

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591435

研究課題名(和文)マイナー抗原特異的免疫療法による免疫誘導能評価の標準化に関する研究

研究課題名(英文) Generation of antigen presenting cells applicable to standardized evaluation of immune status following immunotherapy targeting minor antigens.

研究代表者

赤塚 美樹 (Akatsuka, Yoshiki)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・客員研究員

研究者番号：70333391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では標準化可能な抗原提示細胞作製を目指した。HLA分子を欠損するK562をベースとし、自然な内在性抗原量に近づけるために転写量の調整ができるようにした。HLA-A24拘束性CMV由来ペプチドをモデル抗原とし、GFPやNGFRを共発現させて間接的に抗原量を推定した。当初のKozak配列による発現量調整は困難で、テトラサイクリン誘導型プロモーターにて広いレンジで発現量が調製できたが、キラーT細胞による認識は非常に高感度で抗原認識度を調整できなかった。最終的にHLA発現量そのものを調整することで抗原発現量を調整する方法を選択し、収集した臨床検体の解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We sought to generate antigen presenting cells (APCs) that can be used for standardization when assessing immune responses following immunotherapies. HLA-deficient K562 was mainly tested using various types of approaches to control antigen expression level. Antigenic peptides were co-expressed with GFP or NGFR to estimate antigen expression levels indirectly. Because modification of Kozak sequence was incapable for the purpose, tetracycline-inducible system was incorporated. The latter could control cell surface GFP/NGFR expression level in a wide range from null to around several hundred times when assessed by flow cytometry, however the cognate CTLs was sensitive enough to recognize target cells without any GFP/NGFR expression. To this end, we are currently modifying the APC system so as to control the cell surface HLA expression level, which will be suitable APCs expressing natural level of antigenic peptide internally for testing clinical samples.

研究分野：血液免疫学

キーワード：抗原提示細胞 マイナー組織適合抗原 同種造血細胞移植

1. 研究開始当初の背景

同種造血細胞移植後の再発血液腫瘍の予後は不良で、再移植が唯一の救命法であるが合併症がきわめて多く、より疾患特異的な免疫療法が必要と考えられている。申請者らは自ら同定したアロ抗原であるマイナー抗原 (mHAg) ペプチドを用いた能動免疫療法の早期臨床試験を実施していたが、治療後に誘導されてくるキラーT細胞 (CTL) の *in vitro* での誘導は症例間だけでなく同一症例でも一定せず、培養液にペプチドを非生理的濃度で加えることが問題と考えた。そこで拘束性 HLA 分子・副刺激分子と、発現量が調節できる方法で標的抗原ペプチド配列を遺伝子発現させることでより自然な近い状態で抗原を提示可能な細胞を作成し、これらを免疫療法後の免疫機能評価の標準化に応用できないか検討することとした。

2. 研究の目的

まず HLA 分子を欠損する (K562 など) か HSV の ICP47 やゲノム修飾で除去可能でかつ、副刺激分子を高発現し抗原提示能が良好な細胞株を検索し、妥当な抗原提示細胞を決定し、標準化用の細胞株とする。

ついで目的とする抗原エピトープ (mHAg、主要関連抗原、ポジティブコントロール用の CMV pp65)、 α 2 ミクログロブリン、拘束性 HLA 分子をシングルチェーンで発現するベクターの開発を行う。

さらに内在性の形で抗原エピトープを発現させつつ、その抗原発現量を自然なレベルに近づけることができるようなプロモーター活性の選定とベクターを作成する。最後に以上を用いて、臨床検体 (凍結試料) を同一条件下で包括的なアッセイを実施する。また、本邦を他の癌関連抗原 (WT1 など) へ応用する研究を展開することを目的とした。

3. 研究の方法

初めにエピトープの安定発現目的で、mHAg エピトープ・ α 2 ミクログロブリン・拘束性 HLA を1本鎖として発現するプラスミドを構築した。すなわち N 末端から、 α 2 ミクログロブリン (2m) のリーダー配列 mHAg の最小エピトープ配列 リンカー 2m コード配列 リンカー 拘束性 HLA クラス I 分子のコード配列をタンデムに結合し単鎖化したレトロウイルスベクターを作成した。エピトープは HLA-A*24:02 拘束性の ACC-1Y mHAg、ACC-1C、WT-1、hTERT、EpCAM (HLA-A*24:02)、HA-1H (HLA-A*02:01) を作成する。以上をそれぞれパッケージング細胞に組み込み、K562、Daudi (以上は HLA 欠損) や HL60 白血病細胞株に組み込み発現を確認した。

以上の方法はレトロウイルスの LTR をプロモーターとして用いており非生理学的に高い抗原発現量を来たすので、次いでより生理学的濃度もしくは、それ以下の濃度で抗原エピトープが発現できるようにプロモーター

もしくはリボゾーム結合配列 (Kozak 配列) を改変し、抗原・2m・HLA コンストラクトの細胞表面発現量、もしくは抗原のみの発現量をコントロールできないか検討した。制御不十分な結果が出た場合、テトラサイクリンやタモキシフェン等の薬剤で発現量が調節できるプロモーターを持つベクターの使用を検討することとした。また、これらを K562 等の細胞株に遺伝子導入する際、レトロウイルスの組み込まれたゲノムの位置やコピー数で発現量が一定しないと考えられるため、必要に応じて限界希釈法でクローニングして、生育良好で抗原発現量のコントロールが容易なクローンを樹立し、以降の機能解析に用いる。抗原発現量は上記コンストラクトに手足口病の F2A 配列を用いてタンデムに結合した GFP や NGFR の発現量をフローサイトメトリーにて解析することで推測した。

同種骨髄移植もしくは免疫療法を受けた患者の末梢血に於ける特異的 CTL 前駆体の頻度・機能解析を最終目標とするが、その前に既報の CTL クローンを用いて作成した抗原提示細胞が認識されるか、また薬剤等による抗原量の変化を細胞傷害性などの機能面で検出可能かを検討した。

さらに作成した人工抗原提示細胞が HA-1H mHAg 特異的 T 細胞受容体 (TCR) -様抗体を組み込んだキメラ抗原受容体 T 細胞によって認識される動態を付随研究として実施した。

4. 研究成果

単鎖化したペプチド/HLA 発現系については既に作成済みの ACC-1Y に加えて ACC-1C (HLA-A24 拘束性)、HA-1H (HLA-A2 拘束性) を作成し、レトロウイルスパッケージング細胞に導入した。そのレトロウイルス上清を HLA 欠損の K562 細胞株等に感染し表面での発現を確認した。単鎖化 ACC-1C/HLA-A24 発現細胞はこの mHAg に対応する CTL-1B9 によって認識され、良好に傷害された。次に Kozak 配列をすることにより発現量のコントロールを試みた。ACC-1C ではこのエピトープをコードする BCL2A1 遺伝子の Kozak 配列、最もリボゾームが結合しやすい CCGCC、結合しにくい CCTCC を組み込んだ3種類のベクターを作成したが、K562 細胞上の発現量はフローサイトメトリーで差を認めず、CTL-1B9 を用いた細胞傷害試験でも E:T 比 30:1 から 1:1 の範囲で認識に有意差を認めなかった。単鎖化は細胞内の他のペプチドと HLA を奪い合わないという点で標準化しやすいと考えたが、発現量の調節が困難という点で Kozak を改変するだけでは不十分と判明した。この原因として遺伝子導入に用いたレトロウイルスの LTR プロモーターそのものが強力であったため mRNA が大量に作られ、単鎖化ペプチド/HLA 分子も過剰であったと考えられた。以上より、単鎖化を行うより、HLA は定常量で発現させ、抗原ペプチドの発現量のみを調節する系の開発が必要と考えるに至った。

ペプチドのみを発現させる場合、内在性ペプチドとの競合が問題となる。これを克服するために、Transporter associated with antigen processing (TAP)欠損で、発現させたい抗原ペプチドのみ TAP 非依存性に Endoplasmic reticulum (ER)に導入できる系を検討した。K562 細胞株の HLA 遺伝子は欠損しているとされているが、同じ領域にコードされる TAP 遺伝子は PCR で検出されたため残存していることが判明した。このため TAP のノックダウンおよび単純疱疹ウイルス (HSV)由来の ICP47 遺伝子導入による TAP 阻害を検討した。Zinc finger nuclease を用いた既報の方法 および同じ標的配列を用いた CRISPR-Cas9法では TAP2 欠損株は得られなかった。遺伝子導入効率の良い 293T 細胞株を用いても欠損株は作成出来なかったため、配列に問題があった可能性がある。他方、ICP47では HLA 陽性 HL60 への遺伝子導入でフローサイトメトリーでは検出出来ない程度まで HLA の発現を低下させることが可能であったが、10nM 程度のペプチドを細胞外から添加することで、対応する CTL により HLA60/ICP47 は認識・傷害された。以上より、TAP 機能の完全な阻害は困難であり、また微量の HLA 分子が発現していても CTL は効率良く標的を認識しうるということが判った。親和性の良好な TCR を持つ CTL では 1 細胞あたり数コピーのエピトープペプチドでも認識しうるとの報告もあるため、細胞表面上のエピトープペプチド/HLA 複合体数を定量する方法について検討した。

TCR の 1 量体ではエピトープペプチド/HLA 複合体に安定的に結合できないため、HLA テトラマー試薬のように 4 量体とするか、別途 TCR 様の特異性をもつ抗体を作成する必要があった。過去に HLA-A2 トランスジェニックマウスに HA-1H/HLA-A2 テトラマーを接種し免疫したのち採取した脾細胞から PCR にてイムノグロブリンの軽鎖と重鎖 cDNA を PCR で増幅しファージライブラリを作成した。これをスクリーニングして特異的に HA-1H/HLA-A2 を認識する単鎖抗体を樹立した。これに蛍光を標識し、T2 (HLA-A2 陽性、HA-1H mHAg は陰性) 細胞に HA-1H ペプチドを段階的に濃度を変えてパルスし、単鎖抗体による染色程度を定量キット (QIFIKIT) にて計

HA-1H concentration on T2 cells (μ M)	MFI	ABC	SABC
Irrelevant scFv	24.67	4104	0
1 nM	25.28	4213	109
10 nM	26.26	4388	284
100 nM	35.52	6067	1963
1 μ M	84.46	15359	11255
10 μ M	176.81	33919	29815

測した。

その結果、上表に示すように 10nM のペプチド添加が 1 細胞あたり約 300 抗原複合体数 (表の SABC) に相当した。この複合体数がフ

ローサイトメトリーでシフトを検出できる下限値であった。さらに陰性コントロールから 2 倍程度の蛍光強度のシフトを得るためには 100nM (約 2000 複合体相当) が必要であることが分かった。同時に行った HLA-A2 拘束性 HA-1H 特異的 CTL である EH6-CTL を用いたタイトレーションでは 0.1nM のペプチド濃度でも 60% 程度の細胞傷害活性を示した。

以上の結果から、CTL による認識を回避するにはエピトープ抗原の発現をほとんどシャットダウンできるほどの発現ベクターが必要と推測された。

Kozak 配列改変だけではエピトープ抗原発現量のコントロールが出来なかったため tetracycline (Tet)-On/Off システムを検討した。K562 に Tet 制御性トランス活性化因子を導入しクローニングを行った。各クローンに Tet 応答因子 (TRE) の下流に GFP を発現させるベクターを導入、tetracycline で GFP 発現コントロールが最も良好なクローンを確定した。この K562 クローン (3B10 と命名) に HLA-A24 cDNA および、TRE 下流に NGFR-2A 配列-CMV pp65 エピトープ、NGFR-ACC-1Y マイナー抗原をコードするベクターを導入し評価した。NGFR の発現で間接的に細胞内抗原の発現量を推定した。NGFR の発現が全く確認出来ない状態でもこれらの細胞は CTL で傷害された。細胞表面 HLA にエピトープが残っているのが原因と考え、酸性下 (pH 2.9) で HLA 結合ペプチドを一旦剥がした後に 2 日間培養して HLA-A24 を再発現させたが、K562 は CTL に傷害された。以上の結果から、新規に合成された HLA-A24 に微量ながら発現された抗原ペプチドが結合し細胞表面に到達していたと推定された。1つの原因として、K562 は TAP 機能が弱く内在性ペプチドが ER で HLA 分子に導入されにくいところに、NGFR とエピトープを同時発現させるために用いた手足口病ウイルス由来の 2A 配列が ER エントリー機能を持つために、内在性ペプチドと TAP を競合することなく効率良く ER に入り込んで HLA に結合・提示された可能性がある。また、改良されたとはいえ Tet-On システムはたとえテトラサイクリン不含の牛血清を用いても若干 leaky であると報告があったので、これもコントロールが十分できなかった理由と考えられた。

他方、K562 のような HLA 欠損株でない通常の HLA 発現を有する細胞では、HLA の発現が低下するだけで CTL に認識されなくなる現象がしばしば観察され、実際がんの免疫監視からの逃避機構として複数の報告がある。このため、HLA 分子と抗原エピトープを同時に Tet-On システムでコントロールするレトロウイルスベクターを構築した。この系で HLA を低下させて提示できるペプチドの絶対数を減らす方法の有用性を確認し、CTL での認識がでないほどまでコントロール幅が確保出来れば、他の抗原系にも同法を拡大する。さらに別々に (別々の場合は Tet-On とタモ

キシフェン誘導システム)でコントロールすることも考慮する。

これ以外の研究として、先に樹立した K562 に HLA-A2 と HA-1H mHAg を導入した細胞株と EH6-CTL をコントロールとして用いて、HLA-B*40:02 拘束性に造血幹細胞を傷害し再生不良性貧血を来す CTL クローンの機能評価を行うことができた。また、当初の予定であった腫瘍関連抗原については、現在国内外で臨床試験が行われている WT-1 ペプチドワクチン試験や養子免疫療法試験に応用可能な標準化細胞株を準備中である。mHAg 試験を実施した患者からの末梢血試料数は限られており、人工抗原提示細胞の開発途上で使うことは困難であった。上述の HLA、抗原同時にコントロールが出来る系の完成を待って、検討を行う予定である。

<引用文献>

Gatfield J, Lammert E, Nickolaus P, Münz C, Rothenfusser S, Fisch P, Stevanović S, Schild H, Rammensee HG, Arnold D. Cell lines transfected with the TAP inhibitor ICP47 allow testing peptide binding to a variety of HLA class I molecules. *Int Immunol*. 1998;10:1665-1672.

Haruta M1, Tomita Y, Yuno A, Matsumura K, Ikeda T, Takamatsu K, Haga E, Koba C, Nishimura Y, Senju S. TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Ther*. 2013;20:504-13.

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 5 件)

Inaguma Y, Akatsuka Y, Hosokawa K, Maruyama H, Okamoto A, Katagiri T, Shiraishi K, Murayama Y, Tsuzuki-Iba S, Mizutani Y, Nishii C, Yamamoto N, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Ogawa S, Emi N, Nakao S. Induction of HLA-B*40:02-restricted T cells possessing cytotoxic and suppressive functions against haematopoietic progenitor cells from a patient with severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. (in press) . 査読有 . doi: 10.1111/bjh.13464.

Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T,

Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther*. 2014;21:575-584. 査読有、doi: 10.1038/gt.2014.30.

Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *Hematol Oncol*. 2014;7:3. 査読有、doi: 10.1186/1756-8722-7-3.

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; 74:1103-1110. 査読有 doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.030.

Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. *Anticancer Res*. 2012; 32: 5201-5209. 査読有、<http://ar.iiarjournals.org/content/32/12/5201.full.pdf+html>

[学会発表](計 7 件)

赤塚美樹、赤堀泰、稲熊容子、葛島清隆、恵美宣彦 . 親和性の異なる HLA-A2 拘束性 HA-1H 特異的 CAR-T 細胞の機能解析 . 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、2014 年 9 月 6 日、芝罘会館 山内ホール (京都府京都市)

赤塚美樹、赤堀泰、稲熊容子、西村泰治、岡村文子、葛島清隆、恵美宣彦 . 異なった特異性をもつ HLA-A2 拘束性マイナー抗原 HA-1H 特異的 CAR-T 細胞の機能解析 . 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)

Inaguma Y, Akahori Y, Akatsuka Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y,

Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and Molecular Characterization Of a T-Cell Receptor- Like Antibody and CAR-T Cells Specific For Minor Histocompatibility Antigen HA-1H. The 55th ASH Annual Meeting, 2013年12月9日, New Orleans, 米国.

Akatsuka A, Demachi-Okamura A, Yamamoto Y, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and molecular characterization of a single chain antibody specific for HA-1 minor H antigen. 第72回日本癌学会総会, 2013年10月3日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

赤塚美樹、赤堀泰、稲熊容子、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、葛島清隆、恵美宣彦. HLA-A2 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H を認識する抗体の単離と CAR-T の機能. 第17回日本がん免疫学会総会. 2013年7月5日. ANAクラウンプラザホテル宇部(山口県宇部市).

赤堀 泰, 熊谷容子, 赤塚美樹, 山本幸也, 村山裕子, 伊庭佐知子, 遠藤明美, 平松可帆, 葛島清隆, 恵美宣彦. HLA-A2 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離とその臨床応用に向けての検討. 第35回日本造血細胞移植学会. 2013年3月8日. 石川県音楽堂(石川県金沢市).

Yoshiki Akatsuka, Hirofumi Taji, Yasuo Morishima, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodaera, Nobuhiko Emi, Toshitada Takahashi, Tomohiro Kinoshita, Kiyotaka Kuzushima. Vaccination with minor histocompatibility antigen-derived peptides in post-transplant patients with hematological malignancies - preliminary results. 2nd International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2012年11月6日, Natcher Auditorium (Bethesda, MD, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
該当なし

取得状況(計 0 件)
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA Yoshiki)
愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学
部・客員研究員
研究者番号: 70333391

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし