

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659727

研究課題名(和文) 卵巣癌細胞株を用いた人工抗原提示細胞による新規腫瘍抗原の同定

研究課題名(英文) An attempt to identify new antigens recognized by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using a HLA-modified ovarian cancer cell line as an artificial antigen presenting cell

研究代表者

吉川 史隆 (KIKKAWA, Fumitaka)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40224985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞腺癌細胞株TOV-21Gを基にHLA-A*24:02のみを発現する人工抗原提示細胞(aAPC)を作製、これを用いて新規腫瘍抗原ペプチドの同定を行った。ナイーブCD8陽性T細胞をaAPCで刺激し複数のCTLクローンを樹立した。クローンAの解析からClaudin-1を抗原として同定したが自己抗原の一つであった。クローンBの解析からRNA binding motif protein 4(RBM4)を同定したが、クローンBはHLA-A*24:02拘束性に未同定の抗原を認識すると共に、交差反応性にHLA-Cw*07:02上に提示されるアロ抗原であるRBM4由来ペプチドも認識すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We built a novel method for inducing cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes (CTLs) restricted to an HLA allele of interest. We used an artificial antigen presenting cell (aAPC), TOV21G that express a single HLA-A*24:02 allele and was originally derived from an ovarian clear cell carcinoma. Several CTL clones were established using aAPC stimulation. Then, cDNA library construction using mRNA extracted from the parental TOV21G cells and subsequent expression cloning was conducted. These experiments revealed that a CTL clone recognized a minimal epitope peptide RYEFQALF, which was derived from an autoantigen claudin-1 presented by HLA-A24:02 molecules. Another clone responded not only to ovarian cancer cells in the context of HLA-A*24:02 but also to allogeneic HLA-Cw*07:02 molecules through cross-reactive TCR recognition. Expression screening using a cDNA library revealed that this alloreactivity was mediated through the 9-mer peptide VRTPYTMSY, derived from RNA-binding motif protein 4.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 腫瘍免疫療法

1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫療法は科学的根拠に基づいた開発が必要な現状ではあるが、既存の化学療法や放射線療法に抵抗性であるがん細胞を標的とした新規治療法のひとつとして期待されている。一般に T 細胞によって認識されるヒト腫瘍抗原の同定法として以下の 4 つがあげられる。癌化と関連した腫瘍抗原の候補に対する T 細胞応答の解析、癌細胞に特異的に反応する T 細胞株(クローン)を利用した、癌細胞由来の cDNA ライブラリーのスクリーニング、癌患者血清中の抗腫瘍抗原 IgG を利用した、癌細胞由来の cDNA ライブラリーのスクリーニング (SEREX 法) cDNA microarray analysis による、遺伝子発現の組織特異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定とその抗原性の解析。このうちの を用いる場合、従来法ではアロ反応を避けるために担癌患者の自己リンパ球を自己癌細胞で刺激する必要性が生じることから、自己の癌細胞株樹立が困難ながん種には不向きであった。

2. 研究の目的

担癌患者のリンパ球を自己の癌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要なものの、リンパ球と抗原提示細胞が同ドナーに由来しない場合、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。このアロ反応を回避する方法として、任意の単一 HLA のみを発現する人工抗原提示細胞 (aAPC) システムを構築し、さらに同 aAPC を用いて卵巣明細胞腺癌における新規腫瘍抗原ペプチドを同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

日本人の中で最も頻度の高い HLA-A 座が HLA-A24 であることから、HLA-A24 陰性である卵巣明細胞腺癌細胞株の内因性 HLA 発現を HLA class 遺伝子に共通な塩基配列部位を標的とする short interfering RNA (siRNA) によって完全に抑制し、siRNA 標的部位のコドンを変換(codon-changed;cc)した siRNA 抵抗性の ccHLA-A24 を遺伝子導入することで HLA-A24 のみを発現する aAPC を作製する。この aAPC を HLA-A24 陽性健康人の末梢血単核球から分離したナイーブ CD8 陽性 T リンパ球と共培養することで、HLA-A24 拘束性に卵巣明細胞腺癌細胞株を認識する CTL lines を誘導・樹立する。さらに特異性を IFN- γ キャッチ法にて確認した後に CTL クローンの樹立を行う。

複数の卵巣明細胞腺癌細胞株に対して細胞傷害性を示す CTL クローンが樹立されれば、その CTL クローンが認識している腫瘍抗原が卵巣明細胞腺癌に共通した特異的な新規抗原であるかどうかにつき、aAPC に用いた癌細胞株の mRNA から cDNA ライブラ

リーを作製して同定を試みる。同定した遺伝子の 5'、3'側それぞれを短縮したプラスミドを作製し、CTL が認識している場所を検索する。ミニジーンや合成ペプチドを用いて、CTL が認識する最小のアミノ酸配列を決定する。

卵巣明細胞腺癌における新規腫瘍特異的抗原ペプチドが同定できれば、HLA-A24 陽性の健康人および卵巣明細胞腺癌患者の末梢血リンパ球を同定されたペプチドで刺激することにより、腫瘍抗原特異的 CTL を誘導することができるか否かを検討する。また、同定されたペプチドを含有する HLA-A24 テトラマーを作製し、同定したエピートプに対する CTL が患者体内において存在・活性化されているか否か (体内動態) を解析する。

4. 研究成果

1) 人工抗原提示細胞作製

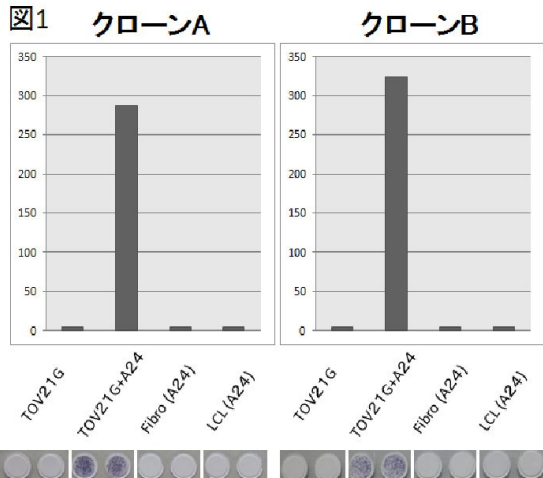
HLA-A*24:02 陰性の卵巣明細胞腺癌細胞株 TOV-21G を基に、ccHLA-A24 および共刺激分子である CD86 をレンチウイルスベクターにて導入した後に 3 種類の siRNA によって内因性 HLA 発現を抑制することで HLA-A*24:02 のみを発現した aAPC を作製した。

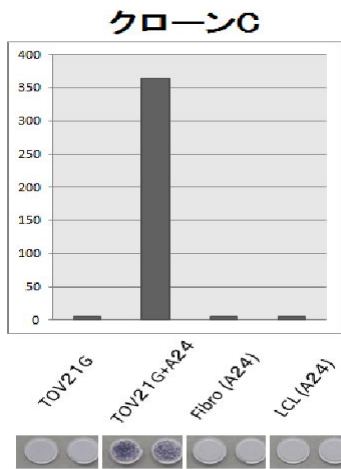
2) CTL 誘導および CTL クローニング

HLA-A24 陽性健康人の末梢血単核球から分離したナイーブ CD8 陽性 T 細胞を aAPC で 2 回刺激して CTL lines を誘導した。さらに限界希釈法でクローニングを行い、複数の CTL クローンを樹立した。

3) 卵巣癌細胞を特異的に認識する CTL クローンの選別 (CTL クローンの HLA-A24 拘束性および TOV-21G 特異性、細胞傷害性の検証)

複数の CTL クローンが樹立できたことから、卵巣明細胞腺癌細胞株を複数認識でき、かつ正常細胞を傷害しない CTL クローンの有無を確認し優先的に解析することとした。樹立された CTL クローンの aAPC に対する HLA-A24 拘束性 (Negative control として HLA-A24 陰性の親株 TOV-21G を含めた細胞株) および TOV-21G 由来抗原特異性 (Negative control として HLA-A24 陽性の





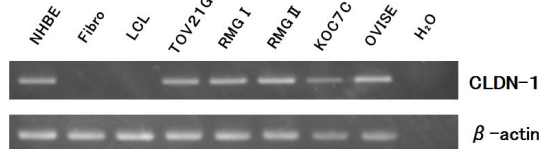
線維芽細胞やBリンパ球細胞といった正常細胞や明細胞腺癌を含めた癌細胞株)をIFN- γ ELISPOT assayにて確認した(図1)。細胞傷害性試験(^{51}Cr release

assay)でaAPCおよび他の卵巣明細胞腺癌を含めた癌細胞株への反応性を確認した。(4) cDNA ライブラリーによる抗原遺伝子の同定およびエピトープの同定

aAPC に用いた TOV-21G の mRNA から cDNA ライブラリーを作製して、各プラスミドを HLA-A*24:02 導入 HEK-293T 細胞 (HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-Cw*07:02) にトランスフェクションした後に CTL クローンと共培養した。同培養上清中の IFN- γ を指標に標的遺伝子を探索し、遺伝子短縮法や合成ペプチドを用いてエピトープペプチドを決定した。

(5) 同定された抗原の検証

図2



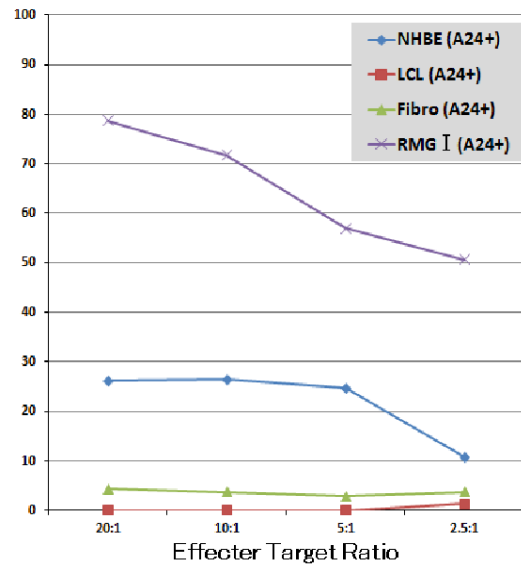
正常気管支上皮: NHBE
卵巣明細胞腺癌: TOV21G, RMG I, RMG II, KOC7C, OVISE

複数の卵巣明細胞腺癌細胞株を認識することができた CTL クローン A の解析から同定された抗原 Claudin-1 (CLDN1) については、エピトープペプチド (RYEFGQALF) の同定まで行うことができた。Claudin-1 は Tight junction の主要タンパク質である Claudin 遺伝子ファミリーの 1 つで、比較的多くの臓器で発現が確認されているものの癌での過剰発現や局在変化が報告されており、癌の転移・浸潤、悪性形質との関連が示唆されているため、卵巣明細胞腺癌における mRNA レベルでの発現量および発現頻度を正常細胞 (気管支上皮や線維芽細胞) と比較した。同抗原は複数の卵巣明細胞腺癌だけでなく正常気管支上皮細胞でも発現がみられた (図 2)。さらに、CTL クローン A は卵巣明細胞腺癌株に対する程度よりは弱いものの気管支上皮細胞に対しても細胞傷害性を示したことから、同定した CLDN1 は腫瘍特異的抗原ではなく自己抗原の一つであると考えられた (図 3)。

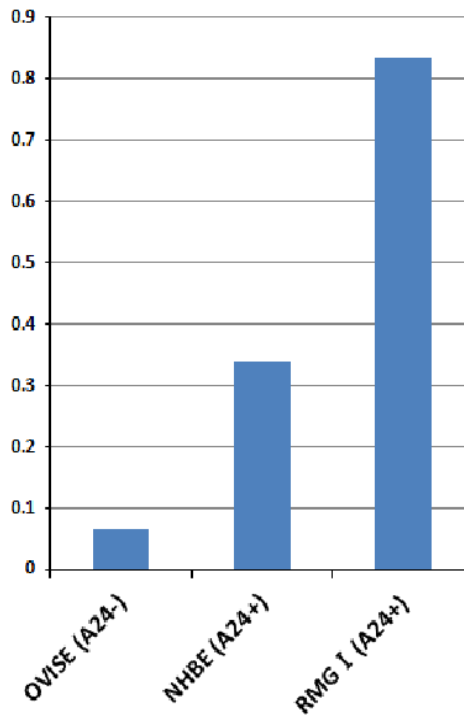
クローン B の解析からは標的とする抗原として RNA binding motif protein 4(RBM4)

図3

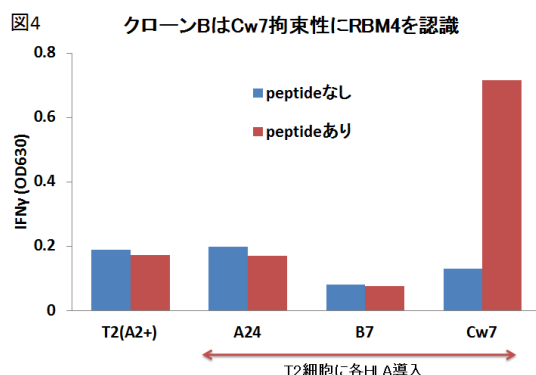
細胞傷害性試験



IFN- γ ELISA assay



が同定された。続いてエピトープペプチド (VRTPYMSY) の決定まで施行したが、このペプチド配列は HLA の A24 に結合しづらいモチーフであったため、追加解析を行ったところ、このペプチドは HEK-293T 細胞に導入した HLA-A*24:02 ではなく、元来同細胞株が保有している HLA-Cw*07:02 によって提示されていることが確認された (図 4)。さらに HLA-Cw*07:02 に結合すると報告されている 3 つのペプチドを合成し、それらに対するクローン B の認識能を比較したところ、ペプチド毎にそれぞれの濃度でクローン B によって認識されたことから、クローン B は RBM4 のペプチドを特異的に認識するわけではなく、HLA-Cw*07:02 に結合する複数



のペプチドを認識できるクローンであることが確認された。誘導に用いたドナーは HLA-Cw*07:02 を保有しておらず、クローン B は HLA-A*24:02 拘束性に抗原 X (同定未) を認識することに加えて、交差反応性に HLA-Cw*07:02 上に提示されているアロ抗原である RBM4 由来ペプチドも認識していると考えられた。

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 3 件)

Luo C, Shibata K, Suzuki S, Kajiyama H, Senga T, Koya Y, Daimon M, Yamashita M, Kikkawa F. GPC3 expression in mouse ovarian cancer induces GPC3-specific T cell-mediated immune response through M1 macrophages and suppresses tumor growth. *Oncol Rep*. 2014; 32(3):913-21. 査読有, DOI: 10.3892/or.2014.3300.

Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant clinical response of progressive recurrent ovarian clear cell carcinoma to glypican-3-derived peptide vaccine therapy: Two case reports. *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10(2):338-43. 査読有, DOI: 10.4161/hv.27217.

Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirosawa 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*.

2013; 74(9):1103-10. 査読有, DOI:

10.1016/j.humimm.2013.06.030.

〔学会発表〕(計 3 件)

鈴木史朗, 三井寛子, 関谷龍一郎, 水野美香, 梶山広明, 柴田清住, 吉川史隆. CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ANALYSIS IN CLINICAL STUDY OF GLYPICAN-3 PEPTIDE VACCINE FOR PATIENTS WITH OVARIAN CLEAR CELL CARCINOMA IN FIRST CLINICAL REMISSION. The 15th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2014), 2014 年 11 月 8 日 ~ 11 月 11 日, Melbourne Convention Exhibition Center

鈴木史朗, 柴田清住, 吉川史隆, 中面哲也. Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy combined with Chemotherapy against Progressive Ovarian Clear Cell Carcinoma. 1st International Symposium on Immunotherapy, 2013 年 10 月 11 日 ~ 10 月 12 日, The Royal Society, London

鈴木史朗, 柴田清住, 吉川聡明, 中面哲也, 吉川史隆. 卵巣明細胞腺癌に対する GPC3 ペプチドワクチン療法における免疫モニタリングおよび GPC3 ペプチド特異的 CTL の誘導. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日 ~ 9 月 21 日, ロイトン札幌

〔その他〕

研究のご紹介

名古屋大学医学部産婦人科

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/tumor/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 史隆 (KIKKAWA Fumitaka)
名古屋大学医学系研究科・教授
研究者番号: 40224985

(2)研究分担者

鈴木 史朗 (SUZUKI Shiro)
名古屋大学医学部附属病院・助教
研究者番号: 20612758

柴田 清住 (SHIBATA Kiyosumi)
名古屋大学医学系研究科・准教授
研究者番号: 90335026

(3)連携研究者

なし