

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

活性型変異K-rasによって提示が誘導されるCTLエピトープの解析研究

分担研究者 藤田 貢

愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 客員研究員

研究要旨 HLA-A\*24:02を導入したK562細胞の刺激により誘導・樹立したCTLクローン16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)由来の12merペプチドを認識する。CTLクローン16F3は、K562細胞のほかいくつかの膵がん細胞株も認識するが、正常細胞は認識しない。一方、標的抗原のPSAはユビキタス蛋白であり、がん細胞にも正常細胞にも同程度発現している。このことから、本エピトープの生成にはがん細胞固有の抗原処理機構が関与していることが示唆され、詳細な検討の結果、膵がん細胞などで恒常的に亢進しているオートファジーに依存していることがこれまでの研究であきらかとなった。本年度は、正常細胞に異なる手段でオートファジーを誘導し、どのような条件が本エピトープの生成に必要なか検討を行った。すなわち、飢餓状態で培養、ラパマイシン処理、活性型変異K-ras (G12V)導入の3種の方法で、正常細胞にオートファジーを誘導したところ、変異K-ras導入においてのみこのエピトープの提示が認められた。変異K-rasは、膵がん、大腸がん、肺がん他、多種のがんで認められており、発がんの初期に発生している遺伝子変異と考えられている。今回、変異K-ras導入によってオートファジーが誘導され、正常細胞表面には存在しないCTLエピトープが新たに提示されることが示された。この事実は、変異K-rasが発生した時点で細胞の蛋白代謝経路に変化が生じ、その結果ユビキタス蛋白の一部ががん特異的CTLの標的になっている可能性を示している。がん特異的免疫を考察する上で、新たな視点を提示した研究結果と考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、HLAを表面に発現していないK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞）にHLA-A\*24:02、CD86および4-1BBLを導入し、このaAPCを使用してHLA-A\*24:02拘束性にK562細胞および膵がん細胞株を認識するCTLクローン16F3を樹立している。16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase

(PSA)由来の12merペプチドを認識する。CTLクローン16F3は、K562細胞のほか、いくつかの膵がん細胞株も認識するが、正常細胞は認識しない。標的抗原のPSAはがん細胞および正常細胞に同程度発現しており、本エピトープの生成にはがん細胞固有のオートファジーが、抗原処理機構に関与していることが示されている。本年度は、正常

細胞に異なる手段でオートファジーを誘導し、どのような条件が本エピトープの生成に必要なか検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) CTLの誘導と標的遺伝子の同定：

HLAを表面に全く発現していないK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞）に、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A\*24:02、CD86及び4-1BBLを導入した。HLA-A24陽性成人のナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞をaAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。限界希釈培養法にてCTLクローンを複数得た。HLA-A24あるいはHLA-A2を導入したK562細胞、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞、および膵がん細胞株への反応性をIFN $\gamma$ キャッチ法にて測定した。K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を発現するHEK293T細胞にcDNAライブラリーのプラスミッドを導入し、CTLと24時間培養した。上清中にCTLから分泌されたIFN $\gamma$ をELISA法により測定した。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いてエピトープを同定した。

### 2) オートファジーの誘導とCTLエピトープ生成の検討：

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aに拘束分子のHLA-A\*24:02を導入後、以下の3通りの方法でオートファジーを誘導した。飢餓培養法；アミノ酸およびグルコースを培養液から除去するためにハンクス緩衝液中で数時間培養した。mTOR阻害法；mTOR阻害剤であるラパマイシンを培養液中に一定期間添加した。活性型K-ras導入法；活性型変異(G12V)を有するK-rasのcDNAを、レトロウイルスベクターを用いてMCF10A細胞に導入した。K-ras蛋白質の発現の確認はウエスタンブロットング法で行った。オートファジー誘導の確認は、LC3に対する免疫染色法およびウエスタンブロットング法で行っ

た。CTLエピトープ生成の判定は、オートファジー誘導後のHLA-A\*24:02導入MCF10A細胞と16F3クローンを混合培養し、ELISA法で測定した上清中のIFN $\gamma$ を指標にした。

本研究計画はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（厚生労働省）を遵守して作成され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会および組換えDNA研究審査委員会の承認を受けた後、実施した。

## C. 研究結果

### 1) CTLの誘導と標的遺伝子の同定：

CTLクローン16F3は、HLA-A24拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞は認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、16F3クローンは複数の膵がん細胞を認識した。16F3クローンは puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエントを認識していた。このスプライスバリエントは、PSA遺伝子の5'側12個のエクソンとその直下のイントロンから構成されており、イントロン内にあるpoly-A付加シグナルによりmRNAが生成されていると考えられた。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いた検討により、PSA上の12merペプチドがエピトープであった。

### 2) オートファジーの誘導とCTLエピトープ生成の検討：

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aを飢餓培養法、mTOR阻害法および活性型K-ras導入法の3通りの方法で処理したところ、いずれの方法においても、細胞内に抗LC3抗体によってドット状に染色されるオートファゴソームの形成を確認できた。オートファジー誘導後のHLA-A\*24:02導入MCF10A細胞と16F3クローンを混合培養したところ、活

性型K-ras導入法を用いた場合のみ上清中にIFN $\gamma$ の分泌を認めた。すなわち、飢餓培養法およびmTOR阻害法で誘導されるオートファジーでは、エピトープの産生がみられず、活性型K-ras導入法を用いたオートファジーにおいてのみエピトープの産生がみられた。

#### D. 考察

16F3クローンは、ユビキタスな発現をするPSA蛋白由来のエピトープを標的とし、膵がん細胞などを傷害する。飢餓培養法およびmTOR阻害法で誘導されるオートファジーでは同エピトープの生成がみられず、活性型K-ras導入法を用いたオートファジーにおいてのみエピトープの産生がみられたことは、活性型K-rasによって細胞内に生じたオートファジー以外の変化が、本CTLエピトープ生成に必要であることが示された結果と考えられる。

#### E. 結論

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aに活性型変異K-rasを導入すると、恒常的なオートファジーが誘導されるとともに、ユビキタスな発現をするPSA蛋白からHLA-A\*24:02拘束性のCTLエピトープが生成されることを示した。活性型変異K-rasを導入したMCF10A細胞および同変異を有する膵がん細胞はオートファジー依存的な増殖能を獲得することが報告されている。がん細胞増殖の維持に必要な代謝経路から、正常細胞表面には無いCTLエピトープが生成されていることは、がん特異的CTLの概念の幅を広げるものであると考えられた。また、本結果はオートファゴソームを免疫原とする新しいがんワクチンの開発の契機となる知見と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nishio N, Fujita M, Tanaka Y, Maki H, Zhang R, Hirosawa T, Demachi-Okamura A, Uemura Y, Taguchi O, Takahashi Y, Kojima S, Kuzushima K. Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunother.* 35(8):598-606, 2012
- 2) Kohanbash G, Ishikawa E, Fujita M, Ikeura M, McKaveney K, Zhu J, Sakaki M, Sarkar S, Okada H. Differential activity of interferon- $\alpha$ 8 promoter is regulated by Oct-1 and a SNP that dictates prognosis of glioma. *Oncimmunology.* 1(4):487-492, 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) 西尾信博、藤田 貢、田中義正、牧 寛之、張エイ、岡村文子、植村靖史、田口修、高橋義行、小島勢二、葛島清隆 . Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human gamma-delta T cells : 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、金沢市、2012年8月
- 2) 植村靖史、峰野純一、池田裕明、劉 天懿、牧 寛之、近藤紳司、張エイ、岡村文子、藤田 貢、赤塚美樹、園田精昭、珠玖 洋、葛島清隆 . 腫瘍抗原特異的TCR遺伝子導入NKT細胞を用いたがん免疫療法の可能性 : 第71回日本癌学会学術総会、札幌市、2012年9月
- 3) 藤田 貢、張エイ、中田 晋、葛島清隆 . Cox-2阻害による肺がん脳転移の抑制とその免疫学的メカニズム : 第71回日本癌学会学術総会、札幌市、2012年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし