

機関番号：85501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20599023

研究課題名（和文）

リサイクリング MHC クラス II 分子による抗原提示を利用した癌ワクチンの開発

研究課題名（英文）

Development of new tumor vaccines using antigen presentation by recycling MHC class II molecules

研究代表者

三村 雄輔 (Yusuke Mimura)

山口宇部医療センター臨床研究部 生理生化学研究室長

研究者番号：00219718

研究成果の概要（和文）：

腫瘍免疫の活性化には抗原提示細胞による CD4+ T 細胞への効率良い抗原提示が必須である。より少量の抗原で T 細胞活性化をもたらす新しいワクチン設計のため卵白アルブミンの抗原エピトープを免疫グロブリンの抗原結合部位（相補性決定部位）に組み込んだ。既知のプロセッシング経路と異なり、このエピトープは細胞表面上のリサイクリング MHC クラス II 分子に直接結合し、エンドゾーム内でのプロセッシング後に T 細胞に提示されるように設計したものである。

研究成果の概要（英文）：

Efficient antigen presentation to CD4+ T cells is essential for activation of anti-tumor immunity. In order to elicit robust T cell responses with smaller doses of antigen, we have designed a new vaccine in which a CD4+ T cell epitope of ovalbumin is inserted in the complementary determining region of an immunoglobulin molecule. This inserted epitope is supposed to be presented to CD4+ T cells after direct binding to a recycling MHC class II molecule on the surface of an antigen presenting cell and processing in the endosome, in contrast to the known processing pathway involving the late endosomes and lysosomes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	0	1,800,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

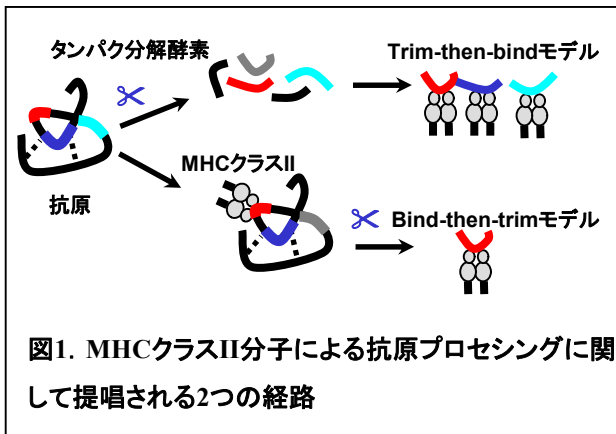
キーワード：抗原認識

1. 研究開始当初の背景

マウスを大腸癌細胞株 CT26 で免疫すると腫瘍抗原 gp90 に対する CD4+ 及び CD8+ T 細胞性抗腫瘍免疫が惹起される (Huang, A., *et al.*, PNAS 93, 9730-5, 1996)。この CT26 に特異

的な CD4+ T 細胞ハイブリドーマは CT26 細胞由来の gp90 にのみ反応し、他の腫瘍細胞由来の gp90 には応答しない (Golgher, *et al.*, J Immunol 167, 147-55, 2001)。構造的に抗原性 (+) gp90 は不完全に折りたたまれた分子種

である事を我々は以前報告している。一方、他の腫瘍細胞由来の抗原性 (-) gp90 は密に折りたたまれた分子種である。また抗原性 (+) gp90 が、細胞表面やエンドゾームに存在するリサイクリング MHC クラス II 分子に結合し、その後細胞内でタンパク分解を受けて T 細胞に認識される経路を明らかにし、同じ抗原でもタンパクの折れたたみの違いにより T 細胞に対する抗原性が変化することを証明した (Mimura, Y. *et al.*, PNAS 104, 5983-8, 2007)。



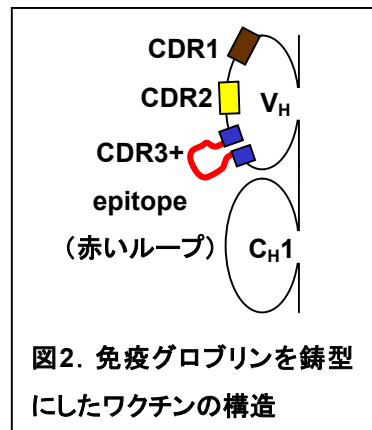
重要な事に、抗原性 (+) および抗原性 (-) gp90 は腫瘍細胞で産生された自然のタンパクであることから、生体内におけるこの抗原性変換機序が明らかになれば、腫瘍抗原の免疫原性を高める手段になりうる。以上の知見から癌免疫療法に関して2つの可能性が考えられた。第1にリサイクリング MHC クラス II 分子に結合し提示されるような癌ワクチンを開発できれば、効率よく CD4+ T 細胞を活性化できる事、第2は折れたたみの異なるタンパク抗原を抗原産生細胞内の酸化還元酵素の発現調節や酸化還元剤等により産生できれば、抗腫瘍免疫を増強できる事である。本研究ではまず第1案の通りリサイクリング MHC クラス II 分子により提示される gp90 抗原エピトープは元のタンパク抗原内でどのようなコンホメーションをとっているのか調べ、その構造を新しい癌ワクチン開発に応用する。また第2案のように腫瘍細胞内で腫瘍抗原の抗原性を変化させることができるのか酸化還元酵素の関与も調べる。

2. 研究の目的

本研究は、以下の2つを主な目的として行った。

- (1) gp90 内の MHC クラス II 分子との結合部位 (エピトープ) を同定し、その立体構造的な特徴や MHC クラス II 分子との相互作用を分析する。
- (2) gp90 エピトープの構造的な特徴を免疫グロブリン可変領域の相補性決定部位 (CDR) に組み入れ、癌ワクチン開発に応用する (図

2)。



3. 研究の方法

(1) gp90 の変異体の調製

gp90 分子は成熟の過程で gp70 と p15E に分離され、ヘテロ 2 量体を形成する。gp70 の N 末側ドメインと C 末側ドメインをそれぞれコードする cDNA を構築し、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞や *E. coli* 細胞に発現させる。また、折れたたみを変化させるためにシステイン残基をアラニンに置換する。N 末側ドメインに 12 個、C 末側ドメインに 8 個のシステインを有するため、計 20 個の変異 cDNA を作成、発現させて抗原性を調べ、最終的にエピトープ同定を試みる。

(2) 免疫グロブリン CDR に CD4+ T 細胞エピトープを組み込んだ癌ワクチンの作成

免疫グロブリンの cDNA を IgG 産生細胞から RNA を抽出し RT-PCR により構築する。その cDNA から V_H-C_{H1} の部分を PCR し、CDR3 の Ser114 と Ser115 の間に卵白アルブミンの CD4+ T 細胞エピトープ (323 I S Q A V H A A H A E I N 335) をコードする合成 DNA (ata tct caa gct gtc cat gca gca cat gca gaa atc aat) を In-FusionTM Advantage PCR Cloning Kit (Clontech) を用いて挿入する。作成した cDNA にはヒスチジンタグを付加し CHO 細胞や *E. coli* により発現させ、ニックルアガロースビーズにより精製する。

4. 研究成果

(1) gp90 のエピトープの同定

gp90 のエピトープ決定は full length gp90 の cDNA から gp90 の N 末側ドメインと C 末側ドメインをコードするベクターを個別に作成し、CHO 細胞に発現させ、どちらのドメインが T 細胞を活性化するか調べることから始めた。しかしながら各ドメインを含む細胞破碎液は CT26 特異的 CD4+ T 細胞を活性化しなかった。これはレコンビナント full length gp90 自体を CHO 細胞に発現させた時に抗原

性(一)であった事と同様の結果であり、gp90が密に折りたたまれているためだと推察された。そこで折りたたみを変えるためにジスルフィド結合に関与している12個のシステイン残基を1つずつアラニンに変換しCHO細胞に発現させた(図3)。しかし、どの変異体もT細胞を活性化しなかった。これはペアを作らないシステイン残基の存在(図3)によりタンパクの凝集が起こったためである事を非還元条件 SDS 電気泳動法により確認した。そのため現在はジスルフィド結合に関与する2つのシステイン残基をともにアラニンへ変換し、凝集を防ぐことにより抗原性の変化を調べている。

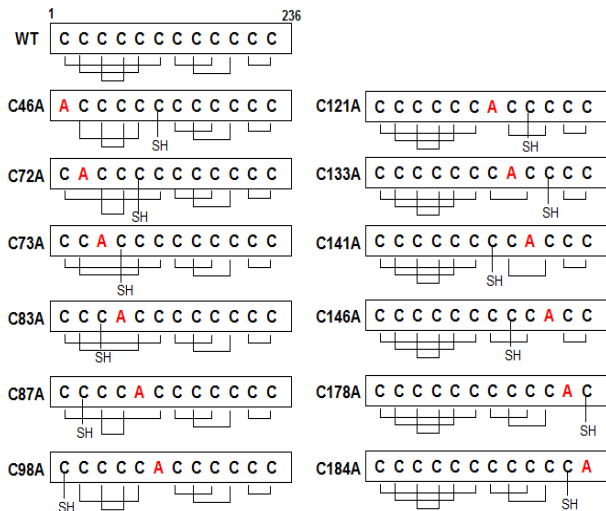


図3. gp90 N末側ドメインの変異体。C:システイン、A:アラニン

一方ではgp90を*E. coli*により発現させ、封入体から再生させる際にフォールディングをランダムにした。IPTG濃度100 μMにて発現誘導を行い、Western blottingによりNドメイン、Cドメインの至適発現を確認した。現在は大量精製を行っている段階である。

(2) 抗体分子相補性決定部位にCD4+ T細胞抗原決定基を組み込んだ新しい癌ワクチン開発

リサイクリングMHCクラスII分子に結合するタンパク抗原分子を作製する目的で抗体分子の抗原結合部位CDR3に卵白アルブミン(OVA)エピトープOVA323-335配列を挿入した(IgOVA)。このcDNA発現ベクターを構築しマウス骨髄腫(myeloma)細胞、CHO細胞や*E. coli*で発現させた。Western blottingによりタンパクの発現を確認し、OVA特異的CD4+ T細胞DO11.10により認識されるかをIL-2測定により検討した(図4)。

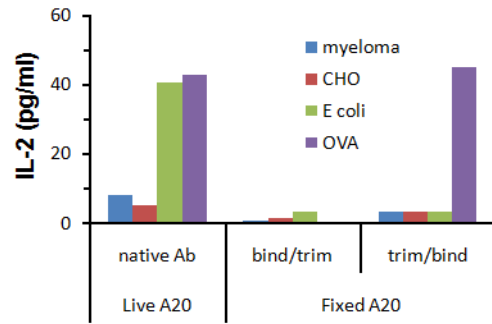


図4. 卵白アルブミン(OVA)のCD4 T細胞エピトープを組み入れた免疫グロブリンワクチンの抗原性。宿主細胞によるワクチンの抗原性の差を示す。抗原量は約10μg。

*E. coli*由来のIgOVAの抗原性がlive A20 Bリンパ腫細胞によるIL-2産生から確認された(図4)。*E. coli*由来IgOVAによるIL-2産生レベルは哺乳類宿主細胞(myeloma, CHO)由来のIgOVAよりも高かった。これは*E. coli*由来IgOVAが封入体から*in vitro*で再生され比較的ランダムな立体構造をとっていたため、抗原提示細胞(A20)内におけるプロセッシングが起こりやすくなった事が理由であろう。一方、リサイクリングMHCクラスII分子による提示はFixed A20細胞を用いてBind-then-trim経路(図1、図3)で調べてみたが、IL-2産生は観察されなかった。従って、*E. coli*産生IgOVAによるIL-2産生はリサイクリングMHCクラスII分子による抗原提示の結果ではない可能性が高い。今後は別のCDRにもエピトープを挿入したり、エピトープの両端にタンパク分解酵素切断部位を導入する方法でIgOVAがリサイクリングMHCクラスII分子により抗原提示されるようになるか調べる予定である。

(3) gp90産生CT26細胞中の酸化還元酵素の発現レベルの検討

マウス大腸癌細胞株CT26には抗原性(+)gp90を産生するCT26-Pと抗原性(-)gp90を産生するCT26-Cのサブラインがある(Mimura, Y. *et al.*, PNAS 104, 5983-8, 2007)。両者の遺伝子発現の違いをDNAマイクロアレイにより網羅的に検索したところ、protein disulfide-isomeraseなどの6個の酸化還元酵素関連遺伝子の発現レベルに違いが認められた。現在、これらの酵素がgp90のフォールディングや抗原性に関与しているか検討中である。

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 Tao, H, Mimura, Y, Aoe, K, Kobayashi, S, Yamamoto, H, Matsuda, E, Okabe, K, Matsumoto, T, Sugi, K, Ueoka, H, Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer*, *in press*, 2011.

② Ghani FI, Yamazaki H, Iwata S, Okamoto T, Aoe K, Okabe K, Mimura Y, Fujimoto N, Kishimoto T, Yamada T, Xu CW, Morimoto C, Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 404, 735-42, 2011.

③ Kim, Y-G, Shin, D-S, Yang, Y-H, Gil, G-C, Park, C-G, Mimura, Y, *et al.* High-throughput screening of glycan-binding proteins using miniature pig kidney N-glycan-immobilized beads. *Chem. Biol.* 15, 215-23, 2008.

[学会発表] (計 3 件)

① 平成 20 年

第 38 回日本免疫学会総会・学術集会発表 12 月 3-4 日、京都

三村雄輔他、”Induction of anti-tumor immunity via recycling MHC class II-guided processing”

② 平成 22 年

第 14 回国際免疫学会発表 8 月 22-27 日、神戸

Mimura, Y, *et al.*, “Impact of α 1-3-linked galactose-containing oligosaccharides of mouse/human chimeric IgG on its Fc effector functions”

第 20 回日本サイトメトリー学会、平成 22 年 6 月 26 日、東京

三村由香、Davide Zocco、三村雄輔他、糖鎖の癌性変化とサイトカインの関係

[図書] (計 1 件)

① Mimura, Y, Jefferis, R, Mimura-Kimura, Y, Abrahams, J, Rudd, PM, Glycosylation of therapeutic IgGs, In *Therapeutic monoclonal antibodies: From Bench to Clinic*, (Ed) An, Z., John Wiley & Sons, 67-89, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.yamaguchi-hosp.jp/english/researchprograms/Researchprograms.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村雄輔 (Yusuke Mimura)

山口宇部医療センター臨床研究部

生理生化学研究室長

研究者番号 : 00219718