

a TAP-dependent pathway (Castellino et al., 2000; Moroi et al., 2000; Suto and Srivastava, 1995). This fact suggests that processing and loading a peptide onto MHC class I requires translocation of the antigen from the endocytic compartment to the cytosolic pathway. Rodriguez et al. demonstrated that DCs have a unique membrane transport pathway linking the lumina of endocytic compartments and the cytosol (Rodriguez et al., 1999). Thus, in DCs, the exogenous HSP-chaperoned antigen in the endocytic compartment is released into the cytosol, where it follows the classical proteasome- and TAP-dependent class I pathway for presentation. Further studies to define the precise mechanisms for Hsp70- and Gp96-chaperoned peptide trafficking may reveal a new paradigm for cross-presentation.

WHO GETS TO 'EAT' ... AND HOW TO 'EAT', THAT'S THE QUESTION!

Despite the extensive studies of cross-presentation, the precise identity of the APCs responsible has been hotly debated. Although the cross-presenting cell is clearly an APC of hematopoietic origin, cross-presentation activity has been detected in both macrophage and DC populations. Because of the lack of critical markers distinguishing these populations, the outcome may have been complicated by small contaminating fractions of the other cell type. More comprehensive studies extensively examining splenic and lymph node DC subsets in mice have identified CD8⁺ DCs as the only population capable of cross-presenting ovalbumin and herpes simplex epitopes. Despite the capacity of macrophages and other DC subsets to acquire antigens, the ability to effectively stimulate cytotoxic T lymphocyte responses seems to be restricted to this population (Pooley JI 2001, Smith JI 2003). However, for HSP-mediated cross-presentation, it has been reported that both macrophages and DCs are involved and the critical cell subsets *in vivo* must be defined. Tobian et al. reported that bacterial Hsp70 promotes alternate MHC class I processing through an endocytic mechanism in macrophages and a cytosolic mechanism in DCs (Tobian et al., 2004). This diversity of processing mechanisms may explain differences among studies regarding the relative roles of cytosolic and endocytic processing for MHC-I cross-presentation of exogenous Ags, including peptides chaperoned by HSPs. In addition, recent reports have demonstrated several types of HSP-receptors expressed by APCs, so it is necessary to clarify the method of endocytosis/phagocytosis for cross-presentation by the HSP-antigen complex and how cross-presentation is affected by the uptake mechanisms of the HSP-antigen complex. For example, different endocytic receptors may have different functional consequences.

Cross-Presentation by Exogenous Hsp90-Peptide Complex

Hsp90 is one of the most abundant proteins within cells and is overexpressed in many cancer cells. Therefore, once cancer cells become necrotic, much Hsp90 would be released from cells and might be a danger signal, subsequently eliciting

cell-specific immune responses. It has been demonstrated that the tumor-derived Hsp90-peptide complex elicits tumor-specific immunity. At present, however, the processing pathway yielding the transfer of exogenous Hsp90-associated peptide antigens to MHC class I molecules is unknown.

We examined the roles of Hsp90 in MHC class I-restricted cross-presentation using bone marrow-derived dendritic cells (DCs) as APCs. First, we tested whether Hsp90-peptide complexes reconstituted *in vitro* were taken up and associated peptides presented in the context of MHC class I molecules by DCs. To monitor the MHC class I antigen-processing pathway, we used Hsp90 reconstituted *in vitro* with the C-terminal extended version of VSV8 (RGYVYQGL), VSV-C (RGYVYQGLKSGNVSC: 15mer) to monitor the processing of the precursor peptide. The Hsp90-VSV-C peptide complex was cocultured with DCs for 2 hours, followed by incubation with a VSV8-specific CTL clone. The culture supernatant was assayed for the production of IFN- γ . VSV-C-loaded Hsp90 was processed and presented by H-2K^b and recognized by the VSV8-specific CTL clone, but not Hsp90 or VSV-C alone. In the presence of an anti-H-2K^b mAb during the presentation assay, the presentation of VSV8 to the specific CTL clone was completely abolished. These data suggested that Hsp90-bound VSV-C peptides were processed to VSV8 within the cells with subsequently gained access to the MHC class I pathway. Intriguingly, this presentation occurred within 15 min, indicating that very rapid and efficient processing might be achieved within DC.

Next, we investigated whether the Hsp90-mediated MHC class I pathway required functional TAP molecules. To test this, we used DCs derived from the TAP1^{-/-} mouse. Surprisingly, DCs from the TAP1^{-/-} mouse could also process and present Hsp90-bound VSV-C peptides as efficiently as DCs from the wild-type mouse.

We also tested another well-characterized H-2K^b-restricted OVA₂₅₈₋₂₆₅ antigen system, Hsp90 reconstituted *in vitro* with the C-terminal extended version of SL8 (OVA₂₅₈₋₂₆₅), SL8-C peptide (OVA₂₅₈₋₂₇₀: 13mer). The Hsp90-SL8-C peptide complex was cocultured with DCs for 2 hours, followed by incubation with SL8-specific B3Z T cell hybridoma. As shown in Figure 3B, the Hsp90-SL8C peptide complex was processed and presented by H-2K^b and recognized by B3Z T cell hybridoma, but not Hsp90 or SL8-C alone, in a TAP-independent manner. These experiments demonstrate that a TAP-independent pathway is used for Hsp90-mediated MHC class I presentation.

Intracellular Localization of Endocytosed Exogenous Hsp90-Peptide Complexes

Using laser confocal microscopy, we found that Hsp90-peptide complexes accumulated only in the endosome and did not reach the stage of the lysosome. We also examined whether Hsp90 accumulation in the endosome was due to temperature-dependent endocytosis. As expected, at 4°C, labeled Hsp90 remained on the cell surface, but internalization was evident after incubation at 37°C following a 10-min internalization period. According to a competition assay, DCs express Hsp90

receptor on the cell surfaces. Identification of receptor (s) will be necessary to elucidate the mechanism responsible for cross-presentation of exogenous Hsp90-antigen complexes.

The Pathway for Hsp90-Mediated Cross-Presentation

To investigate where the Hsp90-associated antigenic peptides bind to MHC class I molecules, we stained H-2K^b molecules and exogenous Hsp90-peptide complexes. After 20 min of endocytosis, Alexa-labeled Hsp90 colocalized with endocytosed H-2K^b molecules. The results showed the internalization and co-localization of H-2K^b and Hsp90 was evident in the early endosome. This finding suggested that HSP-bound peptides might be transferred to MHC class I molecules in the endosome, where recycled MHC class I molecules from the plasma membrane are available. The peptide-MHC class I complexes generated in the endosome are then transported to the cell surfaces of the DCs, where specific CTLs recognize them.

Recycling of endocytosed MHC class I molecules back to the cell surface has been observed. Some of the recycled MHC class I molecules can be loaded into endosomes with peptides derived from endocytosed molecules (Gromme et al., 1999). Therefore, to confirm whether this presentation really utilizes recycled MHC class I molecules, we treated DCs with primaquine, which blocks the membrane recycling pathway. DCs incubated in the presence of this drug could not present the Hsp90-chaperoned SL8C-derived SL8 peptide. This result indicated that precursor peptides chaperoned by Hsp90 or processed peptides entered into recycling endosomes and transferred onto recycling MHC class I molecules, which returned to the cell surface and stimulated B3Z T cell hybridoma. To analyze the involvement of vacuolar acidification of endosomal compartments, DCs were incubated with Hsp90-SL8C in the presence of chloroquine, a known inhibitor of acidification of endosomal compartments. Chloroquine strongly inhibited Hsp90-mediated presentation without affecting SL8 peptide presentation. Thus, acidification of endosomal compartments is necessary for processing of Hsp90-chaperoned precursor peptides (Figure 2).

Hsp90-Chaperoned Precursor Peptides are Processed by the Endosomal Protease

We used protease inhibitors to investigate the proteolytic processes involved in the Hsp90-mediated TAP-independent cross-presentation pathways. In wild-type DCs, a broadly active cysteine protease inhibitor, leupeptin, almost completely inhibited the cross-presentation of Hsp90-SL8C. In contrast, the aspartic protease inhibitor pepstatin did not affect the cross-presentation. Cathepsins S, D and L are known to be the major cysteine proteases in endocytic compartments. We therefore examined the roles of various cathepsins in this pathway. Cathepsin D- and cathepsin L-specific inhibitors did not affect the cross-presentation, whereas a cathepsin S inhibitor completely blocked cross-presentation. Cathepsin S is a cysteine protease

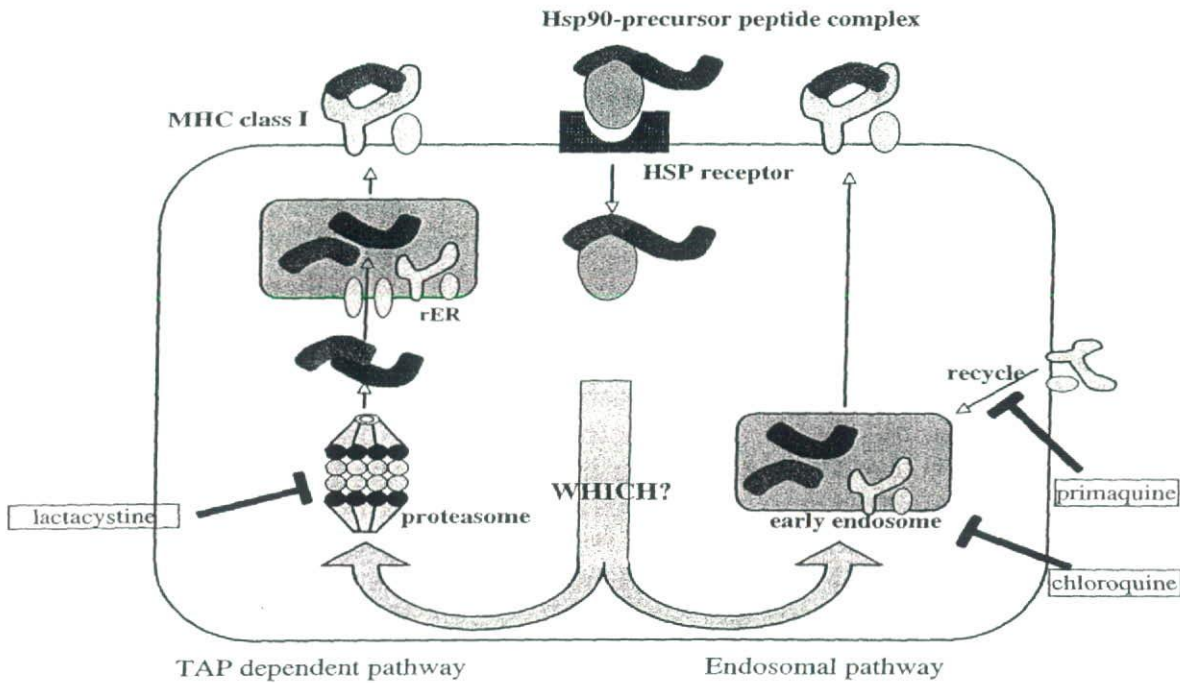


Figure 2. Possible pathway of the Hsp90-antigen complex-mediated cross-presentation. To elucidate how the Hsp90-antigen complex is processed for cross-presentation, we used DCs derived from TAP knockout mouse, and DCs were treated lactacystin as a proteasome inhibitor, chloroquine for blocking the acidification of endosomal compartment, and primaquine for blocking the recycling membrane transport

that is preferentially expressed in APCs, including DCs, macrophages, and B cells within endocytic compartments. Therefore, our data indicate that cathepsin S is a critical enzyme in TAP-independent Hsp90-mediated cross-presentation on MHC class I molecules and that the presented peptides are indeed generated in endosomal compartments.

Advantages of Hsp90-Antigenic Protein Complexes

As described above, we have shown that Hsp90-chaperoned precursor peptides are efficiently processed and presented by MHC class I molecules. To extend the range of HSP-based immunotherapy, we examined whether whole protein antigens chaperoned by Hsp90 were processed and presented by MHC class I molecules as well as class II molecules. The advantages of using protein antigens for cancer immunotherapy are that they can (1) provide an inherent polyvalent vaccine for CD8⁺ T cells, and (2) they include CD4⁺ helper epitopes, required for efficient CTL induction and proliferation. However, protein antigens themselves are not primarily immunogenic and therefore an immunostimulatory adjuvant is necessary for effective T cell responses. Given the well-known ability of HSP to forms complexes with naturally synthesized proteins, it is possible that Hsp90-protein antigen complexes could elicit antigen-specific CTL responses and Th responses

as well. Therefore, we investigated the impact of Hsp90 on the presentation of exogenous protein antigens using OVA as a model antigen. We observed that the Hsp90-OVA complex generated *in vitro* was very efficiently and selectively presented via the MHC class I pathway both *in vitro* and *in vivo*, and that cross-presentation involved both TAP-dependent and -independent pathways described below. These results would provide a rationale for the development of novel vaccination strategies for cancer immunotherapy.

HSP90-OVA COMPLEX IS EFFICIENTLY CROSS-PRESENTED BY DCS

We evaluated cross-presentation of the Hsp90-OVA protein complex. DCs were pulsed with Hsp90 alone, free OVA, a simple mixture of the two or the two in a complex generated *in vitro* for 2 hrs at 37°C, then fixed, washed and cultured with B3Z CD8⁺ T cell hybridoma. The Hsp90-OVA complex elicited strong CTL responses, whereas Hsp90 or OVA alone did not lead to CTL responses. Notably, when we pulsed the simple mixture of Hsp90 and OVA, we did not detect significant CTL responses. These results show that binding to Hsp90 is essential for cross-presentation of OVA.

The Mechanism for Translocation of Hsp90-Chaperoned Antigens from Endosomes to Cytosol

The mechanism for escaping to the cytosol remains unknown, as is whether the Hsp90-antigen complex or its components separately escape to the cytosol. It is possible that the Hsp90-antigen complex first needs to be preprocessed in the endosomal compartments before being transferred to the cytosol to be further degraded by proteasomes. One possibility is that the mildly acidic pH in the endocytic compartments plays an important role for the transport of ingested antigens, and another is that delayed fusion with the late endosome/lysosome is important for the transport. Immature DCs maintained mildly acidic pH in the endocytic compartment even after antigen uptake and could transport these antigens into the cytosol (Hotta et al., 2006). Chloroquine treatment inhibits the acidification of the endocytic compartments. Our data indicated that chloroquine treatment inhibited Hsp90-OVA presentation by DCs in both TAP-dependent and -independent pathways. This suggested that antigen transport was dependent on mildly acidic pH-inducible machinery in the endocytic compartments of DCs. However, a recent report showed that treatment with chloroquine or NH₄Cl enhanced the efficiency of cross-presentation (Accapezzato et al., 2005). These treatments accelerated export of exogenous soluble antigens from endocytic compartments to cytosol, thereby enhancing cross-presentation. The difference between our results and theirs was the method of uptake by DCs. In our case, it occurred via receptor-mediated endocytosis, whereas they indicated that it occurred via phagocytosis or macropinocytosis. However, the regulators for the transport are still unclear. We

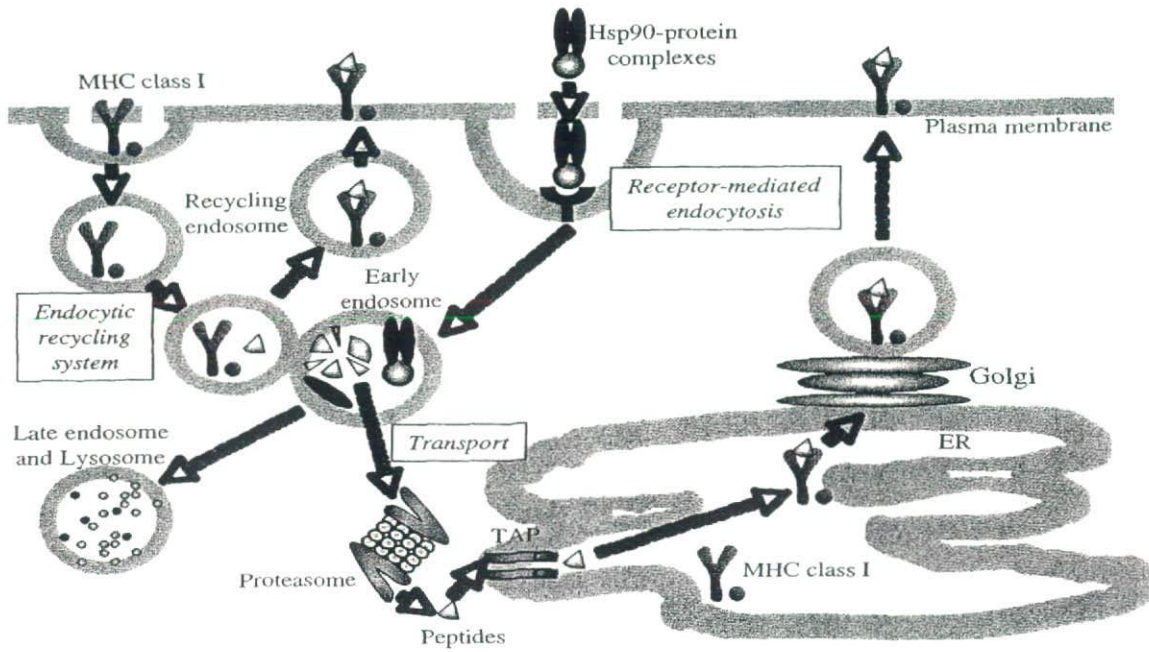


Figure 3. The pathway for the Hsp90-antigen complex-mediated cross-presentation by DCs. Internalized Hsp90-antigen complexes through receptor-mediated endocytosis follow 2 distinct MHC class I pathways. (1) Internalized Hsp90-antigen complexes are translocated to the cytosol and resultant peptide intermediates are imported into the ER in a TAP-dependent fashion. Hsp90-chaperoned antigens are degraded in the cytosol by proteasome and further trimmed by cytosolic peptidases. The resulting peptides are transported into the lumen of the ER for loading on newly synthesized MHC class I molecules. (2) Alternatively, internalized antigens chaperoned by Hsp90 are processed and loading in the endocytic pathway onto MHC class I molecules that are recycled from the plasma membrane, independently of TAP

are still on the road to complete understanding of HSP-mediated immune regulation, and further studies will be required to elucidate the precise mechanism (Figure 3).

CONCLUSION

Although HSPs are primarily cytosolic proteins, they play an important role as a “danger signal” in the extracellular milieu on behalf of immune surveillance. Above all, Hsp90 is one of the most abundant cytosolic proteins and elicits intriguingly efficient and rapid CTL responses. In this meaning, Hsp90 is a “smart and excellent guide” for the MHC class I cross-presentation pathway. A forthcoming issue is to elucidate the mechanism of the driving force toward the CD8⁺ T cell response mediated by HSPs. In addition, the relationship between immune tolerance induced by HSP-mediated cross-presentation and the stimulation of DCs via toll-like receptors should be addressed. These findings will clarify the impact of HSP as a danger signal in the etiologies of autoimmune diseases and tumor immunity.

REFERENCES

- Accapezzato, D., Visco, V., Francavilla, V., Molette, C., Donato, T., Paroli, M., Mondelli, M. U., Doria, M., Torrisi, M. R. and Barnaba, V. (2005) Chloroquine enhances human CD8⁺ T cell responses against soluble antigens in vivo. *J Exp Med* **202**, 817–28.
- Ackerman, A. L., Giodini, A. and Cresswell, P. (2006) A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* **25**, 607–17.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2003) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12889–94.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2005) Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* **6**, 107–13.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A. and Calderwood, S. K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**, 15028–34.
- Basu, S., Binder, R. J., Ramalingam, T. and Srivastava, P. K. (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303–13.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. and Srivastava, P. K. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **12**, 1539–46.
- Becker, T., Hartl, F. U. and Wieland, F. (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* **158**, 1277–85.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R. and Nicchitta, C. V. (2003) Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *Embo J* **22**, 6127–36.
- Binder, R., Han, D. and Srivastava, P. (2000) CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nature Immunol.* **1**, 151–155.
- Castelli, C., Rivoltini, L., Rini, F., Belli, F., Testori, A., Maio, M., Mazzaferro, V., Coppa, J., Srivastava, P. K. and Parmiani, G. (2004) Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 227–33.
- Castellino, F., Boucher, P. E., Eichelberg, K., Mayhew, M., Rothman, J. E., Houghton, A. N. and Germain, R. N. (2000) Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med* **191**, 1957–64.
- Delneste, Y. (2004) Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochem Soc Trans* **32**, 633–5.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J., Haeuw, J., Aubry, J., Nakamura, K., Kawakami-Honda, N., Goetsch, L., Sawamura, T., Bonnefoy, J. and Jeannin, P. (2002) Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353–62.
- Doody, A. D., Kovalchin, J. T., Mihalyo, M. A., Hagymasi, A. T., Drake, C. G. and Adler, A. J. (2004) Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8⁺ T cell effector function. *J Immunol* **172**, 6087–92.
- Gromme, M., Uytdehaag, F. G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J., Tulp, A., Verwoerd, D. and Neefjes, J. (1999) Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10326–31.
- Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397–402.
- Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Kwok, W. W., Wernet, D., Buckner, J. H., Kalbacher, H., Dannecker, G. E. and Holzer, U. (2005) The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4⁺ memory T cells. *Eur J Immunol* **35**, 3163–72.

- Hotta, C., Fujimaki, H., Yoshinari, M., Nakazawa, M. and Minami, M. (2006) The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* **117**, 97–107.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D. and Desjardins, M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402–6.
- Kleijmeer, M. J., Escola, J. M., UytdeHaag, F. G., Jakobson, E., Griffith, J. M., Osterhaus, A. D., Stoorvogel, W., Melief, C. J., Rabouille, C. and Geuze, H. J. (2001) Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* **2**, 124–37.
- Kunisawa, J. and Shastri, N. (2006) Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway. *Immunity* **24**, 523–34.
- Mazzaferro, V., Coppa, J., Carrabba, M. G., Rivoltini, L., Schiavo, M., Regalia, E., Mariani, L., Camerini, T., Marchiano, A., Andreola, S., Camerini, R., Corsi, M., Lewis, J. J., Srivastava, P. K. and Parmiani, G. (2003) Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 3235–45.
- Moroi, Y., Mayhew, M., Trcka, J., Hoe, M. H., Takechi, Y., Hartl, F. U., Rothman, J. E. and Houghton, A. N. (2000) Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3485–90.
- Ramirez, S. R., Singh-Jasuja, H., Warger, T., Braedel-Ruoff, S., Hilf, N., Wiemann, K., Rammensee, H. G. and Schild, H. (2005) Glycoprotein 96-activated dendritic cells induce a CD8-biased T cell response. *Cell Stress Chaperones* **10**, 221–9.
- Rivoltini, L., Castelli, C., Carrabba, M., Mazzaferro, V., Pilla, L., Huber, V., Coppa, J., Gallino, G., Scheibenbogen, C., Squarcina, P., Cova, A., Camerini, R., Lewis, J. J., Srivastava, P. K. and Parmiani, G. (2003) Human tumor-derived heat shock protein 96 mediates in vitro activation and in vivo expansion of melanoma- and colon carcinoma-specific T cells. *J Immunol* **171**, 3467–74.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1**, 362–8.
- SenGupta, D., Norris, P. J., Suscovich, T. J., Hassan-Zahraee, M., Moffett, H. F., Trocha, A., Draenert, R., Goulder, P. J., Binder, R. J., Levey, D. L., Walker, B. D., Srivastava, P. K. and Brander, C. (2004) Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II. *J Immunol* **173**, 1987–93.
- Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. and Rock, K. L. (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155–65.
- Suto, R. and Srivastava, P. K. (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* **269**, 1585–8.
- Tobian, A. A., Canaday, D. H., Boom, W. H. and Harding, C. V. (2004) Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8⁺ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol* **172**, 5277–86.
- Udono, H. and Srivastava, P. K. (1994) Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J Immunol* **152**, 5398–403.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C. J., Issels, R. D. and Wagner, H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* **277**, 15107–12.

1. エピジェネティクスにより制御される 腫瘍の免疫逃避機構

札幌医科大学第1病理学 中津川宗秀

同 准教授 鳥越 俊彦

key words epigenetics, immune escape, DNA methylation, histone deacetylation, HDAC inhibitor

動 向

これまでさまざまながん抗原が同定され、それらを標的とした能動的免疫療法の臨床試験が盛んに行われているが、現在のところ顕著な臨床効果が認められた症例は限られている。免疫療法不応性の原因は一様ではないが、主因の一つにがんの免疫逃避があげられる。これまで、遺伝子の変異や欠失による免疫逃避機序はよく研究されてきたが、近年、エピジェネティクスとがんについて解析が進み、遺伝子変異を伴わない免疫逃避機序が徐々に明らかになりつつある。本稿では、現在までに報告されているエピジェネティックな免疫逃避のメカニズムについて、我々の研究を含めて概説する。

A. 免疫細胞のがん細胞障害経路と免疫逃避

がんに対する免疫監視機構において主要なエフェクター細胞は、T細胞とNK細胞である。T細胞とNK細胞はいずれもがん細胞表面に発現している標的抗原を認識して活性化するが、T細胞はTCRを介してがん細胞表面のMHC class I, class II分子に提示された抗原ペプチドを認識す

るのに対し、NK細胞は、NKG2DのようなNK活性化受容体分子を介して、がん細胞表面のNK標的分子〔たとえばMHC class I related chain A, B (MICA, MICB)〕を認識する。標的細胞を障害する機序はよく似ており、T細胞、NK細胞ともにパーフォリンや細胞障害性顆粒を放出し、細胞膜に穴を開け、グランザイムのような蛋白分解酵素の活性によって細胞にアポトーシスを誘導したり、また細胞表面にFas-LやTRAILを発現し、標的細胞のDeath受容体を活性化させてアポトーシスを引き起こす(図1)。

それに対してがん細胞は、これら免疫細胞の標的となる抗原分子やアポトーシスにかかわるさまざまな遺伝子の発現を抑制したり、cFLIP, SPI-6, IAPs, BCL-2などのアポトーシス抑制分子を過剰に発現することによって、免疫監視機構から逃避している。

B. エピジェネティクスによる遺伝子発現制御

遺伝子発現抑制をもたらすエピジェネティクスな変化として代表的なものは、DNAメチル化とヒストン脱アセチル化である。遺伝子プロモ-

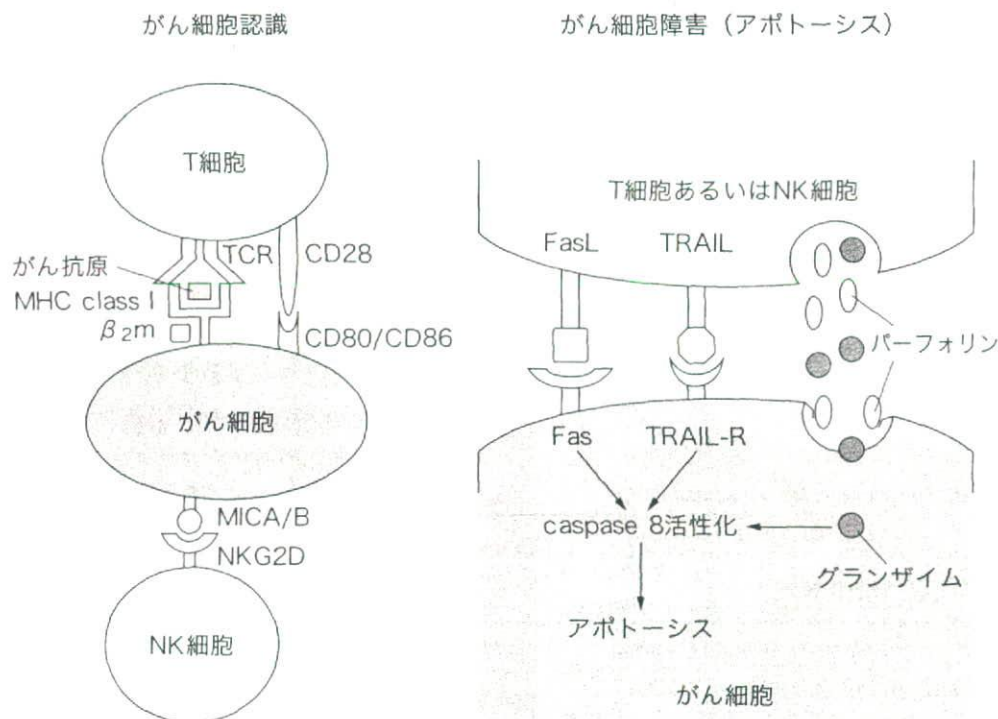


図1 がん細胞認識・障害経路

ター領域に CpG アイランドとよばれるシトシン-グアニン配列 (CpG 配列) の豊富な DNA 配列が存在していると、そのシトシンが DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase (DNMT) によってメチル化され、メチル化シトシンに MBP (methyl-CpG-binding protein) が結合し、MBP にさらにヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase (HDAC) が結合することで、ヒストンの脱アセチル化が起こる。ヒストンの脱アセチル化が起こるとクロマチンは凝集し、プロモーター領域に転写因子がアクセスできなくなり遺伝子発現が抑制される。この他に、DNA メチル化に依存しないヒストン脱アセチル化も知られている。このようなエピジェネティックな遺伝子発現制御は、個体発生や細胞分化の過程で生理的に起こっていることが知られていたが、近年、がん細胞においては、さまざまな増殖抑制遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の発現が、過剰な DNA メチル化によって転写抑制されていることが明らかにされている。遺伝子の欠失や変異を伴わないでが

ん抑制遺伝子の発現が失われ、細胞のがん化にかかわっているのである。この発見は、がん治療法に新たな光明をもたらした。ジェネティックな変化は不可逆的な変化であるため、根本的に修復するには遺伝子治療しか方法はない。しかし、エピジェネティックな変化は可逆的な変化であるため、DNA メチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤によって、失われたがん抑制遺伝子の発現回復が期待できるのである (図2)。このようにして、現在世界中でがんのエピジェネティクス治療薬が臨床試験の段階にある (表1)。

C. エピジェネティクスにより制御されるがんの免疫逃避

がん細胞において、DNA メチル化あるいはヒストン脱アセチル化によって発現制御されている遺伝子は、がん細胞の生存や増殖に都合の悪いがん抑制遺伝子群ばかりではない。前述したように、がん細胞は免疫監視機構からのがれるために、標

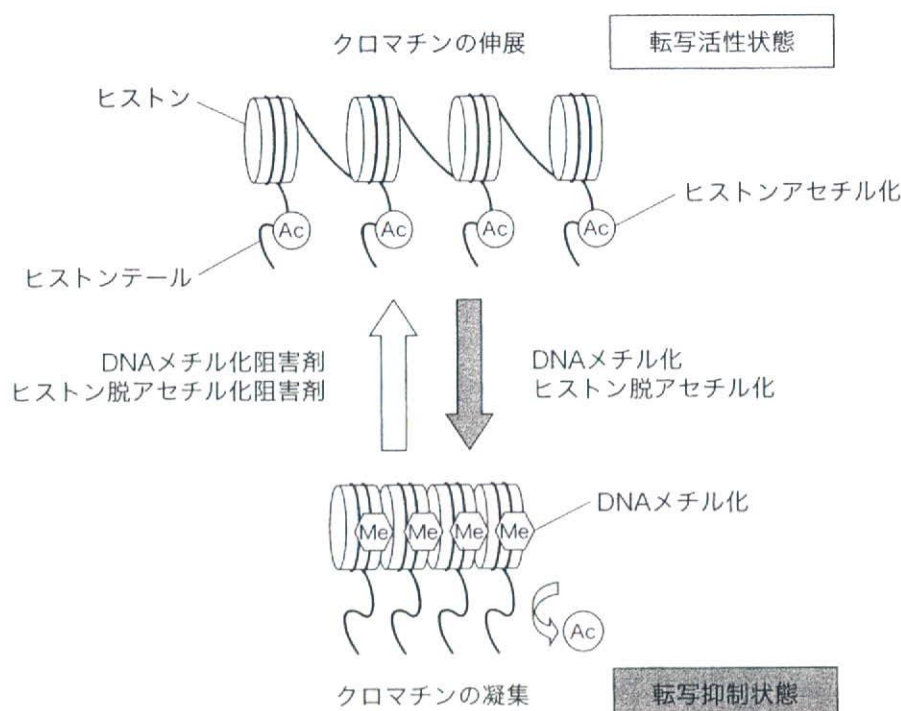


図2 エピジェネティクスによる遺伝子発現制御

表1 臨床試験中のエピジェネティクス治療薬 (文献1～6を改変)

阻害剤	対象疾患
DNAメチル化酵素阻害剤 (DNMT inhibitor)	
5-azacytidine	血液悪性腫瘍 骨髄異形成症候群 (FDA 承認)
5-aza-2'-deoxycytidine	血液悪性腫瘍, 子宮頸がん, 非小細胞肺がん, 腎細胞がん 骨髄異形成症候群 (FDA 承認)
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor)	
短鎖脂肪酸	
butyrate	結腸直腸がん
valproic acid	血液悪性腫瘍, 頭頸部がん
ヒドロキサム酸	
SAHA	前立腺がん, 膀胱がん, 乳がん, 大腸がん, 悪性リンパ腫 皮膚T細胞リンパ腫 (FDA 承認)
LBH-589	進行固形がん, 皮膚T細胞リンパ腫
環状テトラペプチド	
FK-228 (FR901228)	大腸がん, 腎細胞がん, 悪性黒色腫, 非小細胞肺がん, 白血病, 多発性骨髄腫
ベンズアミド	
MS-275	腎細胞がん, 悪性黒色腫, 非小細胞肺がん, 肉腫, 悪性リンパ腫

的抗原遺伝子や細胞性免疫を賦活化する遺伝子をも、エピジェネティクスによって発現制御していることが明らかになってきた。

エピジェネティクスによって制御されていることが報告されている免疫関連遺伝子と、その発現を回復させるDNAメチル化酵素阻害剤 (DNMT

inhibitor)あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor) を表2に示す。

1. 腫瘍抗原の発現低下

メラノーマをはじめとして、さまざまながん腫において cancer-testis antigen は免疫系に認識されやすい immunodominant な抗原として知られている。MAGE family や NY-ESO-1 の発現が低

下しているがん細胞株を DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine や HDAC 阻害剤である trichostatin A で処理すると、その発現が回復する。また、DNMT 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用に相乗効果があるとも報告されている⁷⁻⁹⁾。このことは、がん細胞はエピジェネティクスな機序によって免疫原性の高い拒絶抗原の発現を抑制し、免疫監視機構からのがれていることを示唆してい

表2 エピジェネティクスにより制御される免疫関連遺伝子

発現抑制遺伝子	がん腫	発現回復薬剤		文献
		DNMT阻害剤	HDAC阻害剤	
1. 腫瘍抗原の発現低下				
MAGE family	前立腺がん, 乳がん, 大腸がん	5-AZA-DC	TSA	7
	白血病細胞	5-AZA-DC		7
	肺がん	5-AZA-DC		8
	神経膠芽腫	5-AZA-DC		9
NY-ESO-1	腎細胞がん, 大腸がん, 乳がん, 肺がん,	5-AZA-DC		8
	骨肉種, 平滑筋肉腫, メラノーマ			
GAGE1-6	腎細胞がん	5-AZA-DC		8
2. 抗原提示関連分子の発現低下				
MHC class I	神経芽細胞腫		TSA	10
	前立腺がん		TSA	11
	巨核球性白血病		SB	12
	メラノーマ	5-AZA-DC		13
β_2 -microglobulin	前立腺がん		TSA	11
MHC class II	神経芽細胞腫		TSA	10
	HeLa		TSA	14
	骨髄単球性白血病		SB	12
	B細胞リンパ腫		TSA	15
CIITA	扁平上皮がん		TSA	16
3. 接着共刺激分子の発現低下				
CD80, CD86	骨髄単球性白血病		SB	12
4. NK細胞活性化分子の発現低下				
MICA/MICB	白血病, 乳がん, 大腸がん		FR901228	17
	肝細胞がん		VPA	18
5. アポトーシスシグナル関連分子の発現低下				
Fas, TRAIL-R2 (DR5)	骨髄性白血病		VPA	19
TRAIL-R1 (DR4)	神経膠芽腫	5-AZA-DC		20
	卵巣がん	5-AZA-DC		21
caspase 8	神経芽細胞腫	5-AZA-DC	TSA	22

5-AZA-DC: 5-aza-2'-deoxycytidine, VPA: valproic acid, TSA: trichostatin A, SB: sodium butyrate
DNMT: DNA methyltransferase, HDAC: histone deacetylase

る。MAGE familyを標的としたワクチン療法の臨床試験が実施されているが、初期には腫瘍縮小効果があったものの、やがて標的抗原の発現が低下し、ワクチン不応性になる例が報告されている。このような症例ではMAGE遺伝子のメチル化やヒストン脱アセチル化が亢進していると推察され、ワクチン不応症例に対するエピジェネティクス治療薬併用ワクチン療法の有効性が期待される。

2. 抗原提示関連分子の発現低下

T細胞抗原受容体は、主にMHCによって提示された抗原ペプチドを認識する。したがって、細胞表面へのMHC分子の発現に影響を及ぼす遺伝子の発現低下は、T細胞からの免疫逃避につながる。MHC class I分子は重鎖と軽鎖 β_2 -microglobulin (β_2 M)とのヘテロダイマーからなるため、これらいずれの遺伝子発現が低下しても、細胞表面への発現レベルは低下する。ヒトの場合、重鎖にはHLA-A, B, Cの3種類の遺伝子があるが、軽鎖は β_2 Mで共通している。したがって、 β_2 Mの発現低下は、3種類のHLAすべての発現レベルに影響を及ぼすことになる。

我々は、免疫組織学的に各種がん組織におけるHLA class I分子の発現レベルを検討した。その結果、乳がんと前立腺がんでは他のがん種と異なり、約8割でHLA class Iの発現が低下していること、そしてその原因は β_2 M遺伝子のヒストン脱アセチル化であることを見出した。乳がん細胞株や前立腺がん細胞株をHDAC阻害剤で処理すると、 β_2 Mレベルの回復とともに細胞表面へのHLA class I発現も回復した¹¹⁾。我々はサバイビン2Bペプチドワクチンの臨床試験を実施しているが、乳がんを対象とした場合、他のがん種と比較して著しく臨床効果が低かった。この原因の一つに上で述べたような免疫逃避機序が関与していると推察され、今後乳がんと前立腺がんを対象と

したワクチン療法では、HDAC阻害剤を併用したプロトコルを検討する必要がある。

MHC class Iだけでなく、MHC class II遺伝子や転写因子CIITAの発現もエピジェネティックな制御を受けていることが報告されている¹⁶⁾。

3. 接着共刺激分子（副刺激分子）の発現低下

T細胞が活性化するためにはTCRを介する抗原刺激（第1シグナル）とともに、接着共刺激分子（adhesion-costimulatory molecules）に由来する第2シグナルが必要であることが知られている。がん細胞は、この共刺激分子の発現を抑制し、T細胞による免疫監視からのがれている。Maedaらは、骨髄単球性白血病細胞株において共刺激分子CD80, CD86の発現が抑制されており、HDAC阻害剤の一つであるsodium butyrateによってその発現が回復されることを報告している¹²⁾。すなわち、HDAC阻害剤を用いることによって、がん細胞の免疫原性が飛躍的に増大する可能性がある。

4. NK細胞活性化分子の発現低下

NK細胞は、細胞表面にNKG2Dレセプターのような活性化受容体をもっており、標的細胞の細胞膜上に発現される糖蛋白をリガンドとして活性化し、細胞傷害性を発揮する。このような活性化受容体の代表的なリガンドとしてMICA/MICBが知られている。白血病、乳がん、大腸がん細胞株においてほとんど発現していなかったMICA/MICBが、HDAC阻害剤FR901228によって発現回復した¹⁷⁾。また同様に、肝細胞がん細胞株においてHDAC阻害剤valproic acidによる発現回復が報告されている¹⁸⁾。我々は、乳がん細胞株をvalproic acid存在下で培養し、それによって発現が増加する遺伝子について、DNA microarrayを用いて網羅的に解析した。その結果、MICA/MICBを含む数種類の細胞性免疫標的抗原

遺伝子が見出された。我々は、このようにHDAC阻害剤によって発現が増加ないし回復する抗原分子群をHDAC抗原とよんでいるが、このなかには免疫監視機構のなかで最も抗原性の高い分子群が含まれているのではないかと推察している。T細胞の標的抗原ばかりでなく、NK細胞の標的抗原もHDAC抗原に含まれていることは、NK細胞もがん免疫監視機構において重要な役割を担っていることを示唆しており、HDAC阻害剤はNK細胞に対する感受性も回復させる可能性がある。

5. アポトーシスシグナル関連分子の発現低下

T細胞もNK細胞も、標的がん細胞を認識した後、FasリガンドやTRAILによって標的がん細胞の細胞死受容体分子を活性化し、アポトーシスを誘導する。骨髄性白血病細胞において発現がほとんどみられなかったFasやTRAILレセプター2 (DR5) が、HDAC阻害剤によって発現することが報告されている²⁰⁾。また卵巣がん細胞株では、DNAメチル化阻害剤によってTRAILレセプター1 (DR4) の発現が回復し、アポトーシスが誘導されている²¹⁾。神経芽細胞腫細胞株においては、細胞死受容体ばかりでなく、細胞内アポトーシスシグナル伝達分子も同様にエピジェネティックな制御を受けているらしい。アポトーシスシグナル伝達プロテアーゼcaspase 8がHDAC阻害剤やDNAメチル化阻害剤によって発現回復し、TRAIL誘導性アポトーシスに感受性となることが報告されている²²⁾。このことは、エピジェネティクス治療薬は、免疫担当細胞の標的認識フェーズばかりでなく、細胞傷害エフェクターフェーズにも効果を発揮する可能性を示唆している。

むすび

がん細胞はエピジェネティックな変化によって生存や増殖に不都合な遺伝子群の発現を抑制し、

悪性形質を獲得しているばかりでなく、免疫監視機構に認識される不都合な遺伝子群をも抑制し、免疫から逃避している。しかし、可逆的な変化であることを利用して、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた抗原性の回復が新たな免疫療法として期待される。HLA class I抗原の発現を失ったがんは、乳がん・肺がん・大腸がん・尿路がん・肉腫など、ほとんどの種類のがんで有意差をもって再発率が高い。エビジェネティクス治療薬によって、がん組織で低下しているHLA class I抗原の発現を回復させることができれば、それだけでも患者予後を改善できる可能性がある。がんワクチンや細胞療法などの能動的免疫療法とうまく組み合わせることができれば、現在直面している免疫療法の限界を突破できるかもしれない。

文献

- 1) Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(1): 37-50.
- 2) Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol.* 2005; 32(5): 443-51.
- 3) Sandor V, Bakke S, Robey RW, et al. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(3): 718-28.
- 4) Byrd JC, Marcucci G, Parthun MR, et al. A phase I and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005; 105(3): 959-67.
- 5) Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, et al. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(10 Pt 1): 3578-88.
- 6) Ryan QC, Headlee D, Acharya M, et al. Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *J Clin*

- Oncol. 2005; 23(17): 3912-22.
- 7) Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(5): 339-49.
- 8) Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(8): 2690-5.
- 9) Liu G, Ying H, Zeng G, et al. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res.* 2004; 64(14): 4980-6.
- 10) Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, et al. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol.* 2000; 165(12): 7017-24.
- 11) Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, et al. Down-regulation of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol.* 2007; 178(2): 692-6.
- 12) Maeda T, Towatari M, Kosugi H, et al. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2000; 96(12): 3847-56.
- 13) Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, et al. Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer.* 2001; 94(2): 243-51.
- 14) Zika E, Greer SF, Zhu X-S, et al. Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(9): 3091-102.
- 15) Gialitakis M, Kretsovali A, Spilianakis C, et al. Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by Trichostatin A. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(3): 765-72.
- 16) Kanaseki T, Ikeda H, Takamura Y, et al. Histone deacetylation, but not hypermethylation, modifies class II transactivator and MHC class II gene expression in squamous cell carcinomas. *J Immunol.* 2003; 170(10): 4980-5.
- 17) Skov S, Pedersen MT, Andresen L, et al. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 11136-45.
- 18) Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res.* 2005; 65(14): 6321-9.
- 19) Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med.* 2005; 11(1): 71-6.
- 20) Eramo A, Pallini R, Lotti F, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res.* 2005; 65(24): 11469-77.
- 21) Horak P, Pils D, Haller G, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res.* 2005; 3(6): 335-43.
- 22) Fulda S, Debatin K-M. 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene.* 2006; 25(37): 5125-33.

3. 腫瘍抗原の新しいカテゴリー

札幌医科大学第1病理学 廣橋良彦
同 准教授 鳥越俊彦
同 教授 佐藤昇志

key words immunotherapy, tumor antigen, tolerance, oncogene, cell cycle

動 向

1970～80年代に分子生物学の分野が大きく発展し、徐々に生命現象を分子レベルで解析することが可能となってきた。腫瘍免疫学の分野でも同様に分子生物学的手法が大きな役割を果たしており、Boonらのグループが1991年にはじめてヒト腫瘍拒絶抗原としてMAGEファミリー遺伝子群を分子生物学的アプローチにより同定した¹⁾。この歴史的な発見以降、細胞傷害活性T細胞（CTL）もしくは抗体に認識される多数の腫瘍抗原分子が同定・解析されてきた。そこで、Boonらのグループが、これら数多くの腫瘍抗原分子をいくつかのカテゴリーに分類することを提唱した²⁾。それは、腫瘍抗原分子の腫瘍細胞・正常組織での発現形式から以下の4グループに分類するものである。①がん共通特異抗原、②過剰発現抗原、③臓器特異抗原、④遺伝子変異である。この分類はアップデートされた最新版をウェブサイトにて閲覧することができる³⁾。これらの腫瘍抗原分子をがん免疫療法の標的と考えた場合、非常に重要な情報を与えてくれる。標的とするがん細胞や正常組織での発現様式を知ることにより、免疫療法の副作用としての自己免疫疾患を予測するうえで重要なインフォメーションとなるからであ

る。この点において、Boonらの分類法は非常に有用である。

分子生物学的手法は、がん研究の分野にも大きな進歩をもたらした。多くのがん遺伝子が同定され、がん抑制遺伝子の解析や、がんの浸潤、転移といった、がんを定義づける生物学的な性格が分子レベルで解析されてきている。これまで同定されてきた腫瘍抗原分子のかかなりの部分が、細胞のがん化にもかかわる分子である。とすると、がんの免疫療法を考える場合、抗原分子の機能的側面に基づいた免疫療法のデザインをすることができればより合理的な治療法となるだろう。たとえば、抗アポトーシス機能をもつBcl-2やサバイビン⁴⁾は、がんの放射線療法や、化学療法に対する耐性獲得にかかわっていることが明らかになっている。とすれば、放射線療法や化学療法とBcl-2やサバイビンを標的とした免疫療法を併用すれば、単純な相加効果のみならず、相乗効果として期待できるだろう。このように、合理的ながん免疫療法をデザインするにあたって、免疫療法の標的遺伝子の機能的側面をとらえておくことは非常に重要となる。

そこで、本稿では、従来の腫瘍抗原分子のカテゴリーを基礎に、特にがんの生物学的性格に関す

る機能的側面からとらえなおし、分類化を試みる。これらの細胞がん化に重要な機能をもつ遺伝子群は、正常細胞においても低レベルの発現がみられることが多く、Boonらの分類によると、②過剰発現抗原に分類される。これら過剰発現抗原は、その正常組織で発現が認められるゆえに、免疫寛容が引き起こされている可能性がある。確かに、いくつかの抗原ペプチドでは免疫寛容が誘導されていることが示唆されているが、反面、免疫寛容とならない機構もいくつか知られており、免疫原性の高い抗原ペプチドも報告されている。そこで、免疫寛容の問題にも触れつつ、過剰発現する腫瘍抗原分子を機能的側面から分類する。

がん細胞は、多細胞生物が個体を作り上げ維持する際の基本となるさまざまな制御から逃れている。そして、がん細胞の性質は次の2つにより定義されている。

①細胞分裂制御の破綻。

②細胞間組織構築の破綻。

がんは体細胞より様々な変異が蓄積され生じる。この蓄積された変異が、多くの遺伝子発現を引き起こし、がん細胞をがん細胞たらしめる上記の形質となって現れるのである。細胞のがん化を引き起こすがん遺伝子群は多数知られており、Weinbergらのグループを含め多数のグループが精力的にがん遺伝子の同定を行っている。ヒトの様々ながん腫において、発がんにかかわる遺伝子群は異なるが、がん細胞としての形質を発揮するのに基本となる遺伝子群をHanahan, Weinbergらは6グループに分類している⁴⁾。これは細胞レベルで発がんを理解するうえで重要な方向性を示すものである。

さらに、近年においては、細胞レベルより一つ上の段階の細胞集塊としてがんをとらえるうえで、がん幹細胞理論という重要な概念が提唱されている⁵⁾。これは、はじめに血液系悪性腫瘍にて提唱された概念であるが、上皮系悪性腫瘍にもが

ん幹細胞の存在が明らかになりつつある。がん幹細胞は、その他のがん細胞と比して、著明な腫瘍形成能をもつ。血液系腫瘍とは異なり、上皮系悪性腫瘍では、がん幹細胞の本態はまだまだ不明な点が多いが、いくつかの点について明らかになっている。がん幹細胞は正常幹細胞と類似した分子を発現している。また、がん幹細胞は、膜トランスポーター遺伝子群を高発現している。この膜トランスポーター遺伝子は、化学療法剤などの細胞毒の細胞外への汲み出しにかかわっており、がんの化学療法耐性に寄与している。これらの性質をもったがん幹細胞は、がんの遠隔転移や、がんの治療耐性といった、がん患者の予後に直接関与する形質をもっている。

以上のがん細胞の重要な形質を発揮する遺伝子群を分類すると、以下の7つのカテゴリーに分けられるだろう(表1)。次に、この分類について詳細に検討する。

1. 細胞増殖にかかわる遺伝子群
2. 成長抑制シグナルに対する不応答性にかかわる遺伝子群
3. 組織浸潤にかかわる遺伝子群
4. 血管新生にかかわる遺伝子群
5. アポトーシス耐性能にかかわる遺伝子群
6. 無限増殖能にかかわる遺伝子群
7. 幹細胞性にかかわる遺伝子群

A. 細胞増殖にかかわる遺伝子群

腫瘍抗原分子として同定された細胞増殖にかかわる遺伝子群としては、がん遺伝として報告されてきた受容体型チロシンキナーゼ群から、その下流の細胞周期にかかわるものまで多数ある。受容体型チロシンキナーゼ分子としてHER2, c-metなどが知られている。また、細胞周期にかかわる分子としては、G1/S期にかかわるサイクリンD1が、G2/M期にかかわる分子はサイクリンB1、

表 1

カテゴリー	抗原遺伝子	HLA 拘束性	ペプチド	文献
A. 細胞増殖にかかわる遺伝子群	HER2/neu	A2	KIFGSLAFL	(6)
		A24	TYLPTNASL	(7)
	EGFR	A24	DYVREHKDNI	(9)
		A24	MFNNCEVVL	
		A24	NYDANKTGL	
		A24		
	EphA3	DR11	DVTFNIICKKCG	(12)
	FGF5	A3	NTYASPRFK	(14)
	c-met	A2	YVDPVITSI	(11)
	cyclin D1	DR4	NPPSMVAAGSVAAV	(15)
	cyclin B1	A2	AGYLMELCC	(16)
	Aurora-A	A2		
	CEP55	A24		
	Plk1			
	SART1	A26	KGSGKMKTE	(27)
	survivin	A2	ELTLGEFLKL	(17)
	survivin-2B	A24	AYACNTSTL	(18)
B. 成長抑制シグナルに対する不応性にかかわる遺伝子群	MDM2	A2	VLFYLGQYI	(29)
	Aurora-A	A2		
C. 組織浸潤能にかかわる遺伝子群	MMP2	A2	GLPPDVQRV	(31)
D. 血管新生にかかわる遺伝子群	VEGF-R1	A2	VLLWEIFSL	(32)
		A2	TLFWLLTL	
		A2	NLTATLIVNV	
	VEGF-R2	A2	YMISYAGMV	(33)
		A2	VIAMFFWLL	
	RGS5	A2	LAALPHSCL	(34)
		A3	GLASFKSFLK	
	survivin	A2	ELTLGEFLKL	(17)
	survivin-2B	A24	AYACNTSTL	(18)
	Bcl-2	A2	PLFDFSWLSL	(37)
		A2	YLQGMIAAV	(41)
		A2	YLNDHLEPWI	(38)
		A1		(40)
		A2	ELTLGEFLKL	(17)
E. アポトーシス耐性にかかわる遺伝子群	survivin	A2	ELTLGEFLKL	(17)
	survivin-2B	A24	AYACNTSTL	(18)
	ML-IAP / Livin	A2	SLGSPVLGL	(42)
		A24	KWFPSCQFL	(43)
	telomerase	A2	ILAKFLHWL	(50)
F. 無限増殖能にかかわる遺伝子群	SOX2	A2	ALSPASSRSV	(56)
G. 幹細胞性にかかわる遺伝子群	SOX10	A2	AWISKPPGV	(58)

注: 抗原ペプチドは代表的なものに限る.

サバイビン, オーロラAキナーゼ, CEP55, Plk1 キナーゼなどがある. がん細胞は正常細胞

と比べて細胞増殖が活発であることを考えると, 複数の細胞増殖にかかわる分子が腫瘍抗原分子と

して同定されていることは理にかなっていると考えられる。特に細胞周期にかかわる分子群の中でも、G2/M期関連分子は、細胞がG2期からM期に移行するために必要な遺伝子群である。この遺伝子群に含まれる腫瘍抗原分子は複数同定されている。正常組織と比して、がん組織において細胞分裂像を高い頻度で観察できることと整合性が合うものである。これらの遺伝子群は細胞分裂時に必須となる遺伝子群であり、複数の細胞分裂時に働く遺伝子が腫瘍抗原分子としてCTLに認識されることが明らかになっている。これらの遺伝子群は細胞分裂時に、紡錘糸もしくは、中心体に局在することが明らかとなっている。そもそも細胞分裂は、細胞周期の中では時間的に非常に短い間に起こるイベントである。紡錘糸や、中心体といった細胞分裂にかかわる細胞内器官は、細胞分裂時に細胞骨格が重合することにより現れるが、細胞分裂を終え不要になると、プロテアゾームにより迅速に分解され、劇的な変化を遂げる。このように、紡錘糸や中心体にはプロテアゾームが濃縮されていることが知られており、同部位に局在する腫瘍抗原分子も効率よくプロテアゾームに分解されやすく、それゆえにCTLの標的になりやすい可能性があると考えられる。

1. HER-2/neu

HER-2はEGFRファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼで、Weinberg, Greeneらのグループがラットneuroblastomaからがん遺伝子の一つとして同定している。HER-2は乳がんや、卵巣がんなどの悪性腫瘍で高発現することが知られている。HER-2は抗体療法（ハーセプチン）の標的分子としても知られているが、CTLの標的分子としても複数の抗原ペプチドが同定されている^{6,7)}。しかしながら、HER-2は全身の各臓器に低レベルではあるが発現が認められ、HER-2由来の抗原ペプチドに対する免疫寛容が誘導され

ているためか、HER-2抗原ペプチドは免疫原性が低い傾向にある。Koらのグループは、 α -GalCerをパルスした樹状細胞や、抗GITR抗体、gemcitabineなどでHER-2に対する免疫反応の免疫寛容を解除することにより、強い免疫反応を惹起することに成功している⁸⁾。これらのことから、HER-2に対する免疫療法をデザインする場合、免疫寛容の問題をいかに克服するかが課題になると考えられる。

2. EGFR

EGFRもHER-2同様、受容体型チロシンキナーゼに属する分子で、様々な悪性腫瘍にて高発現することが知られている。ShomuraらのグループはHLA-A24拘束性EGFR由来抗原ペプチドの同定に成功している⁹⁾。

3. c-met

Weinschenkらのグループは、腎がん患者における理想的な仮想抗原ペプチドカクテルをデザインするために、マイクロアレイを用いた遺伝子レベルのスクリーニングと、マスマスペクトロメトリを用いたタンパクレベルのスクリーニングを合わせて行うことにより複数の腫瘍抗原候補遺伝子を同定している。そのなかで、受容体型チロシンキナーゼの一つであるプロトオンコジーン、c-metを同定している¹⁰⁾。その後、同グループは、c-met由来HLA-A2拘束性抗原ペプチドがCTLを誘導できることを証明している¹¹⁾。

4. EphA3

Chiariらのグループは、HLA-DR11拘束性に自己メラノーマ細胞株を認識するCD4(+)T細胞を用いてEphA3遺伝子をクローニングしている¹²⁾。EphA3は、受容体チロシンキナーゼに属する遺伝子で、主に中枢神経の分化にかかわる。がんにおけるEphA3遺伝子の機能は不明である

が, 近年, 様々ながん腫で*EphA3*の遺伝子変異が報告されており, 変異*EphA3*遺伝子が, がん化に関与する可能性が示唆される¹³⁾. 正常*EphA3*遺伝子は, 網膜をはじめとする多くの正常組織に発現しており, 免疫寛容が誘導されていることが予想される. しかしながら, *EphA3*を発現する正常組織はHLAクラスII遺伝子を発現せず, HLAクラスIIに*EphA3*抗原ペプチドが提示されることはない. Chiariらが用いた悪性黒色腫細胞株は, HLAクラスII遺伝子を発現しており, *EphA3*抗原ペプチドを提示することにより免疫原性をもつようになったと考えられる. これらのことから, *EphA3*は腫瘍全般的に発現する抗原分子であると結論づけることは難しいと思われる.

5. FGF5

FGF5は線維芽細胞株をトランスフォームする機能をもつがん遺伝子の一つとして知られており, 正常組織では脳や腎臓にて発現する. Hanadaらのグループは, 自己腎がん細胞株を認識するHLA-A3拘束性CTLを用いて, FGF5由来の抗原ペプチドを同定している¹⁴⁾. 驚くべきことにこの抗原ペプチドは, タンパクとして発現した後にタンパクプライシングにより生じていることが明らかになった. 正常組織とは異なったタンパクプライシングにより, がん組織特異的な抗原ペプチドが産生されることにより, 正常組織にも発現するFGF5由来の抗原ペプチドが免疫原性を持ち, CTLに認識されるようになったと考えられる.

6. サイクリンD1

サイクリンD1はCdk4, Cdk6と結合し, 細胞周期をS期に誘導する細胞周期関連タンパクである. Dengjelらのグループは, マススペクトロメトリーを用いた解析にてサイクリンD1タンパク

に由来するHLA-DR4拘束性抗原ペプチドを同定している¹⁵⁾. 前述のWeinschenkらのグループによると, 腎がん組織よりマススペクトロメトリーにて, HLA-A2拘束性サイクリンD1由来ペプチドの存在を証明しているが, そのペプチドの免疫原性 (CTLの誘導能) までは評価されていない. これまでのところ, サイクリンD1由来抗原ペプチドを認識するCTLの存在は証明されていないが, マントル細胞リンパ腫など特定の悪性腫瘍においては, サイクリンD1の発現レベルは非常に高く免疫療法の標的となるかもしれない.

7. サイクリンB1

サイクリンB1はCdc2キナーゼと結合し, 細胞周期をM期に誘導するマスター分子である. 以下のG2/M期に発現する分子群を誘導するマスター分子である. KaoらのグループはHLA-A2陽性乳がん組織より, マススペクトロメトリーを用いた解析でサイクリンB1由来のペプチドを同定している¹⁶⁾. このペプチドは, サイクリンB1遺伝子がコードするアミノ酸配列とは異なり, 転写後の変異を起こしている可能性がある. また, 他の頭頸部がん患者末梢血リンパ球にて, 同ペプチドに対する免疫反応を検出することが可能であり, サイクリンB1の転写後変異は, 普遍的に悪性腫瘍で起こっているイベントかもしれない.

8. サバイビン

サバイビンは, アポトーシス抑制能をもつアポトーシス抑制タンパク (IAP) 遺伝子群の1つとして同定された. 正常組織においては, ごく微量の発現を認めるが, がん化した組織ではmRNAレベルでも, タンパクレベルでも高いレベルで発現する. サバイビンは, 高発現する抗原分子の中でも免疫原性が比較的高い遺伝子と考えられ, 細胞性免疫, 液性免疫両方の標的になることが明らかになっている¹⁷⁻¹⁹⁾. 我々は, サバイビンのス