癌拒絶抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現はポリクローナル抗体とウエスタンブロット法により実施した。mRNAレベルでの発現はノーザンブロット法によって解析した。癌種としては肺癌、頭頸部癌、脳腫瘍、食道癌、胃癌、乳癌、肝癌、大腸癌、骨腫瘍、腎癌、子宮癌、白血病及び卵巣癌にて解析した。

4) 上記にて同定した癌拒絶抗原内に存在するCTL株により認識されるペプチド抗原を同定し、それらを合成して癌患者リンパ球よりHLA拘束性キラーT細胞誘導能の有無を解析し、癌ワクチンとしての臨床応用の可能性について基礎的研究を実施した。

5) キラーT細胞誘導能の明かなペプチドについては臨床応用可能なグレードのペプチド（GMPグレード）を米国MPS社に依頼し2~4g作製中である。安全性やこれらの精製度などを確認後、第1相臨床試験に供する予定である。第1相臨床試験では有害事象の有無とキラーT細胞誘導能の有無を主目的として山名秀明分担研究者を中心として本久留米大学にて実施する。

6) また上記癌拒絶抗原分子の生理的機能を解析する。例えば、SART-1遺伝子をcos細胞に過剰発現させると細胞はM期に集積した後アポトーシスに陥るが、M期においてアポトーシスを誘導する分子機構について解析する。より具体的にはa) 125kd核内蛋白SART-1800が結合する相手方DNAシークエンスの解明b) 同SART-1蛋白が結合する蛋白をfar western法及びtwo hybrid法にて同定、及びc) 43kd細胞質内蛋白SART-1259の機能、特にSART-1800蛋白の核内での機能を抑制するか否かについて、mutant SART-1259の遺伝子を作成し、SART-1800geneとのco-transfection等にて検討する。第2にSART-1800、SART-1259蛋白に対するモノクローナル抗体を作成し、両者の各種組織細胞における発現や局在を明らかにする。SART-2、SART-3、ART-1、ART-4等の新規の遺伝子の生理的機能等についても同様の分子生物学的手法にて解明する。

### C. 研究結果

我々は日本人に多発するヒトHLA-クラスI拘束性上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）に

対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌拒絶抗原遺伝子をクローニングした。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるin vitroにおけるキラーT細胞誘導能を解析した。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子（SART-1、SART-2、SART-3は新規、SART-4は既知）一方、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子（ART-1、ART-4は新規、他の1つは既知の遺伝子）をクローニングし、それらのコードする蛋白を解析し、CTL株に認識され、かつ癌患者リンパ球よりCTL誘導能を持つペプチドを10種類以上同定した。主な研究結果は具体的には以下の如くである。

1.SART-1癌拒絶抗原遺伝子：1) SART-1遺伝子導入が癌細胞に選択的アポトーシスをp53非依存性に誘導することを見出した。癌ワクチン開発研究においてはHLA-A24拘束性ペプチド（SART-1690-698）が強いCTL誘導能を有することを見出した。2) アジュバントを決定する目的でSART-1690-698ペプチドによるCTL誘導の至適条件を各種サイトカインを用いて明らかにした。3) HLA-A26拘束性ペプチドSART-1736-744がHLA-A2601、-A2602、-A2603癌患者いずれからもCTLを誘導することを見出した。

2.SART-2癌拒絶抗原遺伝子：100kdのSART-2抗原が扁平上皮癌粗面小胞体内に選択的に発現していることを明らかにするとともに、同抗原内にHLA-A24<sup>+</sup>癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つのnonapeptideを同定した。

3.SART-3癌拒絶抗原遺伝子：140kdのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現することを明らかにした。同抗原内にHLA-A24<sup>+</sup>癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つのnonapeptideを同定した。

4.HLA-A24拘束性肺腺癌患者由来CTL株により認識される拒絶抗原遺伝子：1) 3つの遺伝子をクローニングして、そのうち1つは既知（サイクロフィリンB）、2つは新規であったため、Adenocarcinoma Antigen Recognized by T cells -1/-4（ART-1、ART-4）と仮名した。2) サイクロフィリンB分子内にHLA-A24<sup>+</sup>白血病患者リンパ球よりCTLを誘導するnonapeptideを2か所同定した。さらに同サイクロフィリンBペプチドの改変体はより強いCTL誘導能を持つことを明らか

にした。一方、これらの癌拒絶抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現は以下の如くであった。SART-1抗原は扁平上皮癌の60~80%、乳癌を除く腺癌の40~50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍に発現していた。一方、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていなかった。SART-1、SART-2及びSART-3抗原の中に患者リンパ球よりCTL誘導可能なペプチド分子を各々2個、2個及び3個同定した。また、腺癌より同定したサイクロフィリンB分子、ART-1、ART-4分子もSART抗原と同様に上皮性癌に高発現していた。サイクロフィリンB分子中CTL誘導可能な分子を2か所同定した。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A2402は日本人の60%が保有している。これらより、本邦における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられる。したがって、現在上記ペプチドを用いての第1相臨床試験を計画中である。

#### D. 考察

1) これまでに同定した癌拒絶抗原の生理的機能及びHLA-クラスI分子上に提示される生物学的意義についての考察：従来、癌細胞上に発現される抗原は自己抗原ではなく癌細胞に特異的に発現する抗原と想定されていた。確かにそのような抗原もこれまでに同定されたが、メラノーマ等においては自己抗原が主として同定されている。本研究により同定された癌共通抗原はすべて自己抗原であり、正常組織には蛋白レベルで発現されておらず、癌細胞に選択的に発現されているものであった。mRNAレベルでは普遍的に発現されているのでpost-transcriptionalもしくはpost-translationalな調節が上記の癌拒絶抗原においては行われている可能性が高く、今後の研究課題として重要と考えられる。従って新規に同定したSART-1、SART-2、SART-3、ART-1及びART-4遺伝子の生理的機能の解明は不可欠と考えられ、現在その研究を遂行中である。これまでのところSART-1は細胞分裂期においてMPC（サイクロフィリンB1及びcdc2）の活性化に参与している可能性が示唆され、またSART-2蛋白は粗面小胞体内で作用している可能性が示唆されている。一方、SART-3蛋白は、癌化に伴う核内移動が認められ、RNA結合能を有し、かつtwo-hybrid

法により、RNA結合能を持つ他の既知分子と結合する成績が最近得られた。したがってSART-3も細胞増殖に関与する蛋白と考えられる。

これらの抗原の生理的機能の解明が前提であるが、HLA-クラスI分子上に提示される生理的意義についても解明される必要があるものと思われる。これまでに同定した7つの抗原分子のいずれもが細胞増殖と何らかの関連が示唆されている。したがって、増殖細胞の免疫系による監視機能の一つとして、HLA-クラスI分子間の溝（Bjorkmaの溝）にペプチド分子として提示された可能性も示唆され、今後の実証すべき仮説と思われる。

2) これまでに同定した癌拒絶抗原の癌ペプチドワクチンとしての臨床応用についての考察：山名秀明分担研究員による考察を参照して下さい。

3) 新規癌拒絶抗原遺伝子の同定：これまでは主としてHLA-A24拘束性CTL株を用いて抗原遺伝子の同定を実施し、一定の研究成果（7つの遺伝子、うち5つの新規）が得られた。さらにSART-5を同定しかつ、胃癌局所からのHLA-A24拘束性CTL株による腺癌拒絶抗原遺伝子をも同定した。HLA-A24は日本人の6割を占めるアレルである。したがって今後さらに多くの遺伝子を同定する予定である。

一方、HLA-A2拘束性CTL株により認識される癌拒絶抗原遺伝子の同定はこれまでに成功していない。不成功の原因の一つとして、HLA-A2サブタイプの問題がある。即ち日本人の場合のHLA-A2は多くのサブタイプ（0201、0206、0207、0211等）に細分化され、ペプチド結合能も各々異なる。サブタイプの認定には個々にDNAシーケンスが必要であり、CTL株、癌細胞株さらには患者リンパ球のすべてにおいてサブタイピングが必要となる。しかしながら、これまでにHLA-A0206及び-A0207拘束性CTL株を食道癌及び大腸癌局所より樹立したのでそれらを用いてgene-expression cloning法により拒絶抗原遺伝子を同定中である。

HLA-A24、-A2、HLA-A26について多いHLA-クラスI Aアレル（A11、A31、A33）に拘束されるCTL株の樹立については今後の課題として残されている。

#### E. 結論

上皮性癌拒絶抗原遺伝子を7種類（5つは

新規、2つは既知の遺伝子) クローニングした。それらが蛋白レベルで各種癌に選択的かつ高頻度に発現していることを明らかにした。またそれらの拒絶抗原内にコードされるHLA-A24結合性ペプチドのうちキラーT細胞により認識される抗原を同定し、かつその中で10種類以上の合成ペプチドがHLA-A24陽性癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有することを見出した。またHLA-A26陽性癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有するSART-1ペプチド構造も決定した。これらより、上記ペプチドは臨床応用の可能性が考えられ山名秀明分担研究者を中心として本久留米大学における第1相臨床試験を平成11年度に実施予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shichijo, S., Nakao, T., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H., Itoh, K. A Gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187, 277-288, 1998.
- 2) Eton, O., Kharkevitch, D. D., Gianan, M. A., Ross, I., Mansfield, P. F., Lee, J. E., Itoh, K., Pride, M., Bedikian, A. C., Papadopoulos, N. E., Plager, C., Legha, S., Benjamin, R. S., and Balch, C. M. Active immunotherapy with ultraviolet-B irradiated autologous whole melanoma cells plus Detox<sup>TM</sup> in patients with metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research.* 4, 619-627, 1998.
- 3) Higuchi, T., Seki, N., Kamizono, S., Yamada, A., Kimura, A., Kato, H., Itoh, K. Polymorphism of the 5'-flanking region of human tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  gene in Japanese. *Tissue Antigen.* 51, 605-612, 1998.
- 4) Suekane, S., Nakao, M., Inoue, M., Noda, S., Itoh, K., Histocompatibility leukocyte antigen-2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from tumor-infiltrating lymphocytes of a patient with testicular embryonal cancer. *JJCR*, 88, 1180-1189, 1998.
- 5) Takagi, T., Hiraki, A., Uenaka, A., Gomi, S., Itoh, K., Udono, H., Shibuya, A., Tsuji,

T., Sekiguchi, S., and Nakayama, A., Variable expression on lung cancer cell lines of HLA-A2-binding MAGE-3 peptide recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncology.* 12: 1103-1109, 1998.

6) Gotoh, M., Shichijo, S., Hoshino, T., Imai, Y., Imaizumi, T., Inoue, Y., Takasu, H., Yamaoka, T., Itoh, K. Sequence Analysis of genes encoding rodent homologues of the human tumor-rejection antigen SART-1. *JJCR*, 89, 849-855, 1998.

7) Kawamoto, M., Shichijo, S., Imai, Y., Imaizumi, T., Koga, T., Yanaga, H., Itoh, K. Expression of the SART-1 tumor-rejection antigen in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 80, 64-67, 1998.

8) Matsumoto, M., Shichijo, S., Kawano, S., Nishida, T., Sakamoto, M., Itoh, K. Expression of the SART-1 antigens in uterine cancers. *JJCR*, 89, 1292-1295, 1998.

9) Yamada, A., Kubo, K., Takeshita, T., Harashima, N., Kawano, K., Sagawa, K., Sugamura, K., Itoh, K. Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CDw108. *J. Immunology.* 152; 4094-4100, 1999.

10) Kikuchi, M., Nakao, M., Inoue, Y., Matsunaga, K., Shichijo, S., Yamana, H., Itoh, K., Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing the HLA-A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 81, 459-466, 1999.

11) Oiso, M., Eura, M., Takiguchi, M., Sobao, Y., Masuyama, K., Nakashima, M., Itoh, K., and Ishikawa, T. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer.* 81, 387-394, 1999.

12) Yamada, A., Kawano, K., Harashima, N., Niiya, F., Nagai, K., Kobayashi, T., Ushijima, K., Nishida, T., and Itoh, K. Study of HLA-class I-restriction and directed antigens of cytotoxic T lymphocytes at the tumor sites of ovarian cancer. *Can. Immunol. Immunotherapy.*

in press, 1999.

13) Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Hayashi, A., Yamana, H., and Itoh, K., A gene encoding squamous cell carcinoma antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. In: Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy (Gann Monograph on Cancer Research No. 48). (eds) Kikuchi, K., and Sato, T. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1999, in press.

14) Itoh, K., Shichijo, S., Inoue, Y., Hayashi, A., Toh, U., Yamana, H., SART1 gene encoding squamous cell carcinoma antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. In: Cell Therapy. (eds) Ikeda, Y., and Kawakami, Y. Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, 1999, in press.

15) 七條茂樹、今井康久、中尾真修、林明宏、山名秀明、伊東恭悟：ヒト扁平上皮がん抗原遺伝子、SART-1. 細胞工学17(8)：1216-1222, 1998.

16) 伊東恭悟：扁平上皮癌拒絶抗原SART-1の同定と臨床応用. *Molecular Medicine* 35 (9)：1084-1091, 1998.

17) 河上 裕、伊東恭悟、珠玖 洋、中山睿一：新しい癌抗原特異的免疫療法の開発に向けて. *Molecular Medicine* 35 (9)：1100-1119, 1998.

18) 伊東恭悟、山田 亮、新谷文彦、片岡明生、河野光一郎、西田 敬：上皮性悪性腫瘍に対する特異免疫の存在と癌ワクチンの開発. *癌治療と宿主* 10 (2)：57 (169)-64 (176), 1998.

19) 伊東恭悟：上皮性悪性腫瘍に対する特異免疫. *西日泌尿* 60：185-190, 1998.

20) 伊東恭悟：各種癌における腫瘍マーカーとしての血中MAGE-4抗原の測定. *臨床成人病* 28 (10)：1265-1266, 1998.

21) 中尾真修、七條茂樹、伊東恭悟：扁平上皮癌における癌拒絶抗原. *Biotherapy* 12 (9)：1220-1226, 1998.

22) 中尾真修、伊東恭悟：癌ワクチン—扁平上皮癌における癌拒絶抗原— 外科治療

79 (5) 586-589, 1998.

23) 伊東恭悟、七條茂樹、山名秀明：ヒト癌特異的キラーT細胞により認識される抗原1—癌特異的キラーT細胞の存在とメラノーマ拒絶抗原遺伝子の同定— *Immunology Frontier* 9 (2) 57 (129) -68 (140), 1999.

24) 伊東恭悟、七條茂樹、山名秀明：癌特異的キラーT細胞により認識される抗原2.—扁平上皮癌拒絶抗原SART-1及びペプチドワクチン— *Immunology Frontier*, 1999, in press.

## 2.学会発表

1) 伊東恭悟、山名秀明、七條茂樹、中尾真修、五味慎也、今井康久：抗原ペプチド；上皮性癌ワクチンとしての可能性. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

2) 七條茂樹、今井康久、古賀稔啓、中尾真修、伊東恭悟：乳癌における癌拒絶抗原SART-1の発現. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

3) 今井康久、七條茂樹、片山貴文、笹富輝男、原田健司、山名秀明、伊東恭悟：扁平上皮癌由来癌拒絶抗原遺伝子SART-1の生物学的機能解析. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

4) 五味慎也、菊地 慈、中尾真修、林明宏、伊東恭悟：SCYLP由来ペプチドのHLA-A24拘束性白血病ワクチン療法への応用. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

5) 楊 大木、七條茂樹、中尾真修、伊東恭悟：腫瘍特異的CTLによって認識される癌拒絶抗原遺伝子、SART-3の同定. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

6) 河野光一郎、五味慎也、片山貴文、伊東恭悟：HLA-A2402拘束性CTLにより認識される膀胱癌由来遺伝子及び抗原ペプチドの同定. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

7) 松永和子、菊地 慈、中尾真修、七條茂樹、伊東恭悟：SART-1抗原内に存在するHLA-A24+患者に対する癌ワクチンペプチド

の同定. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

8) 井上佳子、中尾真修、七條茂樹、伊東恭悟: HLA-A26拘束性キラーT細胞により認識されるSART-1抗原ペプチドの解析. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

9) 今泉登史宏、中尾真修、菊地 慈、井上佳子、松永和子、伊東恭悟: HLA-A24拘束性癌拒絶抗原 (SART-2) の解析. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

10) 伊東恭悟: 上皮性癌に対する癌ワクチン分子の同定と臨床応用. 第25回日本医学会総会、1999年4月、東京.

11) 由谷 茂、中尾真修、井上佳子、七條茂樹、伊東恭悟: ヒト肝細胞癌におけるSART-1蛋白の発現と、抗原ペプチドによるCTLの誘導. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

12) 関 直子、樋口貴文、神菌慎太郎、伊達是志、山田研太郎、木村彰方、越智隆弘、望月 學、鈴木隆二、伊東恭悟: 各種疾患におけるTNF $\alpha$ 遺伝子プロモーター・エンハンサー領域多型の解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

13) 河野光一郎、五味慎也、田中耕二、伊東恭悟: 肺腺癌局所T細胞由来HLA-A2402拘束性CTL株により認識される癌抗原遺伝子 (ART-4) の同定とペプチドの解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

14) 楊 大木、七條茂樹、中尾真修、高須秀夫、伊東恭悟: ヒト扁平上皮癌患者由来CTLによってHLA-A24拘束性に認識される抗原ペプチドをコードする遺伝子. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

15) 五味慎也、原田健司、河野光一郎、伊東恭悟: 肺腺癌局所T細胞由来HLA-A2402拘束性CTL株により認識される癌抗原遺伝子 (ART-1) の同定とペプチドの解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

16) 小林照忠、中尾真修、高須秀夫、原嶋奈々江、七條茂樹、伊東恭悟: HLA-A2拘束性キラーT細胞により認識されるSART-1ペプチドの解析. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

17) 笹富輝男、唐 宇飛、新谷文彦、山名秀明、白水雄、伊東恭悟: ヒト大腸癌組織における癌拒絶抗原SART-1の発現. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

18) 松本 一、河野光一郎、七條茂樹、西田 敬、伊東恭悟: ヒト子宮癌における癌拒絶抗原SART-1蛋白の発現. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

19) 山田 亮、原嶋奈々江、河野光一郎、竹下敏一、菅村和夫、伊東恭悟: 新しい細胞接着分子CDw108の遺伝子クローニング. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

20) 平山謙二、S. LOOAREESUMAN、菊池三穂子、鈴木富美、会田かやの、K. NABANCHANG、曾根敏雄、J. KARBWANG、木村彰方、伊東恭悟、神田鍊蔵、相川正道: 重症マラリア (脳マラリア) 感受性とHLAクラスI、TNF $\alpha$ プロモーター、CD31 (PECAM) 多型との相関. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

1) 出願番号10-126398

「ヒト癌退縮抗原タンパク質」

(発明者及び特許出願人)

2) 出願番号10-178449

「サイクロフィリンB由来の腫瘍抗原ペプチド」

(発明者及び特許出願人)

3) 出願番号10-196152

「SART-1由来の腫瘍抗原ペプチド」

(発明者及び特許出願人)

4) 出願番号10-212940

「SART-1由来のHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペプチド」



(発明者及び特許出願人)

5) 出願番号 10-242660

「新規な腫瘍抗原タンパク質SART-3、およびその腫瘍抗原ペプチド」

(発明者及び特許出願人)

6) 出願番号 10-291702

「ヒト癌退縮抗原タンパク質」 (ART-4)

(発明者及び特許出願人)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
分担研究報告書

ヒト癌拒絶抗原遺伝子同定と癌ワクチン開発

分担研究者 山名秀明 久留米大学医学部外科学

研究要旨 主任研究者と共同で同定したSART-1～SART-4及びART-4癌拒絶抗原の各種癌組織及び正常組織における発現を解析した（肺癌、食道癌、頭頸部癌、胃癌、乳癌、大腸癌、肝癌など）。その結果、いずれの癌拒絶抗原も各種癌組織において高率に発現（40～80%以上）しており、一方で正常組織においては辜丸を除き全く発現が認められなかった。また、上記癌拒絶抗原分子によりコードされるHLA-A24拘束性ペプチド抗原により各種癌患者末梢リンパ球よりのキラーT細胞誘導能を解析し、SART-1では3ペプチド（2つはHLA-A24拘束性、他の1つはHLA-A26拘束性）、SART-2では2ペプチド、SART-3では2ペプチド、SART-4では2ペプチド、サイクロフィリンBでは4ペプチド（うち改変体が2つ）を同定した。HLA-A24及び及び-A26アレルは日本人において各々60%及び22%に発現されている。以上より上記ペプチドは日本人の多くの癌患者に癌ペプチドワクチンとして応用可能と考えられ、平成11年度より本学において順次第1相臨床試験を実施する予定である。

A.研究目的

本研究の主目的はヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌拒絶抗原遺伝子をクローニングし、上皮性癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異免疫療法の標的分子を開発することである。本邦において多発する癌、即ち肺癌、消化管癌（食道、胃、大腸癌）、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病を主な対象とし、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌に絞って研究する。上皮性癌は我が国における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみでなく世界にも最も頻発する癌である。またHLAとしては本邦でも発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約4割）、及びHLA-A26（約2割）抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定を目指す。次いでHLA-A11（2割）、-A31（2割弱）、-A33（2割弱）を対象とする。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有するのみならず、上記HLAアレルは人種をこえて広く認められる。したがって本研究により癌拒絶抗原遺伝子が同定され宿主によって認識されるペプチド抗原分子機構解明に大きく貢献するものと考えられる。さらに本研究で開発された癌ワクチンが臨床応用された場合、世界レベルで、上皮性癌特異免疫療法として活用されるものと考えられる。

B.研究方法

- 1) 癌局所浸潤Tリンパ球のIL-2存在下での大量培養、もしくは末梢Tリンパ球を自家癌にて刺激することによりヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製する。
- 2) 癌腫としては日本人に多発する上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）を主な対象とし、HLAとしてはHLA-クラスI抗原を主対象として、その中で本邦で発現頻度の高いHLA-A24（癌患者の約6割）、HLA-A2（約2割）拘束性のCTL認識性癌退縮抗原とペプチドの同定を実施中である。
- 3) 上記癌拒絶抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現はポリクローナル抗体とウエスタンブロット法により実施した。癌種としては肺癌、頭頸部癌、脳腫瘍、食道癌、胃癌、乳癌、肝癌、大腸癌、骨腫瘍、腎癌、子宮癌及び卵巣癌にて解析した。
- 4) 上記にて同定した癌拒絶抗原内に存在するペプチド抗原を同定し、それらを合成して癌患者リンパ球よりHLA拘束性キラーT細胞誘導能の有無を解析し、癌ワクチンとしての臨床応用の可能性について基礎的研究を実施した。
- 5) キラーT細胞誘導能の明かなペプチドについては臨床応用可能なグレードのペプチド（GMPグレード）を米国MPS社に依頼し2～4g作製中である。安全性やこれらの精製度などを確認後、第1相臨床試験に供する予定である。第1相臨床試験では有害事

象の有無とキラーT細胞誘導能の有無を主目的として本久留米大学にて実施する。

### C. 研究結果

伊東主任研究者と共同にて日本人に多発するヒトHLA-クラスI拘束性上皮癌（腺癌及び扁平上皮癌）に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌拒絶抗原遺伝子をクローニングした。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるin vitroにおけるキラーT細胞誘導能を解析した。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子（SART-1～SART-4）一方、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子（2つは新規、1つは既知の遺伝子）をクローニングし、それらのコードする蛋白を解析し、CTL誘導能を持つペプチドを10種類以上同定した。具体的には以下の如くである。

- 1.SART-1癌拒絶抗原遺伝子：1) HLA-A24拘束性ペプチド（SART-1690-698）が強いCTL誘導能を有することを見出した。2) アジュバントを決定する目的でSART-1690-698ペプチドによるCTL誘導の至適条件を各種サイトカインを用いて明らかにした。3) HLA-A26拘束性ペプチドSART-1736-744がHLA-A2601、-A2602、-A2603癌患者いずれからもCTLを誘導することを見出した。
- 2.SART-2癌拒絶抗原遺伝子：100kdのSART-2抗原が扁平上皮癌粗面小胞体内に選択的に発現していることを明らかにするとともに、同抗原内にHLA-A24<sup>+</sup>癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つのnonapeptideを同定した。
- 3.SART-3癌拒絶抗原遺伝子：140kdのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現することを明らかにした。同抗原内にHLA-A24<sup>+</sup>癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つのnonapeptideを同定した。
- 4.HLA-A24拘束性肺腺癌患者由来CTL株により認識される拒絶抗原遺伝子：1) 3つの遺伝子をクローニングして、そのうち1つは既知（サイクロフィリンB）、2つは新規であったため、Adenocarcinoma Antigen Recognized by T cells -1/-4（ART-1、ART-4）と仮名した。2) サイクロフィリンB分子内にHLA-A24<sup>+</sup>白血病患者リンパ球よりCTLを誘導するnonapeptideを2か所同定した。一方、

これらの癌拒絶抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現は以下の如くであった。SART-1抗原は扁平上皮癌の60～80%、乳癌を除く腺癌の40～50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍に発現していた。一方、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていなかった。SART-1、SART-2及びSART-3抗原の中に患者リンパ球よりCTL誘導可能なペプチド分子を各々2個、2個及び3個同定した。また、腺癌より同定したサイクロフィリンB分子、ART-1、ART-4分子もSART抗原と同様に上皮性癌に高発現していた。サイクロフィリンB分子中CTL誘導可能な分子を2か所同定した。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A2402は日本人の60%が保有している。これらより、本邦における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられる。したがって、平成11年度に上記ペプチドを用いての第1相臨床試験を本学において計画中である。

### D. 考察

これまでの研究成果より10種類以上のHLA-A24及びHLA-A26陽性の上皮性癌患者に臨床応用可能なペプチドが同定された。平成11年度はさらに多くの新規ペプチドを同定するとともに、上記ペプチドの第1相臨床試験を有害事象の有無及びCTL誘導能の有無を主目的として順次実施する予定である。現在以下の3つの第1相臨床試験を実施もしくは実施する予定である。

- 1.「肺及び食道の高度進行・再発扁平上皮癌に対するSART-1ペプチドワクチンの第1相試験」（平成11年3月9日久留米大学医学部倫理委員会承認）
- 2.「大腸及び乳腺の高度進行・再発腺癌に対するSART-3ペプチドワクチンの第1相試験」（臨床試験予定）
- 3.「高度進行・再発肺癌に対するサイクロフィリンBペプチドワクチンの第1相試験」（臨床試験予定）

これらの第1相試験にて安全性が確認され、かつCTL誘導能が実証されたペプチド分子については次のステップの臨床試験への移行を予定している。

### E. 結論

上皮性癌ペプチドワクチンとして応用可能

な分子を7分子 (SART-1~SART-4、サイクロフィリンB、ART-1及びART-4) 同定し、それらが各種癌に選択的にかつ高率に発現していることを明らかにした。またそれらにコードされ癌患者末梢リンパ球よりin vitroでキラーT細胞誘導能をもつペプチド分子を10種類以上同定した。

## F.研究発表

### 1.論文発表

- 1) Fujii T, Yamana H, Fujita H, Sueyoshi S, Nakashima A, Hayashi I, Nishi M, Kato S, Shirouzu K, Suematsu M: Clinicopathologic study of multiple primary superficial carcinoma of the esophagus. *Int J Oncol*, 12: 421-425, 1998.
- 2) Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niiya F, Yang D, Toh Y, Yamana H, Itoh K: A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 187(3):277-288,1998.
- 3) Yoshida S, Yamana H, Tanaka T, Ishibashi N, Toh U, Ishii H, Shirouzu Y, Shirouzu K: Effect of combination therapy with a methionine-mitomycin C conjugate and a methionine-deficient diet on tumor growth. *in vivo* 12351-356, 1998.
- 4) Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K: Effect of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *Ann Surg*, 227(4):485-491, 1998.
- 5) Hikida S, Takeuchi M, Hata H, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K, Matsuno K, Tanaka T, Kawaguchi C, Akiyoshi K, Tsuru T, Tanaka Y, Mizote H: Free jejunal graft autotransplantation should be revascularized within 3 hours. *Transplantation* 30(7):3446-3448, 1998.
- 6) Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Hayashi, A., Yamana, H., and Itoh, K., A gene encoding squamous cell carcinoma antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. In: *Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy (Gann Monograph on*

*Cancer Research No. 48)*. (eds) Kikuchi, K., and Sato, T. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1999, in press.

7) Toh U, Yamana H, Fujita H, Yanaga H, Ozaki K, Shirouzu K, Itoh K: Establishment of HLA class I-restricted and tumor specific CTLs in patients with esophageal cancer. *Biotherapy* 12(1):56-61, 1998.

8) Itoh, K., Shichijo, S., Inoue, Y., Hayashi, A., Toh, U., Yamana, H., SART1 gene encoding squamous cell carcinoma antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. In: *Cell Therapy*. (eds). Ikeda, Y., and Kawakami, Y. Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, 1999, in press.

9) 山名秀明：食道癌の術後補助療法。日消外会誌 31(8):1930-1935, 1998.

10) 七條茂樹、今井康久、中尾真修、林明宏、山名秀明、伊東恭悟：ヒト扁平上皮がん抗原遺伝子、SART-1。細胞工学17(8)：1216-1222, 1998.

11) 七條茂樹、山名秀明、伊東恭悟：ヒト癌拒絶抗原SART-1分子の解析。がん研究に係わる重点領域研究(がん重点)研究報告集録(平成9年度), 北川知行編, pp608-609, 文部省, 東京, 1998.

12) 伊東恭悟、七條茂樹、山名秀明：ヒト癌特異的キラーT細胞により認識される抗原1—癌特異的キラーT細胞の存在とメラノーマ拒絶抗原遺伝子の同定— *Immunology Frontier* 9 (2) 57 (129) -68 (140) , 1999.

### 2.学会発表

1) 久保田雅博, 山名秀明, 他：食道癌におけるテロメラーゼ活性半定量化と臨床的意義に関する検討。第98回日本外科学会総会、1998年4月、東京。

2) 永松佳憲, 山名秀明, 他：食道癌術後におけるQOLの検討(特に呼吸機能と運動能力の面から)。第98回日本外科学会総会、1998年4月、東京。

3) 篠崎広嗣, 山名秀明, 他：長期予後からみた胸部食道癌に対する術後化学療法の意義。第52回日本消化器外科学会総会、

1998年7月、東京.

4) 伊東恭悟、山名秀明、七條茂樹、中尾真修、五味慎也、今井康久：抗原ペプチド；上皮性癌ワクチンとしての可能性. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

5) 今井康久、七條茂樹、片山貴文、笹富輝男、原田健司、山名秀明、伊東恭悟：扁平上皮癌由来癌拒絶抗原遺伝子SART-1の生物学的機能解析. 第57回日本癌学会総会、1998年9月、横浜.

6) 藤田博正、山名秀明、他：他臓器浸潤(T4)食道癌に対する集学的治療. 第36回癌治療学会総会、1998年10月、福岡.

7) Toh U, Yamana H, et al.: Establishment of tumor specific and HLA class I-restricted CTLs in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. 7th World Congress of International Society for Diseases of the Esophagus (1998/9/1-4:Montreal)

8) Tanaka Y, Yamana H, et al: Clinicopathologic study of multiple primary superficial carcinoma of the esophagus. 7th World Congress of International Society for Diseases of the Esophagus (1998/9/1-4:Montreal)

9) Shima I, Yamana H, et al.: Induction therapy for esophageal cancer in advanced stage: A prospective study. 7th World Congress of International Society for Diseases of the Esophagus (1998/9/1-4:Montreal)

10) Yamana H, Itoh K: Biotherapy for esophageal carcinoma. 1st International Conference on Biological Therapy (1998/11/16-21: Gangzhou)

11) 笹富輝男、唐 宇飛、新谷文彦、山名秀明、白水和雄、伊東恭悟：ヒト大腸癌組織における癌拒絶抗原SART-1の発現. 第28回日本免疫学会総会・学術集会、1998年12月、神戸.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

19980390

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

### 研究成果の刊行に関する一覧表

**A Gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes**

Shigeki Shichijo , Masanobu Nakao, Yasuhisa Imai....

J Exp Med 187(3) 1998 P.277-288

**Active Immunotherapy with ultraviolet B-irradiated autologous whole melanoma cells plus DETOX in patients with metastatic melanoma**

Omar Eton , Dmitri D, Kharkevitch, Mary Ann Gianan, Merrick I Ross....

Clinical Cancer Resarch 4 1998 P.619-627

**A Gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes**

Shigeki Shichijo , Masanobu Nakao, Yasuhisa Imai....

J Exp Med 187(3) 1998 P.277-288

**Sequence analysis of genes encoding rodent homologues of the human tumorrejection antigen SART-1**

Masashi Gotoh, Shigeki Shichijo, Tomoaki Hoshino...

Jpn J Cancer Res 89 1998 P.849-854

**Expression of the SART-1 tumor rejection antigen in breast cancer**

Mayumi Kawamoto, Shigeki Shichijo, Yasuhisa Imai...

Int J Cancer 80 1999 P.64-67

**Identificaiton of a SART-1-Derived peptide capable of inducing  
HLA-A24-Restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes**

Megumi Kikuchi, Masanobu Nakao, Yoshiko Inoue...

Int J Cancer 81 1999 P.459-466