日消外会誌　30（4）：901～905，1997年

特集4

膵癌・大腸癌における *ras* 蛋白に対する免疫応答による存在診断とその治療への展望

横浜市立大学医学部第2外科
高橋　正純　　山岡　博之　　市川　靖史
渡会　伸治　　嶋田　紘
ワシントン大学医学部
Martin A, Cheever

膵癌・大腸癌患者において *ras* 蛋白に対する免疫応答を検討した．血清中の抗 *ras* 抗体陽性率は正常人の5％（2/40）に対し，大腸癌で40％（51/150，$p<0.01$），膵癌で80％（4/5，$p<0.05$）と高かった．抗 *ras* 抗体の認識部位は *ras* 蛋白の正常部，変異部など多様でその73％は *ras* 蛋白のカルボキシル基側の正常部であった．末梢血中の *ras* 蛋白関連ペプチドに対する特異的T細胞の検出率は正常人の0％（0/20）に対し，大腸癌で24％（6/25），膵癌で40％（6/15）と高かった（$p<0.01$）．*Ras* 蛋白を標的とした細胞障害性T細胞（CTL）の誘導を試み，膵癌3例中1例では *ras* 蛋白のカルボキシル基側の正常部ペプチドに特異的なCD4陽性のCTL株が得られた．以上より，膵癌，大腸癌で *ras* 蛋白に対する特異的な血清抗体による癌の存在診断の可能性および *ras* 蛋白に対する特異的CTLによる癌治療の展望が期待された．

Key words： ras oncogene，tumor specific antigen，pancreas cancer

はじめに

癌の遺伝子産物の一部はその遺伝子の変異，欠失，増幅などにより，癌特異的抗原と成り得る[1]．*Ras* 癌遺伝子はヒト膵癌の90％，大腸癌の45％でコドン12，13または61の部位に点突然変異が指摘されており[2)3)]，その遺伝子産物である *ras* 蛋白（p21*ras*）はこれらの癌の発育とともに宿主に特異的な抗原として感作される可能性がある．したがって，膵癌，大腸癌で *ras* 蛋白に対する免疫応答を癌の存在診断や治療に応用することが考えられる．筆者らは膵癌，大腸癌でこの変異型 *ras* 蛋白に特異的な抗体およびT細胞が存在することを報告し[4]，さらに野生型 *ras* 蛋白に対する免疫応答がこれらの癌患者の一部において成立していることを証明した[5]．今回，膵癌，大腸癌の存在診断における *ras* 蛋白に対する免疫応答の有無を検索することの意義と治療への応用として *ras* 蛋白に特異的な細胞障害性T細胞（CTL）の誘導がヒトで可能かどうか検討した．

対象と方法

血清：大腸癌160例，膵癌5例および正常人20例の血清5mlを採取した．

末梢血リンパ球：大腸癌29例，膵癌20例および正常人20例の末梢血を60mlヘパリン加採血し，Ficoll-Hypaque法で単球分画を分離した．

p21*ras* 蛋白関連抗原：5種類のp21*ras* 蛋白および11種類の *ras* 関連ペプチドを用いた（**Table 1**）．各p21*ras* は正常あるいは各点突然変異をもつ *ras* 癌遺伝子を導入した大腸菌由来の組換え遺伝子蛋白をHPLCで純化し，さらにlipopolysaccharidesを除去した．またペプチドは野性型あるいは変異型のp21*ras* の4-21番目のペプチド（p4-21）および野生型のp21*ras* 蛋白の3次元構造上で α-helixを形成し，蛋白表面に位置する部位の各18merペプチドを3カ所選び用いた．対照には分子量の近い蛋白として組換え遺伝子蛋白のmyoglobinとsoybean由来蛋白のtrypsin inhibitorを用いた．

＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開

＜1996年12月11日受理＞別刷請求先：高橋　正純
〒236　横浜市金沢区福浦3－9　横浜市立大学医学部第2外科

Table 1　Normal and mutated *ras* peptides used in the studies*

Ras Peptide Name	Length	Amino Acid sequence																
G12(p4-21)	18mer.	Y	K	L	V	V	V	G	A	G	G	V	G	K	S	A	L	T	I
C12(p4-21)	18mer.	Y	K	L	V	V	V	G	A	C	G	V	G	K	S	A	L	T	I
S12(p4-21)	18mer.	Y	K	L	V	V	V	G	A	S	C	V	G	K	S	A	L	T	I
V12(p4-21)	18mer.	Y	K	L	V	V	V	G	A	V	G	V	G	K	S	A	L	T	I
D12(p4-21)	18mer.	T	K	L	V	V	V	G	A	D	G	V	G	K	S	A	L	T	I
G13(p4-21)	18mer.	Y	K	L	V	V	V	G	A	G	D	V	G	K	S	A	L	T	I
(p48-63)	18mer.	G	E	T	C	L	L	D	I	L	D	T	A	G	Q	E	E	Y	S
(p125-142)	18mer.	V	D	T	K	Q	A	Q	D	L	A	R	S	Y	G	I	P	F	I
(p147-164)	18mer.	K	T	R	Q	R	V	E	D	A	F	Y	T	L	V	R	E	I	R
(p162-179)	18mer.	E	I	R	Q	Y	R	L	K	K	I	S	K	E	E	K	T	P	G

*Normal (wild type) p21*ras* protein contains Gly at amino acid position 12.

血清中の抗 *ras* 抗体の同定：血清中の抗 *ras* 抗体の存在を同定するため，ELISA を用いた．また抗 *ras* 抗体の認識部位を検討するため，*ras* 蛋白関連ペプチドによる抗体中和試験を ELISA で行った．

1) ELISA：抗体となる p21*ras* および対照の蛋白をコーティングした（0.02μg/well）ELISA プレートを作成した．Casein 含有緩衝液でブロックした後，同液で40倍希釈した血清を一次抗体とし，2次抗体には peroxidase 標識抗ヒト-IgA 抗体を用いた．Tetramethyl-benzidine（TMB）発色後に450nm での吸光度を測定した．

2) ペプチドによる抗体中和試験（ELISA）：希釈血清は各ペプチド（100μg/ml）を加えて1時間インキュベートした後に一次抗体として用い，前述の ELISA を施行した．

3) リンパ球増殖試験による p21*ras* 特異的 T 細胞の検出：末梢血リンパ球（2×10^6/ml）を各種 p21*ras* 蛋白関連抗原（蛋白：10μg/ml，ペプチド：50μg/ml）を加えて96時間96穴丸底プレートで7％自己血清加 RPMI(GIBCO) を用い培養した．^{3}H-thymidine 1mCi/well を最後の8時間に添加して，^{3}H の取り込みを測定し，抗原を添加しない場合の値を分母とした stimulation index（SI）を算出した．陽性対照としてテタヌス毒（TT）を用い，SI>2.0を陽性とした．

4) p21*ras* 蛋白関連抗原で刺激培養して得られたリンパ球のペプチド特異的な細胞障害活性の測定：膵癌3例の末梢血リンパ球を初期培養では p21*ras*-G12または p21*ras*-D12蛋白で刺激し，その後は各蛋白の由来のペプチド，IL-2および IL-7を用いて in vitro で刺激培養してペプチド特異的 T 細胞株の作成を試みた．こうして得られた各ペプチド特異的 T 細胞株の *ras* 抗原特異的な細胞障害活性を自己 B リンパ球から作成した EB ウイルス形質転換細胞を標的とし，各ペプチドを添加した場合のペプチド特異的な細胞障害活性を^{51}Cr 遊離試験で検討した．

統計学的検討：測定値は unpaired student-t 検定を行い，$p<0.05$を有意差ありと判定した．

結　果

1) 大腸癌患者では *ras* 蛋白に対する血清 IgA 抗体の陽性率が正常人より有意に高かった．

Table 2　Serum IgA antibody to p21*ras* protein can be detected in colon cancer patients with much greater incidence than in normals

sera	evaluable rate	p21*ras* proteins					
		G12	D12	V12	S12	L61	Any
Colon Cancer	150/160	30.0%**	28.6%**	31.8%**	32.5%**	31.0%**	40.6%**
Pancreas Cancer	5/5	80.0%*	80.0%*	80.0%*	80.0%*	80.0%*	80.0%*
Normal Donor	40/40	5.0%	2.5%	2.5%	2.5%	2.5%	5.0%

*：$p<0.05$，**：$p<0.01$ vs normal donor

ELISA demonstrated significantly higher posotive rate of serum antibody to every p21*ras* protein in patients with colon and pancreas cancer.

大腸癌患者160例および正常人40例の血清を1次抗体，抗IgA抗体を2次抗体としてELISAを施行した．大腸癌患者では平均吸光度が0.25±0.31と正常人の0.02±0.06に比べ，有意に平均吸光度が高かった($p<0.01$)．正常人の平均吸光度＋3倍標準偏差以上を抗*ras*抗体陽性と判断した．野生型あるいはいずれかの変異型p21*ras*に対するIgA抗体陽性率は判定可能症例に限ると大腸癌患者で40.6%(61/150)，膵癌患者で80%（4/5）であった．各p21*ras*に対してはG-12 30.0%，D-12 28.6%，V-12 31.8%，S-12 32.5%，L-61 31.0%であった（**Table 2**）．

2）抗*ras*抗体陽性の大腸癌患者の多くは野生型，変異型いずれの*ras*蛋白に対しても抗体反応が陽性であった．

症例の27.3%で野生型（G-12）と変異型（D-12）の両方のp21*ras*に対するIgA抗体が検出され，各p21*ras*に対してだけ反応する抗体をもつ症例は各々G-12 4.7%，D-12 3.3%であった（**Table 3**）．したがって，大腸癌患者血清中の抗*ras*抗体はポリクロナールでその認識部位は多様であり，多くはp21*ras*の正常部を認識している可能性が考えられた．

3）抗*ras*抗体の認識部位の多くは*ras*蛋白のカルボキシル基末端側の正常部であった．

Table 3 For most patients with colon cancer, antibody that responds to mutated p21 K-*ras* protein also responds to normal p21 K-*ras* G12 protein

Antibodies to p21 K-*ras* protein		Percent of patients positive	Number
D12 mutation	Normal (G12)		
+	+	27.3%	41/150
+	−	3.3%	5/150
−	+	4.7%	7/150
−	−	64.7%	97/150

抗*ras*抗体陽性であった大腸癌15例について各種ペプチドを用いた抗体中和試験を行い，これらの血清抗体が認識するp21*ras*のエピソートープを検索した．ELISAの平均吸光度を25%以上抑制し，抗*ras*抗体を中和したペプチドはp21*ras*のカルボキシル基末端側の2種類のペプチドで，中和された症例数はp147～164で8例（53%），p162～169で9例（60%），合わせて10例（67%）であった（**Table 4**）．したがって，抗*ras*抗体の認識部位の多くはp21*ras*のカルボキシル基末端側のペプチドであると考えられた．

4）大腸癌，膵癌患者の末梢血リンパ球中にp21*ras*の関連ペプチドに対する特異的なT細胞が存在した．

大腸癌でSI値が2.0以上と各ペプチドに対して特異的なT細胞が存在すると考えられた陽性症例は変異部のペプチドでC12（6例，24%），S12（5例，20%），正常部のペプチドではp162～179（4例，16%）に多かった．膵癌での陽性例は変異部のペプチドでD12（6例，40%），C12（2例13.3%），S12（2例13.3%），D13（2例13.3%），正常部のペプチドではp162～179（6例40%）に多くみられた．健常人に陽性例はなかった（**Table 5**）．

5）膵癌患者の末梢血リンパ球を*ras*関連抗原で刺激培養して得られたCD4$^+$陽性細胞にペプチド特異的な細胞障害活性が認められた．

膵癌3例中1例で変異部のD-12ペプチドおよび正常部のp162～179ペプチドに特異的な増殖を示すCD4陽性T細胞株が1株ずつ得られた．これらのT細胞株のペプチド特異的な細胞障害活性を自己Bリンパ球から作成したEBウイルス形質転換細胞を標的に測定すると，カルボキシル基側の正常部のp162～179ペプチド特異的増殖を示すT細胞株でp162～179ペプチド特異的な細胞障害活性（ET比1：20，64%）を認めた．変異部のD-12ペプチド特異的に増殖をT細胞

Table 4 Antibody responses to p21*ras* proteins in colon cancer patients can be blocked by peptides from the carboxyl terminus of p21*ras* protein (n=15)

	p21ras G12 protein	p21ras peptides as competitor				
		p4-21	p48-65	p125-142	p147-164	p162-179
number of patients with antibody neutralized by peptide n=15	15 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (53%)	9 (60%)
mean of %inhibition	54%	4.4%	1.5%	0.8%	28%	29%

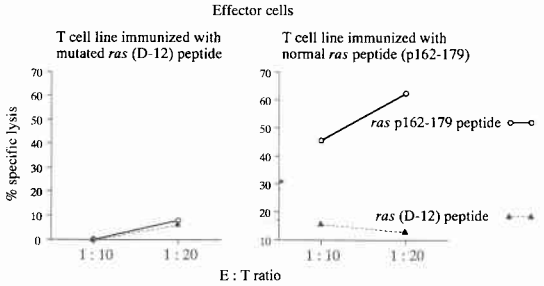
Peptide neutralization assay suggested that most of anti-*ras* antibody recognized peptides from carboxyl terminus of p21*ras* protein.

Table 5　CD4+ T cell immunity to p21*ras* peptides can be detected in patients with colon or pancreas cancer

p21*ras* peptide	Evaluable Patients		Normal donor (n=20)
	Colon cancer (n=25)	Pancreas cancer (n=15)	
D12	2/25(8%)	6/15(40%)	0/20
G12	0/25(0%)	1/15(6.7%)	0/20
C12	6/25(24%)	2/15(13.3%)	0/20
S12	5/25(20%)	2/15(13.3%)	0/20
V12	1/25(4%)	0/15(0%)	0/20
D12	1/25(4%)	2/15(13.3%)	0/20

Number of patients tested: colon cancer; 29, pancreas cancer; 20. Evaluable patients had positive response to tetanus toxoid in lymphocyte proliferation assay.

Fig. 1　Peptide-specific lysis by CD4+T cell line immunized with normal *ras* peptide



株ではペプチド特異的な細胞障害活性は認められなかった（**Fig. 1**）.

考　察

癌細胞の遺伝子に変異，欠失，増幅などがある場合，その遺伝子産物は質的あるいは量的に癌に特異的な蛋白といえる[1]．T細胞が抗原として認識するのは主要組織適合性複合体（MHC）とその溝に入り込んだ蛋白由来のオリゴペプチドの形成する複合体で[6]，細胞内蛋白であっても宿主の免疫系が癌化に伴う異常な蛋白由来のペプチドを認識する可能性がある．既知の癌遺伝子産物の中で免疫応答を誘導し得るものとしてp53[7]，HER2/neu[8]，*bcr-abl*[9]，*c-myc*[10]，*ras*[11)12)]などの遺伝子の関連蛋白がある．*Ras* 癌遺伝子の関連蛋白は189個のアミノ酸からなる分子量21-KDの蛋白（p21*ras*）で，コドン12，13あるいは61などでDNAが点突然変異することにより[2]，アミノ酸が1つ置換し，細胞増殖のシグナル伝達を促進する活性型のp21*ras*となり，細胞の癌化に関わる．人では膵癌の90%，甲状腺濾胞腺癌の50%，大腸癌の45%，肺癌の30%などさまざまな癌で *ras* 癌遺伝子の同じ部位のコドンの点突然変異が指摘され[2)3)]，p21*ras* はこれらの癌に特異的な共通抗原といえる．したがって，膵癌，大腸癌など *ras* 癌遺伝子の変異の割合が多い癌では *ras* 蛋白に特異的な抗体およびT細胞などの免疫応答の有無が癌の存在診断に応用できる可能性がある．一方，*ras* 蛋白に対する免疫応答の治療への応用として *ras* 蛋白に特異的なCTLの誘導がヒトで可能であれば，これらのCTLを用いた受動免疫療法やワクチン療法への展望も開けると考えられた．

今回，一部の大腸癌，膵癌患者においてp21*ras* に対する特異的な血清IgA抗体の存在が認められた．これら抗 *ras* 抗体が認識する部位は患者により多様でp21*ras* の変異部のみならず正常部のペプチドにも認められた．このことは変異蛋白による免疫寛容の破壊がおこり，癌患者に自己抗体が発現したことを意味する．抗 *ras* 抗体の認識部位の違いと臨床病理学的特徴に関連性は指摘しえなかったが，大腸癌の40.6%，膵癌の80%に抗 *ras* 抗体が検出されたことはその存在診断に応用可能と思われた．血清抗体検査が量的，時間的に容易で経済的にも負担の少ない検査であることから臨床上有用であろうと考えられた．

p21*ras* に対する細胞性免疫応答として *ras* 関連ペプチドに対する特異的増殖反応を検討したところ，大腸癌の20%，膵癌の40%にペプチド特異的なCD4陽性T細胞が認められた．末梢血中の特異的T細胞の細胞数比率は10^5～10^6個に1個と極めて少ないことから，リンパ球の増殖反応は陽性例でもSI値が2.0～4.0と弱い反応であり，癌の存在診断への応用は困難であると思われた．しかし，これらのペプチド特異的なリンパ球増殖反応を癌特異的ペプチドの同定に用いれば，癌のワクチン療法に用いるペプチドの選定に有用な検査法であると思われた．またin vitroで癌患者のリンパ球を癌特異的ペプチドで刺激増殖させ，得られたCTLを養子免疫療法に応用することが考えられた．事実，膵癌患者の末梢血リンパ球を *ras* 蛋白関連ペプチドで刺激培養して得られたCD4陽性T細胞にペプチド特異的な細胞障害活性が認められたことから，*ras* 蛋白を分子標的とした免疫療法を臨床応用することは可能と思われた．

消化器外科領域では *ras* 蛋白に対する免疫応答の具体的な応用方法に関しては，術後の補助療法として *ras* 蛋白関連ペプチドを用いたワクチンによる免疫刺激を行い，minimal residual tumorからの再発を抑制

したり，特異的リンパ球の養子移入による転移の抑制などが考えられる．今後，他のサイトカイン，BRM製剤および抗癌剤などの併用効果に関してこの *ras* 蛋白を分子標的とした免疫療法の研究をすすめることで膵癌，大腸癌の新たな治療の確立が期待された．

文　献

1) Cheever MA, Disis ML, Takahashi M et al: Immunity to oncogenic proteins. Immunol Rev **145**: 33—59, 1995
2) Barbacid M: Ras genes. Ann Rev Biochem **56**: 779—827, 1987
3) Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res **49**: 4682—4689, 1989
4) Qin H, Chen W, Takahashi M et al: $CD4^+$ T-cell immunity to mutated *ras* protein in pancreatic and colon cancer patients. Cancer Res **55**: 2984—2987, 1995
5) Takahashi M, Chen W, Byrd DE et al: Antibody to *ras* proteins in patients with colon cancer. Clin Cancer Res **1**: 1071—1077, 1995
6) Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B et al: The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. Nature **329**: 512—518, 1987
7) Labreque S, Naor N, Matlashewski G et al: A analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. Cancer Res **53**: 3468—3471, 1994
8) Disis ML, Calenoff E, Cheever MA et al: Existent T cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. Cancer Res **54**: 16—20, 1994
9) Chen W, Peace DJ, Cheever MA et al: T-cell immunity to the joining region of p210obc, abl protein. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 1468—1472, 1992
10) Ben-Mahrez K, Sorokine I, Thierry D et al: Circulating antibodies against c-myc oncogene product in sera of colorectral cancer patients. Int J Cancer **46**: 35—38, 1990
11) Peace DJ, Smith JW, Cheever MA et al: Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. J Exp Med **179**: 473—479, 1994
12) Gedde-Dahl T III, Spurkland A, Gaudernack G et al: T cell epitopes encompassing the mutational hot spot position 61 of p21 ras. Eur J Immunol **24**: 410—414, 1994

A Survey of Diagnosis of Existence and Immunotherapy with Immune Response to *ras* Oncogenic Proteins in Pancreatic and Colon Cancer Patients

Masazumi Takahashi, Hiroyuki Yamaoka, Yasushi Ichikawa, Shinji Togo, Hiroshi Shimada and Martin A. Cheever*

Second Department of Surgery, School of Medicine, Yokohama City University

*Division of Oncology Department of Medicine, School of Medicine, University of Washington

Immune responses to *ras* oncogenic proteins were studied in pancreatic and colon cancer patients. Positive rates for serum anti-*ras* antibody were significantly higher in patients with pancreatic cancer (80%, 4/5, $p<0.05$) and colon cancer (40%, 51/150, $p<0.01$) as compared to normal donors (5%, 2/40). The anti-*ras* antibodies recognized normal or mutated segments of p21*ras* protein, and 73% of colon cancer patients had antibodies to the carboxyl terminus of p21*ras* protein. T lymphocyte detection rates for specific *ras* peptides were significantly higher in patients with pancreatic cancer (40%, 6/15, $p<0.01$) and colon cancer (24%, 6/25, $p<0.01$) as compared to normal donors (0%, 0/20). We attempted to elicit cytotoxic T lymphocytes (CTL) specific for *ras* peptides, and found that $CD4^+$ CTL specific for the normal carboxyl terminus of the p21 *ras* protein could be elicited from peripheral blood lymphocytes from one of the three patients with pancreatic cancer. The results suggest that diagnosis of the existence, based on serum antibodies to *ras* oncogenic proteins, and immunotherapy with CTL specific for *ras* oncogenic proteins are promising future medical treatments for pancreatic and colon cancer patients.

Reprint requests: Masazumi Takahashi Second Department of Surgery, School of Medicine, Yokohama City University
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, 236 JAPAN