

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830108

研究課題名(和文) 循環血中腫瘍細胞を用いたがん抗原の網羅的解析法の開発

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of MHC-class I-restricted cancer antigen peptides

研究代表者

鳴海 兼太 (Narumi, Kenta)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10534258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞のMHC class I分子上に提示されるがん抗原ペプチドを網羅的に解析する方法として、MHC class I分子上のペプチドを酸解離法により溶出し、溶液中のペプチドを質量分析計(2DICAL)により解析する方法を考案した。HLA-A24との結合が予測されるGlypican3由来ペプチドを合成し、HLA-A24発現細胞に会合させて提示させた後、酸解離-2DICALによるペプチド同定を行ったところ、HLA-A24と最も結合性が高いペプチドのみが検出された。将来的には本方法を循環血中腫瘍細胞に応用し、がん細胞上に実際に提示されているがん抗原ペプチドを探索することが可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Here we reported an acid-stripping-mediated comprehensive analysis method of MHC class I-restricted cancer antigen peptides. We added five HLA-A24-restricted Glypican3-related peptides to the HLA-A24-expressing cells, following acid-stripping and ultrafiltration. The filtrates were analyzed by 2DICAL. It was revealed that only the peptide which had the strongest binding affinity against the HLA-A24 molecules was detected in the filtrates. This finding indicated that acid-stripping and 2DICAL analysis was a useful method to detect HLA-A24-binding peptides. This method may be applicable to the comprehensive screening of cancer antigen using circulating tumor cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：ペプチドワクチン がん抗原 循環血中腫瘍細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在のがん治療では「手術的治療」「放射線治療」「化学療法」に次ぐ第4の治療選択肢として「がん免疫療法」が期待されている。同一のがん腫においても、がん患者ごとに宿主免疫系が認識するがん抗原は異なるため、免疫療法を行う上で腫瘍細胞上に提示されるがん抗原を個々の症例ごとに同定することは、免疫療法の治療成績向上に大きく貢献できる。がん患者ごとに免疫療法に有効ながん抗原を同定することができれば、ペプチドワクチン療法におけるペプチド選択根拠となり、治療前の効果予測や免疫モニタリングを行う上で大変有用であると考えられる。腫瘍の生検組織ないし切除標本から、オミックス技術を用いた発現解析にてがん抗原を網羅的に解析するなどの試みが、国内外の施設にて行われているが、見つかった候補がん抗原タンパクが実際に腫瘍細胞上の主要組織適合抗原 (MHC) class 分子上に提示されているかどうかの確認は困難である。

循環血中腫瘍細胞 (Circulating tumor cell; CTC) は固形腫瘍をもつ患者の末梢血中に検出される腫瘍細胞と定義される。この細胞は腫瘍の原発巣から、上皮間葉転換や結合組織の分解などの過程を経て血管内に侵入し、全身を循環していると考えられている。CTC の存在は悪性腫瘍の転移の前駆病態として注目され、実際、乳がんなど一部の悪性腫瘍において術後の CTC 細胞数が術後再発と関連することが報告されており (Cristofanilli M, et al. *NEJM* (2004))、転移や予後を予測するバイオマーカーとして近年積極的に研究が行われている。

CTC は、末梢血中において1億~10億細胞あたり1個程度しか存在せず、種々の解析を行うのに十分な検体量を採取することが困難であることから、これまで研究が制限されてきた。しかし、近年、CTC を検出・回収する技術装置の向上により、循環血液中にごくわずかに存在する CTC であっても検出し研究に利用することが可能となった (Parkinson DR, et al. *J Transl Med* (2012))。CTC は Liquid biopsy により検討することが可能であり、侵襲性が少なく、また経時的に腫瘍の細胞生物学的な変化を追うことができる。これまでの主な研究用検体であった生検・手術検体にはない有利な特徴を有している。

## 2. 研究の目的

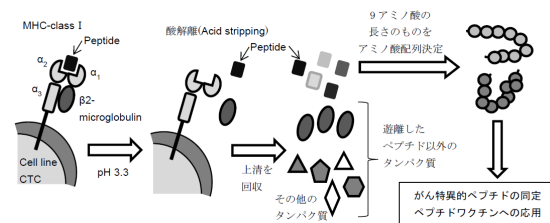
MHC class 分子とペプチドとの結合は酸性環境において解離することが知られている (Udaka K, et al. *Immunogenetics* (2000))。さらにプロテオーム解析技術の進歩により、短鎖のペプチドにおいてもそのアミノ酸配列を決定することが可能となった。本研究では CTC の代わりに腫瘍細胞株を用いて MHC class I 分子上のペプチドを酸解離法により溶出し、ペプチドを網羅的に質量分析計により同定する新たなシステムを確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

日本人に多い遺伝子多型である HLA-A24 分子に結合すると予測されるペプチドを合成し、それを HLA-A24 陽性細胞に添加して結合させ、酸解離により溶出させて質量分析計で検出可能であるかどうかを検討した (図 1)。

質量分析計は、超低流速の液体クロマトグラフィーと質量分析で経時的に得られるスペクトラムをデジタル処理し、質量電荷比 ( $m/z$ )、保持時間 (RT) の 2 軸を持つ平面に描出するプロテオーム解析法である 2DICAL (2Dimensional Image Converted Analysis of LCMS) を用いた。

図 1 研究方法の概略



## 4. 研究成果

肝細胞がんペプチドワクチン療法の臨床試験が進行中である Glypican3 タンパク由来のペプチドのうち、HLA-A24 と結合すると予想されるものをアルゴリズムにより予測し、上位 5 つのペプチドを合成した (GlypA/GlypB/GlypC/GlypD/GlypE)。この新たに予測したペプチドの HLA-A24 結合能を測定したところ、臨床応用されているペプチド (Clinical; 親和性定数  $\text{LogKa}=5.346$ ) に対し、GlypA/GlypC は同等、また GlypB は臨床応用ペプチド以上の HLA-A24 分子への結合を認め (LogKa=6.307)、GlypD および GlypE は HLA-A24 に結合しなかった (図 2) (表 1)。

次にこれら合成したペプチドがどの程度の濃度で同定可能であるかを 2DICAL によ

り検討した。水溶液中に GlypA-D および臨床応用ペプチドを段階的に希釈し、測定を行ったところ、100-1pmol のペプチドは検出可能であった(図 3 上段)。さらに希釈を行っていくと、50fmol のペプチド分子は同定可能であり、5fmol はかすかなシグナルとしてのみ検出可能(ペプチド配列の同定は不可能)、500amol では検出できなかった(図 3 下段)。

図 2 合成したペプチドの HLA-A24 に対する結合実験

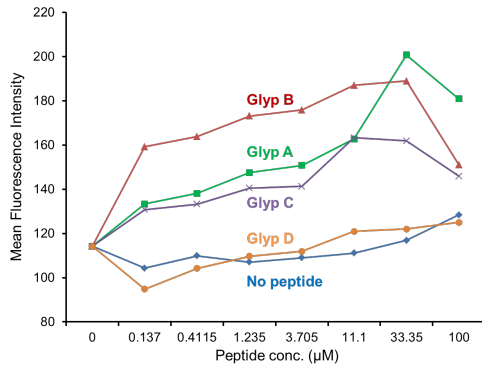
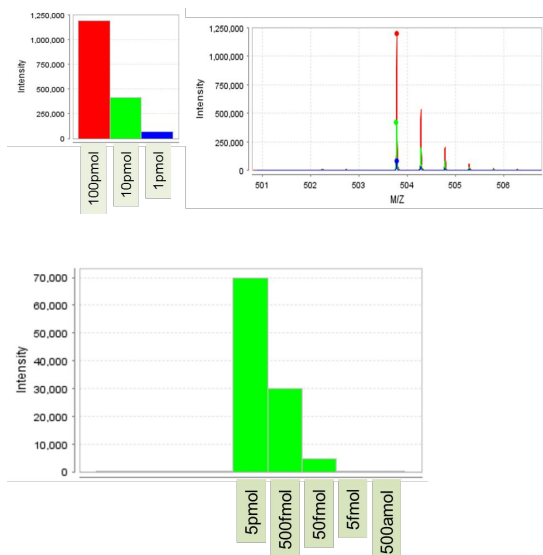


表 1 合成した Glypican3 由来ペプチドの HLA-A24 に対する結合能

Peptide	MW	LogKa
Glyp A	1097.31	5.630
Glyp B	1006.22	6.307
Glyp C	1074.15	5.266
Glyp D	1064.11	3
Glyp E	1059.2	3
Clinical	1108.24	5.346

図 3 2DICAL によるペプチド検出限界



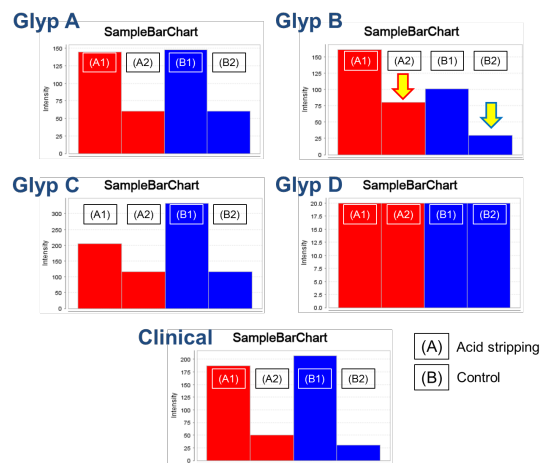
次に、実際に酸解離により MHC-class I 分子上に結合していたペプチドを 2DICAL で網羅的に解析できるかを検討した。2DICAL 解析の際に、目的ペプチド以外のタンパク質(細胞内タンパク質など)が混入した場合、ごくわずかしが含まれないペプチドを検出することが困難になるため、限外濾過により高分子量タンパク質を除去した。

具体的には、HLA-A24 陽性細胞 ( $3 \times 10^8$  個) をあらかじめ酸解離液 (Na-citrate phosphate buffer; 0.131M citric acid + 0.066M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 3.3) により MHC class I 分子上のペプチドを除去し、そこへ GlypA/ GlypB/ GlypC/ GlypD/ Clinical の各ペプチドを最終濃度各  $2 \mu\text{M}$  となるように混合して添加した。氷上にて 3 時間再会合を行い、よく洗浄した後、等量ずつ 2 つに分け、(A) PBS(-) を添加、(B) 酸解離液を添加した。この細胞の上清を限外濾過 ( $3 \text{kDa}$ ) し、濾過液(フィルター通過液)を遠心濃縮し、2DICAL により同液中に含まれるタンパク質を解析した。

その結果、酸解離を行っていない溶液(A)と比較して多くのペプチドが酸解離液中(B)に含まれていたのは GlypB のペプチドのみであった(図 4)。GlypB は表 1 に示す通り、最も HLA-A24 分子との結合が強いペプチドである。本方法は強く HLA-A24 に結合しているペプチドを酸解離-2DICAL にて直接的に検出できることを示している。

図 4 酸解離-2DICAL による HLA-A24 拘束性ペプチドの網羅的解析

独立して 2 回施行し、A1-B1、A2-B2 を対比したところ、GlypB のみが 2 回とも A(酸解離液)に多量に検出された。



本研究により、酸解離-2DICAL という比較的簡便な方法によって MHC-class I 分子上に提示されているペプチドを網羅的に解析することができることが分かった。現在のところ MHC-class I 分子上のペプチドを同定するのに  $1.5 \times 10^8$  の細胞を必要とした。1 つ

の細胞あたり  $1\text{-}2 \times 10^5$  の MHC-class I 分子が発現しており、また 1 つの細胞あたり 500-1000 のペプチドが提示されていると報告されている(Rammensee HG, et al. *Annu. Rev. Immunol.* 1993)。酸解離の効率を上昇させ、かつ限外濾過などのステップにおける検体処理中のペプチドの喪失を最小限に抑えられれば、現在の質量分析計の感度でも  $3 \times 10^5$  程度の細胞数があれば、計算上本方法においてペプチドを検出できる。しかしながら担がん患者血清中からこの細胞数の CTC を回収することは今の技術では困難である。今後 CTC を表現型を変えずに増殖させる技術革新や、より高感度の質量分析法が登場すれば、本方法を CTC に応用し、経時的にがん抗原を探索することが可能になると考えられた。またこの技術がさらに発展すれば、難治性の自己免疫疾患において、自己免疫現象を引き起こしている自己抗原の同定に応用することも期待できる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鳴海 兼太 (NARUMI, Kenta)

国立がん研究センター研究所

分子細胞治療研究分野

研究者番号：10534258

##### (2) 研究分担者

該当者なし

##### (3) 連携研究者

該当者なし