

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	安住 誠
<h3>学位論文題目</h3> <p>Six-transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate as an Immunotherapeutic Target for Renal Cell and Bladder Cancers (腎癌、膀胱癌に対する免疫治療標的分子としてのSTEAPに関する研究)</p> <h3>共著者名</h3> <p>小林博也、青木直子、佐藤啓介、木村昭治、柿崎秀宏、立野正敏</p> <h3>未公表</h3> <h3>研究目的</h3> <p>難治性腎癌、膀胱癌に対する効果的な治療法は今日まで確立されていない。近年難治癌の治療法の一つとして免疫療法が注目され、開発が進められてきた。免疫療法を併用することで一部の患者群において原発、転移巣の縮小や血清腫瘍マーカー値の低下等その有用性が認識され、QOLの改善した症例も報告されはじめた。癌ペプチドワクチン療法は副作用のほとんどない、体に優しい新たな癌治療法で、今後の発展が期待されている治療分野の一つである。</p> <p>Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate(STEAP)は6回膜貫通部位を有する339個のアミノ酸からなるタンパク質である(1)。これまでに多くの腫瘍で過剰発現していることが知られており、STEAPを標的抗原として活用できれば、STEAPを発現している腫瘍に対して有効な免疫療法を構築できる可能性がある(2、3)。効率的な腫瘍免疫応答を誘導するには、抗原特異的キラーT細胞(CTL)だけではなく、抗原特異的なヘルパーT細胞(HTL)の動員が重要である。</p> <p>本研究ではSTEAPが腎癌および膀胱癌に対する免疫治療標的分子となる可能性を探るため、腎癌、膀胱癌細胞株を認識するSTEAP特異的HTLを誘導し、その機能解析を行った。</p> <h3>材料・方法</h3> <h4>1. STEAPタンパクの発現を検討</h4> <p>腎癌、膀胱癌のSTEAP発現の検討にはパラフィン包埋切片を用いて、STEAPの免疫組織化学染色を行った。一次抗体には抗STEAP抗体(Zymed社製)を</p>			

使用した。ヒト腎癌、膀胱癌細胞株中におけるSTEAPタンパクの発現にはウエスタンブロット法を用いて検討した。一次抗体には抗STEAP抗体(Santa Cruz社製)を使用した。

2. STEAP特異的HTLの誘導

4名の健常人を対象とした。採血に当たってはインフォームドコンセントを得た。ヘルパーエピトープペプチドSTEAP₁₀₂₋₁₁₆およびSTEAP₁₉₂₋₂₀₆(3 μ g/ml)でパルスした樹状細胞(DC)でCD4陽性T細胞を刺激し、STEAP特異的HTLを誘導した。HLA class I、DRをそれぞれ抗ヒトHLA class I、抗ヒトHLA-DR抗体でブロックした抗原提示細胞を用い、培養上清中のIFN- γ の定量をELISA法により行い、HTLのHLA拘束性を検討した。

3. STEAP特異的HTLによる腫瘍細胞株の認識

ヒト腎癌、膀胱癌細胞株におけるHLA-DRの発現をFACSにて検討した。細胞表面上にSTEAPタンパクおよび十分なHLAクラスII分子を発現する腫瘍細胞株を用いて、STEAP特異的HTLが直接腫瘍細胞を認識できるかどうかを検討した。またSTEAPタンパクを高発現しているヒト腎癌、膀胱癌細胞株のtumor lysateを抗原タンパクとしてDCにとりこませ、DCがSTEAP特異的HTLを活性化できるかどうか検討した。結果の判定には、培養上清中のIFN- γ の値を用いた。

4. 腎癌、膀胱癌患者末梢血中におけるSTEAPエピトープペプチドに反応するT細胞前駆細胞の検討

STEAPヘルパーエピトープペプチドを認識するT細胞前駆細胞が腎癌、膀胱癌患者末梢血中に存在するかどうかを検討した。腎癌、膀胱癌患者末梢血単核球(PBMC)とヘルパーエピトープペプチドSTEAP₁₀₂₋₁₁₆およびSTEAP₁₉₂₋₂₀₆を共培養し(10 μ g/ml)、14日後に培養上清を回収し、ELISA法によりIFN- γ の定量を行った。採血にあたっては、インフォームドコンセントおよび本学倫理委員会の承認を得た。

5. CTL活性の検討

CTL活性を示すHTLの存在が知られており、今回誘導されたHTLと、ヒト腎癌、膀胱癌細胞株を共培養し、細胞障害性の有無を破壊された癌細胞株から上清中に遊離されるLDHを定量して検討した。

成 績

1. STEAPタンパクの発現

腎癌、膀胱癌摘出検体において、各々20例中18例(90%)、20例中17例(85%)に

STEAPタンパクの発現を認めた。ヒト腎癌、膀胱癌細胞株8種中7種(88%)においてSTEAPタンパクの発現を認めた。

2. 誘導されたSTEAP特異的HTLの解析

HLAの異なる4名の健常人から、STEAP₁₀₂₋₁₁₆特異的HTLは6クローン、STEAP₁₉₂₋₂₀₆特異的HTLクローンは3クローンが誘導され、STEAP₁₀₂₋₁₁₆、STEAP₁₉₂₋₂₀₆はいずれもひとつのペプチドから異なったHLA-DRに抗原提示されるpromiscuousエピトープであることが示唆された。これらのSTEAP特異的HTLクローンは抗HLA class I抗体の存在下では、反応の抑制は認められず、抗HLA-DR抗体の存在下で、反応の抑制が認められたことから、HLA-DR分子を介する反応であることが示された。またペプチド濃度依存性に反応の増強を認めた。

3. STEAP特異的HTLによる腫瘍細胞株の認識

拘束HLA-DR分子が一致するSTEAP陽性の腫瘍細胞株をSTEAP特異的HTLクローンは認識し、Th1サイトカインであるIFN- γ を産生した。またDCはSTEAP陽性腫瘍細胞から得られたtumor lysateを取り込んで、HLA-DR分子を介して抗原を提示することで、STEAP特異的HTLを活性化し、IFN- γ の産生を誘導した。

4. 腎癌、膀胱癌患者末梢血中におけるSTEAPエピトープペプチドに反応するT細胞前駆細胞の検討

腎癌患者5例中5例でSTEAP₁₀₂₋₁₁₆および5例中4例でSTEAP₁₉₂₋₂₀₆に反応するT細胞前駆細胞の存在を認めた。膀胱癌でも同様に、5例中4例で両ペプチドに反応するT細胞前駆細胞の存在を認めた。

5. CTL活性

STEAP₁₀₂₋₁₁₆特異的DR9拘束性HTLクローンMT22およびHK9C1はSTEAPを発現する腎癌細胞株SW839および膀胱癌細胞株5637を認識し、細胞数依存性にCTL活性を示した。

考 案

本研究では、STEAPが腎癌、膀胱癌に高発現する免疫治療標的分子で、腫瘍特異的HTLを誘導する癌抗原のひとつであることを示した。また腎癌、膀胱癌患者末梢血中にSTEAPに反応するT細胞前駆細胞の存在を明らかにした。

癌免疫治療において、生体内で癌を傷害する主要な効果細胞はMHC class I結合ペプチドを認識するCTLであるが、最近の研究によりCTLの抗腫瘍反応にはMHC class II結合抗原ペプチドで惹起されるHTLの作用の重要性が認識されてきた。具体的には1)特異的CTLの誘導に必須のDCの成熟、2)長期間にわたる有効な癌特異的CTL(メモリーCTL)の維持、3)直接的に癌抗原特異的HTLが腫瘍を認識し、破壊するとともに、他の免疫細胞を活性化するサイトカインを分泌することなどである。こ

これらの観点から、有効な腫瘍特異的HTLの誘導を可能とするMHC class II拘束性癌抗原ペプチドを探索し、特定することは、これらをCTLが認識するMHC class I結合癌抗原ペプチドと併用することで、癌ペプチドワクチン療法の効果をさらに向上させることが期待される。また動物実験モデルでは、CTL単独での抗腫瘍効果に比べ、CTLとHTLを同時に誘導した方が、良好な抗腫瘍効果が得られている。このことからSTEAPにおいてヘルパーおよびキラーT細胞両者を刺激しうるようなエピトープの探索も重要である。




結 論

STEAP₁₀₂₋₁₁₆およびSTEAP₁₉₂₋₂₀₆はSTEAPを発現する腎癌、膀胱癌に対して効果的な抗腫瘍ヘルパーT細胞反応を惹起するヘルパーT細胞エピトープペプチドであり、これらのエピトープペプチドを用いた癌ペプチドワクチン療法への臨床応用が期待される。

引 用 文 献

1. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, Leong K, Mitchell SC et al: STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 14523-8.
2. Kobayashi H, Nagato T, Sato K, Aoki N, Kimura S, Murakami M et al: Recognition of prostate and melanoma tumor cells by six-transmembrane epithelial antigen of prostate-specific helper T lymphocytes in a human leukocyte antigen class II-restricted manner. Cancer Res 2007; 67: 5498-504.
3. Challita-Eid PM, Morrison K, Etesami S, An Z, Morrison KJ, Perez-Villar JJ et al: Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo. Cancer Res 2007; 67: 5798-805.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	安住 誠
<p>審査委員長 高後 裕 </p> <p>審査委員 羽田 勝計 </p> <p>審査委員 立野 正敏 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Six-transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate as an Immunotherapeutic Target for Renal cell and Bladder Cancers (腎癌、膀胱癌に対する免疫治療標的分子としての STEAP に関する研究)</p>			
<p>難治性腎癌、膀胱癌に対する効果的な治療法は今日まで確立されておらず、免疫療法にも期待が持たれている。論文提出者は、6回膜貫通部位を有する399個のアミノ酸からなる six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP) が、ヒト腎癌、膀胱癌の癌組織に高発現していることに注目し、STEAP のアミノ酸配列から HLA class II 分子と結合しうる配列を持つペプチドを用いることで STEAP を用いた免疫療法が可能であるか否かを検討した。</p> <p>① STEA が腎癌あるいは膀胱癌由来細胞株に発現し、さらに手術材料を用いて実際の腫瘍組織で発現していることを、免疫染色および western blot で示した。</p> <p>② STEAP 蛋白の中で、HLA class II 分子と結合しうるペプチド STEAP102-116, STEAP192-206 を用いて、正常ヒトリンパ球からペプチドと反応するヘルパーT細胞株 (8THL) を樹立した。</p> <p>③ これらの HTL は HLA class II 拘束性を示し、異なった複数の HLA-DR 抗原におい</p>			

でも提示されることから、ワクチンとして使われた場合に、異なったハプロタイプを有する人々に免疫能を賦活する可能性が示された。

- ④ SETA ペプチドの形だけでなく、腫瘍融解産物でも免疫が誘導できること、一部は細胞障害を示すことを証明した。
- ⑤ 進行腎癌、膀胱癌患者の末梢血の中にペプチドと反応する T 細胞分画が存在することを示した。
- ⑥ STEAP ペプチドのあるものは HTL の誘導とキラー T 細胞誘導能を示す重複する部分があることを示し、それを用いることで、HTL と同時にキラー T 細胞を誘導できる可能性を示した。

これらの実験結果は、治療法の少ない腎癌、膀胱癌において、STEAP を用いた免疫療法の可能性を示し、臨床面での研究に寄与するものが大である。

これは肝癌治療の標的として Stat3 が有望である可能性を示すものと考えられた。論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。