

プライミングバリエント (サバイピン2B) にコードされる HLA-A24 拘束性抗原ペプチドを同定した。また、野生型サバイピンにコードされる HLA-A24 拘束性ペプチド (C peptide) も同定したが、サバイピン2Bペプチドの方が、Cペプチドと比して免疫原性が高い傾向にあった²⁰⁾ (未発表データ)。サバイピン2Bは mRNA レベルで、野生型サバイピンより数十倍発現が低い。このことから、正常組織における発現が高い野生型サバイピンにコードされる抗原ペプチドは免疫寛容に陥っている可能性がある反面、正常組織での発現がきわめて低いサバイピン2Bにコードされる抗原ペプチドは免疫原性が保たれている可能性がある。この場合、がん免疫療法の標的としてはサバイピン2Bの方が適切である可能性がある。実際に我々は、サバイピン2Bペプチド製剤を用いて、様々ながん種にて臨床試験を開始しているが、治療対象となったがん患者全体の約10パーセントにおいて、腫瘍退縮を認めており、比較的良好な結果を得ている²¹⁾。この結果から、サバイピン2Bペプチドは免疫寛容が誘導されておらず、免疫原性の高い抗原ペプチドであることを示唆するものである。

9. オーロラAキナーゼ

オーロラAキナーゼは有糸分裂時に異常な紡錘糸を形成する変異型酵母の原因遺伝子である *Ipl1* キナーゼと高い相同性をもつ遺伝子として同定されている²²⁾。オーロラAキナーゼはG2/M期に高発現し、中心体に局在するセリン、スレオニンキナーゼである。オーロラAキナーゼを高発現させた NIH3T3 細胞はトランスフォームすることが明らかとなっており、がん遺伝子の一つとも考えられている。ヒト腫瘍組織においても、オーロラAキナーゼは複数のがん腫で高発現し、その発現と悪い予後が相関することが知られている。また、オーロラAキナーゼは、p53がん抑制遺伝子

をリン酸化することにより、MDM2によるp53分解を促進することが知られている²³⁾。これらのことからオーロラAキナーゼも免疫療法のよい標的となりうると考えられる。

つい最近、愛媛大学、安川らのグループは、ヒトオーロラAキナーゼ由来のHLA-A2拘束性抗原ペプチドの同定に成功している。また、我々はマウスオーロラAキナーゼ遺伝子を用いたDNAワクチンにて抗腫瘍効果を確認しており、*in vivo* にもオーロラAキナーゼは拒絶抗原分子になりうると考えられる。

10. CEP55/c10orf3

CEP55/c10orf3は中心体に局在する分子として同定された分子である²⁴⁾。CEP55/c10orf3は細胞周期分裂期のプロメタフェイス～アナフェイスにかけて中心体に存在するが、cdc2キナーゼにリン酸化され中心体を離脱し、Plk1キナーゼにリン酸化されミッドボディに局在することが知られている。siRNAを用いた実験により細胞分裂に必須の分子であることが証明されている。また、sakaiらのグループはマイクロアレイを用いたスクリーニングで、大腸がんを高発現する遺伝子としてCEP55/c10orf3を同定している²⁵⁾。

我々も、マイクロアレイを用いたスクリーニングで乳がんにおいて高発現する分子としてCEP55/c10orf3を同定している (未発表データ)。また、HLA-A24拘束性CEP55/c10orf3由来の抗原ペプチドの同定に成功している。半数以上のHLA-A24陽性がん患者にてこの抗原ペプチドを認識するCTLを検出することが可能であり、免疫原性が非常に高い分子であることが示唆される。さらに我々は、CEP55/c10orf3抗原ペプチドを用いた臨床試験を計画している。

11. Plk1キナーゼ

Plk1キナーゼは、ショウジョウバエの細胞分

裂にかかわる分子である polo と相同性を示す分子として同定されている。Plk1 キナーゼは細胞分裂に必須のセリン, スレオニンキナーゼの一つで, がん組織で高発現する点で上記オーロラ A キナーゼと類似する分子である²⁶⁾。

我々は, マウス Plk1 キナーゼ遺伝子を用いて, DNA ワクチン実験を行った結果, Plk1 キナーゼが, 腫瘍拒絶抗原となりうることを確認した (未発表データ)。このことから Plk1 キナーゼもオー

ロラ A キナーゼ同様, 免疫療法の標的分子となりうることを示唆するものである。

12. SART-1

SART-1 は HLA-A26 拘束性 CTL が認識する食道がん抗原分子として同定された分子である²⁷⁾。SART-1 はスプライソソームに局在し, スプライシングにかかわる分子であるが, Kittler らのグループが siRNA を用いて網羅的に細胞分裂にか

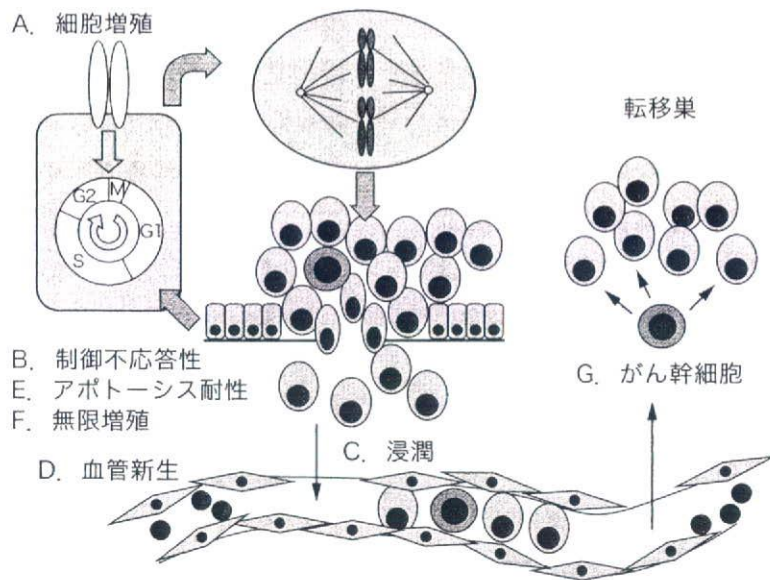


図1 発がん, 浸潤, 転移にかかわる遺伝子群

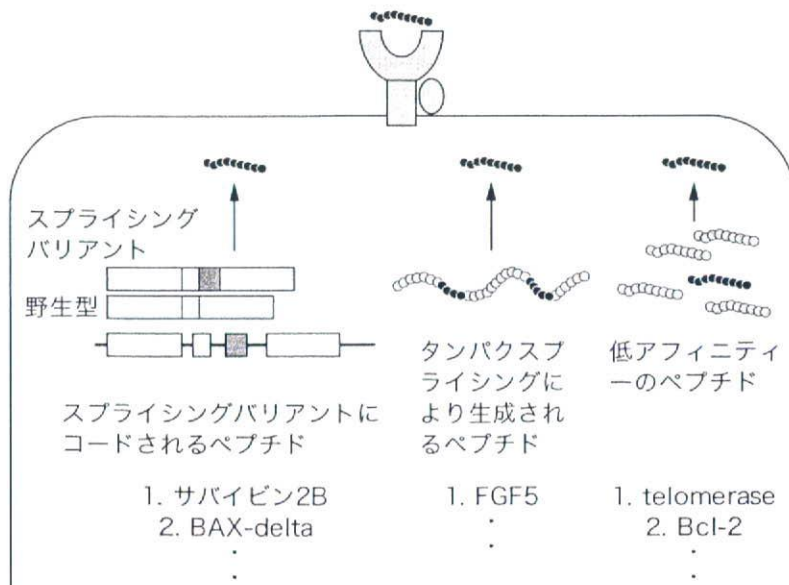


図2 過剰発現抗原ペプチドが免疫原性を獲得するさまざまな機構

かわる遺伝子をスクリーニングした結果, SART-1を同定している²⁸⁾. このことは, SART-1も細胞分裂に必須の分子であることを示唆するものである(図1, 2).

B. 成長抑制シグナルに対する不応答性を司る遺伝子群

正常細胞においては, 変異を生じた細胞が異常増殖しないために, 様々なチェックポイント機構が働いている. G1/S チェックポイント, G2/M チェックポイント, スピンドルチェックポイントなどである. がん細胞においては, これらのチェックポイント機構を解除するような遺伝子が発現していることが知られている. 正常p53遺伝子を抑制するMDM2, やオーロラAキナーゼ, 他にはウイルス由来のHPV E6, HPV E7などである. これらの遺伝子群もまた, 腫瘍抗原分子としてもCTLに認識されることが知られている.

1. MDM2

Asaiらのグループは腫瘍細胞の細胞溶解液をHLA-A2陽性健常者由来の樹状細胞に取り込ませたあと, この樹状細胞を抗原提示細胞としてCTLを誘導している. このCTLの認識する抗原ペプチドとしてMDM2由来の抗原ペプチドを同定している²⁹⁾.

C. 組織浸潤にかかわる遺伝子群

がん細胞の重要な形質である組織浸潤能を司る遺伝子群である. 細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素遺伝子群としてマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)遺伝子群が知られている. MMPは, 23個のファミリーからなる遺伝子群で, その中でも, MMP-2とMMP-9が腫瘍細胞での発現が高く, 腫瘍の浸潤・転移にかかわっ

ていると考えられている. また, その他のMMPファミリーも腫瘍細胞で高発現するという報告がなされており, CTLの標的分子になりうる可能性を秘めていると考えられる. 一方で, MMP-3やMMP-8など特定のMMP分子は, 逆に腫瘍の浸潤を抑制することにより, 腫瘍進展からホストを守っているという報告もあり³⁰⁾, 一概にMMPファミリー分子がCTLの標的分子として適しているかどうかは結論づけられない. しかしながら, MMPファミリーは, がんの浸潤・転移というがん患者の予後を直接左右する現象にかかわる遺伝子群であり, 免疫療法の標的分子として魅力的であることに変わりはないと思われる. 今後の詳細な検討が望まれる.

1. MMP2

GodefroyらのグループはMMP2がHLA-A2拘束性にCTLの標的分子となることを明らかにしている³¹⁾. MMP2タンパクが $\alpha v \beta 3$ 依存性に, 悪性黒色腫細胞に取り込まれクロスプレゼンテーションされることによりCTLに認識される. 本来なら全身臓器に発現するMMP2を認識するCTLは免疫寛容が誘導されていることが予想されるが, Godefroyらによって同定された抗原ペプチドは, $\alpha v \beta 3$ 陽性細胞にクロスプレゼンテーションされることによりはじめてCTLに認識される. 全身に発現する自己抗原分子でありながら, CTLが正常組織にも発現する腫瘍分子腫瘍特異的に反応する機序が明快に解明された貴重な報告である.

D. 血管新生にかかわる遺伝子群

がんは, 一定以上の大きさに増殖するためには, 血管新生を伴う必要がある. 多くの腫瘍細胞は新生血管を誘導するサイトカインである, VEGFを分泌し, 血管新生をうながす. VEGFレセプター

である VEGFR1, VEGFR2 由来の抗原ペプチドが同定されている。また腫瘍血管にて発現する RGS5 も腫瘍抗原分子として同定されており, VEGF レセプター同様, 腫瘍血管を標的とする免疫療法の標的となりうる。

1. VEGFR1

Ishizaki らのグループは HLA-A2/Kb トランスジェニックマウスを用いて VEGF-R1 にコードされる HLA-A2 拘束性抗原ペプチドを同定している³²⁾。VEGF-R1 抗原ペプチドにて免疫された担がんマウスでは, 血管新生が抑制されており, 腫瘍増大を抑制することができた。このことから, 抗血管新生治療として, VEGF-R1 ペプチドは有用である可能性が示唆される。

2. VEGFR2

Wada らも, HLA-A2/Kb トランスジェニックマウスを用いて HLA-A2 拘束性 VEGF-R2 抗原ペプチドを同定している³³⁾。

3. RGS5

上記 Weinschenk らのグループは腎がん組織から RGS5 由来の抗原ペプチドも同定しているが, Cristina らは, 同ペプチドを用いてその免疫原性を確認している³⁴⁾。興味深いことに RGS5 はがん細胞に過剰発現すると同時に, 腎がん組織の血管内皮細胞にも発現していることが確認されており³⁵⁾。RGS5 を標的とする免疫療法は, がん細胞自身と, がん細胞を栄養する腫瘍血管を認識できる可能性を示唆するものである。

4. サバイビン

増殖刺激を受けた血管内皮細胞は異所性にサバイビンを発現することが知られている³⁶⁾。腫瘍新生血管にもサバイビンが発現しており, サバイビンは新生血管の標的分子としても機能する可

能性がある。このことから, サバイビンに対する免疫療法は, がん細胞のみならず, 腫瘍血管を標的とすることができると考えられる。

E. アポトーシス耐性能にかかわる遺伝子群

正常細胞は, 臓器内においての規律を保つためのアポトーシス経路をもっている。変異を起こし, 臓器内規律から外れた細胞はアポトーシスにより自己死を引き起こし個体としてのホメオスタシスを保っている。しかしながら, がん細胞は, 増殖の制御から外れており, アポトーシス耐性になっている。アポトーシス耐性を獲得するために様々な抗アポトーシス遺伝子群が高発現することが知られている。そのなかでも, Bcl-2, Bcl-xL, サバイビン, ML-IAP/Livin などが知られている。

1. Bcl-2

Bcl-2 は Burkitt リンパ腫または濾胞リンパ腫で見られる染色体転座 t(8;14)t(14;18) から同定された遺伝子で, 多くの悪性腫瘍で過剰発現することが知られている。近年では, Bcl-2 は分子標的治療薬の標的として, アンチセンスオリゴや, Bcl-2 インヒビターは製薬化に向けた臨床試験中である。免疫療法の標的分子としても興味深い分子である。Andersen らのグループは Bcl-2 が CTL の標的になることを証明している³⁷⁾。Andersen らは, Bcl-2 由来の HLA-A2 拘束性抗原ペプチドを複数デザインしている。がん患者末梢血を用いて免疫学的な検討を行った結果, 中アフィニティー～低アフィニティーペプチドで免疫反応を検出できたが, 高アフィニティー抗原ペプチドではがん患者血液における免疫反応を検出できなかった。Bcl-2 は正常リンパ節や胸腺などでも発現がみられ, 高アフィニティーペプチドは免疫寛容になっている可能性が示唆される。

2. Bcl-xL

Andersenらのグループは抗アポトーシス分子の一つであるBcl-XLもまたCTLの標的となりうることを証明している³⁸⁾。

3. Mcl-1

やはりAndersenらのグループが抗アポトーシス活性をもつMcl-1由来のHLA-A1拘束性抗原ペプチドの同定に成功している³⁹⁾。Mcl-1はまた、血液系幹細胞に発現し、血液幹細胞がアポトーシス死による枯渇から守っていることが示されている⁴⁰⁾。これらのことから、Mcl-1は血液系腫瘍の幹細胞を標的とした免疫療法をデザインできる可能性がある。

4. BAX-delta

BAXはプロアポトティックタンパクの一つで、Bcl-2と結合することにより、細胞のアポトーシスを促進する分子である。BAXにはいくつかスプライシングバリエーションが知られているが、エクソン3を欠失することによりデスドメインを欠くバリエーションとしてBAX-deltaが知られている。その詳細な機能は不明であるが、デスドメインを有する野生型BAXと結合することにより、BAXのアポトーシス誘導能を抑制することにより、アポトーシス抑制能を有する可能性が示唆されている。

Maiaらのグループはマイクロアレイを用いたスクリーニングで、B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) に高発現する遺伝子の一つとしてBAX-deltaを同定している⁴¹⁾。BAX-deltaのエクソン2とエクソン4結合部位にコードされるHLA-A2拘束性抗原ペプチドの同定に成功している。BAX-deltaはエクソン3を欠くため、エクソン2、エクソン4結合部位のアミノ酸配列はBAX-delta特異的であると考えられる。野生型BAXがプロアポトティック機能を有し、正常組

織で発現がみられるのに対し、BAX-deltaは腫瘍特異的な発現様式を示し、免疫原性を獲得したと考えられる。

5. ML-IAP/Livin

ML-IAP/Livinは悪性黒色腫に高発現するIAPファミリー遺伝子melanoma-IAP (ML-IAP)として同定されたアポトーシス抑制分子である。ML-IAP/Livinは悪性黒色腫で、非常に免疫原性の高い抗原分子として同定されている⁴²⁾。また最近、ML-IAP/Livinは悪性黒色腫のみならず、様々な悪性腫瘍で高発現することが知られており、悪性黒色腫以外の悪性腫瘍でも免疫療法の標的分子となりうることも示されている。我々は、肺癌組織にてML-IAP/Livinが高発現することを見出した⁴³⁾。また、ML-IAP/Livinは非常に免疫原性の高い分子であり、高頻度に肺癌患者にて細胞性、液性免疫を確認することができる⁴⁴⁾。また、上記MariaらのグループはB-ALLにおいてもML-IAP/Livinが高発現することも見出している。これらのことから、ML-IAP/Livinは様々な悪性腫瘍に発現し、しかも、免疫原性が強く、免疫療法の標的分子として理想的な分子の一つといえる。

6. サバイビン

サバイビンは、上記の通り抗アポトーシス能をもつ分子で、悪性腫瘍に対する化学療法や、放射線療法に対する耐性獲得の原因遺伝子の一つと考えられている⁴⁵⁾。化学療法や、放射線療法が効果を奏さない症例でも免疫療法の標的として期待できる分子である。

7. HSP105

Nakatsuraらのグループは肺癌患者の血清を用いて、液性免疫が認識する抗原分子としてHSP105を同定している⁴⁶⁾。後に同グループは、

HSP105のDNAワクチンを用いて、HSP105がCD4およびCD8 T細胞依存性に、抗腫瘍効果を有する腫瘍抗原であることを証明している⁴⁷⁾。興味深いことに、HSP105をsiRNAでノックダウンすると、様々ながん種細胞株でアポトーシスを誘導し、HSP105はアポトーシス耐性を有する分子であることが示唆されるが、その詳細はいまだ不明であり、今後の解析が期待される⁴⁸⁾。

F. 無限増殖能にかかわる遺伝子

正常細胞は、分裂するたびにテロメアが短くなり、テロメアが一定の長さまで短くなると染色体不安定性を引き起こすことにより、細胞が分裂できなくなる。しかしながらがん細胞においては、テロメアを伸張する機構が働いており、テロメア長を保っている。テロメラーゼは正常組織においては、胸腺、精巣、骨髄などの限られた臓器にのみ発現するが、がん組織においては、高頻度に高発現することが明らかになっている⁴⁹⁾。

テロメラーゼ

Vonderheideらのグループは、テロメラーゼ由来のHLA-A2拘束性抗原ペプチドにより、様々ながん腫を認識することができるCTLを誘導することができることを証明している⁵⁰⁾。ほぼ全てのがん細胞はテロメラーゼを高発現することが明らかになっており、魅力的な標的分子と考えられる。しかしながら、テロメラーゼは上記の通り正常組織にも発現する遺伝子であり、免疫寛容が引き起こされている可能性がある。Grossらのグループは、HLA分子に高～低結合力を示すテロメラーゼ由来のHLA-A2拘束性ペプチドを複数デザインしてCTL誘導実験を行った結果、HLA-A2分子に高結合力で結合する抗原ペプチドを認識するCTLは免疫寛容に陥っており、逆に、低結合力を示す抗原ペプチドの方において免疫原

性が高かったことを示している⁵¹⁾。テロメラーゼは胸腺にも発現する分子であり、高結合力でHLA-A2分子に結合する抗原ペプチドを認識するCTLは胸腺で除去されていた可能性を示唆するものである。このような免疫寛容の問題を乗り越えることができるならば、非常に魅力的な標的分子の一つである。

G. 幹細胞性にかかわる遺伝子群

がん幹細胞を同定するマーカーとなる遺伝子群はいくつか知られている⁵⁾。しかしながら現時点において絶対的なものはいまだ報告されていない。現在がん幹細胞を分離する一つの方法として、セルソーターを用いてside population (SP) として分離する方法が知られている⁵²⁾。これは、がん幹細胞は膜トランスポーター分子を高発現しており、ヘキスト33342という色素を細胞外に汲み出す能力が高く、染色され難いことを利用するものである。我々は、SPを用いて肺がん幹細胞の候補抗原分子としてSOXファミリー遺伝子群を同定したが、SOXファミリー遺伝子群は中枢神経系腫瘍や、悪性黒色腫などでは免疫原性も確認されており、がん幹細胞標的分子となりうる可能性を示唆するものである。

1. SOX2

SOX遺伝子ファミリーはHMBドメインをもつDNA結合分子である。その中でもSOX1, SOX2, SOX3は神経幹細胞の有する自己複製能に必須な遺伝子として知られている⁵³⁾。また、Takahashiらのグループは線維芽細胞にc-Myc, Oct-3/4, SOX2, Klf4というたった4つの遺伝子を導入することにより人工的ES細胞の作製に成功している⁵⁴⁾。このことは、SOX2遺伝子が、幹細胞性の形質発現に重要な役割を果たしていることを示唆する。

一方で、これらのSOXファミリー遺伝子群はSEREX法により、小細胞肺癌症例で、抗体により認識される腫瘍抗原分子としても同定されている⁵⁵⁾。小細胞肺癌は神経内分泌系の性格をもった悪性腫瘍であり、神経幹細胞に発現するSOX遺伝子ファミリーが、神経系への分化にかかわっている可能性が示唆される。また、SOX2にコードされるHLA-A2拘束性抗原ペプチドも同定されており、神経系悪性腫瘍もしくは、神経内分泌系の性格をもつ悪性腫瘍の標的となりえると考えられる⁵⁶⁾。さらに、SOX2は良性単クローン性 γ グロブリン血症の患者において、抗SOX2の液性および、細胞性免疫が確認されている⁵⁷⁾。このことはSOX2タンパクが非常に免疫原性を示すことが示唆される。これらのことから、中枢神経系悪性腫瘍や、肺がんのがん幹細胞を標的とした免疫療法を考える場合、SOX2はその標的となりえると考えられる。

2. SOX10

SOX10は神経性難聴、色素沈着低下、神経節細胞欠損性巨大結腸症の症状を示すタイプ4のWaardenburg症候群の原因遺伝子として知られている。Khongらのグループは、免疫療法に著効を示した悪性黒色腫患者のHLA-A2拘束性腫瘍浸潤リンパ球を用いて、その認識する抗原分子としてSOX10を同定している⁵⁸⁾。SOX10はまた、TRP2や悪性黒色腫発生のマスター遺伝子と考えられているmicrophthalmia-associated transcription factorの転写、発現を制御しており、悪性黒色腫の発生に重要な役割を果たしていると考えられる。これらのことから、SOX10は悪性黒色腫のがん幹細胞の標的分子となりうる可能性がある。

むすび

これまで述べてきたとおり、腫瘍抗原分子とし

て同定された遺伝子群のかかりの数の遺伝子が、細胞の腫瘍化にとっても重要な働きをもっている。腫瘍抗原分子は、正常細胞に比べて、がん細胞で高発現する分子群であることを考えると非常に理にかなっている。以上に述べてきた腫瘍抗原分子の機能的側面は、がんの生物学的側面を理解するうえで有用であるばかりでなく、免疫療法と他の治療法を併用する場合に有用になると考えられる。

たとえば、免疫療法と、化学療法もしくは放射線療法の併用を考えると、トポイソメラーゼI拮抗剤や、代謝拮抗剤、放射線療法は、がん細胞をG1期で停止することが知られている。ならば、G1期で停止したがん細胞は、細胞周期にかかわる抗原分子群で、G1/S期に高発現する分子を高発現すると考えられるので、G1/S期抗原分子での免疫療法を併用するとより効果的になると考えられる。G2/M期で細胞を停止させるトポイソメラーゼII拮抗剤や、ピンカアルカロイド製剤、タキサン系製剤と、G2/M期に発現する抗原分子を用いた免疫療法も同様に有効と考えられる。実際、我々は、がん細胞をタキソールやVP-16で処理するとG2/M期抗原分子群(サバイビン、オーロラAキナーゼ、CEP55/c10orf3)の発現が上昇することを確認している。また、逆に負の効果もあり得る。たとえば、サバイビンは、HER-2やEGFRの下流に位置することが知られている^{59,60)}。とすると、HER-2やEGFRを標的とした(ハーセプチン、ゲフィニチブ)分子標的治療を行うと、がん細胞のサバイビンの発現が低下し、サバイビンを用いた免疫療法はハーセプチンやゲフィニチブとの併用に向かないと考えられる。このように、腫瘍抗原分子を機能的側面にて理解することは、がん治療の臨床の場に直接利益をもたらすものと考えられる。

化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療も含めて、既存のがんの治療法は、その副作用

は無視できない。残念ながらこれら苦痛をもたらす治療は、たとえ生物学的に腫瘍の退縮をもたらすことが可能であっても、患者にとってはその苦痛ゆえに、精神的には患者を病気から治癒させているとは考え難い側面もある。抗原分子の機能をとらえつつ合理的な免疫療法をデザインし、これまで進歩を遂げてきた化学療法や、放射線療法といった既存のがん治療法との接点を探ることにより、免疫療法は新たにスタンダードながんの治療法として確立されると考えられる。

<追伸>

当教室では上記のように、がん免疫療法を化学療法、放射線療法といった既存の治療法と比肩するようながんの標準的な治療法として確立するための基礎的な研究を進めている。がんの免疫療法に関して御興味をもたれた方がおられたら、是非お気軽に御連絡頂きたい。hirohash@sapmed.ac.jp

文献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991; 254: 1643-7.
- 2) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9: 684-93.
- 3) [http://www.cancerimmunity.org/peptide database/Tcellepitopes.htm](http://www.cancerimmunity.org/peptide_database/Tcellepitopes.htm)
- 4) Hanahan D, and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- 5) Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1253-61.
- 6) Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*. 1995; 181: 2109-17.
- 7) Okugawa T, Ikuta Y, Takahashi Y, et al. Novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse K(d)-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 3338-46.
- 8) Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res*. 2007; 67: 7477-86.
- 9) Shomura H, Shichijo S, Komatsu N, et al. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 1776-86.
- 10) Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res*. 2002; 62: 5818-27.
- 11) Schag K, Schmidt SM, Muller MR, et al. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 3658-66.
- 12) Chiari R, Hames G, Stroobant V, et al. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res*. 2000; 60: 4855-63.
- 13) Balakrishnan A, Bleeker FE, Lamba S, et al. A novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2007; 67: 3545-50.
- 14) Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*. 2004; 427: 252-6.
- 15) Dengjel J, Decker P, Schoor O, et al. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 3644-51.
- 16) Kao H, Marto JA, Hoffmann TK, et al. Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized by T cells. *J Exp Med*. 2001; 194: 1313-23.
- 17) Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, et al. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein

- survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 869-72.
- 18) Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, et al. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 1731-9.
 - 19) Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 2000; 60: 1815-7.
 - 20) Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1474-82.
 - 21) Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, et al. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med.* 2004; 2: 19.
 - 22) Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 42-50.
 - 23) Katayama H, Sasai K, Kawai H, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet.* 2004; 36: 55-62.
 - 24) Fabbro M, Zhou BB, Takahashi M, et al. Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell.* 2005; 9: 477-88.
 - 25) Sakai M, Shimokawa T, Kobayashi T, et al. Elevated expression of C10orf3 (chromosome 10 open reading frame 3) is involved in the growth of human colon tumor. *Oncogene.* 2006; 25: 480-6.
 - 26) Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 321-30.
 - 27) Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 187: 277-88.
 - 28) Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature.* 2004; 432: 1036-40.
 - 29) Asai T, Storkus WJ, Mueller-Berghaus J, et al. In vitro generated cytolytic T lymphocytes reactive against head and neck cancer recognize multiple epitopes presented by HLA-A2, including peptides derived from the p53 and MDM-2 proteins. *Cancer Immun.* 2002; 2: 3.
 - 30) Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; Aug: 24.
 - 31) Godefroy E, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med.* 2005; 202: 61-72.
 - 32) Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S, et al. Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 5841-9.
 - 33) Wada S, Tsunoda T, Baba T, et al. Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res.* 2005; 65: 4939-46.
 - 34) Boss CN, Grunebach F, Brauer K, et al. Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3347-55.
 - 35) Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, et al. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2004; 203: 551-8.
 - 36) O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol.* 2000; 156: 393-8.
 - 37) Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, et al. Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Blood.* 2005; 105: 728-34.
 - 38) Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, et al. Spontaneous immunity against Bcl-xL in cancer patients. *J Immunol.* 2005; 175: 2709-14.
 - 39) Andersen MH, Becker JC, Thor Straten P. The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia.*

- 2005; 19: 484-5.
- 40) Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*. 2005; 307: 1101-4.
 - 41) Maia S, Haining WN, Ansen S, et al. Gene expression profiling identifies BAX-delta as a novel tumor antigen in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005; 65: 10050-8.
 - 42) Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3398-403.
 - 43) Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1000-9.
 - 44) Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2005; 48: 217-21.
 - 45) Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol*. 2006; 208: 476-86.
 - 46) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, et al. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281: 936-44.
 - 47) Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, et al. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4 T cells and CD8 T cells. *Cancer Sci*. 2005; 96: 695-705.
 - 48) Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, et al. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2006; 97: 623-32.
 - 49) Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22: 531-57.
 - 50) Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, et al. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999; 10: 673-9.
 - 51) Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*. 2004; 113: 425-33.
 - 52) Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 781-6.
 - 53) Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, et al. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*. 2003; 6: 1162-8.
 - 54) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
 - 55) Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, et al. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 4198-203.
 - 56) Schmitz M, Temme A, Senner V, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1293-301.
 - 57) Spisek R, Kukreja A, Chen LC, et al. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*. 2007; 204: 831-40.
 - 58) Khong HT, Rosenberg SA. The Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10, is a novel tumor-associated antigen identified in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *Cancer Res*. 2002; 62: 3020-3.
 - 59) Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005; 65: 11018-25.
 - 60) Wang Q, Greene MI. EGFR enhances Survivin expression through the phosphoinositide 3(PI-3) kinase signaling pathway. *Exp Mol Pathol*. 2005; 79: 100-7.

2

熱ショック蛋白質による免疫
制御と癌ワクチン開発

札幌医科大学病理学第一講座 田村保明, 佐藤昇志

はじめに

近年、多数のヒト腫瘍拒絶抗原分子が同定され、抗原ペプチドや蛋白を用いた腫瘍特異的ワクチン療法が臨床試験の段階にある。一部の症例では腫瘍の完全退縮といった劇的な治療効果を認め、新たな治療法として注目を集めはじめたが、その一方でワクチン療法には全く反応を示さない症例が多数あり、このような臨床効果の違いが何に起因しているのかを解明し、より効果的な治療法を開発する必要がある。

癌抗原を用いたワクチン療法をより有効性の高いものとするには、抗原ペプチドあるいは蛋白質を樹状細胞に代表される抗原提示細胞に効率よく送達することに加え、抗原提示細胞の成熟化・サイトカイン産生を誘導することが重要である。さらに、抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導することが目的の場合は、ワクチン抗原をクロスプレゼンテーション経路に誘導することが必須である。

我々は、細胞外の熱ショック蛋白質(HSP)-抗原複合体が樹状細胞によって受容体依存性にエンドサイトーシスされ、クロスプレゼンテーションによりCTLを効率よく誘導することを示してきた。中でもHsp90や小胞体の分子シャペロンORP150と抗原の複合体はCTL誘導による抗腫瘍効果が確認され、臨床応用が期待される。本項では、Hsp90, ORP150を用いた抗

腫瘍免疫応答誘導のメカニズム、特に細胞内における抗原プロセッシングについて述べる。さらに最近ロシアにおいて製薬化が承認されたgp96を用いたpersonalizedワクチンについても解説する。

熱ショック蛋白質と免疫誘導

癌免疫における熱ショック蛋白(heat shock protein : HSP)の意義付けは、1990年代のSrivastavaらの報告に端を発する。彼らは、マウスの線維肉腫の腫瘍拒絶抗原同定過程で、小胞体HSPの一種であるgp96に免疫原性があることを発見し、その拒絶抗原の本態はgp96そのものではなくgp96に結合している腫瘍由来の抗原ペプチドであると報告した。ほぼ同時期に我々は、癌化に伴って細胞表面上に発現するHsc73様抗原が $\gamma\delta$ T細胞と反応することを報告した。さらに、Hsp72やHsp90, grp170(ORP150)にも同様の免疫原性があることが証明された。その後の精力的な研究により、HSPはシャペロンとして細胞内で主にプロテアソームにより生成される抗原ペプチドを結合・保護・輸送し、MHCクラスI分子による抗原提示を介して、T細胞による免疫応答を誘導することが明らかにされた。このような細胞内での分子シャペロンとしての重要性に加え、近年では細胞外のHSPの免疫制御機構、特にクロスプレゼンテーションにおける役割が脚光を浴び

ている。すなわちストレスに曝露された腫瘍細胞や感染細胞が壊死に陥ると、細胞内のHSPはペプチドと複合体を形成した状態で細胞外に放出される。このHSP-抗原複合体はreceptor dependentに効率よく樹状細胞(dendritic cell: DC)などの抗原提示細胞に取り込まれる。こうしてHSPに結合した抗原が抗原提示細胞上のMHCクラスIおよびクラスII分子に提示され、T細胞応答が誘導される。この場合、HSP-抗原ペプチド複合体は樹状細胞にとっては外来性抗原として認識される。外来性抗原がMHCクラスIIと結合し細胞表面上に提示されるメカニズムに関してはよく知られているが、MHCクラスIに提示される分子機序(クロスプレゼンテーション)に関しては未だ不明の点が多い。近年の研究によりHSP-抗原ペプチド複合体は非常に効率よくクロスプレゼンテーションされることが明らかになってきた¹⁾。腫瘍細胞や感染細胞から細胞外周囲環境に放出されたHSPは、腫瘍あるいは感染症由来の抗原と細胞が本来有している内在性自己抗原の両者を結合している。この際、内在性自己抗原に反応するT細胞はnegative selectionにより除去されているため、免疫反応は腫瘍抗原あるいは感染症の原因である細菌あるいはウイルス由来の抗原に対して選択的に誘導されると考えられる。さらに細胞外のHSPはToll-like receptorを介する刺激により抗原提示細胞からのサイトカインの産生や抗原提示細胞の成熟化を促進することにより、自然免疫系を活性化することが知られており、natural immune adjuvantとしての機能も注目されている²⁾。

クロスプレゼンテーションの生体防御機構における意義と癌ワクチン療法に与えるインパクト

本来外来性抗原はMHCクラスII経路に入

り、 $CD4^+$ T細胞の活性化を誘導することがcentral dogmaとして認識されてきた。しかし抗原の形態あるいは樹状細胞による抗原の取り込み方法によっては、外来性抗原であってもMHCクラスI経路に入り、 $CD8^+$ T細胞の活性化を誘導する経路、すなわちクロスプレゼンテーション経路の存在が明らかになった。クロスプレゼンテーションの生体防御機構における意義は、専門的抗原提示細胞以外の細胞が発現する抗原に対する免疫応答の誘導には、必ずクロスプレゼンテーション経路により、 $CD8^+$ T細胞が抗原提示を受け活性化される必要があるということである。すなわち癌細胞に対する免疫応答が効率的に誘導されるためには、priming phaseでこのクロスプレゼンテーションが行われる必要がある。癌細胞自身は癌特異的抗原を発現しているにもかかわらず、共刺激分子を発現していないため、 $CD8^+$ T細胞を活性化できないからである。またこのクロスプレゼンテーション経路は、蛋白質抗原を用いた癌ワクチンを考えた際にも、大変重要な問題となる。なぜなら、抗原の投与方法ないし取り込まれ方により、ワクチンとしての癌抗原の提示経路が異なる可能性があるからである。ペプチドワクチンと異なると、蛋白質抗原ワクチンの場合は、 $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞の両方の活性化を目的として投与される。しかし外来性抗原がMHCクラスI分子経路に誘導されるのは予想以上に難しい。そのため抗原を化学修飾する、あるいはリポソームに封入するなどの様々な工夫が提案されている。ごく最近我々は、Hsp90にシャペロンされた抗原ペプチドは主としてTAP非依存性のエンドソーム-リサイクリング経路によりMHCクラスI分子にクロスプレゼンテーションされることを報告した²⁾。さらに投与される抗原は外来性抗原であるため、当然MHCクラスII分子による抗原提示も同時に行われると予

想したが、実際は Hsp90 にシャペロンされた MHC クラス I およびクラス II 分子のいずれにも提示されるエピトープを含む前駆ペプチドは MHC クラス I 分子によってのみ抗原提示された。このような“クラス I 抗原提示経路”、“選択的な抗原輸送”がいかにして実行されるのであろうか。以下に我々の結果について述べる。

Hsp90-抗原複合体によるクロスプレゼンテーション

Hsp90 は細胞質内に豊富に存在する分子シャペロンであり、多くの癌細胞で発現が増加している。そのため、癌細胞が壊死に陥った際には、細胞外周囲環境に放出され、これが danger signal として抗原提示細胞により取り込まれることで、T 細胞を主体とする免疫応答を誘導すると考えられた。これを検証するために、まず前駆ペプチドを用いて、Hsp90 と前駆ペプチドの複合体を作成し、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションを検討した³⁾。OVA 由来の抗原ペプチド SL8(SIINFEKL)は H-2K^bに提示され、CD8⁺ T 細胞ハイブリドーマ B3Z に認識される。この系を用いて Hsp90 によるクロスプレゼンテーション誘導を検討した。SL8 の C 末端側に 5 つのアミノ酸を付加した SL8C 前駆ペプチドと Hsp90 の複合体を *in vitro* において作成し、樹状細胞にパルスすると、前駆ペプチド単独と比較して非常に効率よくクロスプレゼンテーションされ、B3Z に認識された。しかもこのクロスプレゼンテーションは TAP (transporter-associated with antigen processing) ノックアウトマウス由来の樹状細胞を用いても野生型マウス由来の樹状細胞と同程度の抗原提示を示したことから、TAP 非依存性に抗原提示されることが明らかになった。次に蛍光色素ラベルした Hsp90 と SL8C との複合体を用いて、樹状細胞内の局在を検討すると、初期エンドソ-

ムに存在することが明らかになった。しかし後期エンドソーム、lysosome にはその存在を認めなかった。さらに H-2K^b と SL8 エピトープとの複合体を認識する抗体 25-D1.16 を用いた検討で、Hsp90 にシャペロンされた前駆ペプチドは初期エンドソームで processing を受け、リサイクリングエンドソームに輸送され、ここでリサイクル MHC クラス I 分子に受け渡されることが示された。また competition assay の結果、Hsp90-ペプチド複合体の取り込みは受容体依存性エンドサイトーシスによることが示された (図 1)。

Hsp90-抗原ペプチド複合体による免疫誘導と免疫監視機構

このような Hsp90-抗原ペプチド複合体による免疫誘導が実際、生体内でも行われているのだろうか？ 最近、国澤らは細胞質内の Hsp90 は C 末端側に長い前駆ペプチドを結合して、輸送していることを示した⁴⁾。我々がクロスプレゼンテーションを検討するために用いた C 末端側を延長した前駆ペプチドと Hsp90 との複合体は非常に効率よくクロスプレゼンテーションされ、CD8⁺ T 細胞を活性化する。すなわち Hsp90-前駆ペプチド複合体が実際に細胞内で存在しており、細胞壊死により、細胞外に放出されると、局所の炎症を感知して浸潤してきた樹状細胞などの抗原提示細胞に取り込まれ、結合抗原をクロスプレゼンテーションするものと考えられる。例えば生体がウイルスに感染した場合、感染細胞が壊死を起し、ウイルス抗原の前駆ペプチドを結合した HSP が周囲に放出される。このとき、この微少環境では大量のサイトカインと HSP-前駆ペプチド複合体が存在するので、炎症反応を感知した樹状細胞が浸潤し、サイトカインによりさらに活性化され、同時に HSP 受容体を用いて、HSP-前駆ペプチド

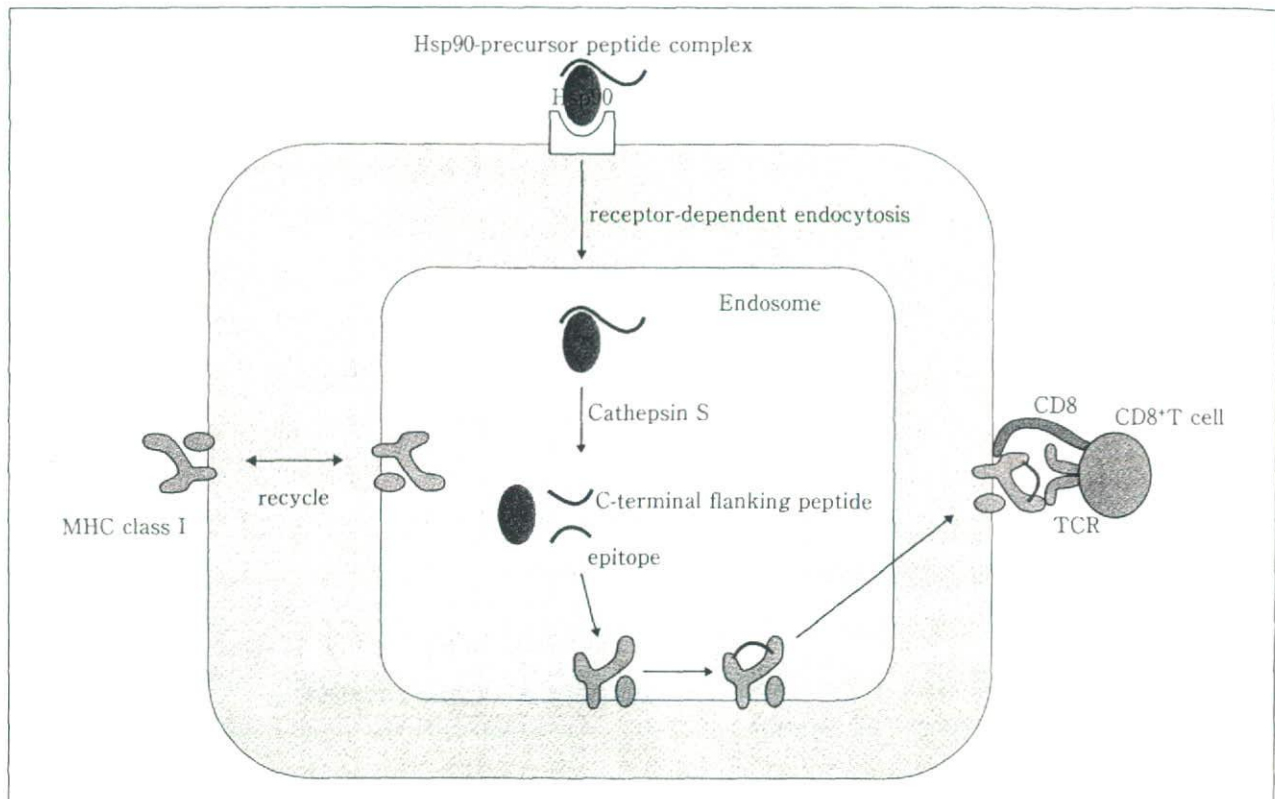


図1 Hsp90-抗原ペプチド複合体によるクロスプレゼンテーション経路

Hsp90-抗原ペプチド複合体のクロスプレゼンテーションは、エンドソーム-リサイクリング経路に入り、カテプシン S などのプロテアーゼにより process され、MHC クラス I 分子に提示される。

複合体をエンドサイトーシスにより取り込み、クロスプレゼンテーション経路に誘導する。もちろん、細胞内には Hsp70 をはじめとする様々な分子シャペロンが存在するので、これらの分子によるクロスプレゼンテーションを介する免疫制御について、さらに理解を深める必要がある。

HSP-癌抗原ペプチド複合体を用いた抗原特異的免疫応答増強効果

これまで述べたように、HSP にシャペロンされた抗原は非常に効率よくクロスプレゼンテーションされ、CTL を誘導することができる。この優れた免疫賦活作用を有する HSP と癌ワクチンペプチドとの複合体を用いた抗原特異的 CTL 誘導について検討した。現在我々は、アポトーシス抑制分子の一つである survivin 2B がほとんどすべての癌細胞に発現していること、

かつ抗原性が高く、CTL 誘導効率が優れていることから、HLA-A*2402 を対象にした survivin 2B 由来の癌抗原ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験を実施している。しかし、予想していたとおりではあるが、単独投与や不完全フロイドアジュバントを併用したワクチンでは十分な免疫効果が得られず、サイトカインの併用や自然免疫リガンドを利用した新規アジュバントを開発することが必要である。そこで我々は、survivin 2B ペプチドと HSP を含む自然免疫リガンドを用いた複合型ワクチンの動物試験を実施した。抗原として用いた survivin 2B ペプチドは、9 アミノ酸からなるペプチドであり、日本人に最も頻度の高い HLA-A*2402 拘束性に提示される CTL epitope である。我々は、survivin 2B ペプチドと種々の自然免疫リガンドを組み合わせて HLA-A*2402/K^b transgenic

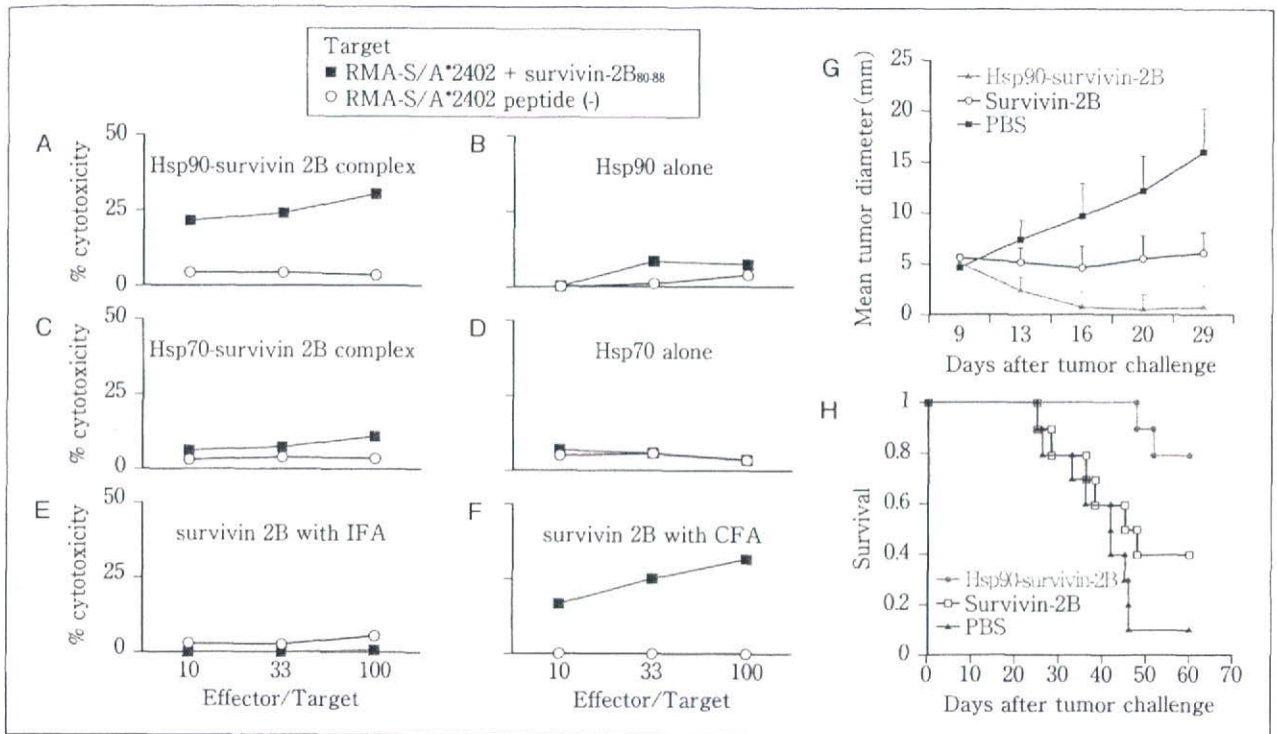


図 2 Hsp90-抗原ペプチド複合体による CTL 誘導効果と抗腫瘍免疫

癌抗原 survivin 2B 由来のペプチドを HLA-A*2402 トランスジェニックマウスに免疫して、その CTL 誘導効果を比較検討した。IFA とともに免疫(E)あるいは Hsp70 との複合体を免疫したもの(C)に比較して、Hsp90-survivin 2B ペプチド複合体で免疫すると(A)、CFA とともに免疫した場合(F)に匹敵する高い細胞傷害活性を示す特異的 CTL が誘導された。また HLA-A*2402 トランスジェニックマウスに survivin 2B を発現する腫瘍をあらかじめ接種し、Hsp90-survivin 2B ペプチド複合体を用いてその治療効果を検討した。Survivin 2B ペプチド単独と比較すると、Hsp90-survivin 2B ペプチド複合体による治療的ワクチンは腫瘍の増殖を抑制し(G)、80% の生存率を得た(H)。

mouse に投与し、ペプチド特異的 CTL の誘導能と腫瘍拒絶効果を比較検討した。その結果、図 2 に示すように Hsp90 とペプチドの複合体を免疫した場合に、高い CTL 誘導効果と腫瘍縮小効果を示した。これは前述したように、HSP-抗原ペプチド複合体が樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞によって効率的にクロスプレゼンテーションされた結果、抗原ペプチド特異的 CTL が誘導されたためと考えられる。

小胞体局在分子シャペロン ORP150 (Grp170)によるクロスプレゼンテーションと免疫応答

小胞体に局在する分子シャペロンを用いた免疫応答制御については gp96 がよく解析されて

いる。我々は低酸素で発現誘導される分子シャペロンである ORP150 に注目して、クロスプレゼンテーションを促進するか否かについて検討した。ORP150 は Kuwabara らが同定した低酸素誘導性の分子シャペロンである。さらに Spee らは、小胞体に輸送されたペプチドは、gp96, PDI, Erp72, calnexin および ORP150 により選択的に結合することを示している⁵⁾。この事実を基に我々は、ORP150 による免疫制御について検討した。すなわち ORP150 と OVA 由来 SL8 の前駆ペプチドとの複合体を作製して、骨髄由来の樹状細胞にパルスするとペプチド単独と比較して効率よくクロスプレゼンテーションされることを示した。またこの ORP150-SL8 前駆ペプチド複合体をマウスに免

疫すると高い細胞傷害性を示す CTL が誘導された。ORP150 のユニークな点は、Hsp90 と異なり、MHC クラス I および MHC クラス II 分子に提示されるペプチドを含む前駆ペプチドと複合体を作製して、樹状細胞にパルスすると MHC クラス I 分子はもちろん、MHC クラス II 分子にも提示され、CD4⁺T 細胞を活性化する。この ORP150-抗原ペプチド複合体も現在解析中の受容体依存性に取り込まれ、初期エンドソームに入り、リサイクリング経路でクロスプレゼンテーションされることを確認している。このように CD4⁺T および CD8⁺T 細胞のいずれも活性化することを期待する場合は ORP150 を用いることができる。

HSP ワクチンの臨床試験の現況

現在海外では、autologous tumor-derived gp96 vaccine (Oncophage) が転移性悪性黒色腫と腎癌を対象として第 3 相臨床試験の段階にある。特筆すべきことに、ごく最近この Oncophage がロシアにおいて世界初の personalized cancer vaccine として認可された。対象は転移の認められない intermediate risk (stage I/II の high grade, stage III の T1, T2, T3a で low grade) の腎癌患者である。これはロシアを含む多施設の臨床試験において、604 人の転移のない intermediate risk の腎癌患者を対象にした randomized trial が実施され、362 人の Oncophage を投与された患者の 45% に有意な無再発生存期間の延長が認められたという結果をふまえた承認である。また現在 Glioma と非小細胞性肺癌の Phase I/II が現在進行中である。また同様に、autologous tumor derived Hsp70 vaccine (AG-858) の臨床試験も実施された。Gleevec と組み合わせることで CML 患者 8 人のうち 7 人に臨床効果

が認められた。また、imatinib mesylate との組み合わせによって、慢性骨髄性白血病患者の 20 人中 13 人に臨床効果が認められたことも報告され、新たな白血病治療法として大きな期待を集めている。

まとめ

HSP-抗原複合体による免疫制御について、癌免疫療法への応用とその分子機序を中心に述べた。抗原提示細胞上の分子シャペロンの受容体がいくつか同定されたが、現在のところこれら受容体による取り込みと免疫応答にいたるまでの分子間の相互関係、例えばシャペロンと受容体は細胞内のどのコンパートメントで解離し、その後リサイクルされるのかあるいは分解へと回るのか、など未解明の課題が山積している。これらを一つひとつ明らかにすることが、癌の強固な牙城を崩す、免疫療法の確立につながるものと考えている。

文 献

- 1) Srivastava P: Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annual Rev Immunol* 2002; **20**: 395-425.
- 2) Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al.: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; **6**: 435-442.
- 3) Kurotaki T, Tamura Y, Ueda G, et al.: Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. *J Immunol* 2007; **179**: 1803-1813.
- 4) Kunisawa J, Shastri N: Hsp90alpha chaperones large C-terminally extended proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway. *Immunity* 2006; **24**: 523-534.
- 5) Spee P, Subject J, Neeffjes J: Identification of novel peptide binding proteins in the endoplasmic reticulum: ERp72, calnexin, and grp170. *Biochemistry* 1999; **38**: 10559-10566.

I 癌免疫監視機構のエスケープ 機序としての HLA クラス I の 発現低下

札幌医科大学外科学第一講座 平田公一, 九富五郎, 奥谷浩一, 豊田宣彦
岩山祐司, 亀嶋秀和, 鶴間哲弘, 古畑智久
同 病理学第一講座 九富五郎, 鳥越俊彦, 奥谷浩一, 佐藤昇志

はじめに

癌として認識できる病変形成には, 細胞が長い時間をかけ遺伝子変異を積み重ね, かつ生体防御系としての特異的あるいは非特異的な免疫機構の認知から逃れ(escape mechanism: エスケープ機構)での増殖が必要条件となる. エスケープ機構については種々報告されるに至っているが, 免疫系では排除のできない細胞が選択的に増殖している可能性も否定しえない. しかし, あくまでも癌細胞が一個人において異物として存在しているということであるならば, 免疫機構から常に監視されていると考えねばならず, したがって免疫原性の強弱を含め癌細胞の特性がその存在の可否を決定している一つの要因といえる.

癌細胞をこのような視点から捉えると, 程度の差こそあれ, 免疫学的排除機構を利用した治療に期待がもたれる. そこで, より有用性を高める細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T-lymphocyte: CTL) の刺激方法と抗原性の高い認識システムの確立が治療の視点から望まれる. さらに癌細胞が有するエスケープ機構の特徴を把握する一環として, 抗原認識機構における genetic あるいは epigenetic な分子機構変化を解明することが要求されている(表 1). 以前より, Human Lymphocyte Antigen: HLA クラス I の発現

表 1 癌細胞のエスケープ機構の成因

成 因	可逆性	治療法
I. Genetic 遺伝子 (HLO)	非可逆的	遺伝子治療
II. Epigenetic DNA メチル化 ヒストン脱アセチル化 (siRNA/miRNA)	可逆的	反応阻害薬

低下あるいは消失した癌細胞の存在は把握されていたが¹⁻³⁾, 札幌医科大学病理学第一講座でヒトの HLA クラス I のすべてのアレルの解析を包含できるモノクローナル抗体を作成しえた⁴⁾ことから, この領域の分析が一挙に進んでいる. 今日, 臨床応用へ期待が持たれる多くの固型癌の抗原分子が急速に明らかにされ, 数多くの臨床試験が行われている. 中でも癌ワクチン療法については, 人工的に抗原分子を造り出すことが可能となっている今日, HLA クラス I の細胞膜上での表出とその機能の発揮が, 最新の実践的な癌ワクチン療法の成績向上に期待が寄せられている.

癌ペプチド抗原作用機構の基本的概念

T 細胞はその機能の種別などによって分類され, 中でもヒト癌細胞が作成する癌抗原を認識するリセプターを有する T 細胞は CTL と総称

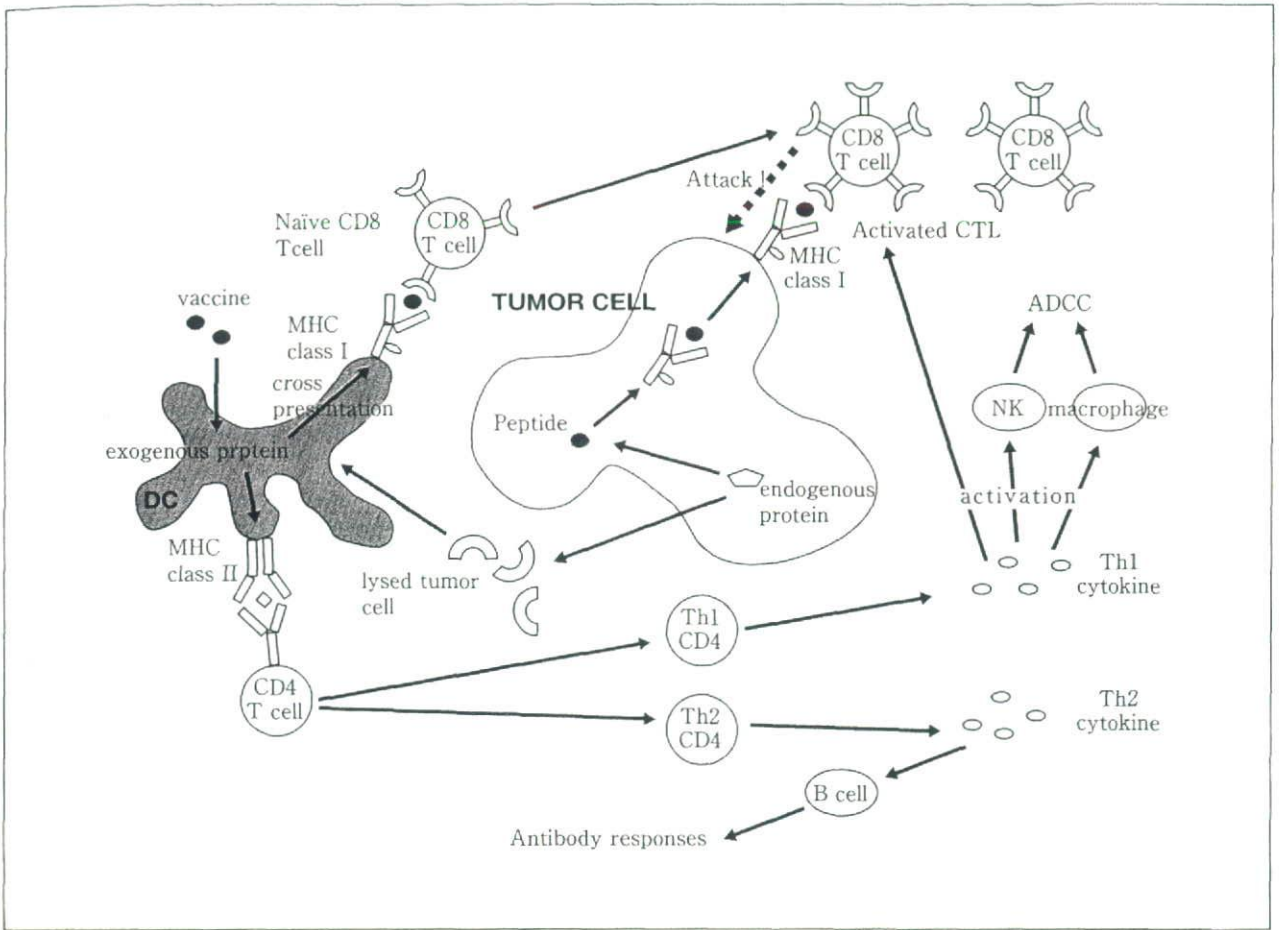


図1 腫瘍免疫機構の概要

され、CD8 陽性 T 細胞として今日では捉えられている。ヘルパー T 細胞である CD4 陽性 T 細胞が産生するサイトカインなどの刺激によってその機能が発揮される(図1)。CD8 陽性 T 細胞は HLA クラス I 拘束性に、CD4 陽性 T 細胞はクラス II 拘束性に癌抗原を認識する(図1)。癌抗原の存在については、癌細胞が一定の配列の蛋白あるいはミスフォールディングにて誤った配列の蛋白を過剰に産生することとなり、その蛋白がプロテオソーム内でペプチドレベル(アミノ酸数として8~10個)に分解され、そのペプチドが小胞体に輸送され、そこでHLA クラス I と複合体を形成し、細胞表面上に出示する(図2)。このように癌細胞膜表面上の HLA クラス I 上はペプチド(癌抗原)が占拠している状態となっており、それを CD8 陽性細胞が認

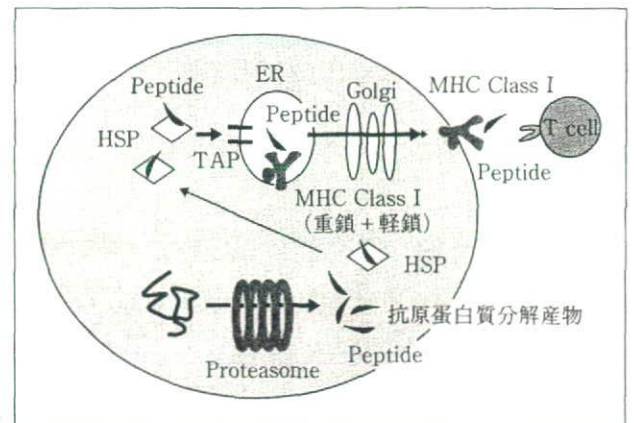


図2 MHC クラス I 抗原提示経路

識する。また HLA クラス II にも、結合に重要な役割を果たす部位が決まっており、一定のアミノ酸とが結合性を有することが知られており、この特性が免疫療法を成立させる基本の一つとなっている。

本項では HLA クラス I について概説するものである。

癌抗原認識からのエスケープ機構

そもそも癌細胞は、個体の有する自然および特異的免疫機構の監視機構から逃れて生育しているものとして捉えることもできる。この監視機構から逃れる機序については多くの事象が確認されており、エスケープ機序の解明とそこからの排除のための方策についての研究が盛んに行われてきた。エスケープ機構には「腫瘍側の因子」と「T 細胞側の因子」に分類され(表 2)、各種機序について詳細に報告されている⁵⁻⁷⁾。担癌生体でこれらの現象のすべてが存在するのではなく、その種類や程度は様々である。このための克服策は、癌ワクチン療法実施上、避けて通れぬ重要な課題である。個々の癌ワクチン療法を実施する中で、*in vivo*、*in vitro* でのエスケープ機構の詳細な分析が、治療成績向上のための大切な基礎と考えられる。近年、癌細胞クロマチン(図 3A)においては、紹介する過剰な DNA メチル化(図 3B)あるいはヒストン脱アセチル化(図 3C)によって、ヒストンの N 末端は

表 2 腫瘍免疫エスケープ機構

A. 腫瘍側の因子

MHC 重鎖欠失
 β_2 ミクログロブリン欠失
 抗原分子の欠失
 TAP 欠失
 LMP 欠失
 Fas リガンド発現
 免疫制御分子(TGF β などの)放出

B. CTL 側の因子

T 細胞受容体シグナル伝達異常
 Th1/Th2 バランスの喪失
 T 細胞欠失
 キラー細胞抑制受容体の発現
 Treg による T 細胞制御

陽性荷電となり陰性荷電の DNA と結合して転写が抑えられる。その後、MBP はヒストンメチル化酵素と結合し、N 末端はメチル化し(図 3D)、その部分を認識するヘテロクロスチン蛋白(HPI)が結合し(図 3E)、HPI 同士が重合することによりその領域は凝縮する(図 3F)。増殖抑制遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の発現のための転写抑制を生じ、このことが癌のエスケープ機序の一つとして関与していることが明らかとなっている^{8,9)}。本項では HLA クラス I 発

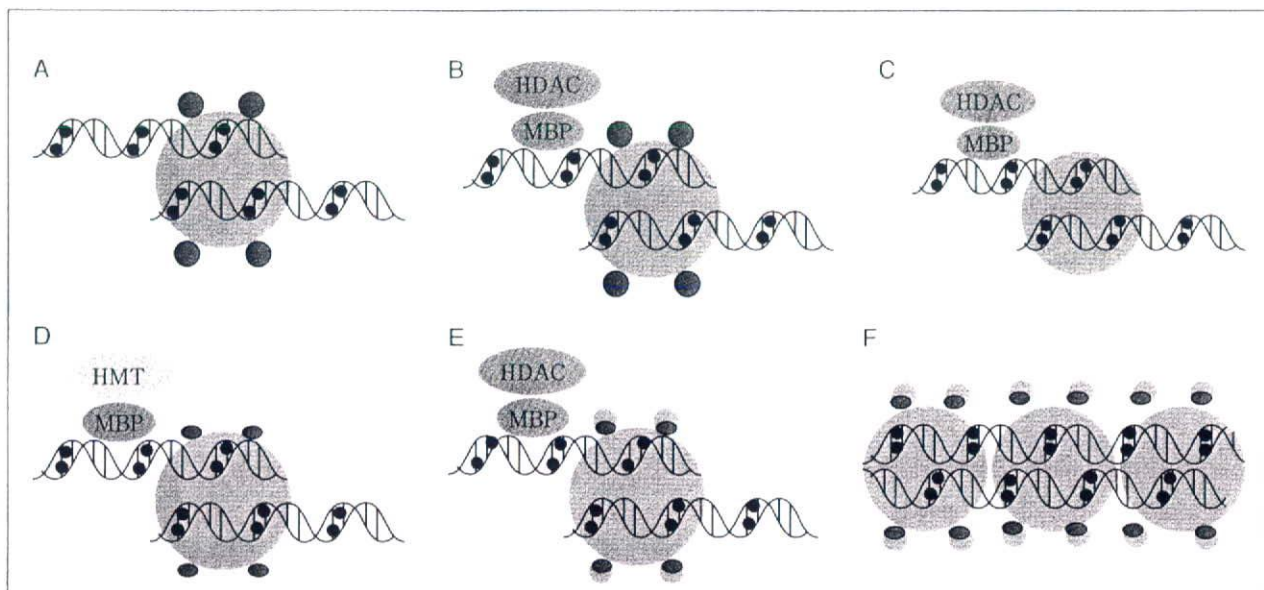


図 3 DNA メチル化とクロマチン構造の変化

現低下に関する最近のエピジェネティクスに関する知見を紹介するものである。

エピジェネティクスによる遺伝子発現抑制機序とは

遺伝子発現抑制を生じる機序についてはジェネティック、エピジェネティックなそれに大別される。近年後者の機序、すなわち遺伝子の欠失や変異を伴わないが癌抑制遺伝子発現が失われる現象のあることが知られており、それが可逆的な変化であることから発現回復を望むことができるため、その制御による治療への応用に期待が寄せられている。エピジェネティックな変化として注目されている現象の代表的なものとしてヒストン脱アセチル化現象が挙げられる。その概要(図3)をより詳細に解説する形で以下に説明する。

遺伝子のプロモーター領域にシトシン・グアニン配列(CpG配列)の豊富なDNA配列として特徴づけられるCpGアイランドが存在する。そのシトシンがDNAメチル化酵素(DNA methyltransferase: DNMT)によってメチル化を生じ(図4)、メチル化シトシンとなる。ここに

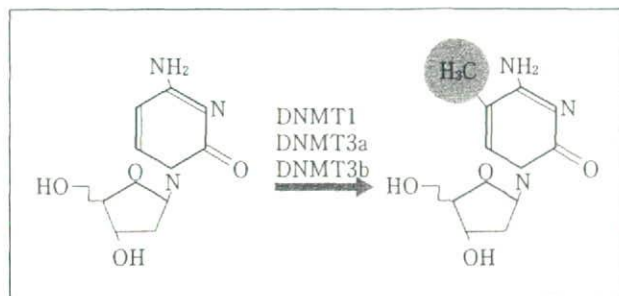


図4 DNAメチル化部位

methyl-CpG-binding protein (MBP)が結合し(図5A)、さらにこのMBPにヒストン脱アセチル化酵素(histone acetylase: HDAC)が結合する(ヒストン脱アセチル化現象、図5B)。脱アセチル化により電化(イオン化)を伴っていたヒストンテールの喪失からクロマチンが凝集することとなる。その結果、このプロモーター領域に転写因子のアクセスが失われ遺伝子発現が抑制される(図6)。このプロセスが代表的なヒストン脱アセチル化によるエピジェネティクス遺伝子発現抑制機序である。この機序がHLAクラスI発現に作用しているとするならば、免疫エスケープ機序の一つとなることから、そのエピジェネティクス変化の修飾化により、エスケープ機

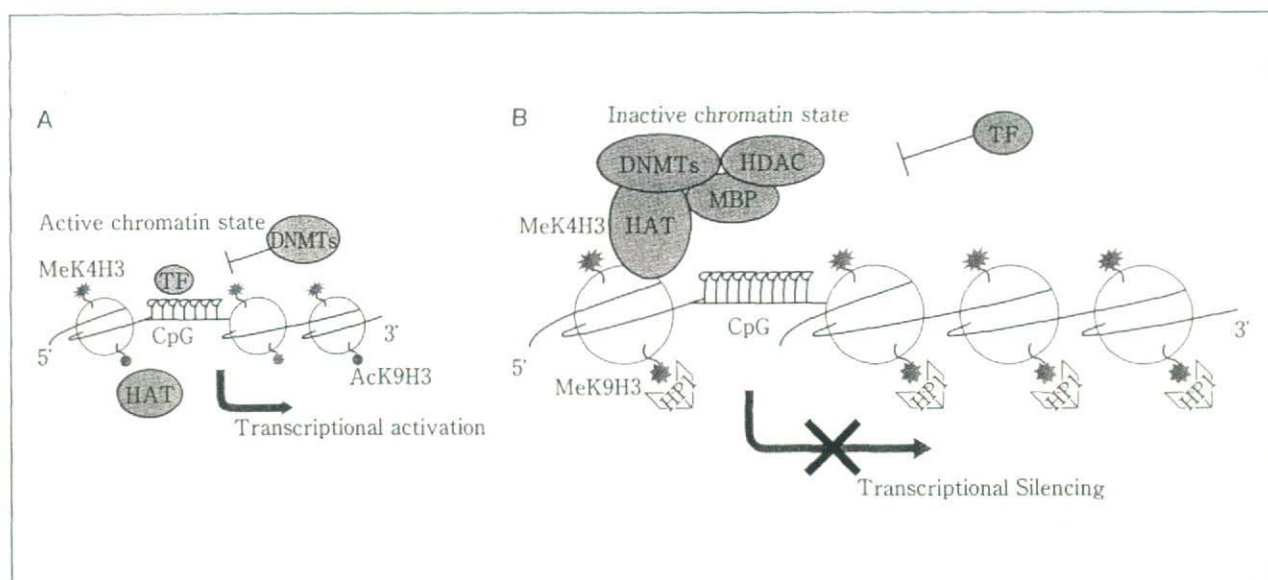


図5 遺伝子転写制御系のepigenetic変化—activationとsilencing—