

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23701079

研究課題名（和文）マスマスペクトロメトリーによる CTL エピトープの探索

研究課題名（英文） Identification of CTL epitope using mass spectrometer.

研究代表者

岡村 文子 (OKAMURA AYAKO)

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫学部・研究員

研究者番号：10546948

研究成果の概要（和文）：がんに対する免疫療法において細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を利用する治療では CTL ががんを認識する時の目印である細胞表面上の HLA+ペプチド複合体の情報が必要である。そこで、より広くエピトープの同定を行うことが可能なマスマスペクトロメトリーによる CTL エピトープの検討を行った。また腫瘍特異的な抗原提示装置の違いによる CTL エピトープの解析を行うために、抗原提示装置の異なる細胞を作製し、がん遺伝子である K-ras 遺伝子の活性型変異を有する細胞では高活性状態になったオートファゴソームによるエピトープの産生に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) exert anti-tumor effects through recognition of tumor antigen-derived peptides bound to human leukocyte antigens (HLAs) on cell surfaces. To identify diverse CTL epitopes of tumor antigens, mass spectrometry-based approach are examined. To investigate CTL epitope panel through tumor-specific antigen presenting machinery, MCF10A cells were transduced mutated K-ras gene. As a result, the gene-modified MCF10A cells had constitutively active autophagosomes and produced autophagosome-dependent epitopes. These data suggest that the cells having tumor-specific antigen presenting machinery provide us information on various CTL epitopes processed through the machinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫、細胞傷害性 T リンパ球

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス自家癌モデルにおいて腫瘍の拒絶反応が免疫応答によるものであることが証明されて以来、マウスの腫瘍抗原発見につき、ヒト悪性黒色腫において腫瘍抗原の発見により腫瘍免疫学研究は大きく発展し、癌に対する新規の治療法となりうる免疫療法の基礎的および臨床的研究が大きく前進した。免疫療法への応用に欠かせないのが腫瘍抗原

とエピトープの同定、およびそのエピトープを提示する特定の主要組織適合性抗原（MHC、ヒトでは HLA）型の同定である。細胞傷害性 T 細胞（CTL）の T 細胞リセプター及び CD8 分子は HLA 分子と腫瘍抗原因由来の 10 アミノ酸程度からなるエピトープペプチド複合体を認識する。HLA の種類によってエピトープペプチドと複合体を形成できる配列が異なるため、各 HLA 分子でエピトープペプチドは異

なる。そのため、HLA とエピトープペプチドのセットで同定する必要がある。

(2) 腫瘍細胞の表面に発現している HLA からエピトープペプチドを抽出して解析する生化学的方法は *in vitro* における HLA とペプチドの結合性は保証されるが、結合性と免疫原性が必ずしも相関しないため CTL のターゲットエピトープであるとは限らず、同定されたエピトープペプチドのスクリーニングをしなければならない。しかしながら最近のプロテオーム解析技術の革新によりマスマスプロメーターによる解析を行うことで容易にエピトープペプチド候補を探索でき、またその由来となる蛋白質をインターネットウェブ上でのソフトにより簡単に解析して同定できる利点がある。

(3) この手法は国外においては多くの学術論文が報告されているのに対して、日本国内においては学術論文が非常に少なく、世界レベルから大変遅れている。一方、HLA 分子は HLA-A だけで 60 種類程度と非常に多く存在するが、遺伝により例えば A アリルを 2 つ受け継ぐため、民族によりその分布は大きく異なる。そのため、日本人の 6 割が HLA-A24 を保有しているが、欧米では HLA-A24 の保有率は 10% 程度と低い。すなわち、日本人に多い HLA-A24 に結合するエピトープペプチドの探索は国外では行われておらず、また国内で同定されたエピトープペプチドは癌種のタイプ間における違いや正常を細かく反映した腫瘍抗原パネルやエピトープペプチドパネルが存在している訳ではなく、改良の必要性が高い。

(4) 抗原提示装置の違いによる CTL エピトープの差を調べた論文は少ない。特に腫瘍細胞においては、腫瘍特異的な変化によって抗原提示装置が異なることは知られている。一方で同じ細胞を元にして、特定の抗原提示装置の違いによって産生される CTL エピトープパネルを網羅的に調べた報告は少ない。がんに対する免疫療法を効果的に行うためには、腫瘍特異的な抗原提示装置の変化を調べて、それによる CTL エピトープの違いを知ることが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

より簡便に腫瘍抗原およびエピトープペプチドを同定するシステムを構築するために、生化学的手法によりマスマスプロメーターにより同定したペプチド配列の免疫原性を確認して価値のある腫瘍抗原およびエピトープペプチドパネルを作製することを目的とする。また、異なる抗原提示機構によ

って産生されるエピトープの検索を行うため、同じ細胞を元にして異なる抗原提示機構を持つ細胞を作製して、産生されるエピトープペプチドの比較を行う。

3. 研究の方法

(1) マスマスプロメーターによるエピトープペプチド解析のためのエピトープサンプルの生化学的調製

HLA-A24 分子を抽出してくる時に用いる抗 HLA-A24 抗体 (マウスモノクローナル抗体、IgG2b サブタイプ) を扱い易い様にプロテイン A 磁気ビーズと結合させる。その後、解離しないように試薬を用いて架橋した。架橋したプロテイン A 磁気ビーズ結合抗 HLA-A24 抗体が架橋しているかどうかを架橋前後のサンプルを蛋白質用電気泳動にて比較した。抗体のコントロールとして HLA-A24 のアイソタイプである抗マウス IgG2b 抗体も同様に作製して確認をした。

次にペプチドが分取できているかどうかを確認することが手法上できないため、HLA-A24 分子が本当にこの方法で得られるかどうかを確認するために、HLA-A24 を発現している腫瘍細胞 10^8 個 (1 μ g 相当の HLA-A24 があると考えられる) の溶解溶液とプロテイン A 磁気ビーズ結合抗 HLA-A24 抗体を反応させる。磁石で磁気ビーズとそれに結合している物質を分離して、洗浄を繰り返した後、電気泳動用にサンプルを調製した。このサンプルからウェスタンブロット法で抗 HLA 抗体を用いて、HLA-A24 を検出できるかどうか確認して、分離方法を検定した。

(2) マスマスプロメーター解析のための最適化

エピトープペプチド解析のためのマスマスプロメーターの条件を検討するために、コントロールであるウシ血清アルブミン (BSA) をトリプシンで消化したサンプルを用いて、nano-LC による分取後、マスマスプロメーターによる解析を行うことで、BSA 由来のペプチドをデータとしてどれくらい捕捉できるか検討した。

(3) 抗原提示装置の異なる腫瘍からのエピトープペプチド解析のための細胞作製

膀胱がん細胞において K-ras 変異体によるオートファジーの活性化によって提示される CTL エピトープが生成されていることを我々は見出している。世界的にみても腫瘍関連抗原でオートファジーが介在してエピトープ

を産生している報告はない。世界に先駆けて活性型変異 K-ras による高活性型オートファジー介在性 CTL エピトープを調べるために、同じ細胞を元にしてエピトープの産生を比較することを検討した。まずは活性型変異を有する K-ras 遺伝子を導入してオートファジーが高活性化するかどうかをオートファジーマーカーを指標とした免疫染色にて観察した。

4. 研究成果

(1) マススペクトロメトリーによるエピトープペプチド解析のためのエピトープサンプルの生化学的調製

プロテイン A 磁気ビーズを結合させた抗体の作製を行った。免疫療法への応用を視野に置いて、日本人の約 6 割の人が持っている HLA-A24 を対象として系を確立することとした。抗 HLA-A24 抗体とプロテイン A 磁気ビーズを結合させて解離しないように架橋剤を用いて架橋した。このプロテイン A 磁気ビーズ結合 HLA-A24 抗体が架橋しているかどうかを判定するために架橋前後のサンプルをタンパク質用電気泳動にて比較した。その結果架橋前サンプルで抗体の重鎖と軽鎖のバンドが検出され、架橋後にはその重鎖と軽鎖のバンドが消失していることが確認できた。すなわち、架橋によってプロテイン A 磁気ビーズと抗体が良く架橋されていた。これにより抗体を扱う際に、抗体と強く結合しているプロテイン A 磁気ビーズを磁石で操作することで回収できるようになった (図 1 参照)。

次にこのプロテイン A 磁気ビーズ結合抗 HLA-A24 抗体を用いて HLA-A24 を発現している腫瘍細胞の溶解液と反応させた。この反応により HLA-A24+エピトープペプチド複合体がプロテイン A 磁気ビーズ結合抗 HLA-A24 抗体と結合することが予想される。この溶液を磁石を用いて磁気ビーズとそれに結合している抗 HLA-A24 抗体を回収して、洗浄を繰り返し行って夾雑物を取り除いた。このサンプルはウェスタンブロッティング法のために調製した。このサンプルが本当に HLA-A24 を含んでいるかどうかを、抗 HLA クラス I 抗体を用いてウェスタンブロット法にて調べた。その結果 HLA クラス I のサイズのバンドが検出され、HLA-A24 とそれに提示されているエピトープペプチドを調製する系を確立することに成功した (図 2 参照)。

腫瘍細胞からのエピトープペプチド精製 1

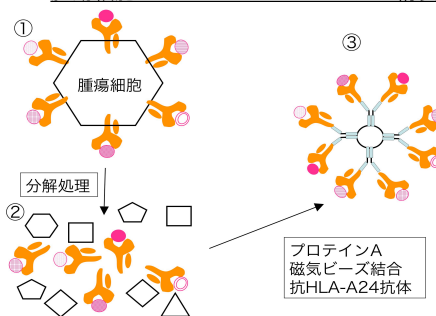


図 1 ペプチドの回収 (前半)

腫瘍細胞からのエピトープペプチド精製 2

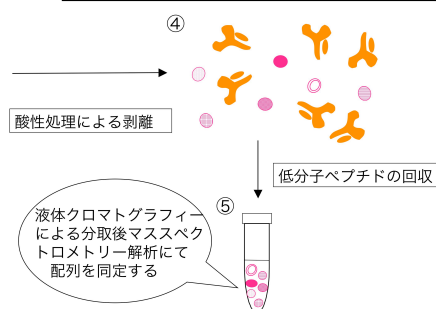


図 2 ペプチドの回収 (後半)

(2) マススペクトロメトリー解析のための最適化

まず、コントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA) をトリプシンで消化したサンプルを用いて、nano-LC による分取した。この際に分離用バッファーの組成などを変えて様々な条件で行った。その後マススペクトロメーターによる解析を行ったところ、BSA 由来のペプチドを 40-50%程度捕捉することができた。これは使用したマススペクトロメーターの規格上成功したと考えられた。しかしながら、マススペクトロメーター測定後の解析時において、本サンプルは未消化な状態であるため、解析条件の検討が必要であることが判明した。BSA サンプルはトリプシン消化サンプルであり、解析時にもトリプシン消化サンプルとして処理されて結果が得られる。しかし同じ BSA サンプル測定結果をトリプシン消化という条件をはずして解析すると、解析結果が大幅に異なった。すなわち、マススペクトロメーターを用いる場合、その後の解析においてこういったサンプルなのかという条件を加えることでより正確な結果を導きだせるシステムである。一方、我々のサンプルは酵素処理は一切行っていない

ため、このような解析をより効果的に行うための条件付けができない。また本サンプルは8アミノ酸から12アミノ酸程度と想定され、このように短いペプチドを酵素で消化してしまうと結果がアミノ酸断片としてしか測定できない可能性が推測された。一連の検討から、解析条件のさらなる検討が必要であることが示された。

(3) 抗原提示装置の異なる腫瘍からのエピトープペプチド解析のための細胞作製

我々は膵がん細胞において活性型変異を有するK-ras遺伝子によるオートファジーの高活性化によって新たなCTLエピトープがユビキタスな発現パターンを示す抗原から産生されることを明らかにした。

複数のオートファジー阻害剤を作用させたところ、CTLエピトープの産生が阻害された。また複数のオートファジー関連遺伝子をRNA干渉法によって発現抑制をしたところ、その細胞におけるCTLエピトープの産生が低下した。このことから、このCTLエピトープの産生はオートファジー依存性であることがわかった。このCTLエピトープをよく産生している膵がん細胞を調べたところ、オートファジーが異常に高活性であることがわかった。しかしながら、薬剤処理によってオートファジーを誘導しても、CTLエピトープは産生されてこなかった。膵がんではがん遺伝子であるK-rasが変異して常に活性化シグナルを伝達していることがよく知られている。またK-ras変異を有するがん細胞ではオートファジーが異常に高活性であることが知られている。そこでK-ras遺伝子の変異の有無とオートファジーの状態をオートファジーマーカーであるLC3を指標とした免疫染色によってを検討したところ、K-ras遺伝子が有る細胞ではオートファジーが異常に高活性状態にあることがわかった。次に、K-ras遺伝子の変異の有無およびオートファジーの状態とCTLエピトープの産生を調べた所、K-ras遺伝子の変異があつてオートファジーが亢進している細胞ではCTLエピトープが産生されていた。

これらの結果は抗原の発現パターンは腫瘍非特異的な抗原であっても、抗原提示装置が腫瘍特異的な場合、産生されるエピトープは腫瘍抗原様である可能性を示している。そこで同じ細胞を元にしてK-ras変異の有無に

よるCTLエピトープ産生の違いを検討するための細胞を作製した。

まずは、変異を有するK-ras遺伝子を導入することでオートファジーが活性化することがすでに知られている乳腺由来正常細胞であるMCF10AにK-ras変異遺伝子を導入した。K-rasの導入によりrasタンパク質の発現が増強されていることをウェスタンブロット法にて確認した。さらに、オートファジーの状態をオートファジーマーカーであるLC3に対する免疫染色で確認したところ、図3に示す通り、K-ras変異遺伝子導入細胞においては強い赤いシグナルが観察され、オートファジーが亢進されて、高活性化状態であることがわかった。これらの細胞のCTLエピトープ産生を特異的CTLの反応によって調べたところ、K-ras変異遺伝子導入細胞でCTL応答が増強されていたことから、エピトープの産生が増加していることが明らかとなった。以上のことから、コントロール遺伝子導入細胞とK-ras変異遺伝子導入細胞からそれぞれエピトープペプチド解析用のサンプルを調製して、マスマスペクトロメーターにて測定後、比較して解析することでがん遺伝子であるK-rasの変異によって誘導されたオートファジーという抗原提示装置によって新たに産生されるCTLエピトープの解析に有用であることが考えられた。

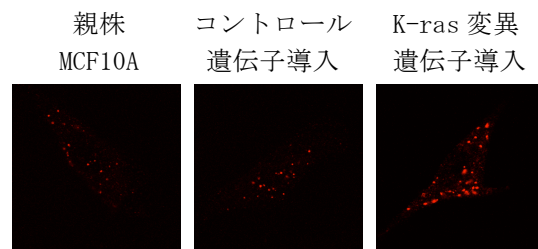


図3 オートファジーマーカーの免疫染色

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. PLoS ONE 査読有 7, 2012, e47126
doi:10.1371/journal.pone.0047126.

[学会発表] (計5件)

①岡村文子、人工抗原提示細胞システムを利用した新規腫瘍抗原探索、第 34 回日本造血細胞移植学会総会、2012 年 2 月 24 日、大阪、大阪国際会議場

②近藤紳司、内在性 HLA の発現を抑制し目的の HLA-A24 を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣がんを障害する CTL の誘導、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋、名古屋国際会議場

③岡村文子、膵がん細胞における恒常的高活性オートファジーによる CTL エピトープの産生、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋、名古屋国際会議場

④葛島清隆、Artificial antigen presenting cells as tools for defining cancer-specific antigens、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋、名古屋国際会議場

⑤近藤紳司、内在性 HLA の発現を抑制し目的の HLA-A24 を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣がんを障害する CTL の誘導、第 15 回日本がん免疫学会総会、2011 年 7 月 1 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 文子 (OKAMURA AYAKO)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍免疫学

部・研究員

研究者番号：10546948