

肺癌に対する MAGE 蛋白標的免疫治療の試みと細胞傷害因子遺伝子
導入併用効果の検討

(10671249)

平成10年度—平成11年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

平成12年3月10日

研究代表者 井上 修平
滋賀医科大学第2外科

肺癌に対する MAGE 蛋白標的免疫治療の試みと細胞傷害因子遺伝子導入併用効果の検討

(10671249)

平成10年 - 平成11年科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



1999018742

平成12年3月10日

井上 修平

滋賀医科大学第2外科

は し が き

研究組織

研究代表者： 井上 修平 (滋賀医科大学第2外科)
研究分担者： 藤野 昇三 (滋賀医科大学第2外科)
研究分担者： 紺谷 桂一 (滋賀医科大学第2外科)

研究経費

平成10年度 1,600 千円
平成11年 1,500 千円
計 3,100 千円

研究発表

(ア) 学会誌発表

- A) 紺谷 桂一、澤井 聡、花岡 淳、手塚 則明、井上 修平、藤野 昇三 合成ペプチドを用いた MUC-1 特異的細胞傷害 T リンパ球(CTL)の誘導と進行肺癌患者に対する養子免疫療法の試み *Biotherapy*, 1998, 12: 5
- B) 澤井 聡、紺谷 桂一、花岡 淳、手塚 則明、井上 修平、藤野 昇三、藤村 昌樹 癌抗原 MUC1 ムチンを標的とした抗腫瘍免疫誘導の試みと癌免疫療法の臨床効果に関する研究 *外科治療*, 1999, 81: 364

(イ) 口頭発表

- (B) 紺谷桂一、澤井聡、花岡淳、手塚則明、井上修平、藤野昇三、樹状細胞の MUC1 特異的 CTL 誘導能の検討と、MUC1 を標的とした DC ワクチン癌免疫療法の試み、第58回日本癌学会総会、平成11年9月29日
- (C) K. Kontani, S. Sawai, J. Hanaoka, M. Ichinose, N. Tezuka, S. Inoue, S. Fujino, A. Mori. THE ABILITY OF DENDRITIC CELLS LOADED WITH MUC1 ANTIGENS TO ELICIT TUMOR-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AND ANTI-TUMOR EFFECT OF VACCINATION USING THE LOADED DENDRITIC CELLS. The World Congress of Breast Cancer, 平成11年7月12日
- (D) 紺谷 桂一、澤井 聡、花岡 淳、一瀬増太郎、手塚則明、井上 修平、藤野昇三、自家腫瘍抽出蛋白でパルスした樹状細胞の腫瘍特異的細胞傷害 T リンパ球誘導能

の検討と進行肺癌症例に対する樹状細胞ワクチン療法の試み、第52回日本胸部外
科学会総会、平成11年10月6日

<研究成果>

従来の癌免疫治療は、BCG ワクチン療法や LAK (lymphocyte-Activated Killer Cell)療法など患者の非特異的免疫能を活性化することによって、癌の消退を図ろうとするものであった。しかし、その臨床効果は期待したものとはほど遠く現在ではほとんど行われていない。原因としては、非特異的免疫力の強化だけでは癌の進展抑制効果が乏しいのは明らかであり、現在ではいかにして癌特異的免疫を賦活化しうるかの研究開発が盛んに行われている。癌特異的免疫を有効に賦活化する目的で、癌細胞上に発現している癌抗原を選択的に認識しこれを殺傷するエフェクター細胞 CTL が用いられるようになった。すなわち、患者リンパ球より ex vivo にて誘導した CTL を再び患者体内に戻すいわゆる CTL 療法に大きな臨床効果が期待できる。

本研究は、肺癌患者腫瘍の MAGE 抗原発現の検討、MAGE 発現腫瘍特異的細胞傷害 T リンパ球(CTL)の樹立とその抗原特異性の検討、および肺癌細胞株の樹立を目的として行われた。この計画にもとづいて以下の結果が得られた。

A) 肺癌患者腫瘍の MAGE 発現の解析

20例の肺癌患者から手術時に採取した主腫瘍より mRNA を抽出した(表1)。抽出 RNA より逆転写酵素を用いて cDNA を合成した後、これを鋳型にして RT-PCR 法により MAGE-1, -2, -3 をコードする cDNA 由来フラグメントを増幅した。MAGE 抗原の RNA レベルでの発現はいずれも約30%で認められた。これらの発現と、肺癌の病理組織型あるいは肺癌の臨床病気との相関は認められなかった。

表1

case	sex	age	histology	T	N	M	clinical stage
1	f	71	Ad ^a	4	2	1	4
2	f	59	Ad	4	2	0	3B
3	rr	57	Ad	2	0	0	1B
4	rr	69	Ad	4	2	0	3B
5	rr	66	Ad	2	0	0	1B
6	f	79	Ad	1	0	0	1A
7	f	55	Ad	1	0	0	1A
8	rr	74	Ad	4	2	0	3B
9	rr	74	Ad	1	1	0	2A
10	f	70	Ad	2	0	0	1B
11	rr	71	Ad	2	1	0	2B
12	f	33	Ad	2	1	0	2B
13	f	61	Ad	1	2	1	4
14	f	61	Ad	1	0	0	1A
15	f	63	Ad	1	0	0	1A
16	f	58	Ad	3	0	0	2B
17	rr	83	Ad	2	0	0	1B
18	rr	49	Ad	1	0	1	4
19	rr	65	Sq ^b	2	1	0	2B
20	rr	61	Sq	1	2	0	3A

^a adenocarcinoma

^b squamous cell carcinoma

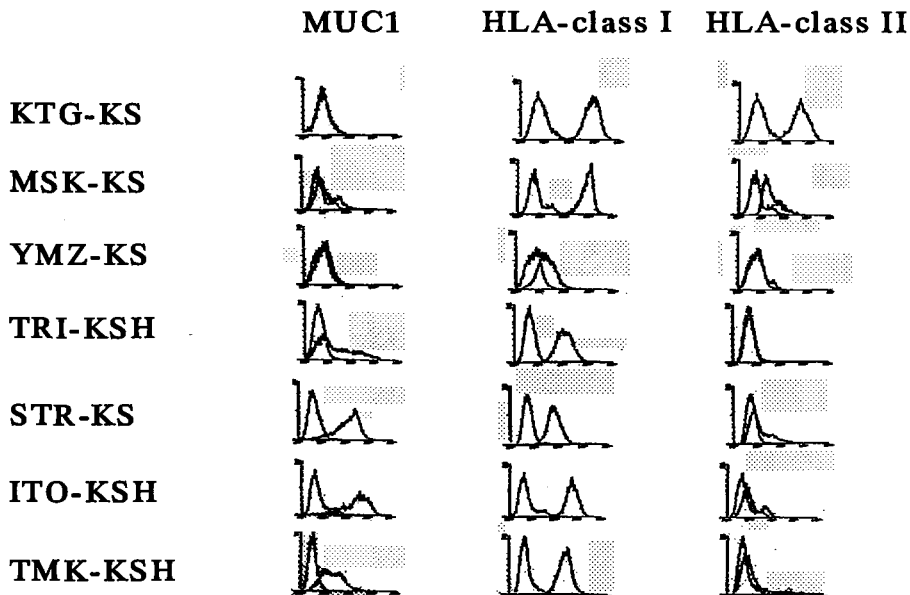
(B) 肺癌細胞株の樹立

患者腫瘍の一部を Scid マウス皮下に移植した。3カ月後、移植腫瘍の約30%が生着した。それらを培養液の入ったカルチャープレートに移し、癌細胞株樹立を試みた。これまでに腺癌4株、扁平上皮癌3株、小細胞癌1株の樹立に成功した。樹立癌細胞株の主要組織適合性抗原分子のハプロタイプを調べるとともに、細胞表面上での同分子の発現、リンパ球活性化シグナル誘導分子B7-1の発現をフローサイトメトリーにて解析した(表2、図1)。

表2 肺癌患者より樹立した癌細胞株

細胞名	組織型	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR
MSK-KS	Sq	31	61	Cw3	2/4
KTG-KS	Ad	2	35/70	Cw3/Cw7	4
YMZ-KS	Ad	31/33	44/51	-	8
TRI-KSH	Sq	24/33	7/51	Cw7	1/9
STR-KS	Ad	2/24	46/48	Cw1	2/8
ITO-KSH	Small	24/26	7/35	Cw3/7	4/9
TMK-KSH	Ad	11/24	7/39	Cw7	1/8
OKM-KS	Sq	2/24	46/60	Cw1	4/12

図2 フローサイトメトリーによる樹立癌細胞株の MUC1、 HLA-class I および II 分子発現解析



C) 患者末梢血単核球(PBMC)より MAGE 蛋白特異的 CTL を誘導

MAGE 蛋白発現陽性患者より採取分離した末梢血リンパ球を、自家腫瘍細胞抽出蛋白でパルスした自家樹状細胞で IL-2 および IL-12 存在下に共培養し、腫瘍特異的 CTL を誘導を試みた。週に一度抗原パルス樹状細胞を用いた *in vitro* 刺激を繰り返すことにより5週後に CTL を誘導できた。この表面マーカーをフローサイトメトリー法にて解析した結果、CD3/CD4 陽性 T 細胞群優位であることがわかった (図3)。誘導 CTL の抗原特異性を、自家腫瘍抽出蛋白パルス樹状細胞を標的とした TNF-alpha 産生 ELISA 法にて解析した。パルス抗原濃度に依存した抗原 T 細胞応答が認められた (図4)。

図3 フローサイトメトリーによる CTL の表面マーカー解析

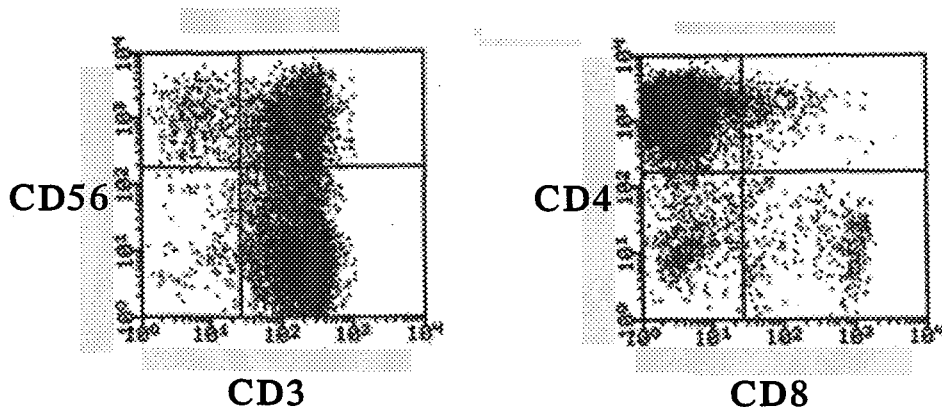
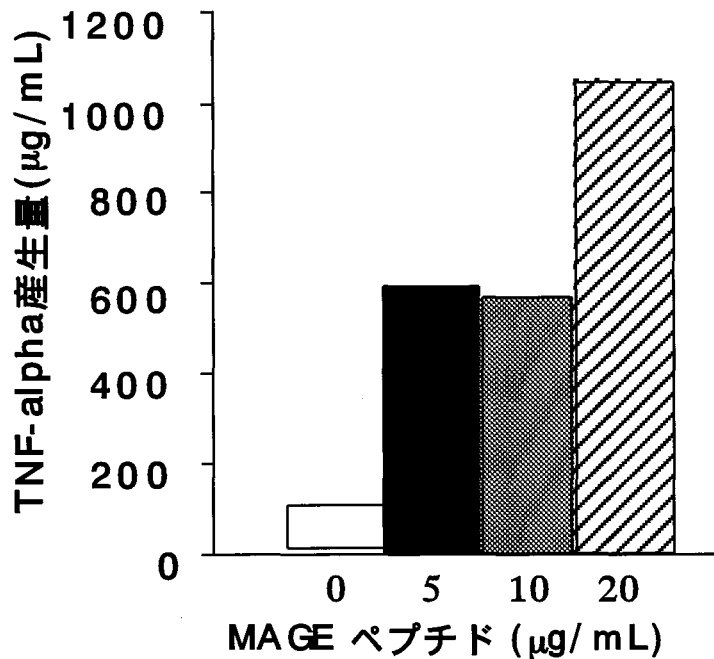


図4 ELISA 法による CTL の抗原特異的 TNF-alpha 産生能の解析



<考察>

以上の結果より、MAGE 抗原は肺癌細胞に高発現し CTL を誘導する強い抗原性を有していることが明らかになった。近い将来、同抗原を標的にした肺癌患者に対する癌免疫治療の臨床応用も可能であると考えられた。今後は、肺癌患者より樹立した癌細胞株を標的として、これらの細胞表面に発現しているナীবな MAGE 抗原を CTL が認識・殺傷できるかを検討する計画である。さらには、CTL の *in vivo* における MAGE 発現肺癌腫瘍抑制効果を検討する目的で、CTL の Scid マウス移植腫瘍に対する発育抑制効果を検討することが必要であろうと考えられる。

<キーワード>

MAGE、肺癌、細胞傷害Tリンパ球 (CTL)、癌免疫治療