

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861446

研究課題名(和文) 癌幹細胞抗原DNAJB8を標的としたペプチド免疫療法の確立

研究課題名(英文) Identification of antigenic peptides from novel cancer stem cell antigen, DNAJB8

研究代表者

西澤 哲(Nishizawa, Satoshi)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90458076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HLA-A24拘束性ペプチドDNAJB8_22(9) (AYRKLALRW)、DNAJB8_99(9) (IFREFFGGL)の刺激により誘導された細胞傷害性T細胞(CTL)は抗原特異的なIFN- γ の産生と細胞傷害活性を有した。DNAJB8_22(9)はマウスDNAJB8の配列と一致した。HLA-A24とマウスのMHC class I分子、H-2Kdはそのアンカーモチーフが似ており、結合するペプチドが一致する傾向があることが一般的に知られている。そこでDNAJB8_22(9)をマウスに免疫すると、in vivoで誘導されたCTLはDNAJB8特異的なIFN- γ の産生と細胞傷害活性を有した。

研究成果の概要(英文)：Three candidate peptides were identified by peptide binding assay. Of the three HLA-A24 restricted peptide, DNAJB8_22(9) (AYRKLALRW) and DNAJB8_99(9) (IFREFFGGL) induced antigen specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), which presented peptide specific IFN- γ secretion and cytotoxic activity. The sequence of DNAJB8_22(9) is completely identical to murine DNAJB8. Since HLA-A24 restricted peptides were tended to be compatible with binding to murine MHC class I molecule, H-2Kd, we evaluated CTL induction in vivo by immunization of DNAJB8_22(9) in Balb/c mouse model. DNAJB8_22(9) immunization could also induced DNAJB8 specific IFN- γ production and cytotoxic activity in mice.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：DNAJB8 癌幹細胞 腫瘍免疫 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

腎癌は抗癌剤や放射線療法が奏功しにくく、手術療法が長らく治療の主体となっていた。1990年頃よりIL2やIFNといった非特異的な免疫療法が用いられるようになり、一部の症例で優れた治療効果を示す症例があるものの全体としての治療成績は満足できるものではなかった。近年、種々の分子標的薬が開発され臨床応用されてからは治療の選択肢は格段に広がったものの、完全寛解となる症例が少ないことや副作用の観点から、さらに治療成績の改善が望まれている。

2. 研究の目的

今回、我々は癌幹細胞に着目し、この細胞群に必須な分子を標的とした新しい免疫療法の確立を計画した。癌は形態学的、機能的に heterogeneous な細胞集団であり、その中に癌幹細胞 (Cancer stem-like cells/Cancer initiating cells; CSCs/CICs) と呼ばれる造腫瘍性の高い細胞集団の存在が報告されている (癌幹細胞仮説)。癌幹細胞は化学療法や放射線療法への抵抗性と関連し、治療後の再発・転移の原因と考えられている。さらに癌幹細胞は造腫瘍性が高く、癌幹細胞を標的とした治療は現在の癌治療の課題を克服する一助となり得る可能性がある。具体的には腫瘍起始 (Tumor-initiation) に関与する癌幹細胞が死滅すれば癌の再発、転移の予防が可能と予測され、また莫大な腫瘍細胞が存在する進行癌において、限られた細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を有用に利用するために少数の造腫瘍性の高い癌幹細胞を標的とすることは治療戦略として理にかなない、高い臨床効果が見込める。これまでに我々は新規癌精巢抗原 DNAJB8 が癌幹細胞に有意に発現し、癌幹細胞の機能維持に関わることを報告した (Nishizawa et al. Cancer Res, 2012)。すなわち DNAJB8 を標的とした免疫療法を確立することは癌幹細胞を根絶させる可能性を秘め、ひいては癌の根治を期待できると考えられる。今回我々は、癌幹細胞を標的とした免疫療法を確立するために HLA classI 分子のうち日本人で最も多い HLA-A24 に結合する DNAJB8 の抗原エピトープの同定を試みた。

3. 研究の方法

ペプチド結合アッセイ: Web 上で4つの候補ペプチド (DNAJB8(22-30) AYRKLALRW、DNAJB8(90-99) GYTFRNPEDI、DNAJB8(99-107)

IFREFFGGL、DNAJB8(143-151) AFMEAFSSF) を推定した。実際の HLA-A24 に対する結合能についてはペプチド結合アッセイで確認した。

HLA-A24 に結合する候補ペプチドを同定後、このペプチド免疫により、CTL が誘導可能かどうか後述の実験で検討した。

候補ペプチド刺激によるペプチド特異的 CTL 誘導の確認

IFN- γ アッセイ: HLA-A24 陽性健常者から CD8 陽性細胞を採取し、候補ペプチドを提示する抗原提示細胞 (PHA 芽球) で3回刺激し、effector 細胞とした。Target 細胞はペプチド刺激した T2A24 細胞 (TAP; transporter associated with antigen processing を欠損した細胞、内在性の抗原提示ができず、刺激したペプチドを効率的に提示できる) を用いた。Target 細胞に対する Effector 細胞の IFN- γ の産生を Flow cytometry で確認した。

LDH release アッセイ: 誘導した CTL の細胞傷害活性については LDH release アッセイで評価した。

DNAJB8_22(9) の配列はマウス DNAJB8 の配列と以下の通り完全に一致した。

DNAJB8 (22-30) **AYRKLALRW**

Murine DNAJB8 sequences

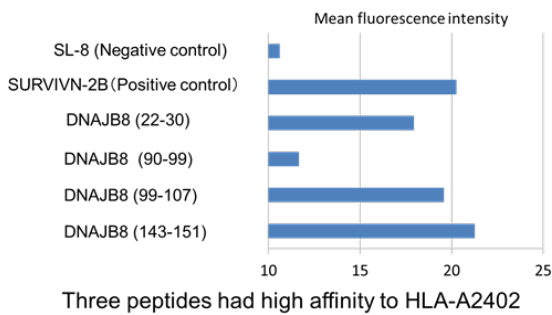
MANYEVLGVQSSASPEDIK**AYRKLALRW**HPDKNPNDKKEAEK
KFKQVSEAYEVLSDSKKRSVYDRAGCDRWRAGGGANVPSSPF
GAGYFPRNPEDIFREFFGGLDPFSFEFWDTPFSGRGRPHGLHRVF
PSGFGEFPFMEALSSFNTLGHGGGRSTFSSASFSGSGSSGFKS
VMSSTEMVNGRQVTTKRIENGQERVEEDGQLRSVTVNGKEKL
MRVDK

The identified human DNAJB8 derived peptide (22-30) sequences are completely identical to murine Dnajb8

HLA-A24 とマウスの MHC classI 分子、H-2Kd はそのアンカーモチーフが似ており、結合するペプチドが一致する傾向があることが一般的に知られている。そこで DNAJB8_22(9) をマウスの皮下に1週間おきに IFA とエマルジョン化させたペプチドを計2回免疫し、腫大したリンパ節から採取したリンパ球を用いて抗原特異的な IFN- γ の産生 (IFN- γ アッセイ) と細胞傷害活性 (LDH release アッセイ) を検討し、in vivo で CTL が誘導できるかを確認した。

4. 研究成果

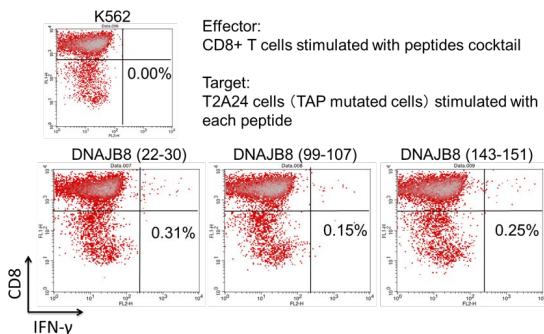
ペプチド結合アッセイにより以下の候補ペプチドを同定した。候補ペプチド: DNAJB8(22-30) AYRKLALRW、DNAJB8(99-107) IFREFFGGL、DNAJB8(143-151) AFMEAFSSF)



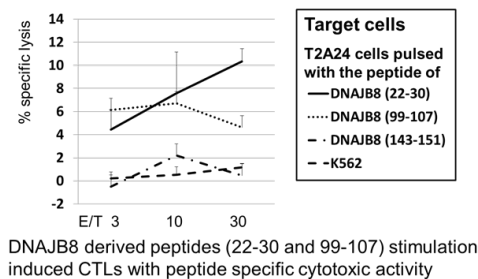
Three peptides had high affinity to HLA-A2402

IFN- アッセイ

Target 細胞の control として用いた K562 (MHC class I が低発現のため、CTL の標的にされにくい) に対しては、Effector 細胞による IFN- の産生を認めず、候補ペプチドで刺激した T2A24 細胞に対しては、それぞれ IFN- 産生が確認され、ペプチド刺激による CTL の誘導が示された。



LDH release アッセイ: DNAJB8(22-30)、DNAJB8(99-107)で刺激した T2A24 細胞に対して、誘導した CTL による細胞傷害活性を認めた。

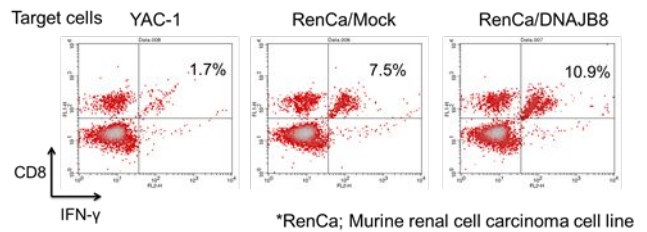
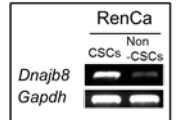


DNAJB8 derived peptides (22-30 and 99-107) stimulation induced CTLs with peptide specific cytotoxic activity

IFN- アッセイ

マウスの in vivo の免疫実験系においても採取したリンパ節より得られた CD8 陽性細胞より、抗原特異的な IFN- の産生を認めた。

Effector: Lymphocytes extracted from lymph nodes of immunized mouse
 Target: YAC-1, *RenCa/Mock, RenCa/DNAJB8 (stable transformants)

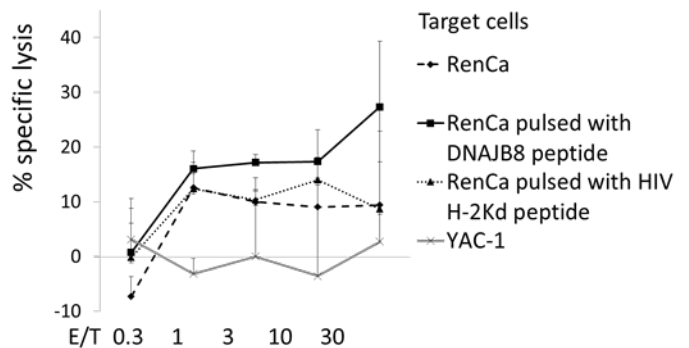


*RenCa; Murine renal cell carcinoma cell line

IFN-γ secretion against RenCa was confirmed in the lymphocytes from immunized mouse

LDH release アッセイ

免疫マウスより採取したリンパ節より得られた CD8 陽性細胞から、抗原特異的な細胞傷害活性を認めた。



Lymphocytes from DNAJB8 immunized mouse showed peptide specific cytotoxic activity

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)

Morita R, Nishizawa S, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sokolovskaya A, Kochin V, Kondo T, Hashino S, Asaka M, Hara I, Hirohashi Y, Sato N., Heat shock protein DNAJB8 is a novel target for immunotherapy of colon cancer-initiating cells., Cancer science, 2014 Apr;105(4):389-95. doi: 10.1111/cas.12362

査読有り

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

西澤 哲 (NISHIZAWA, Satoshi)

和歌山県立医科大学 医学部 博士研究

員

研究者番号：[90458076](#)