**学位論文抄録**

**Diversity in antigen recognition by and immune response of the human CD4+ T cell clone**

 **(ヒトCD4 陽性T細胞クローンの認識抗原ペプチドと免疫応答の多様性)**

熊　本　　花　子

指導教員

◯◯　◯◯　教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻△△学

Abstract of the Thesis

**Background and Purpose**: In order to establish cancer immunotherapy, it is important to identify the tumor-associated antigens (TAAs) that are strongly expressed in the tumor cells but not in the normal cells. In this study, to establish an effective anticancer immunotherapy, we tried to identify the ideal TAA of pancreatic cancer.

**Methods**: Based on a previous genome-wide cDNA microarray analysis of pancreatic cancer, we focused on Cadherin 3 (CDH3)/P-cadherin as a novel candidate TAA for anticancer immunotherapy. To identify the HLA-A2 (A\*0201)-restricted CTL epitopes of CDH3, we used HLA-A2.1 (HHD) transgenic mice (Tgm). Furthermore, we examined the cytotoxicity against the tumor cells in vitro and in vivo of CTLs specific to CDH3 induced from HLA-A2-positive healthy donors and cancer patients.

**Results**: CDH3 was overexpressed in the majority of pancreatic cancer and various other malignancies, including gastric and colorectal cancers, but not in their non-cancerous counterparts, or in many normal adult tissues. In the experiment using HLA-A2.1 Tgm, we found that the CDH3-4655-663 (FILPVLGAV) and CDH3-7757-765 (FIIENLKAA) peptides could induce HLA-A2-restricted CTLs in Tgm. In addition, peptides-reactive CTLs were successfully induced from PBMCs by in vitro stimulation with these two peptides in HLA-A2 positive healthy donors and cancer patients, and these CTLs exhibited cytotoxicity specific to cancer cells expressing both CDH3 and HLA-A2. Furthermore, the adoptive transfer of the CDH3-specific CTLs could inhibit the tumor growth of human cancer cells engrafted into NOD/SCID mice.

**Conclusions**: The CDH3 is a novel TAA useful for broad-spectrum cancer immunotherapy for pancreatic, gastric and colorectal cancers.

**学位論文抄録**

[ 目的 ] 大腸癌を含むさまざまな癌でadenomatous polyposis coli (APC)遺伝子の不活性化やβ-カテニン遺伝子（CTNNB1）の変異のため、細胞内や核内にβ-カテニンが蓄積していることが報告されている。核内に蓄積したβ-カテニンはT-cell factor / lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef)と複合体を形成し、下流遺伝子の転写を制御することによって発癌に関与することが示されている。このβ-カテニン-Tcf/Lef複合体の下流遺伝子を同定し機能解析を行うことによって、大腸癌の発癌メカニズムの解明、および治療への応用を目指すことを目的とした。

[ 方法 ] 細胞培養液中のドキシサイクリンの濃度によって活性型β-カテニンの発現を調整できる系をマウスの線維芽細胞L-cellで樹立し、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法を用い、活性型β-カテニンの発現量の変化に伴い発現の変化する遺伝子の同定を行った。

[ 結果 ] 蛍光ディファレンシャルディスプレイ法により、活性型β-カテニンの発現の増加に伴い発現の減少するクローンD-15を同定した。この遺伝子はＣ-Ｃケモカインに属するmonocyte chemotactic protein-3(MCP-3)であった。MCP-3は活性型β-カテニンの発現の増加に伴い発現が減少し、逆に活性型β-カテニンの細胞内蓄積が減少すると発現が増加することをＲＴ-ＰＣＲにて確認した。また、野生型ＡＰＣ遺伝子を組みこんだアデノウイルスをヒトの大腸癌細胞株SW480に感染させると、MCP-3の発現はβ-カテニンの減少に逆相関して増加した。reporter-gene assay ではMCP-3のプロモーター活性がβ-カテニンの核内蓄積に伴って低下し、Tcf/Lefの結合部位であるATCAAAGを介して制御されていたelectrophoresis mobility shift assay (EMSA)ではβ-カテニン-Tcf/Lef複合体が直接MCP-3のプロモーター領域に結合し、転写を制御していることがわかった。さらにMCP-3のcDNAをHT-29に導入すると、大腸上皮の分化マーカーであるalkarine phosphatase (ALP) activity とcarchinoembryonic antigen (CEA)の増加を認めた。

[ 考察 ] β-カテニン-Tcf/Letを介したMCP-3の発現抑制のメカニズムは不明であるが、直接制御、間接制御、またはこの複合体以外の第三の分子が関与している可能性が考えられる。

[ 結論 ] β-カテニンの細胞内蓄積はシグナル伝達系を介してMCP-3の導入する大腸の分化を制御する。これによって大腸上皮の癌化に影響している可能性がある。