

学位論文の要旨

| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 林 諭史 |
|--|----|----|------|
| <p>学位論文題目</p> <p>Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate and enhancer of zeste homolog 2 as immunotherapeutic targets for lung cancer (肺癌に対する免疫標的分子としてのSTEAP, EZH2に関する研究)</p> <p>共著者名</p> <p>熊井琢美, 松田佳也, 青木直子, 佐藤啓介, 木村昭治, 北田正博, 立野正敏, Esteban Celis, 小林博也</p> <p>Journal of Translational Medicine 9巻190頁 2011年 掲載</p> <p>研究目的</p> <p>近年, 癌免疫治療が注目され, 化学療法と免疫治療の併用は一部の患者群で有用性が認識されている. 癌免疫治療の確立には, 正常組織に発現せず, 腫瘍に高発現した腫瘍関連抗原 (TAA) の同定が重要である. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP) は膜タンパク (1), Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) は遺伝子発現の抑制に関与する核内タンパクで, 肺癌で過剰発現しており, 不良な予後と直結している. これらTAAを免疫標的抗原として活用することで, 有効な免疫治療を構築できる可能性がある (2). 効率的な腫瘍免疫を誘導するには, キラーT細胞 (CTL) だけではなく, ヘルパーT細胞 (HTL) の動員が重要である. そこで, STEAPとEZH2が日本人の死因のトップである肺癌の新規免疫治療標的分子となる可能性を探るため, 肺癌細胞株を認識するSTEAPとEZH2ペプチド特異的HTLを誘導し, その機能解析を行った.</p> <p>材料・方法</p> <p>1. STEAP, EZH2, HLA-DR発現の検討</p> <p>肺癌組織の免疫染色と各種細胞株のウエスタンブロット法で発現を検討した.</p> | | | |

2. ペプチド特異的HTLの誘導

ヘルパーエピトープペプチドSTEAP₂₈₁₋₂₉₆およびEZH2₉₅₋₁₀₉で刺激した樹状細胞(DC)でCD4陽性T細胞を刺激し、STEAPあるいはEZH2特異的HTLを誘導した。また、抗HLA-class I抗体、抗HLA-DR抗体を用い、誘導したHTLのHLA拘束性を検討した。

3. ペプチド特異的HTLによる腫瘍細胞株の認識

STEAPあるいはEZH2を発現し、かつHLA-DRを発現した腫瘍細胞株を用い、特異的HTLが直接腫瘍細胞を認識可能か検討した。また、STEAPを発現した肺癌細胞株のtumor lysateをDCに抗原提示させ、STEAP特異的HTLを活性化できるか検討した。

4. CTL活性の検討

誘導した特異的HTLと肺癌細胞株を共培養し、破壊された細胞由来のLDHを定量して細胞障害活性の有無を検討した。

5. 肺癌患者末梢血中におけるSTEAP₂₈₁₋₂₉₆、EZH2₉₅₋₁₀₉に反応するT細胞前駆細胞の検討

両ペプチドを認識するT細胞前駆細胞が肺癌患者末梢血中に存在するかを検討した。肺癌患者末梢血単核球(PBMC)とSTEAP₂₈₁₋₂₉₆あるいはEZH2₉₅₋₁₀₉を共培養し、14日後に培養上清中のIFN- γ 定量を行った。採血に際し、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(承認番号849)。

成 績

1. STEAP, EZH2, HLA-DR発現の検討

肺癌組織(腺癌, 扁平上皮癌)の免疫染色で、全症例にSTEAPとEZH2の発現を認めた。HLA-DRは肺腺癌5例中4例に認め、癌細胞周囲に浸潤したリンパ球、肺胞マクロファージにも発現していた。

ウエスタンブロット法で、STEAPとEZH2は肺癌を含む様々な腫瘍細胞株で発現していた。両タンパクはPBMCに発現していなかった。

2. 誘導されたペプチド特異的HTLの解析

6名の健常人からSTEAP特異的HTLは4種、EZH2特異的HTLは6種誘導された。STEAP₂₈₁₋₂₉₆、EZH2₉₅₋₁₀₉は一つのペプチドから異なるHLA-DRに抗原提示されるpromiscuousなエピトープであった。これらの特異的HTLは、抗HLA-DR抗体で反応が抑制された。また、ペプチド濃度依存性に反応の増強を認めた。

3. ペプチド特異的HTLによる腫瘍細胞株の認識

STEAP特異的HTL, EZH2特異的HTLは, HLA-DR拘束性にSTEAPあるいはEZH2陽性の腫瘍細胞株を認識した. さらに, DCはtumor lysateを取り込み, HLA-DR拘束性に抗原提示をすることで, STEAP特異的HTLを活性化した.

4. CTL活性の検討

一部の特異的HTLはHLA-DR拘束性にSTEAPあるいはEZH2を発現する肺癌細胞株を認識しgranzyme Bを産生し, 細胞数依存性にキラー活性を示した.

5. 肺癌患者末梢血中におけるSTEAP₂₈₁₋₂₉₆, EZH2₉₅₋₁₀₉に反応するT細胞前駆細胞の検討

肺癌患者10例中, STEAP₂₈₁₋₂₉₆では9例, EZH2₉₅₋₁₀₉では全例で, ペプチドに反応するT細胞前駆細胞の存在を認めた.

考 案

肺癌組織の癌細胞周囲にHLA-DRを発現したリンパ球や肺胞マクロファージを認めたことから, 生体内で肺癌細胞に対する免疫反応が起こっていると考えられる. また, 肺癌細胞株の23%, 肺腺癌の45%でHLA-DRが発現していると報告され, HLA-DRを介する肺癌免疫治療が有効な可能性がある. 加えて, 1)同定したペプチドは様々なHLA-DRにより抗原提示されるpromiscuousなエピトープであること, 2)特異的HTLがtumor lysateや肺癌細胞株を直接認識し, 細胞障害活性もみられること, 3)健常者あるいは肺癌患者からT細胞反応を誘導できることから, 臨床応用が可能と考える.

癌免疫治療を行う上で, 1)自己免疫反応を誘導せず, 2)TAAに対しトレランスでないことが重要である. 1)について, STEAPとEZH2のタンパク発現量は正常組織で低く, 正常細胞は特異的HTLに認識されないため, STEAPとEZH2を使用しても自己免疫反応は起きないと推察される. 2)について, STEAPとEZH2は少ないものの正常組織, 良性腫瘍に発現がみられ, 悪性腫瘍では発現量が増加する. これらの低レベル, 高レベルのTAA発現が特異的HTLレパトリーの減少を起し, トレランスを誘導する可能性もあるが, 肺癌患者末梢血中にペプチド反応性のT細胞が存在することから, このトレランスは起こらないと考えられる.

動物実験では, CTL単独に比べ, 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. したがって, STEAP₂₈₁₋₂₉₆のようなCTLエピトープと一部重複するHTLエピトープや, HTL・CTLエピトープの併用が有用となる可能性がある. EZH2については, 近年抗腫瘍効果のあるEZH2阻害薬の開発の報告があり, 薬物・免疫治療の併用による肺癌治療成績の向上が期待される.




結 論

STEAP₂₈₁₋₂₉₆およびEZH2₉₅₋₁₀₉は、STEAPあるいはEZH2を発現する肺癌細胞株に対し、有効なHTL反応を誘導できた。これらのペプチドを用いた癌免疫治療の臨床応用が期待される。

引 用 文 献

1. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, et al: STEAP: A prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. PNAS 1999, 96:14523-14528.
2. Kobayashi H, Nagato T, Sato K, 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, 67:5498-5504.

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 | 林 諭史 |
| <p>審査委員長 大崎能伸 </p> <p>審査委員 原淵保明 </p> <p>審査委員 小林博也 </p> | | | |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate and enhancer of zeste homolog 2 as immunotherapeutic targets for lung cancer 肺がんに対する免疫表的分子としての STEAP, EZH2 に関する研究</p> | | | |

癌細胞に対する細胞性免疫を誘導して治療に応用するためには、正常組織には発現しないで、癌細胞に特異的に強く発現する蛋白質を標的にする必要がある、この標的蛋白質を腫瘍関連抗原 (TAA) とよぶ。学位論文の申請者は、細胞膜に発現する **six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP)** と、核内蛋白質で遺伝子発現の抑制に関与する **enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)** を腫瘍関連抗原とした癌免疫療法の基礎的研究を行った。肺癌切除検体を用いた免疫染色で、STEAP は腺癌 8 例中 8 例、扁平上皮癌 6 例中 6 例、EZH2 は腺癌 5 例中 5 例、扁平上皮癌 5 例中 5 例に検出できた。この成績に基づき、EZH2 に関しては 3 種類、STEAP に関しては 2 種類のエピトープペプチドを選択して以下の実験に用いた。3 種類の EZH2 ペプチドと 2 種類の STEAP ペプチドを用いた検討で、6 名の健常者から STEAP では 4 種類、EZH2 では 6 種類の特異的 CD4 T-cell が誘導された。EZH2、STEAP に反応する CD4 T-cell は 5 株の肺癌培養細胞株を用いた検討で、それぞれ数株で EZH2、STEAP を認識した。また、樹状細胞は肺癌培養細胞株の細胞ホモジネートを取りこみ、HLA-DR 拘束性に抗原を提示することで STEAP 特異的 CD4 T-cell を活性化した。一部の CD4 T-cell は HLA-DR 拘束性に STEAP あるいは EZH2 を発現する肺癌細胞を認識し、**granzyme B** を産生し、細胞数依存性にキラー活性を示した。肺癌患者 10 名からの検体を用いた検討では、STEAP で 9 例に、EZH2 では全例でエピトープペプチドに反応する T 細胞前駆細胞が存在した。

以上の研究により、肺癌を対象として STEAP と EZH2 をターゲットとした癌免疫治療の可能性を明らかにした。

本研究の成果はすでに **Journal of Translational Research** に出版されている。学位論文の申請者に対して、各審査委員から研究内容、関連領域に関する査問がなされ、十分な知識を持つ事が確認された。

本委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者が積み重ねた努力の結果であり、当該分野において十分に貢献した事を認め、医学博士を授与する価値があると結論した。