

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

免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定

分担研究者 葛島 清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

研究要旨 がん細胞を選択的に認識する細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)の樹立とその標的抗原の同定は細胞性免疫療法の基盤である。本年度は、HLA-A*24:02陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞を、HLA-A*24:02を導入したK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞株）で刺激し、CTL株を樹立した後に限界希釈法にてCTLクローンD12を得た。D12は、大腸がん細胞株PMF-ko14およびOUMS-23をHLA-A*24:02拘束性に認識したが、線維芽細胞などの正常細胞には反応しなかった。K562細胞のmRNAから構築したcDNAライブラリーを用いた発現スクリーニング法により、D12の認識する抗原としてHSP90βを同定した。短縮した遺伝子や合成ペプチドを用いて、HLA-A*24:02分子によってD12に提示されるエピトープの最短の配列を決定した。HSP90β蛋白が発現していてもCTLに認識されない細胞があることから、このCTLエピトープはがん細胞に特異的な経路でプロセスされ表面に提示されていることが考えられた。検討の結果、興味深いことにこのエピトープはtransporters associated with antigen processing(TAP)分子を介さない経路で提示されていることが判明した。すなわち、TAPの発現を抑制するsiRNAの導入等により、複数のがん細胞株においてD12の認識が増強された。がん患者の体内ではCTLの攻撃から逃れるために、がん細胞の表面HLAが低下することがある。この原因の一つが、TAP分子の発現低下である。TAPは、細胞質内でプロテアソームによって切断されたペプチドを小胞体へ輸送する役割を持っている。CTLの標的抗原として同定したHSP90βは、正常細胞にも蛋白発現がみられるが、今回同定したHLA-A*24:02拘束性のエピトープはTAP欠損状態においてのみCTLへ提示される。全ての正常細胞はTAPを有しており、細胞からTAPが失われるのは、がん細胞が免疫圧力から逃れて生き残った場合である。すなわち、本エピトープは、一部のがん細胞に選択的に提示されていると推論できるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。

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。我々は以前に、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

導入し人工抗原提示細胞(artificial antigen presenting cells, aAPC)を作製した。今年度は、このaAPCを使用して誘導したCTLクローンD12の認識する抗原について詳しい検討を行った。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製とCTLの誘導 :

HLAを表面に全く発現していないK562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。aAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。特異性はエリスポット法とIFN γ キャッチ法にて確認した。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定 :

K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を導入した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 γ 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。

3) D12の標的細胞認識の検討 :

大腸がん細胞、膵がん細胞、K562細胞、HLA-A24陽性の線維芽細胞や正常ヒト気管支上皮細胞、EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球などを抗原提示細胞として用いた。必要に応じて、拘束分子HLA-A*24:02あるいはコントロールとしてHLA-A*02:06を細胞に導入した。TAPの発現を抑制するためにTAP遺伝子に特異的なsiRNAを一過性に導入した細胞も準備した。TAP蛋白のペプチド輸送機能を抑制するために、ヒトサイトメガロウイルスUS6あるいは単純ヘルペスウイルスICP47遺伝子を導入した細胞株を作製した。抗原提示細胞とD12を共培養した上清中に分泌されたIFN γ をELISA法にて測定した。

本研究計画は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 :

HLA-A*24:02、CD86及び4-1BBLを導入したK562細胞は長期間にわたりこれらの蛋白を発現していた。HLA-A*24:02拘束性にK562を認識するT細胞株から、限界希釈培養法にてCTLクローンD12を得た。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定 :

CTLクローンD12が認識する遺伝子としてHSP90AB1(HSP90 β)を同定した。短縮した遺伝子を導入したHEK293T細胞に対する反応に引き続いて、合成ペプチドを用いた検討からアミノ酸9個のエピトープを同定した。

3) D12の標的細胞認識の検討 :

CTLクローンD12は、HLA-A*24:02拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞、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。EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球も認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、HLA-A*24:02を導入した大腸がん細胞株OUMS23とPMF-ko14のみを認識した。興味深いことに、D12はsiRNA、US6あるいはICP47でTAP機能を抑制した膵がん細胞株MiaPacaとKP-3、および同様の処理をした大腸がん細胞株HCC-56を認識した。

D. 考察

CTLクローンD12は、様々ながんで高発現していることが知られているHSP90 β 由来のエピトープを標的とする。HSP90 β は、正常細胞にも蛋白発現がみられるが、今回同定したHLA-A*24:02拘束性のエピトープはTAP欠損状態においてのみCTLへ提示される。この一見逆説的な現象は以下のように説明できる。細胞内で産生するHLA結合ペプチドの多くは、TAPによって小胞体へ輸送される。一方、特殊な構造のために、

TAPを介さずに小胞体に輸送されるペプチドも少数ながら存在しており（今回同定したエピトープペプチドが相当する）、競合的に劣勢であるために、HLAに結合することができないと考えられる。がん細胞においてTAPの発現が低下すると、TAPに依存しないペプチドが選択的に小胞体内に侵入できるため、HLAに結合できるようになり、CTLに提示される。

正常細胞はTAPを有しており、細胞からTAPが失われるのは、がん細胞が免疫圧力から逃れて生き残った場合のみと考えられる。すなわち、本エピトープは正常細胞表面では提示されず、免疫逃避した後のがん細胞で選択的に提示されていると推論できるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。今後は、なぜこのCTLエピトープがTAPに非依存的なのかその構造上の理由を明らかにするとともに、HLA-A*24:02/HSP90βペプチド複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、正常組織およびがん組織を免疫染色することで本複合体の分布を検討する予定である。

E. 結論

TAPの欠損または機能不全になった細胞表面のHLA-A*24:02分子によって提示される、HSP90βに由来するCTLエピトープをcDNA発現クローニング法によって同定した。本エピトープは、免疫逃避した後のがん細胞に選択的に提示されていると推察されるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y,

Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther.* in press.

2) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7(1):3, 2014.

3) Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirose T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. *Hum Immunol.* 74(9):1103-1110, 2013.

4) Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood.* 121(24):4894-4901, 2013.

5) Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Inoue H, Yasukawa M. Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer

- functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific T-cell receptor. *PLoS One*. 8(2):e56820, 2013
- 6) Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kuzushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Nakayama E.: Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int J Cancer*. 132(2):345-354. 2013.
2. 学会発表
- 1) 岡本幸子、天石泰典、池田裕明、藤原弘、葛島清隆、安川正貴、珠玖 洋、峰野純一．高親和性NY-ESO-1特異的TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 2) 朝井洋晶、藤原 弘、越智史博、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、北澤莊平、赤塚美樹、珠玖 洋、安川正貴．経静脈的に輸注されたWT1特異的人工CTLは腎糸球体たこ足細胞を傷害しない：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 3) 赤塚美樹、赤堀 泰、稲熊容子、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、葛島清隆、恵美宣彦．HLA-A2拘束性に提示されたマイナー抗原HA-1Hを認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 4) 越智史博、藤原 弘、谷本一史、宮崎幸大、朝井洋晶、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、石井榮一、安川正貴．抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 5) Okamoto S, Iwase N, Amaishi Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J. EFFECTIVE AND SAFE TCR GENE THERAPY WITH SILENSING ENDOGENOUS TCRs AND HIGH AFFINITY TCR VARIANTS: 第19回日本遺伝子治療学会、岡山市、2013年7月
- 6) 岡村文子、葛島清隆．K-rasの活性化変異に伴うオートファジーによるCTLエピートープの産生：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 7) 赤塚美樹、田地浩史、森島泰雄、宮村耕一、小寺良尚、高橋利忠、木下朝博、葛島清隆、恵美宣彦．同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 8) 稲熊容子、赤塚美樹、赤堀 泰、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、葛島清隆、恵美宣彦．HLA-A2拘束性に提示されたマイナー抗原HA-1Hを認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 9) 藤原 弘、越智史博、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、神田輝、葛島清隆、珠玖 洋、安川正貴．抗体療法と細胞療法を組み合わせたハイブリッド型抗腫瘍免疫療法の開発研究：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 10) 藤原 弘、越智 史博、朝井 洋晶、岡本幸子、峰野 純一、葛島 清隆、珠玖 洋、安川 正貴．HLAクラスI拘束性白血病抗原特異的CD4陽性T細胞の抗白血病効果：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 11) 越智 史博、藤原 弘、谷本一史、朝井

- 洋晶、宮崎幸大、岡本 幸子、峰野 純一、葛島 清隆、珠玖 洋、安川 正貴．抗体依存性細胞傷害活性を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 12) 柴川 伸吾、垣見 和宏、磯辺 みどり、和田 尚、上中 明子、葛島 清隆、西川 博嘉、鶴殿 平一郎、岡 三喜男、中山 睿一．NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T細胞免疫応答の誘導：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 13) 赤塚 美樹、岡村 文子、山本 幸也、西村 泰治、高橋 利忠、葛島 清隆、恵美宣彦．HLA-A2に提示されたマイナー抗原HA-1認識抗体の開発と応用：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 14) 岡本 幸子、天石 泰典、池田 裕明、藤原 弘、葛島 清隆、安川 正貴、珠玖 洋、峰野 純一．高親和性TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 15) 宮原 慶裕、杉野 早穂子、王 立楠、葛島 清隆、藤田 知信、河上 裕、岡本 幸子、天石 泰典、峰野 純一、珠玖 洋．HLA-A0201拘束性NY-ESO-1由来ペプチド (p157-165) 特異的T細胞受容体はHLA-A0206陽性NY-ESO-1陽性腫瘍を認識する：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 16) 葛島 清隆．Artificial antigen presenting cells and basic research for advanced immunotherapy：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 17) 朝井洋晶、藤原 弘、宮崎幸大、越智史博、越智俊元、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、珠玖 洋、安川正貴．Preclinical evaluation for renal safety of WT1-targeting adoptive immunotherapy：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 18) 越智史博、藤原 弘、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、石井榮一、安川正貴．Artificial CD16 positive T cells successfully display in vivo anti-tumor effect through ADCC：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 19) 赤塚美樹、細川晃平、岡本晃直、片桐孝和、稲熊容子、岡村文子、葛島清隆、恵美宣彦、中尾眞二．Isolation of a HLA-B*40:02-restricted CTL to HPCs from a patient with aplastic anemia with 6pLOH：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 葛島清隆、伊藤嘉規、出町文子、赤塚美樹、森島泰雄、愛知県、株式会社医学生物学研究所．United States Patent No.US8481051B2: CYTOTOXIC T-CELL EPITOPE PEPTIDES THAT SPECIFICALLY ATTACK EPSTEIN-BARR VIRUS-INFECTED CELLS AND USES THEREOF. 2013年7月9日登録