

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460581

研究課題名(和文) 抗免疫エスケープ腫瘍ペプチドワクチンの開発

研究課題名(英文) Loss of tapasin limits HLA class I antigen processing and results in escape from CTL responses to cancer cells

研究代表者

金関 貴幸 (KANASEKI, Takayuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：50531266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞に対する免疫応答(CD8+ T細胞応答)は臨床的にも治療効果をもたらすが、その一方で免疫応答から逃避するがん細胞の存在が知られており、そのメカニズム解明が重要である。本研究では非小細胞肺癌患者のがん組織を解析し、全体の70%以上にtapasin発現低下が認められること、さらにtapasin発現低下は予後悪化と関連するリスクファクターであることを示した。さらにはがん細胞モデルを用いた検証から、tapasin欠損によりCD8+ T細胞の標的であるがん抗原ペプチドの産生量が低下することで、がん細胞に対するCD8+ T細胞応答低下を招いているメカニズムを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Understanding the mechanisms by which cancers escape from immune surveillance is an issue of wide importance. In this study, we show that tapasin expression is decreased in more than 70% of the cancer tissues of non-small cell lung cancer patients, and positively correlated with patient survivals. The further experiments using tapasin-deficient cancer models demonstrate that loss of tapasin expression leads to escape from tumor-associated antigen (TAA) specific T-cell recognition. Tapasin-deficient cancer cells produce reduced amounts of TAAs and are resistant to cytotoxic T-cell responses both in vitro and in vivo. Thus, tapasin expression is a key for T-cell mediated immune surveillance against human cancers.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 免疫逃避 抗原提示 HLAクラスI tapasin CTL

1. 研究開始当初の背景

様々ながん種において MHC クラス I 抗原プロセッシング異常が報告されている。これら多くの結果的ながん細胞表面の MHC クラス I 発現量低下につながり、さらには細胞傷害性 T 細胞 (CTL) からの免疫逃避に働くことが知られている。これはがん細胞に対する T 細胞免疫応答を考えるうえで極めて重要な現象であるが、これら分子異常ががん抗原のプロセッシングをどのように変化させるか分子レベルでは解明されていない。

2. 研究の目的

我々は抗原プロセッシング関連分子のうち、とくに上皮系腫瘍で高頻度に発現低下が認められる tapasin に焦点をあて、がん細胞に内在性に発現するがん抗原のプロセッシング変化と CTL 応答の変化を検討した。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌患者 85 症例のがん組織を免疫染色し、tapasin 発現とがん組織中の CD8+ T 細胞を解析し、患者予後と比較した。

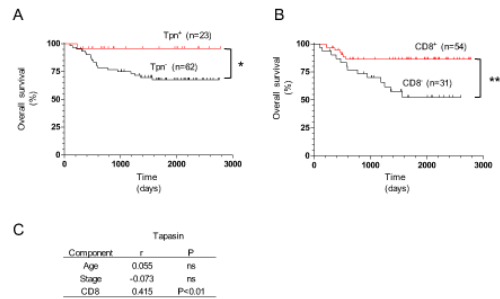
(2) Tapasin 発現低下による抗原プロセッシング解析のために、ヒト肺癌細胞株および大腸がん細胞株から CRISPR/Cas9 システムを用いて tapasin 発現欠損株を作成した。

(3) 作成した tapasin 欠損株肺癌および大腸がん細胞を用い、内在性に発現するがん抗原の MHC クラス I プロセッシングとがん細胞に対する CTL 応答の変化を検証した。

4. 研究成果

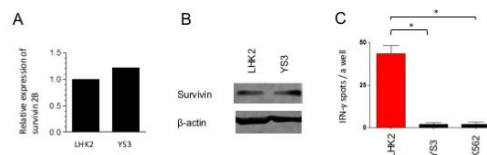
(1) 非小細胞肺癌組織 85 症例において、約 73% という高率に tapasin 発現低下が観察された。またがん組織中の CD8+ T 細胞浸潤が高いケースは約 64% に認められた。さらに、tapasin 発現低下と CD8+ T 細胞浸潤低下はそれぞれともに患者予後増悪と有意な関連が認められた。即ち、tapasin 発現は肺癌患者の予後因子のひとつと考えられる。興味深いことに、腫瘍部での tapasin 発現低下と CD8+ T 細胞浸潤低下自体にも有意な相関性が認められた。このことは tapasin 発現低下が腫瘍に対する CD8+ T 細胞反応低下を招いている可能性を示唆している (図 1)。

(図 1) 肺癌組織における tapasin 発現 (A)



と CD8+ T 細胞腫瘍浸潤 (B) との予後相関。Tapasin 発現と CD8+ T 細胞浸潤との相関性 (C)。論文 1 より改変。

(2) 非小細胞肺癌細胞株 LHK2 から CRISPR/Cas9 システムを用いて tapasin 欠損株 YS3 を作成した。ウェスタンブロット法にて、YS3 は tapasin タンパクを全く発現しておらず、また IFN- γ 添加でも tapasin タンパクは確認されなかった。YS3 の HLA クラス I 発現量は LHK2 に比較して 1/10 程度にまで減少した。YS3 は tapasin 欠損株であるが、既知の内在性がん抗原 survivin を LHK2 と同程度に発現しているため、抗原遺伝子発現量に依存せず CTL 応答変化を比較することができる。我々はがん患者血液から HLA-A24 拘束性の survivin-2B ペプチド特異的 CTL を誘導し、CTL クローンを樹立した。この CTL 応答を測定したところ、YS3 に対する CTL 反応は LHK2 と比較し有意に低下 (ELISPOT スポット数で 1/20 以下) する結果となった (図 2)。

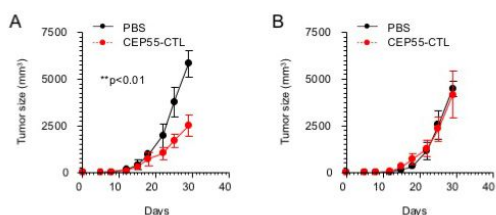


(図 2) Tapasin 欠損株 YS3 は親株 LHK2 と同等に survivin 2B 抗原を発現する (A、B)。Survivin 2B 特異的 CTL による IFN- γ ELISPOT (C)。論文 1 より改変。

(3) 大腸がん細胞株 SW480 を用いて同様に検証した。最初に CRISPR/Cas9 システムを用い tapasin 欠損株 3G12 を作成した。3G12 は IFN- γ 処理をしても tapasin タンパクを全く発現しない欠損株である。この SW480 と 3G12 ペアを比較すると、やはり HLA クラス I 発現量は後者で 1/10 程度に減少していた。SW480 と 3G12 は survivin-2B 遺伝子を同程度に発現しているにもかかわらず、樹立した survivin-2B 特異的 CTL は SW480 を効率的に細胞傷害し、3G12 は傷害されない結果となった (LDH 測定による細胞傷害アッセイ)。同様に、がん抗原 CEP55 においても、CEP55 発現

量は両がん細胞株間で等しいにもかかわらず、CEP55 特異的 CTL は SW480 のみを細胞傷害する結果となった。

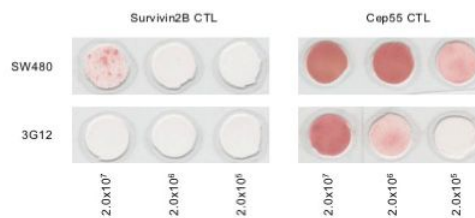
この現象は in vivo の担癌マウスモデルでも確認された。免疫不全 NSG マウスに SW480 および 3G12 を移植したところ、腫瘍の増殖速度(腫瘍径)は両者で等しい。即ち、tapasin 欠損あるいは CRISPR/Cas9 操作は腫瘍自体の増殖には影響していない。ここに CEP55 特異的 CTL を静注すると、SW480 細胞の増殖は有意に抑えられる一方で、3G12 の増殖は抑えることができず、CTL による抗腫瘍効果が得られなかった。以上から、tapasin 欠損はがん細胞が内在性に発現するがん抗原に対する CTL 応答を減弱させ、腫瘍の CTL 免疫逃避に寄与していると考えられる(図3)。



(図3) CEP55 特異的 CTL 輸注による腫瘍退縮効果。SW480 (A) および 3G12 (B) 移植した NSG マウスでの腫瘍系を示す。論文1より改変。

(4) 今回観察された tapasin 欠損がん細胞への CTL 応答低下のメカニズムとして大きく2つの可能性が考えられる。ひとつは HLA 発現量低下による CTL 応答低下であり、もうひとつはがん抗原のプロセッシング異常によるがん抗原ペプチド産生量の低下である。この分子メカニズムを検証するために、SW480 および 3G12 の細胞ライセートを抽出し、同一の抗原提示細胞にパルスし、CTL 応答を比較した。この細胞ライセートは両細胞がナチュラルに産生した抗原ペプチドを含む。その結果、survivin-3B 特異的 CTL、CEP55 特異的 CTL はいずれも SW480 細胞ライセートには反応したものの、3G12 細胞ライセートに対する反応は大きく低下する結果となった(ELISPOT アッセイ)。

これは同一の抗原提示細胞を用いた実験条件であり、アッセイ系の HLA 発現量は等しいことから、3G12 では survivin および CEP55 の両がん抗原ペプチドの産生量が低下していると結論づけた。即ち、tapasin 欠損がん細胞は、細胞表面 HLA クラス I 発現量低下をきたすだけでなく、がん抗原由来の抗原ペプチド産生能を損なっており(MHC クラス I 抗原プロセッシング異常)、これらのメカニズムによって CTL 応答からエスケープしていると考えられる(図4)。



(図4) SW480 および 3G12 における内在性腫瘍抗原ペプチド(survivin 2B および Cepp55)の量的比較。それぞれに示す数の腫瘍細胞から生化学的に抽出されたペプチドに対する CTL 反応を IFN ELISPOT アッセイで測定した。論文1より改変。

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)

Shionoya Y, Kanaseki T, et al. Loss of tapasin in human lung and colon cancer cells and escape from tumor-associated antigen-specific CTL recognition. *Oncoimmunology*. 査読有. 2017 Jan 3;6(2):e1274476. doi: 10.1080/2162402X.2016.1274476.

[学会発表](計 11 件)

塩野谷洋輔、金関貴幸、他。非小細胞肺癌における tapasin 発現低下と CTL 免疫逃避のメカニズム。第 20 回日本がん免疫学会総会。2016 年 7 月 28 日。大阪国際交流センター(大阪市)。

時田芹奈、金関貴幸、他。ヒト細胞における HLA-A24 リガンドーム解析。第 61 回日本病理学会秋期特別総会。2015 年 11 月 5 日。東京大学安田講堂(東京都文京区)。

濱田早紀、金関貴幸、他。ヒトがん幹細胞を標的とした HLA-A2 ナチュラルペプチドの探索。第 61 回日本病理学会秋期特別総会。2015 年 11 月 5 日。東京大学安田講堂(東京都文京区)。

塩野谷洋輔、金関貴幸、他。腫瘍の CTL 免疫逃避バリエーションに対する新しい治療戦略。第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会。2015 年 7 月 16 日~18 日。ロイトン札幌(札幌市)。

Sho Miyamoto, Takayuki Kanaseki, 他。A novel immunogenic peptide that is naturally processed and presented by HLA-A24 of human colon cancer stem cells. *がん免疫療法マクロファージ国際会議 2015*。2015 年 7 月 9 日。東京大学伊藤国際学術センター(東京都文京区)。

塩野谷洋輔、金関貴幸、他。悪性腫瘍の immune-escape variant を標的とした新

しいCTL治療の開発。第104回日本病理学会総会。2015年4月30日。名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）。植木美渚、金関貴幸、他。癌幹細胞のMHCクラスI抗原プロセッシング。第60回日本病理学会秋期特別総会。2014年11月20日。国立劇場おきなわ（沖縄県浦添市）。金関貴幸、他。A new mode of CTL induction secondary to antigen-processing defects in the endoplasmic reticulum。第73回日本癌学会学術総会。2014年9月25日。パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。Kochin Vitaly, Takayuki Kanaseki, 他。HLA-A24 peptidomics of cancer and cancer stem cells。第18回日本がん免疫学会総会。2014年7月31日。ひめぎんホール（愛媛県松山市）。塩野谷洋輔、金関貴幸、他。抗原プロセッシング異常により提示されるユニークな新規CD8+T細胞抗原ペプチドの同定。第103回日本病理学会総会。2014年4月25日。広島国際会議場、ANAクラウンプラザホテル広島（広島県広島市）。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金関 貴幸 (KANASEKI, Takayuki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：50531266