

プチドで刺激して誘導された多くの細胞傷害性 T 細胞ががん細胞を MHC 拘束性に傷害することをこれまで報告してきたが、これらの CTL は通常抗原を発現している正常細胞に対する細胞傷害活性は無い。この現象の機序に関しては、おそらく正常細胞での発現量ががん細胞よりも低いために T 細胞が認識するに至らない (T 細胞は 100 個以上細胞表面に提示されないと活性化されない) ためだと考えられる。あるいは、正常細胞が攻撃から免れる何らかの別の機序があるのかもしれない。

しかしながら、これらの経験に反し、SARS-CoV 由来のペプチドで刺激して誘導された CTL ががん細胞のみならず正常細胞に対しても傷害活性が認められたことは、SARS-CoV 感染者の一部で重篤な自己免疫様肺炎と関連する可能性が考えられた。

D. 考察

はじめに、昨年度同定した SARS ウイルス構成タンパク質由来の 3 種類のペプチドを用いた迅速診断法の確立を目的に研究を行った。

ルミネックス法による感染後 6 ヶ月後に採血した血清中の 3 種類のペプチドに対する抗体は、それぞれ S791 が 51%、M207 が 60%、および N161 が 41%であることを初年度に報告した。そこで本年度、感染初期における抗体の産生を中国人の患者血清で測定した (共同研究) ところ、S791 に対する抗体は 14 例中 14 例が陽性であることが確認された。N161 に対する抗体は約 42%と、6 ヶ月後採血のベトナム人患者の結果とほぼ同じだった。すなわち、エピトープによって患者の免疫応答の違いが確認されたことから、これらの抗体の産生と患者の発症時の病態や回復過程などに関連を解析することは重要だと考えられた。

次に、患者抗体が認識する T 細胞エピトープペプチドを同定することによりペプチドワクチン治療への応用を検討することを目的として研究を行った。

昨年度の本研究で、健常人および SARS-CoV 感染者の両者の血清中に、HLA-A2 拘束性ペプチド K532-74 (YLTFyFTNDV、CDS1 にコードされる HLA-A2 拘束性ペプチド) を認識する IgG 抗体が高頻度に存在することが分かった。このペプチドのアミノ酸配列はウイルス由来であり、もともと非感染者では免疫応答が起こるはずがない。一方、SARS-CoV 感染者の一部は一定期間後重篤な肺の炎症のため致死率の高いことが知られている。そして、

この肺炎に対しては免疫抑制性のステロイド剤が効果のあることが報告されている。このことから、我々は SARS ウイルス感染がきっかけとなり、自己免疫応答が起こり交差性の抗体および T 細胞の誘導が起こるためではないかという仮説を立てた。

T 細胞エピトープ同定を目的に、HLA-A2 および -A24 結合性ペプチド 340 種類のうち、血清抗体が認識する 12 種類のペプチドを同定した。そのうち 9 種類のペプチドで日本人健常人末梢血からの T 細胞誘導が確認された。これらのペプチドの中には他の微生物とのホモロジーを有するペプチドがあることが判明した。SARS 由来断片ペプチドに対する抗体や CTL 前駆細胞の存在意義の解析、さらに、感染患者末梢血からの CTL 誘導能を有するペプチドの同定を行う必要がある。

これらの誘導された T 細胞の解析はまだ十分ではないが、HLA-A2 結合性の SARS 由来ペプチド (K532-74) により誘導された CTL の細胞傷害活性の一例では、HLA-A2 を持っていない前立腺がん細胞株に対しては細胞傷害活性を示さないのに対して、HLA-A2 を発現させた同じ細胞株に対しては有意な細胞傷害活性を示した。このことは、SARS 由来ペプチドで誘導した CTL が、おそらく相同性の高いペプチド配列を持つ分子を細胞が持っている可能性を示唆している。さらに、HLA-A2 陽性の PHA 刺激正常細胞に対してもまた傷害活性を有していることが分かった。このことは、SARS 患者の一部で重篤な自己免疫性の肺炎症状を起こすメカニズムと関連している可能性があるのではないかと考え、今後慎重に検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1-1. 論文発表 (英文査読誌掲載論文)
なし

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)
なし

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)
なし

1-4. 論文発表 (著書)
なし

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表（口頭・ポスター発表）

なし

2-2. 国内学会発表（口頭・ポスター発表）

なし

L. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

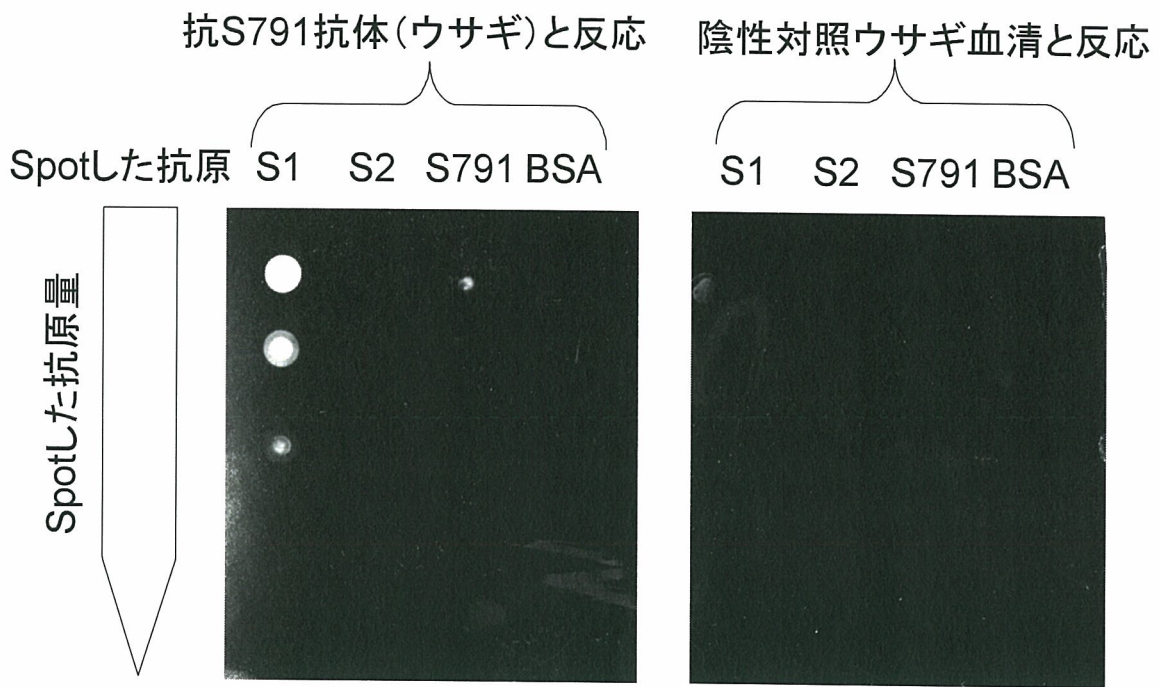


図1 SARS-CoV 由来リコンビナント蛋白質に対するウサギ抗 S791 抗体の反応性

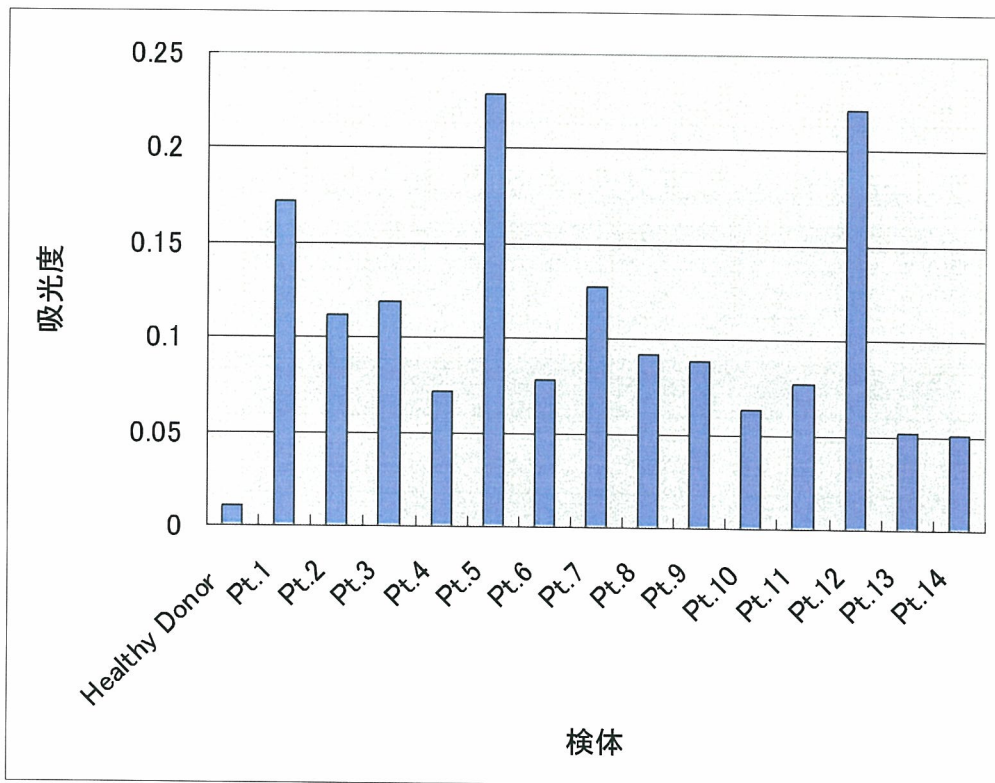


図2 SARS-CoV 急性期感染患者血清中の S791 に対する抗体

表1 SARS-CoV 急性期感染患者血清中の抗 N161-pep IgG

患者番号	吸光度	患者番号	吸光度	患者番号	吸光度	患者番号	吸光度
1	0.020	47	0.378	93	0.000	139	0.340
2	0.036	48	0.105	94	0.008	140	0.622
3	0.012	49	0.010	95	0.007	141	0.014
4	0.072	50	0.018	96	0.334	142	0.013
5	1.159	51	0.005	97	0.004	143	0.007
6	0.133	52	1.280	98	1.235	144	0.012
7	0.068	53	0.040	99	0.005	145	1.117
8	0.045	54	0.001	100	0.018	146	0.473
9	0.057	55	0.047	101	0.014	147	0.017
10	0.031	56	0.102	102	0.021	148	0.014
11	0.048	57	1.729	103	0.007	149	0.001
12	0.976	58	0.013	104	0.030	150	0.011
13	0.005	59	0.011	105	0.117	151	0.134
14	0.002	60	0.066	106	0.029	152	0.842
15	0.035	61	0.023	107	0.020	153	0.039
16	0.238	62	0.698	108	0.018	154	0.006
17	0.060	63	0.024	109	0.386	155	0.688
18	0.057	64	0.023	110	0.060	156	0.001
19	0.093	65	0.044	111	0.080	157	0.009
20	0.182	66	0.143	112	0.027	158	0.711
21	0.037	67	0.017	113	0.007	159	0.009
22	0.048	68	0.037	114	0.044	160	0.007
23	0.010	69	0.006	115	0.004	161	0.024
24	1.408	70	0.017	116	0.064	162	0.014
25	0.027	71	0.247	117	0.217	163	0.015
26	0.017	72	0.049	118	0.017	164	0.023
27	0.012	73	0.127	119	0.077	165	0.002
28	0.084	74	0.006	120	0.006	166	0.007
29	0.031	75	0.021	121	0.026	167	0.114
30	0.004	76	0.006	122	0.014	168	0.008
31	0.049	77	0.076	123	0.003	169	0.024
32	0.054	78	0.081	124	0.021	170	0.023
33	0.044	79	0.062	125	0.002	171	0.023
34	0.027	80	0.044	126	0.023	172	0.015
35	0.038	81	0.045	127	0.003	173	0.019
36	0.037	82	0.029	128	0.100	174	0.006
37	0.121	83	0.005	129	0.059	175	0.196
38	0.121	84	0.011	130	0.017	176	0.002
39	0.112	85	0.007	131	0.160	177	0.003
40	0.071	86	0.000	132	0.001	178	0.003
41	0.032	87	0.002	133	0.012	179	0.015
42	0.028	88	0.008	134	0.016	180	0.365
43	0.060	89	0.097	135	0.018	181	0.019
44	0.015	90	0.428	136	0.007	182	0.172
45	0.044	91	0.014	137	0.027	183	0.000
46	0.036	92	0.002	138	0.998	184	1.425

表2 リアルタイム PCR による K532-74 ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子の正常脳および 3 種類の脳腫瘍細胞株における発現

	GAPDH	SLC38A3	GAPDH 1000 copy に対する 目的遺伝子の copy 数
Brain 正常	1394	5	3.59
	1889	12	6.35
T98G	13765	4	0.29
	19714	5	0.25
KNS81	27885	0	0.00
	31116	0	0.00
NO.10	23599	2	0.08
	23609	3	0.13

	GAPDH	SRGAP3	GAPDH 1000 copy に対する 目的遺伝子の copy 数
Brain 正常	1394	11	7.89
	1889	26	13.76
T98G	13765	6	0.44
	19714	9	0.46
KNS81	27885	0	0.00
	31116	0	0.00
NO.10	23599	2	0.08
	23609	4.8	0.20

	GAPDH	Sorting nexin 13	GAPDH 1000 copy に対する 目的遺伝子の copy 数
Brain 正常	1394	47	33.72
	1889	63	33.35
T98G	13765	574	41.70
	19714	574	29.12
KNS81	27885	396	14.20
	31116	488	15.68
NO.10	23599	411	17.42
	23609	547	23.17

	GAPDH	JAK1	GAPDH 1000 copy に対す 目的遺伝子の copy 数
Brain 正常	1394	42	30
	1889	90	48
T98G	13765	334	24
	19714	509	26
KNS81	27885	535	19
	31116	551	18
NO.10	23599	755	32
	23609	774	33

表3 K532-74ペプチドとホモロジーを有するペプチドを含む遺伝子発現のデータベース検索結果

1: JAK1 protein [Homo sapiens]

2: KIAA1864 protein [Homo sapiens]

4: SLC38A3 [Homo sapiens]

5: Sorting nexin 13 [Homo sapiens]

6: SRGAP3 protein [Homo sapiens]

	Breakdown by Tissue											
	Hs.207538		Hs.535451		Hs.76460		Hs.585343		Hs.571101			
adipose tissue	144	2 // 13881	0	0 // 13881	0	0 // 13881	0	0 // 13881	0	0 // 13881	0	0 // 13881
adrenal gland	32	1 // 31075	0	0 // 31075	32	1 // 31075	0	0 // 31075	32	1 // 31075	0	0 // 31075
ascites	0	0 // 40204	0	0 // 40204	0	0 // 40204	24	1 // 40204	0	0 // 40204	0	0 // 40204
bladder	32	1 // 30314	0	0 // 30314	32	1 // 30314	32	1 // 30314	0	0 // 30314	0	0 // 30314
blood	89	10 // 111468	0	0 // 111468	0	0 // 111468	71	8 // 111468	17	2 // 111468	0	0 // 111468
bone	193	14 // 72269	0	0 // 72269	0	0 // 72269	13	1 // 72269	0	0 // 72269	0	0 // 72269
bone marrow	61	3 // 48843	0	0 // 48843	0	0 // 48843	81	4 // 48843	0	0 // 48843	0	0 // 48843
brain	64	59 // 920005	5	5 // 920005	38	35 // 920005	39	36 // 920005	102	94 // 920005	0	0 // 920005
cervix	124	6 // 48044	0	0 // 48044	0	0 // 48044	0	0 // 48044	0	0 // 48044	0	0 // 48044
cochlea	0	0 // 16693	0	0 // 16693	0	0 // 16693	59	1 // 16693	0	0 // 16693	0	0 // 16693
colon	64	13 // 201707	0	0 // 201707	0	0 // 201707	29	6 // 201707	19	4 // 201707	0	0 // 201707
connective tissue	55	6 // 107446	0	0 // 107446	18	2 // 107446	18	2 // 107446	18	2 // 107446	0	0 // 107446
cranial nerve	0	0 // 18970	0	0 // 18970	0	0 // 18970	0	0 // 18970	0	0 // 18970	0	0 // 18970
embryonic tissue	45	9 // 199296	0	0 // 199296	0	0 // 199296	55	11 // 199296	15	3 // 199296	0	0 // 199296
esophagus	52	1 // 19070	0	0 // 19070	0	0 // 19070	104	2 // 19070	0	0 // 19070	0	0 // 19070
eye	48	10 // 207188	9	2 // 207188	139	29 // 207188	38	8 // 207188	28	6 // 207188	0	0 // 207188
heart	66	6 // 89611	0	0 // 89611	22	2 // 89611	0	0 // 89611	22	2 // 89611	0	0 // 89611
kidney	131	28 // 212690	0	0 // 212690	9	2 // 212690	47	10 // 212690	4	1 // 212690	0	0 // 212690
larynx	756	23 // 30412	0	0 // 30412	0	0 // 30412	0	0 // 30412	32	1 // 30412	0	0 // 30412
liver	52	11 // 209809	0	0 // 209809	95	20 // 209809	66	14 // 209809	4	1 // 209809	0	0 // 209809
lung	48	17 // 347481	0	0 // 347481	2	1 // 347481	34	12 // 347481	43	15 // 347481	0	0 // 347481
lymph	201	9 // 44605	0	0 // 44605	0	0 // 44605	0	0 // 44605	0	0 // 44605	0	0 // 44605
lymph node	346	33 // 95350	0	0 // 95350	0	0 // 95350	62	6 // 95350	0	0 // 95350	0	0 // 95350
mammary gland	122	21 // 171055	0	0 // 171055	5	1 // 171055	64	11 // 171055	35	6 // 171055	0	0 // 171055
mouth	102	7 // 68504	0	0 // 68504	14	1 // 68504	14	1 // 68504	14	1 // 68504	0	0 // 68504
muscle	61	7 // 114733	8	1 // 114733	43	5 // 114733	156	18 // 114733	26	3 // 114733	0	0 // 114733
nerve	119	2 // 16697	0	0 // 16697	59	1 // 16697	0	0 // 16697	179	3 // 16697	0	0 // 16697
ovary	37	4 // 106303	0	0 // 106303	18	2 // 106303	47	5 // 106303	28	3 // 106303	0	0 // 106303
pancreas	123	27 // 219209	0	0 // 219209	18	4 // 219209	41	9 // 219209	9	2 // 219209	0	0 // 219209
parathyroid	47	1 // 20844	0	0 // 20844	0	0 // 20844	0	0 // 20844	0	0 // 20844	0	0 // 20844
pharynx	22	1 // 45449	0	0 // 45449	0	0 // 45449	0	0 // 45449	44	2 // 45449	0	0 // 45449
pituitary gland	0	0 // 17486	0	0 // 17486	0	0 // 17486	114	2 // 17486	0	0 // 17486	0	0 // 17486
placenta	26	8 // 296896	0	0 // 296896	0	0 // 296896	53	16 // 296896	6	2 // 296896	0	0 // 296896
prostate	58	9 // 154863	0	0 // 154863	0	0 // 154863	6	1 // 154863	19	3 // 154863	0	0 // 154863
salivary gland	0	0 // 20410	0	0 // 20410	0	0 // 20410	0	0 // 20410	0	0 // 20410	0	0 // 20410
skin	63	12 // 187976	0	0 // 187976	0	0 // 187976	15	3 // 187976	0	0 // 187976	0	0 // 187976
small intestine	67	3 // 44282	0	0 // 44282	0	0 // 44282	0	0 // 44282	0	0 // 44282	0	0 // 44282
spleen	0	0 // 52827	0	0 // 52827	0	0 // 52827	0	0 // 52827	0	0 // 52827	0	0 // 52827
stomach	39	4 // 102095	0	0 // 102095	0	0 // 102095	19	2 // 102095	0	0 // 102095	0	0 // 102095
testis	100	35 // 348675	#	4 // 348675	0	0 // 348675	88	31 // 348675	31	11 // 348675	0	0 // 348675
thymus	81	6 // 73978	0	0 // 73978	0	0 // 73978	13	1 // 73978	13	1 // 73978	0	0 // 73978
thyroid	345	19 // 54971	0	0 // 54971	18	1 // 54971	54	3 // 54971	0	0 // 54971	0	0 // 54971
tonsil	232	4 // 17168	0	0 // 17168	0	0 // 17168	0	0 // 17168	0	0 // 17168	0	0 // 17168
trachea	185	9 // 48483	0	0 // 48483	0	0 // 48483	144	7 // 48483	185	9 // 48483	0	0 // 48483
umbilical cord	0	0 // 13547	0	0 // 13547	0	0 // 13547	0	0 // 13547	73	1 // 13547	0	0 // 13547
uterus	113	27 // 238846	0	0 // 238846	0	0 // 238846	41	10 // 238846	29	7 // 238846	0	0 // 238846
vascular	177	9 // 50657	0	0 // 50657	0	0 // 50657	19	1 // 50657	0	0 // 50657	0	0 // 50657
whole body	132	6 // 45199	0	0 // 45199	22	1 // 45199	88	4 // 45199	44	2 // 45199	0	0 // 45199
whole brain	29	4 // 137839	0	0 // 137839	43	6 // 137839	7	1 // 137839	65	9 // 137839	0	0 // 137839

Breakdown by Health State															
	Hs.207538			Hs.535451			Hs.76460			Hs.585343			Hs.571101		
adrenal tumor	72	1 / 13775	0	0 / 13775	72	1 / 13775	0	0 / 13775	0	0 / 13775	72	1 / 13775			
bone tumor	129	13 / 100077	0	0 / 100077	0	0 / 100077	29	3 / 100077	9	1 / 100077	9	1 / 100077			
breast (mammary gland) cancer	58	6 / 102862	0	0 / 102862	9	1 / 102862	29	3 / 102862	38	4 / 102862	4	1 / 102862			
cervical tumor	87	3 / 34359	0	0 / 34359	0	0 / 34359	0	0 / 34359	0	0 / 34359	0	0 / 34359			
colorectal cancer	54	7 / 129546	0	0 / 129546	0	0 / 129546	46	6 / 129546	15	2 / 129546	2	1 / 129546			
esophageal tumor	60	1 / 16543	0	0 / 16543	0	0 / 16543	120	2 / 16543	0	0 / 16543	0	0 / 16543			
gastrointestinal tumor	33	4 / 119046	0	0 / 119046	0	0 / 119046	16	2 / 119046	0	0 / 119046	0	0 / 119046			
genetic predisposition	187	2 / 10663	0	0 / 10663	187	2 / 10663	0	0 / 10663	0	0 / 10663	0	0 / 10663			
germ cell tumor	34	9 / 257958	7	2 / 257958	0	0 / 257958	15	4 / 257958	19	5 / 257958	5	2 / 257958			
glioma	36	4 / 108610	0	0 / 108610	46	5 / 108610	0	0 / 108610	55	6 / 108610	6	1 / 108610			
head and neck tumor	183	28 / 152671	0	0 / 152671	13	2 / 152671	26	4 / 152671	13	2 / 152671	2	1 / 152671			
kidney tumor	257	18 / 69945	0	0 / 69945	14	1 / 69945	57	4 / 69945	14	1 / 69945	1	1 / 69945			
leukemia	107	11 / 102699	0	0 / 102699	0	0 / 102699	58	6 / 102699	19	2 / 102699	2	1 / 102699			
liver tumor	100	9 / 89435	0	0 / 89435	145	13 / 89435	22	2 / 89435	11	1 / 89435	1	1 / 89435			
lymphoma	165	12 / 72698	0	0 / 72698	0	0 / 72698	27	2 / 72698	0	0 / 72698	0	0 / 72698			
non-glioma	46	6 / 129256	0	0 / 129256	0	0 / 129256	7	1 / 129256	15	2 / 129256	2	1 / 129256			
non-neoplasia	53	5 / 92722	0	0 / 92722	10	1 / 92722	21	2 / 92722	32	3 / 92722	3	1 / 92722			
normal	88	300 / 3397397	3	13 / 3E+06	25	88 / 3E+06	45	## / 3E+06	41	## / 3E+06	41	## / 3E+06			
ovarian tumor	86	7 / 80624	0	0 / 80624	24	2 / 80624	62	5 / 80624	24	2 / 80624	2	1 / 80624			
pancreatic tumor	94	10 / 106022	0	0 / 106022	0	0 / 106022	18	2 / 106022	18	2 / 106022	18	2 / 106022			
prostate tumor	27	2 / 71565	0	0 / 71565	0	0 / 71565	13	1 / 71565	13	1 / 71565	1	1 / 71565			
respiratory tract tumor	27	3 / 109181	0	0 / 109181	0	0 / 109181	36	4 / 109181	18	2 / 109181	2	1 / 109181			
retinoblastoma	21	1 / 46745	0	0 / 46745	21	1 / 46745	21	1 / 46745	0	0 / 46745	0	0 / 46745			
skin tumor	79	10 / 125599	0	0 / 125599	0	0 / 125599	15	2 / 125599	0	0 / 125599	0	0 / 125599			
soft tissue/muscle tissue tumor	258	23 / 88812	0	0 / 88812	0	0 / 88812	11	1 / 88812	22	2 / 88812	2	1 / 88812			
urinary bladder tumor	44	1 / 22523	0	0 / 22523	0	0 / 22523	44	1 / 22523	0	0 / 22523	0	0 / 22523			
uterine tumor	93	9 / 96710	0	0 / 96710	0	0 / 96710	62	6 / 96710	51	5 / 96710	5	1 / 96710			

Breakdown by Developmental Stage															
	Hs.207538			Hs.535451			Hs.76460			Hs.585343			Hs.571101		
embryo	36	6 / 162373	0	0 / 162373	0	0 / 162373	67	11 / 162373	36	6 / 162373	6	1 / 162373			
embryoid body	97	7 / 71853	0	0 / 71853	0	0 / 71853	41	3 / 71853	13	1 / 71853	1	1 / 71853			
fetus	63	37 / 586284	0	0 / 586284	30	18 / 586284	37	22 / 586284	25	15 / 586284	15	5 / 586284			
neonate (less than 4 weeks old)	37	1 / 26769	0	0 / 26769	0	0 / 26769	74	2 / 26769	37	1 / 26769	1	1 / 26769			
infant (less than 3 years old)	0	0 / 22031	0	0 / 22031	0	0 / 22031	0	0 / 22031	0	0 / 22031	0	0 / 22031			
juvenile (less than 17 years old)	90	5 / 55067	0	0 / 55067	0	0 / 55067	0	0 / 55067	36	2 / 55067	2	1 / 55067			
adult (17 years old and older)	120	232 / 1923176	2	4 / 2E+06	20	39 / 2E+06	55	## / 2E+06	53	## / 2E+06	##	## / 2E+06			

表3 ペプチド刺激によって活性化されたT細胞からのIFN- γ 産生 (ng/ml)

		K532-74	EBV	HIV
Healthy donor	1	35	9	-
	2	-	-	-
	3	42	36	-
	4	36	-	-
	5	-	25	-
	6	26	11	-
	7	49	-	35
	8	-	-	-
Prostate cancer patients	1	-	-	-
	2	62	2	52
	3	21	32	70
	4	828	424	183
	5	95	165	156
	6	186	64	-
	7	222	40	328
	8	104	152	50
	9	20	34	22

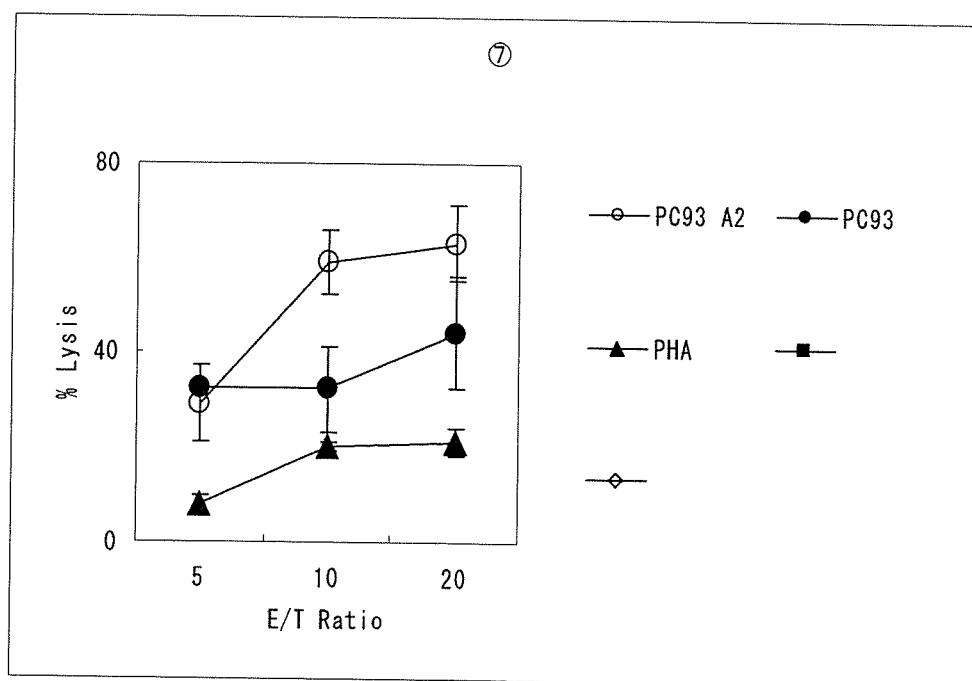


図3 前立腺がん患者末梢血からK532-54 ペプチド刺激で誘導されたCTL活性

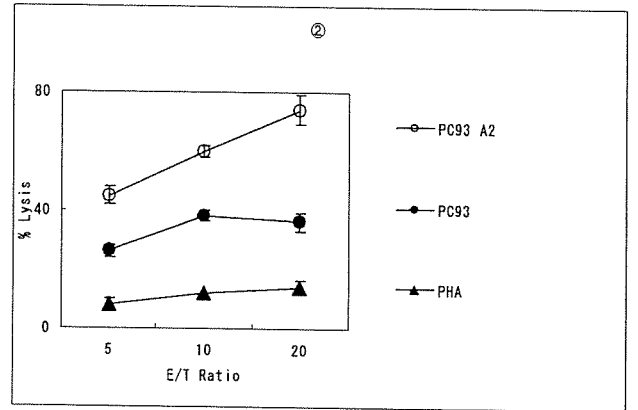
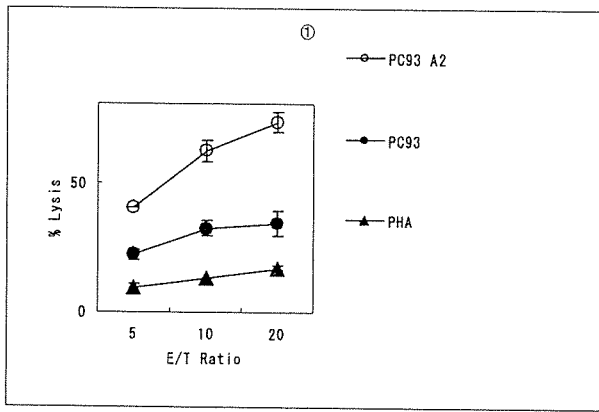


図4 健常人末梢血をK532-54 ペプチドで刺激することにより誘導されたCTL 活性

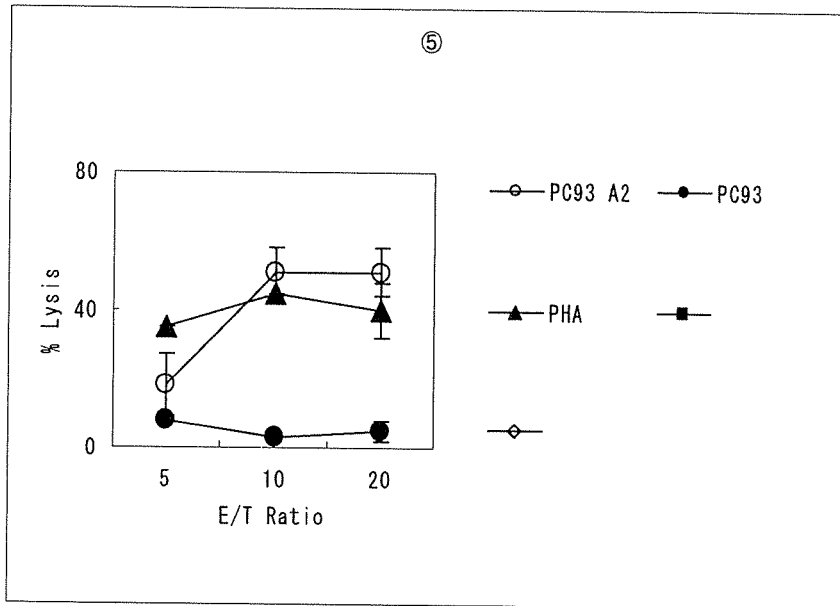


図5 前立腺がん患者末梢血リンパ球から K532-54 ペプチド刺激で誘導された CTL 活性

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌 なし