

学 位 論 文 題 名

Identification of squamous cell carcinoma antigen-derived peptides having the capacity of inducing cancer-reactive CTLs in HLA-A24<sup>+</sup> cancer patients

(HLA-A24陽性癌患者における CTL 反応を有する  
SCCA 由来ペプチドの同定)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景、目的】扁平上皮癌抗原 (squamous cell carcinoma antigen : SCCA) は、子宮頸癌の TA-4 複合体より精製された抗原であり、扁平上皮癌患者の血清中に高頻度で存在し、扁平上皮癌の発生や再発を予測することが出来る有用な腫瘍マーカーのひとつである。近年、癌関連抗原の研究が進み、癌反応性細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocytes: CTLs) が認識する癌抗原由来ペプチドの解析が急速に進歩してきた。しかし、SCCA を癌特異的免疫療法における標的分子として研究した報告はない。一方、様々な癌種に対する癌ペプチドワクチン療法が臨床試験として行われ、一部の症例では HLA クラス I 拘束性 CTL の誘導や腫瘍縮小が認められている。我々も、癌ペプチドワクチン療法の臨床試験により、CTL 誘導可能なペプチドがペプチド特異的液性免疫反応を惹起し、ペプチドワクチン療法後の液性免疫の増強が予後と相関することを報告した。本研究では、HLA-A24 陽性癌患者において、液性免疫に認識され、HLA クラス I 拘束性癌特異的 CTLs を誘導できる臨床応用可能な SCCA 由来ペプチドの同定を試みた。

【方法】食道癌細胞株 5 種類、肺癌細胞株 13 種類 (扁平上皮癌 5、腺癌 5、小細胞癌 3)、子宮頸癌細胞株 5 種類、膵癌細胞株 4 種類、胃癌細胞株 6 種類、大腸癌株 6 種類に関して、real-time PCR 法により SCCA の mRNA の発現を検討した。また、食道癌 5 例、肺扁平上皮癌 5 例、子宮頸癌 5 例、肺腺癌 5 例、肺小細胞癌 3 例、胃癌 6 例の癌組織を用いて免疫組織染色を行い、蛋白レベルでの SCCA の発現を検討した。また、SCCA のアミノ酸配列に基づいて HLA-A24 分子に結合性を有すると考えられる 9 個、または、10 個のアミノ酸からなる抗原ペプチドをコンピューターアルゴリズムにより予測し、9 種類の合成ペプチドを準備した。次に、子宮頸癌患者 17 人、乳癌患者 10 人、膵癌患者 10 人、胃癌患者 10 人、大腸癌患者 6 人と健常人 10 人の血清中のペプチド特異的 IgG 抗体を、LUMINEX 法により測定した。抗ペプチド抗体の特異性は、ペプチド吸収試験により確認した。抗ペプチド抗体の結果に基づき 4 種類のペプチドを選択し、CTL 誘導の実験に用いた。食道癌患者 4 例、子宮頸癌患者 4 例、肺癌患者 4 例、胃癌患者 4 例、大腸癌患者 4 例と健常人 8 例の末梢血単

核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) を、選択した個々のペプチドで繰り返し刺激し、その反応性を INF- $\gamma$  産生と  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験で検討した。癌患者の PBMCs を個々のペプチド (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で 3 日毎に IL-2 (100U/ml) の存在下に繰り返し刺激し、14 日後に、刺激したペプチドをパルスした C1R-A24 細胞に対して産生する IFN- $\gamma$  の量を ELISA 法で測定した。IFN- $\gamma$  が 50 pg/ml 以上産生された場合を陽性と判定した。その後、IL-2 (100 U/ml) で培養 PBMCs を 10 日間培養し、 $^{51}\text{Cr}$  遊離試験を実施した。 $^{51}\text{Cr}$  遊離試験では、YES-1 食道癌株 (HLA-A24<sup>+</sup>, SCCA<sup>+</sup>)、YES-2 食道癌株 (HLA-A24<sup>+</sup>, SCCA<sup>+</sup>) と HLA-A24<sup>+</sup> PHA-blastoid T 細胞を標的細胞として用いた。さらに、誘導された CTLs の HLA 拘束性とペプチド特異性を確認するため、抗体による阻害試験と cold target による競合抑制試験を実施した。

【結果】検討した癌細胞株における SCCA の mRNA の発現は、食道癌細胞株では 100%、子宮頸癌細胞株では 80%、肺扁平上皮癌細胞株では 80%、肺腺癌では 0%、肺小細胞癌では 0%、胃癌では 17%、大腸癌では 0%であった。免疫組織染色を実施した癌組織の SCCA 蛋白の発現は、食道癌では 100%、肺扁平上皮癌では 100%、子宮頸癌では 80%、肺腺癌では 0%、肺小細胞癌では 0%、胃癌では 16%であった。HLA-A24 分子への結合性に基づいて準備した 9 種類の SCCA 由来ペプチドを用いて、癌患者 53 例と健常人 10 例の血清中のペプチド特異的 IgG 抗体のレベルを LUMINEX 法で検討した。その結果、SCCA107-116、SCCA112-120、SCCA215-224、SCCA286-295 の 4 種類のペプチドに対する IgG 抗体が、20-50% の癌患者の血清中に存在することが確認された。抗ペプチド抗体の有無は、患者の HLA タイプとは無関係であった。また、抗ペプチド IgG 抗体は、対応する SCCA ペプチドをコートした well 中で検体を培養することによりペプチド特異的に吸収されたことから、抗ペプチド IgG 抗体の反応特異性が確認された。次に、抗ペプチド IgG 抗体によるスクリーニングにより選択された 4 種類の SCCA ペプチドによって癌患者の PBMCs から SCCA ペプチド特異的、または、癌細胞反応性 CTL を誘導できるかを検討した。IFN- $\gamma$  産生による評価では、SCCA112-120 と SCCA215-224 ペプチドを用いることによる 60% の癌患者 PBMCs から SCCA ペプチド特異的 CTL を誘導することができた。 $^{51}\text{Cr}$  遊離試験では、SCCA ペプチド特異的 CTLs は、HLA-A24 陽性 SCCA 陽性癌細胞株に対して細胞傷害活性を示したが、HLA-A24 陰性癌細胞株や SCCA 陰性細胞に対しては細胞傷害活性を示さなかった。また、SCCA ペプチド特異的 CTL の細胞傷害活性は、抗 HLA class I 抗体や抗 CD8 抗体の添加により抑制された。さらに、HLA-A24 陽性 SCCA 陽性癌細胞株に対する細胞傷害活性は、刺激に用いた SCCA ペプチドをパルスした  $^{51}\text{Cr}$  でラベルしない C1R-A24 細胞 (cold target) の添加により抑制されたことから、SCCA ペプチド特異的 CTLs が、癌細胞に対する細胞傷害活性を担っていることが示された。

【考察】HLA-A24 分子への結合性を有する 9 種類の SCCA 由来ペプチドの中で SCCA112-120 と SCCA215-224 が、約半数の癌患者の液性免疫に認識され、また、ペプチド特異的、癌細胞反応性 CTLs を誘導することができた。これらのペプチドによる健常人の PBMCs からのペプチド特異的 CTLs の誘導は、稀であった。

本研究により、SCCA が癌抗原として HLA-A24 拘束性癌反応性 CTLs に認識されることを示した。また、SCCA 由来の 2 種類のペプチドにより、HLA-A24 陽性癌患者の PBMCs から

癌傷害性 CTL を誘導可能であることが判明した。これらの結果は、これら 2 種類の SCCA 由来ペプチドが、HLA-A24 陽性癌患者に対するペプチドワクチン療法に有用である可能性を示唆している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 西 村 孝 司  
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

## Identification of squamous cell carcinoma antigen-derived peptides having the capacity of inducing cancer-reactive CTLs in HLA-A24<sup>+</sup> cancer patients

(HLA-A24陽性癌患者における CTL 反応を有する  
SCCA 由来ペプチドの同定)

扁平上皮癌抗原は、扁平上皮癌患者の血清中に高頻度で存在し、扁平上皮癌の発生や再発を予測することが出来る有用な腫瘍マーカーのひとつである。また腫瘍抗原の解析が近年急速に進歩しつつあり、癌免疫療法の臨床試験が進んでいる。しかし癌特異的免疫療法の分野では SCCA を標的分子とした報告は少ない。本研究は、HLA-A24 癌患者において HLA-class I 拘束性腫瘍特異的細胞性および液性免疫を誘導しうる臨床応用可能な SCCA 由来ペプチドを同定することを目的とした。SCCA 蛋白アミノ酸配列より、HLA-A24 分子に高親和性を示すことが予想される 9-10 アミノ酸からなるペプチドを文献的に予測し、9 種類のペプチドを合成した。これらのペプチドに対し、癌患者血清中の各ペプチド特異的 IgG 抗体を LUMINEX 法にて測定し、高率に患者血清中に抗体が存在する 4 種類のペプチドに対し癌患者末梢血へのペプチド刺激による CTL 誘導試験を *in vitro* で施行した。SCCA 112-120 ペプチドと SCCA 215-224 ペプチドで、60%の癌患者末梢血単核球においてペプチド特異的 CTL を誘導した。この SCCA ペプチド特異的 CTL はクロム遊離試験において、HLA-A24 陽性癌細胞株を強く傷害した。一方、HLA-A24 陰性細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。さらに、HLA 拘束性、CD8 依存性およびペプチド特異性を検討するため抗 HLA-class I 分子抗体・抗 CD8 抗体による抑制試験および cold target による競合抑制試験を施行した。誘導された CTL の細胞傷害活性は抗 HLA-class I 分子抗体・抗 CD8 抗体添加により抑制されたこと、さらに SCCA ペプチドをパルスした cold target により抑制されたことから、HLA-class I 拘束性、CD8 陽性 T 細胞依存性かつ SCCA ペプチド特異的であることが証明された。これらの結果より

SCCA 蛋白由来の 2 種のペプチドは、HLA-A24 陽性癌患者の末梢血においてペプチド特異的液性かつ細胞性免疫の両者を誘導可能であることを示した。

公開発表後、副査の西村教授より 1)抗ペプチド抗体の誘導機序、2)IgG サブタイプの検討についての質問があった。それに対して、1)ワクチン投与した CTL 誘導ペプチドが CD4 のエピトープにもなり CD4 陽性 T 細胞を誘導する。(Harada. J Immunother(28)2005) 2)誘導される IgG は IgG1 と G2 が主であり、ADCC を認めていない。(Shomura. British Journal of cancer(90)2004) 等の回答があった。藤堂教授からは、1)癌免疫療法の今後の展望についての質問があった。それに対して、1)より免疫原性の高い新規癌抗原の同定すること、腫瘍による免疫抑制の解除等による免疫監視機構からの逸脱の制御、CD4T 細胞や抗原提示細胞への操作等でより強力な抗腫瘍作用の誘導すること、抗癌剤、放射線療法、抗体療法等との併用療法により相乗効果を期待する、等の回答がなされた。また主査の秋田教授より、1)同定した SCCA ペプチドワクチンの臨床応用への展望、2) 免疫療法と他の治療法との併用療法について質問があった。1)臨床試験を行う際、食道癌や肺癌を適応癌種に広げ SCCA を発現する扁平上皮癌に対応することが可能になる。2) 液性免疫、細胞性免疫をモニタリングし、免疫抑制のかからない適正量を把握し、抗癌剤との併用を行うこと、また免疫抑制の影響のない抗体療法との併用の可能性がある等の回答がなされた。本論文は、SCCA 由来ペプチドが癌特異的抗原として同定された世界で初めての報告であり SCCA を過剰に発現している腫瘍の癌特異的免疫療法への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。