

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

HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定

分担研究者 岡村 文子  
愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 研究員

研究要旨 様々な種類のがんに対して免疫療法を効果的に実施するためには、個々のがん種に発現している、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の標的抗原の同定が必要である。平成22年度には、RNA干渉法(siRNA)とsiRNAに抵抗性のHLA-A24を発現するレンチウイルスを用いて、HLAを改変した卵巣がん細胞株TOV21Gについて報告した。このHLA改変TOV21Gを抗原提示細胞として、HLA-A24陽性の成人末梢血ナイープCD8<sup>+</sup>T細胞を刺激し、HLA-A24拘束性にTOV21G細胞を傷害する複数のCTLクローンを樹立した。平成23年度はそのうち一つのCTLクローンが認識する抗原遺伝子として*claudin-1*を同定した。本年度は、もう一つのCTLクローンが認識する遺伝子として*RNA binding motif protein 4*を同定した。

A. 研究目的

担がん患者のリンパ球を自己のがん細胞株で刺激することで得られる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、CTL標的抗原の同定に必須である。このため、細胞株を樹立しにくいタイプのがんではCTL標的抗原の同定が遅れている。他の患者から樹立されたがん細胞株を抗原提示細胞として使用すると、一致していないHLAに対する強いアロ反応がCTLの誘導を阻害する。

我々は、アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞(aAPC)システムの構築を試みている。平成22年度は、siRNAによる細胞本来のHLAの発現を抑制し、そのsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A\*24:02 cDNAをレンチウイルスベクターによって導入する方法を開発し、本方法の有用性を卵巣がん細胞株TOV21Gで検討した。平成23年度は、このHLA改変TOV21G細胞

を用いて誘導したHLA-A24拘束性CTLクローンD2の認識する抗原遺伝子として*claudin-1*を、そのエピトープ部位のアミノ酸配列RYEFGQALFを決定した。本年度は、もう一つのCTLクローンが認識する遺伝子を同定したので報告する。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製:

HLA class-I遺伝子のエクソン部位の中で、HLA-A座、B座およびC座に共通な配列部位に結合する3種のsiRNAを作製した。この内、2種は既に報告されている配列を使用した(Transplant Proc 2007, Molecular therapy 2005)。1種は、我々で独自に同定した配列を用いた。

上記3種のsiRNA結合部位のコドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNAを、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A24陰性の卵巣が

ん明細胞株TOV21Gに導入した。CTLの誘導を助けるためにCD86分子もレンチウイルスベクターで導入した。細胞表面のHLAおよびCD86分子の発現は蛍光色素ラベル抗体で染色後、フローサイトメーターで解析した。

#### 2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導：

コドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNAとCD86分子をレンチウイルスベクターで導入したTOV21G細胞に、内在HLAの発現を抑制する3個siRNAを一過性にトランスフェクションしてaAPCを作製した。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。TOV21G細胞、コドン変換していないHLA-A\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞への反応性をIFN $\gamma$ キャッチ法にて測定した。

CTLクローンは限界希釈培養法にて樹立した。クローンの傷害性および特異性の判定は、TOV21G細胞およびHLA-A24導入TOV21G細胞に加え他の卵巣がん細胞株、HLA-A24陽性の線維芽細胞、EBウイルス感染リンパ芽球株(LCL)および正常気管支上皮から樹立された細胞株NHBEなどの正常細胞を標的としたクロム放出試験にて検討した。

#### 3) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

TOV21G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一過性に導入し、CTLと24時間培養した。CTLから分泌された上清中の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の同定を試みた。

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) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製：

TOV21G細胞にHLAクラスI分子に特異的な3種のsiRNAを導入すると、3から5日後には、表面のHLAクラスI分子の発現はほぼ完全に消失した。siRNA結合部位のコドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞に、3種のsiRNAを導入すると、HLA-A24分子の発現は低下することなく、むしろ増強した。

#### 2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導：

コドンを変換したHLA-A\*24:02及びCD86を導入したTOV21G細胞を用いて刺激したCD8<sup>+</sup>T細胞株は、野生型HLA-A\*24:02を導入したTOV21G細胞に対してIFN- $\gamma$ を産生したが、元のTOV21G細胞、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLに対してはIFN- $\gamma$ を産生しなかった。このCD8<sup>+</sup>T細胞株を限界希釈培養し、複数のCTLクローンを樹立した。この内クローンG3は、HLA-A\*2402導入TOV21G細胞を傷害したが、HLA-A24陽性の線維芽細胞、LCLおよびNHBEは傷害しなかった。

#### 3) CTLクローンG3が認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

クローンG3は*RNA binding motif protein 4*がコードする遺伝子産物を認識していた。5'および3'側から短縮したcDNA発現プラスミッドと合成ペプチドを用いた検討により、CTLエピトープの領域をアミノ酸としてAVRTPYTMSY(196-205番目)まで絞り込んだ。

#### D. 考察

今回同定したCTLクローンG3が認識する抗原遺伝子*RNA binding motif protein 4*は正常細胞にも発現している。今回、HLA-A24を保有する成人のナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞に、*RNA binding motif protein 4*を認識するCTLの前駆細胞が含まれていることが明らかとなった。このことから、今回同定したエpiteープに対するT細胞応答が、卵巣がん患者においても惹起されている可能性が示唆された。

#### E. 結論

siRNAとsiRNAに抵抗性のHLA-A24:02を導入した細胞を用いて、HLA-A24拘束性に卵巣がんを傷害するCTLクローンを樹立した。TOV21G細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製し、CTLクローンG3が認識する抗原遺伝子*RNA binding motif protein 4*を同定した。これらの情報は、卵巣がんに対する免疫応答を考察する基盤となると考えられる。また、今回用いたsiRNAによるHLA改変法は、他のがん細胞株にも応用可能であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. *PLoS One*. 7(10):e47126, 2012.
- 2) Nishio N, Fujita M, Tanaka Y, Maki H, Zhang R, Hirose 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.

- 3) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirose T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens* 80(2): 119-125, 2012.
2. 学会発表
  - 1) 葛島清隆、岡村文子 . HLAを改変したがん細胞株で誘導したCTLの標的抗原の解析：第16回日本がん免疫学会総会、札幌市、2012年7月
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) Zhang R, Liu Tianyi, Suzuki M, Hirose N, Kaneko S, Okamura A, Sakamoto Y, Kuzushima K, Uemura Y. Regulation of IL-27/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells: 第41回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし