

氏名	す だ た か こ 須 田 多 香 子
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第553号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Identification of <i>secernin 1 (SCRN1)</i> as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray (cDNAmicroarray を用いた遺伝子解析から同定された新規胃癌抗原 SCRN1)
学位論文審査委員	(主査) 井 藤 久 雄 (副査) 清 水 英 治 池 口 正 英

## 学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

cDNA expression cloning 法や serological analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX) 法に代表される種々の手法によって、これまでに約 50 種類の腫瘍抗原が同定され、癌免疫療法の標的として応用されてきた。しかし、現在までに報告されている腫瘍抗原の総数は癌の多様性を考慮した場合、いまだ十分であるとは言えず対象となる癌種にもまだ制限がある。特に、上皮性悪性腫瘍に関しては既知の抗原数が少なく新たな腫瘍抗原の開発が望まれている。一方、近年ではゲノム研究の発展により、多数の遺伝情報を同時・網羅的に解析する方法として cDNA microarray が開発され、腫瘍に特異的に発現する未知の遺伝子をも発見することが可能となった。

本研究ではこの手法を用いて胃癌の遺伝子発現解析を行い、胃癌特異的な遺伝子 *secernin1 (SCRN1)* を得た。さらに、SCRN1 の発現解析や機能解析を行うとともに、SCRN1 に由来する HLA-A\*0201 結合性のエピトープペプチドの同定を試み、この分子の腫瘍抗原としての免疫原性を証明した。

### 方 法

各種培養細胞株 11 株および胃癌切除 11 症例の腫瘍部と非腫瘍部粘膜を用いた。23040 個の遺伝子を搭載した cDNA microarray を使用した胃癌の遺伝子発現情報解析から胃癌に高発現する遺伝子 *SCRN1* を抽出した。SCRN1 の癌組織および正常臓器における発現は、それぞれ RT-PCR 法と northern blot 法にて確認し、機能解析は colony formation assay を行った。エピトープペプチドの同定は reverse immunology 法の手法に従った。

SCRN1 の全アミノ酸配列から HLA-A\*0201 結合性のペプチドを予測し、HLA-A\*0201 への結合親和

性が高いものから順に、9mer および 10mer ペプチドをそれぞれ 20 個ずつ作成した。次に、それら各々について健康人末梢血より自己樹状細胞を使用し、Cytotoxic T Lymphocyte (CTL)の誘導を試みた。誘導した CTL の細胞傷害活性は 51Cr release assay によって検討し、CTL の特異性は cold target inhibition assay および antibody blocking assay にて確認した。

## 結果

cDNA microarray による解析では、胃癌症例 11 例中 9 例において非癌部胃粘膜に比べ胃癌組織で SCRN1 の発現上昇を認め、RT-PCR 解析でも胃癌組織での発現が確認された。また、正常組織における発現を northern blot 法にて解析した結果、SCRN1 は精巣と卵巣に強く発現しており癌胎児性抗原様の発現パターンを有していた。機能解析の結果により、この遺伝子は細胞増殖に関与することが示された。エピトープペプチドの同定に際しては、SCRN1 由来の候補ペプチドのうち、SCRN1-196(KMDAEHPPEL)を用い、SCRN1-196 に特異的な細胞傷害活性を有す CTL clone が樹立された。この CTL clone はペプチドを外因性にパルスした標的細胞だけでなく、SCRN1 を内因性に発現する腫瘍細胞株 SNU475 に対しても細胞傷害活性を示した。この CTL clone は、cold target inhibition assay において、ペプチドの存在により hot target への細胞傷害活性が阻害されており、また、抗体による阻害試験では抗 HLA class I 抗体の存在によって、その活性が抑えられていたことから、抗原ペプチドへの特異性と細胞傷害活性の HLA-A\*0201 拘束性が確認された。よって、SCRN1-196 を SCRN1 のエピトープペプチドであると決定し、同時に、SCRN1 は、CTL に認識されて免疫療法の標的となり得る腫瘍抗原であることが証明された。さらに、SCRN1-196 の免疫原性を高める目的で、SCRN1-196 のアミノ酸配列中の leucine を valine に置換し、HLA-A\*0201 への結合親和性を高めた改変ペプチド SCRN1-9V(KMDAEHPPEV)を作成し、CTL の誘導を試みたところ、SCRN1 を認識可能な CTL が誘導された。

## 考察

SCRN1 は Way らの報告を嚆矢とするが、本研究では cDNA microarray による遺伝子発現情報を利用し、胃癌に対する新規腫瘍抗原であることを見いだした。SCRN1 は 414a.a.から成る細胞質内蛋白であり、分泌顆粒のリクルートメントや放出に関与し、肥満細胞の脱顆粒を促進することが知られている。また、胃癌での発現頻度が高く、細胞増殖作用のあることが示唆された。

本研究では SCRN1 を標的とし、癌ワクチン療法として臨床応用可能なエピトープペプチド SCRN1-196 を同定した。今回用いた手法は、遺伝子の発現情報の観点から、従来の手法で発見し得なかった新しい腫瘍抗原を効率的に同定する有力な方法であることが示唆された。今後、この方法を用いより効果的な癌免疫療法の標的分子の開発が期待される。

なお、9mer からなるエピトープペプチド SCRN1-196 および改変ペプチドは、日本人の約 20%、欧米人の約 50%が有する HLA-A\*0201 を介して CTL に認識される。従って、本抗原を用いた胃癌のワクチン療法が期待される。

## 結 論

cDNA microarray を使用した胃癌の新規腫瘍関連抗原をコードする遺伝子 *SCRN1* の機構解析を行い、本抗原を用いた胃癌のワクチン療法の可能性を提示した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は新規腫瘍関連抗原の検索を目的として、cDNA microarray 法により胃癌で特異的に発現している *SCRN1* 遺伝子産物の機能解析を行っている。*SCRN1* はヒト胃癌組織のみならず、精巣と卵巣に強く発現しており癌胎児性抗原様の生物学的特性を解明した。さらに、全アミノ酸配列から HLA-A\*0201 結合性のエピトープペプチドを同定した。健常人末梢血より自己樹状細胞を使用して、Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) の誘導し、エピトープペプチドおよびその改変ペプチド認識 CTL の細胞傷害活性を解析し、*SCRN1* は CTL に認識されて免疫療法の標的となり得る腫瘍抗原であることが証明した。かかる結果は胃癌の新規ワクチン療法の可能性を提示したものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。