

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890147

研究課題名（和文）

CD40 活性化 B 細胞の抗原処理、提示能、および抗原特異的 T 細胞誘導能の検討

研究課題名（英文）

Assessment of antigen processing and presentation of CD40 activated B cells

研究代表者

近藤 英生 (KONDO EISEI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：30379747

研究成果の概要（和文）： CD40 活性化 B 細胞 (CD40-B) は、樹状細胞に匹敵する抗原提示能を有し、かつ少量の血液より増幅し樹立可能であるため、小児や血球減少を伴う患者など多量の血液採取が難しい人からも十分量の抗原提示細胞を得ることが可能である。

抗原をコードした mRNA は、方形波エレクトロポレーションにて、ほぼ 100% CD40 活性化 B 細胞に導入することが可能であった。また、抗原蛋白を添加した CD40 活性化 B 細胞を抗原提示細胞とすることで、複数の抗原特異的 CD4+T 細胞を同時に樹立することができ、CD40 活性化 B 細胞は細胞療法等に用いられる抗原提示細胞として有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）： It has been demonstrated that CD40-activated B (CD40-B) cells are potent antigen presenting cells that can be expanded significantly ex vivo.

Several methods to antigen load CD40-Bs to generate viral or tumor-antigen specific CD8+ T cells have been identified. However, it is unclear how CD40-Bs take up and process exogenous antigen in an B cell receptor independent manner to stimulate CD4+ T cells. CD4+ T cells specific for multiple epitopes were successfully generated in stimulation with CD40-B cells pulsed with recombinant protein. In addition, CD40-Bs were able to be easily transfected with in vitro transcribed-mRNA. CD40-B cells are thought to be useful in cellular therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

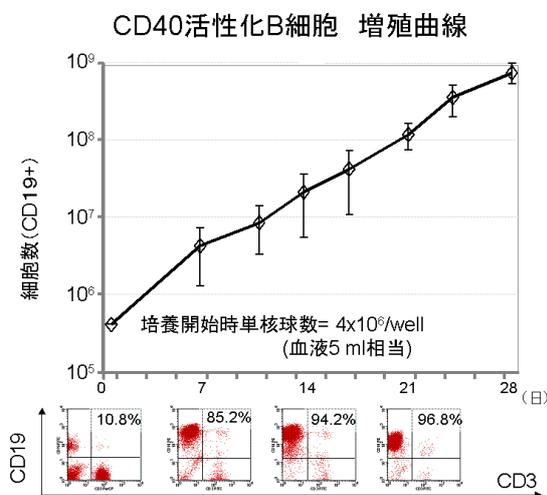
研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・血液内科学

キーワード： 腫瘍免疫、CD40 活性化 B 細胞、CMV、mRNA transfection

1. 研究開始当初の背景

近年、樹状細胞 (DC) の抗原提示細胞 (APC) としての有用性が注目され、基礎研究のみならず細胞療法 (がんワクチン) としての臨床試験も広く行われている。ヒトでは主に末梢血単球由来 DC (MoDC) が用いられるが、MoDC は培養中に増殖しないため、充分量の細胞を得るためには多量の採血 (50-100ml) または体外循環による単核球採取が必要であり、多大な身体的負担となる。したがって、適応は一部の人に限られ、上記の侵襲に耐えられない患者や小児は対象とすることができない。Schultze らが報告 (J Clin Invest 100(11):2757) した CD40 活性化 B 細胞 (CD40-B) は、DC に匹敵する抗原提示能を持つことが知られており、かつ培養により増殖可能であるため、10ml 程度の血液があれば十分な量の CD40 活性化 B 細胞を樹立することができる。そのため、小児も含め、すべての患者からの抗原提示細胞を得ることが可能であり、MoDC に代わる細胞ワクチン療法のための抗原提示細胞として、その臨床応用が期待される。IL-4 存在下に CD40 リガンド (CD154) で刺激された B リンパ球は、NF κ B 経路が活性化され、



細胞分裂するとともに腫瘍組織適合抗原

(HLA) や CD80, 86 などの副刺激分子が発現される。通常、B 細胞が免疫抑制的に働くのに対して、この CD40 活性化 B 細胞は、HLA や副刺激分子 (CD86, CD80 など) を発現しているため、樹状細胞を同等の抗原提示能を有する。また、培養において週当たり 3-10 倍の速度で増殖する (右図参照)。

我々は、この CD40 活性化 B 細胞に着目し、少量の血液 (10ml) より APC および CTL を樹立することを試みた (Kondo et al, J Immunol 2002)。樹状細胞を用いた CTL 樹立の実験では、特定の HLA (HLA-A*0201, A*2402 など) に提示されるエピトープペプチドを抗原として用いることが多いが、HLA に制限されず、より多くの人を対象とするため、抗原遺伝子全長をレトロウイルスベクターを用いて抗原提示細胞に導入する方法をとった。通常、レトロウイルスベクターによる血液細胞への遺伝子導入は困難であるが、spin infection 法および GALV-psuedotyped vector を用いることによって、CD40-B 細胞への遺伝子導入は可能となった。次に、健常人の血液より CMV-pp65 遺伝子導入 CD40-B 細胞を作製し、CD8 陽性 T 細胞を刺激することで、CMV-pp65 特異的 CTL 株を樹立した。抗 CMV 抗体陽性者全例 (計 11 例) より、pp65 特異的 CTL 株を樹立可能であった。なお、抗 CMV 抗体陰性者からも pp65 特異的 CTL 株は誘導可能であったが、抗 CMV 抗体陽性者から得られた CTL 株に比べ、機能が劣っていた。樹立した CTL 株の HLA 拘束性を ELISPOT 法にて解析したところ、すべての CTL 株で複数の HLA に対する反応が見られ、この方法で樹立した CTL 株は poly-clonal であると考えられた。計 11 例の抗 CMV 抗体陽性ドナーより得られた CTL

株を用い、新規CTLエピトープを同定した。

Deletion mutant, Linear expression fragment, およびBIMASなどのコンピュータアルゴリズムを用いることにより、今まで報告のなかったHLA-C拘束性のものを含め計14種類の新規CMV-pp65由来CTLエピトープを同定した。(Kondo et al, Blood 2004)

また、抗CMV抗体陰性ドナーからのCMV-pp65特異的CTLの樹立についても試み、ペプチド添加CD40-B細胞を用いた方法にて、目的のCTLを得ることができた。しかし、レトロウイルスベクターによりCMV-pp65を導入したCD40-B細胞を用いた方法では、他の抗原特異的なCTLが主に得られたため、標的抗原、およびエピトープを詳細に解析したところ、レトロウイルスベクターのパッケージングシグナル内で、mRNAに転写される際、スプライシングにより切り離される部分にスタートコドンが残っており、ここから翻訳される配列を認識していることが分かった。このレトロウイルスは、一部の臨床試験に用いられていたものと同等であり、レトロウイルスベクター自体の抗原性として報告した。(Kondo et al, Genetherapy 2005) さらに、フランスにおけるレトロウイルスベクターによるX連鎖性複合免疫不全症に対する遺伝子治療の臨床試験において3例の白血病が発生したこともあり、現状のレトロウイルスベクターは、臨床試験をする上において有効性、安全性ともに問題がある。

2. 研究の目的

CD40活性化B細胞へのレトロウイルスベクターに代わる抗原遺伝子導入法、添加法を検討し、最適化する。次に最適化した条件で抗原導入したCD40活性化B細胞の抗原提示能を、既知の抗原に特異的なCTL、CD4+T cell を用いて確認し、さらに新規がん抗原について抗

原特異的CTL, CD4+Tcellの樹立を試みる。

3. 研究の方法

(1) CD40活性化B細胞への抗原遺伝子(mRNA)の導入による抗原提示の検討

pSTIベクター(ドイツ・マインツ大学 Dr. Sahin より供与、Blood 108(13): 4009, 2006) または他のベクターにクローニングされた標的抗原cDNA配列をテンプレートとし、In vitro transcription (IVT)法にてmRNAを作成する。まず、マーカー遺伝子(EGFP) mRNAを用いて、エレクトロポレーション法による導入条件を最適化し、その条件を用いて抗原遺伝子mRNAの導入を試みる。

(2) 抗原遺伝子導入CD40-B細胞を用いた抗原特異的T細胞の樹立および特異性の検討

① 抗原特異的細胞傷害性T細胞の樹立

(1)の研究によって最適化した条件を基に、抗原特異的CD8+T細胞の樹立を試みる。健常人または患者より得られた末梢血単核球を用いてCD40-B細胞を樹立し、抗原遺伝子をコードする IVT-mRNA をエレクトロポレーション法によってCD40-B細胞に導入することによって、抗原提示細胞と得る。同一ドナーの末梢血単核球より分離したCD8+細胞をmRNA導入CD40-B細胞で週1回、計3-4回刺激した後、得られた細胞株の抗原特異性をIFN- γ ELISPOT法、⁵¹Cr release assay、CD107 mobilization assay などを用いて確認する。

② 抗原特異的CD4+T細胞の樹立

抗原組み替えたんぱくを添加したCD40-B細胞を抗原提示細胞とし、同一ドナーの末梢血単核球より分離したCD4+細胞を繰り返し刺激することによって、抗原特異的CD4+T細胞を樹立する。得られたCD4+T細胞株の特異性をIFN- γ ELISPOT法またはELISA法を用いて確認する。

③ CD40活性化B細胞への抗原蛋白添加によ

る抗原提示の検討

標的抗原の組み換え蛋白を作成し、CD40活性化B細胞に添加する。CD40活性化B細胞の抗原取り込み能、抗原処理能、抗原提示能を抗原特異的T細胞および各種阻害剤を用いてIFN- γ ELISPOT法にて解析する。

4. 研究成果

(1) CD40活性化B細胞への抗原遺伝子(mRNA)の導入による抗原提示の検討

EGFP-mRNAをIVT法にて作成、CD40活性化B細胞にBio-rad社 Gene Pulser Xcell electroporation system を用いて、遺伝子導入を行った。方形波(Square wave)にて 250V, 350V, 450Vおよび 250uSec, 350uSec, 450uSec の組み合わせで遺伝子導入したところ、いずれの条件でも90%の導入効率を得たが、350V, 350uSec での効率が最も高かったため、以後の実験では本条件を採用した。

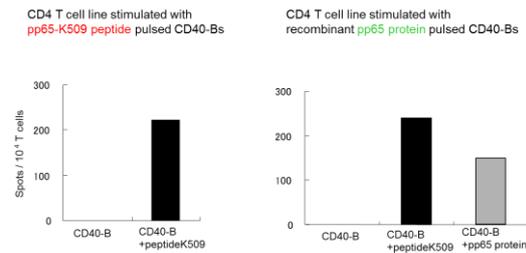
(2) 抗原遺伝子導入CD40-B細胞を用いた抗原特異的T細胞の樹立および特異性の検討

① 抗原特異的細胞傷害性T細胞の樹立
腫瘍幹細胞に関する抗原 (CD133、 α Bクリスタリン)をコードするIVT-mRNAを作成し、CD40活性化B細胞に導入、CD8+T細胞を繰り返し刺激することで、抗原特異的CTLの樹立を試みた。IFN- γ ELISPOT assayにて特異性を確認したところ抗原特異的CTLは得られていなかった。現在、それぞれのIVT-mRNA導入効率について検討中である。

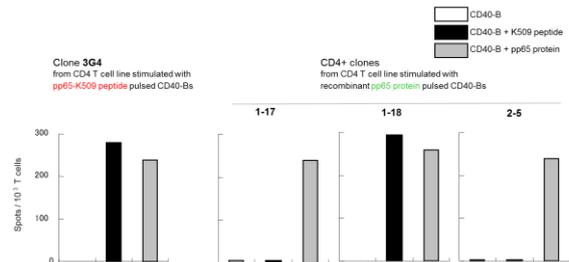
② 抗原特異的CD4+T細胞の樹立

CMVpp65組み換え蛋白 または 既報の抗原ペプチド pp65-K509 (CMVpp65 509-523aa; KYQEFFWDANDIYRI)を添加したCD40活性化B細胞を抗原提示細胞とし、CD4陽性T細胞を繰り返し刺激することでpp65特異的CD4陽性T細胞

を得た。



特異性をIFN- γ ELISPOT assayにて確認したところ、いずれのCD4+T細胞も添加した抗原を特異的に認識した。加えてpp65蛋白で刺激したCD4+T細胞は、pp65-K509添加CD40活性化B細胞も認識しており、抗原蛋白で刺激したCD4+T細胞はpp65-K509特異的なものを含め、複数のエピトープを認識するCD4+T細胞を同時に樹立しているものと考えられた。得られた抗原特異的CD4+T細胞をより詳細に検討するため、限界希釈法によりCD4+T細胞クローンを樹立した。

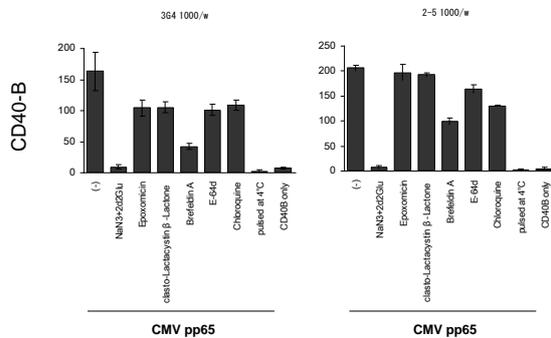


pp65蛋白で刺激したCD4+T細胞より樹立したクローンは、すべてpp65蛋白を認識したが、pp65-K509は認識するものとしらないものの双方が認められた。

③ CD40活性化B細胞への抗原蛋白添加による抗原提示の検討

②で得られた抗原特異的CD4+T細胞クローンをを用いて、CD40活性化B細胞の抗原提示能を検討した。pp65-K509特異的なクローン(3G4)および他のpp65由来エピトープを認識するクローン(2-5)を用い、各種阻害剤により処理したCD40活性化B細胞にCMVpp65蛋白を取り込ませた後、IFN- γ ELISPOT法にて抗原提示能を評価した。

エンドサイトーシス阻害剤 (NaN3 + 2-deoxy-d-glucose) 存在下および低温 (4°C) で pp65 蛋白を添加した CD40 活性化 B 細胞はいずれのクローンにも認識されなかった。



また、エンドゾーム内での酸化阻害剤 (クロロキニン)、プロテアーゼ阻害剤 (E-64d)、新規 MHC 分子等の細胞内転送阻害剤

(BrefeldinA) などにより、抗原提示は一部阻害されていた。

興味深いことに、通常 CD4+T 細胞への抗原提示は、MHC class I 経路であるプロテアソームの阻害剤の影響を受けないが、クローン 3G4 への抗原提示はプロテアソーム阻害剤

(Epoxomicin, Lactacystin) でも一部阻害されており、K509 ペプチドの提示について通常の MHC class II 経路以外の経路の関与が示唆された。

今後、細胞内での抗原処理過程についてより詳細に検討する予定である。

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 3 件)

1. The cyclins: a family of widely expressed tumor antigens? Kondo E, von Bergwelt-Baildon MS, Klein-González N, Wendtner CM. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3):389-95. 査読有り

2. von Bergwelt-Baildon MS, Shimabukuro-Vornhagen A, Wendtner CM, Kondo E Identification of native, immunogenic peptides from Cyclin D1. *Leukemia* 24, 209-211, 2010 査読有り

3. Klein-Gonzalez N, Kondo E, von Bergwelt-Baildon MS. Cyclins against cancer: a novel family of tumor antigens? *Immunotherapy*. 2, 595-597. 2010 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. 近藤 英生, Cyclin A2 特異的 High-avidity CTL の樹立、第 69 回日本癌学会、2010/9/23、大阪

2. 近藤 英生, Cyclin D1 as a widely expressed tumor antigen: generation of high avidity CTL in an autologous setting、第 14 回日本がん免疫学会総会、2010/7/22、熊本

[図書] (計 1 件)

近藤 英生, 他、羊土社、がんの分子標的と治療薬事典、2010、102-103

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 英生 (KONDO EISEI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：30379747