

腫瘍抗原 MUC1 合成ペプチドを用いた免疫療法 の

基礎的研究とその臨床応用

(課題番号 12671304)

平成 12 年度～13 年度科学研究費補助金

(基盤研究 C) 研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



2001015491

平成 14 年 3 月

研究代表者 紺谷桂一

(滋賀医科大学医学部第二外科)

目 次

1. はじめに	P.1
2. 研究組織	P.5
3. 研究経費	p.5
4. 研究発表	P.6
5. 研究成果	
MUC1 合成ペプチド刺激抗原提示細胞の抗原提示様式	
DC と癌関連抗原 MUC1	P.7
MUC1 特異的 CTL 誘導における抗原提示細胞の 抗原提示様式に関する検討	P.9
MUC1 特異的 CTL 誘導における B7-1 の役割	P.19
MUC1 をターゲットにした免疫療法の臨床応用	
MUC1 をターゲットにした肺癌患者の免疫療法	P.27
癌抗原MUC1ムチンを標的とした樹状細胞ワクチン療法 ー進行再発乳癌を中心にー	P.34
MUC1を標的としたDNAワクチン免疫療法の開発	
癌抗原MUC1を標的としたDNAワクチン免疫療法の開発： マウスモデルを用いた検討	P.39

はじめに

1.研究の背景

腫瘍関連抗原の研究から、MAGE および GAGE ファミリー、tyrosinase、Melan-A/MART-1、erbB-2、MUC1 など種々の腫瘍抗原が同定されている。しかも、その多くが担癌個体に強い特異的抗腫瘍免疫応答を誘導しうることから、これらの分子を標的抗原に用いた免疫療法の可能性についての研究が精力的に進められている。特に抗原提示細胞上の MHC 分子に結合して発現する腫瘍抗原ペプチドが同定されてからは、その合成ペプチドを用いた抗原特異的細胞傷害 T リンパ球 (CTL) の誘導が盛んに行われ、現在臨床試験の段階に入っているものもある。また、樹状細胞の研究からその優れた抗原提示能が明らかとなり、同細胞を抗原提示細胞とした CTL 誘導やワクチン療法が開発され、その臨床応用が期待されている。

MUC1 分子も重要な腫瘍抗原の 1 つと考えられており、多くの癌細胞上に高発現する膜貫通糖蛋白である。他の腫瘍抗原の CTL による認識機構が MHC 拘束性であるのに対して、MUC1 の認識機構は MHC 非拘束性である点が特徴的である。我々は、これまで 30 アミノ酸長の MUC1 合成ペプチドを用いた CTL 誘導が可能であること、その際の抗原提示は MUC1 分子同様に MHC 非拘束性であることを明らかにしており、同ペプチドを用いた免疫療法の臨床効果が期待される。

2.研究目的

上記の研究背景を基盤として、MUC1 合成ペプチドを用いた免疫療法の基礎的研究をさらに進めるとともに、臨床試験を行いその安全性・効果について評価を行う（滋賀医科大学倫理委員会承認済）。

<基礎的研究>

- 1) MUC1 合成ペプチド刺激樹状細胞を用いて、その抗原提示に関与する細胞表面分子を同定する。また、同樹状細胞による MUC1 特異的 CTL 誘導における抗原提示様式を検討する。
- 2) MUC1 合成ペプチド用いた MUC-1 特異的 CTL 誘導のより有効な方法を確立する。

<臨床応用>

他治療無効 MUC-1 発現肺癌・乳癌症例を対象に、MUC1 特異的 CTL を用いた養子免疫療法および MUC1 合成ペプチド刺激樹状細胞を用いたワクチン療法を施行し、その効果・安全性を評価する。

3.研究成果の概要

1) MUC1 合成ペプチド刺激抗原提示細胞の抗原提示様式

3-1) DC と癌関連抗原 MUC1

MUC1 は乳癌、膵癌、大腸癌や肺癌など多くの癌細胞上に高発現するばかりでなく、MHC 非拘束性に CTL に認識されうる。一方、樹状細胞(DC)はその細胞表面に抗原提示に不可欠な MHC とリンパ球活性化シグナルに関与する分子を高発現している。そのため DC は効率的に細胞傷害性 T リンパ球(CTL)を賦活・誘導できる。そこで、DC の MUC1 抗原提示能および MUC1 特異的 CTL 誘導能について検討した。共通の HLA タイプを持たない 3 健常者由来 DC を、30 アミノ酸長の MUC1 コア合成ペプチドで刺激しその細胞表面ペプチドを解析したところ、MUC1 コア蛋白部分は HLA タイプに無関係に抗原提示細胞上に発現提示されることが明らかになった。また、MUC1 ペプチド刺激 DC で刺激を繰り返し誘導された CTL の TNF- α 産生能はペプチド濃度に依存していることがわかった。しかも、乳癌患者に同 DC を接種すると、そのワクチン効果が認められた。

3-2) MUC1 特異的 CTL 誘導における抗原提示細胞の抗原提示様式に関する検討

MUC-1 コア合成ペプチドを用いた MUC-1 特異的 CTL 誘導に関与する抗原提示細胞 (APC) の抗原提示様式について樹状細胞 (DC) を用いて検討した。DC がその HLA ハプロタイプに無関係に MUC1 ペプチド刺激で細胞表面上に SM3 に認識される同一の抗原決定基を細胞上に抗原提示することが明らかになった。しかも、この反応が Bredelfin A で抑制されたことよりペプチドが DC 細胞内に一旦取り込まれプロセッシングを受けた後に抗原提示すると考えられた。また、MUC1 高発現株 T-47D の cell lysate

刺激でも DC が合成ペプチド刺激と同じエピトープを抗原提示することも明らかになった。MUC1 発現腫瘍組織から抽出した cell lysate 刺激でも MUC1 特異的 CTL の誘導が可能であると考えられた。さらに、MUC1 ペプチド刺激 DC 上に MUC1 エピトープが結合する細胞表面分子が HLA class I および class II であることがわかった。このことは HLA class I のみならず class II 上に抗原提示しうることを示すものであり、MUC1 特異的 CTL 誘導において DC が CD4(+), CD8(+) の両 T 細胞に抗原提示が可能であることを示唆する。CTL 誘導におけるヘルパー T 細胞の重要性が報告されていることを考慮すると、MUC1 ペプチド刺激 DC を用いることが CTL 誘導に有用であると考えられた。

2) MUC1 特異的 CTL 誘導における B7-1 の役割

Autologous dendritic cells or cells expressing both B7-1 and MUC1 can rescue tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from MUC1-mediated apoptotic cell death

リンパ球—腫瘍細胞の共培養による MUC1 特異的 CTL の誘導を試みると、CTL は 16 日以内にアポトーシスに陥ることが観察された。これに自己 DC を加えることで CTL のアポトーシスからの回避が観察された。DC 上の co-stimulatory 分子である B7-1 分子がこのことに重要な働きをしていることが明らかになった。有効な CTL 誘導に B7-1 分子の存在が必要であることが示唆された。

3) MUC1 をターゲットにした免疫療法の臨床応用

3-1) MUC1 をターゲットにした肺癌患者の免疫療法

MUC1 高発現肺癌患者に対し MUC1 コア合成ペプチドを用いた免疫療法を施行し、その治療効果および安全性について検討した。(本治療は高度先進医療および滋賀医科大学倫理委員会の承認を得た)

切除標本・胸水中肺癌細胞において MUC1 の高発現が確認された他治療無効または施行不能の肺癌患者 6 例に MUC1 をターゲットにした免疫治療を施行した。そのうち、評価可能であった 4 例を対象とした。血球分離装置により分離した末梢血単核球(PBMC)を 30 アミノ酸の MUC1 ペプチドで刺

激しMUC1特異的CTLを誘導し、これを2～4週毎にIL-2とともに点滴静注した。さらにPBMCより誘導したDCをMUC1ペプチドで刺激した後、皮下注射または胸腔内注入するワクチン療法も併用した。他治療にてもPDであった4例は、3例がNC、1例がPRの免疫治療効果が得られた。本治療による副作用は軽度の発熱のみで重篤なものはみられず全身状態不良例にも施行可能であった。

3-2) 癌抗原MUC1ムチンを標的とした樹状細胞ワクチン療法

－進行再発乳癌を中心に－

進行再発乳癌患者に対して樹状細胞ワクチン療法を施行した。癌抗原MUC1を標的とした症例3例は、治療後血清腫瘍マーカー値の低下や癌性胸水の消失が認められるとともに、それに伴う呼吸困難などの症状は改善した。一方、MUC1陰性患者2例に対しては、自家腫瘍抽出蛋白をパルスした樹状細胞を接種したが治療効果はみられなかった。腫瘍抗原性の強いMUC1を標的にした本治療は、強力な抗腫瘍免疫を誘導する事が可能でありその効果が期待出来る結果であった。

4) MUC1を標的としたDNAワクチン免疫療法の開発

癌抗原MUC1を標的としたDNAワクチン免疫療法の開発：マウスモデルを用いた検討

癌抗原遺伝子を直接生体に接種するいわゆるDNAワクチンは、目的蛋白を接種部位に長期間高発現させることが出来る。癌抗原MUC1を標的とするDNAワクチン療法の開発を目的としたマウスモデルを作成した。MUC1cDNAを組み込んだ発現ベクターを、BALB/cマウスの後肢筋肉内に接種した。接種後72時間後に抗原蛋白発現が確認でき、少なくとも4週間持続した。MUC1 DNA接種マウスは血清中にMUC1特異的抗体を獲得していた。また、このマウスではMUC1遺伝子導入腫瘍の生着・増殖が完全に抑制された。DNAワクチン療法のマウスモデルは、癌に対するDNAワクチン療法の開発に大いに貢献するものと思われた。

研究組織

研究代表者：紺谷桂一（滋賀医科大学 医学部 助手）

研究分担者：藤野昇三（滋賀医科大学 医学部 講師）

研究分担者：澤井 聡（滋賀医科大学 医学部 助手）

研究経費

平成 12 年度 1,800 千円

平成 13 年度 1,500 千円

計 3,300 千円