

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870992

研究課題名(和文) pMHC複合体を認識する抗体の特性と生物学的機能の解明

研究課題名(英文) Characteristics and biological function of anti-pMHC antibody

研究代表者

小松 誠和 (Komatsu, Nobukazu)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：50343687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドワクチン臨床試験に参加の被験者末梢血より、pMHC複合体を認識する抗体を表面プラズモン共鳴により検出した結果、一部の検体において非常に低い親和性・結合量ながら、pMHC複合体に対する抗体が検出された。抗pMHC抗体の精製はその低い親和性により困難であったため、プロテインGによるIgG精製後、抗体依存性細胞傷害活性を調べたが陰性であった。ヒト末梢血単核球をペプチド刺激する際に抗体を添加培養すると統計学的有意差は得られなかったがIFN gamma産生が増加する傾向にあった。以上より抗pMHC抗体はペプチドワクチンの抗腫瘍効果における主たる作用機序ではなく、副次的なものと推測された。

研究成果の概要(英文)：I have demonstrated surface plasmon resonance analysis for an antibody recognized pMHC complex in human peripheral blood. Antibody was detected, albeit low affinity and low binding levels. Then, IgG fraction was purified from plasma sample by protein G column chromatography. During CTL stimulation assay, IFN-gamma production was increased in PBMC cultured with peptide, IgG fraction, although it is not significant statistically. However IgG fraction is not effective cytotoxicity mediated by ADCC. Therefore, an antibody recognized pMHC complex is not seem to be main cytotoxic mechanism during peptide vaccination therapy.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：抗体 ペプチド・MHC複合体

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、HLA クラス I 分子に提示され、宿主 T 細胞の標的分子となる抗原ペプチドを用いたペプチドワクチン療法の臨床研究を実施しており、いくつかのがん種では、ワクチンを投与した患者群で有意な延命効果が認められている。

すい臓がんを対象としたペプチドワクチン療法の臨床試験のサブ解析では、投与ペプチドに対する免疫反応の増加した群の生存期間の中央値は 15 カ月であったのに対し、投与ペプチドに対する免疫反応の増加しなかった群の生存期間の中央値は 7 カ月であった(小松ら 2009 年第 68 回日本癌学会学術総会、柳本ら 2010 年 Oncology Report、図 1 参照)。このほか、国内・国外の研究においてもがんワクチンの抗原に対する免疫反応の増加が臨床効果と関連する報告も多数報告されていることから、ペプチドワクチン療法において、免疫機能が臨床効果に大きく関与していることは明らかだと思われる。

さらに、ペプチドワクチン臨床試験に参加の患者血液を解析すると、臨床効果の得られた患者の多くは、ワクチン投与により細胞傷害性 T 細胞の機能増加がもたらされたのみならず、ペプチドに対する抗体が増加していることが確認されている。本来、T 細胞エпитープと B 細胞エピトープは異なっており、T 細胞も B 細胞もその役割が異なっていることが知られている。これまでに実施の臨床試験において、T 細胞エピトープペプチドに対する抗体の存在が明らかになっているが、その特性と生物学的機能は未だ多くの点不明である。

一方で、がん抗原ペプチドに対する抗体についても、MHC と複合体を形成したがん抗原ペプチドに対しては、立体構造の面から抗体が結合しないと考えられていたが、近年、国外にて抗原ペプチド・MHC (pMHC) 複合体を認識するモノクローナル抗体が作製され、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) を誘導することや、細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている (Vaughan P ら 2012 年 The Journal of Immunology)。しかしながら、ヒト血液中で pMHC 複合体に対する抗体の報告はこれまでのところ皆無である。

2. 研究の目的

ペプチドワクチン臨床試験に参加のがん患者血液を試料とし、pMHC 複合体に対する抗体を検出する。pMHC 複合体に対する抗体が陽性を示す患者資料を選択し、抗体精製及び表面プラズモン共鳴により、その特性について解析する。

さらに、これらの抗体が示す生物学的機能について解析し、がんワクチンの作用機序への pMHC を認識する抗体の関与について考察する。

3. 研究の方法

(1) 久留米大学医療に関する倫理委員会へ

申請し承認を受け、血液試料を収集する。

(2) ペプチドワクチン臨床試験に参加した患者の血液を試料として、表面プラズモン共鳴により pMHC 複合体に対する抗体を検出する。

(3) 抗体精製ののち、抗体の特性について解析する。

(4) 精製された抗体を用い、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性、リンパ球の増殖に与える影響等について検討する。

4. 研究成果

(1) 血液試料の収集

ペプチドワクチン投与前、並びに 1 クール毎に血液試料を収集し、血漿を分離、さらに比重遠心密度勾配法により PBMC を分離保存した。

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) によるペプチド・MHC 複合体を認識する抗体の検出
センサーチップにキャプチャー抗体 (抗マウス Ig 抗体) を固相し (図 1-1)、その後 BD 社 Dimer X I (HLA-A2:Ig Fusion Protein) を固相した (図 1-2)。そこに、候補ペプチドを添加しペプチド・MHC 複合体を形成した (図 1-3)。次にペプチドワクチン臨床試験被験者試料をアナライトとして pMHC 複合体との分子間相互作用の解析を行った (図 1-4)。その結果、試料中に微弱ながら pMHC 複合体と相互作用を有するものを確認した。

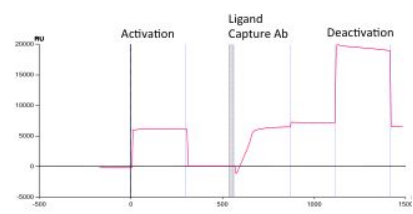


図 1-1
キャプチャー抗体の結合例

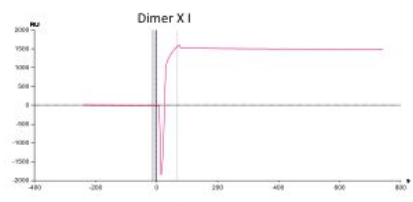


図 1-2
Dimer XI の結合例

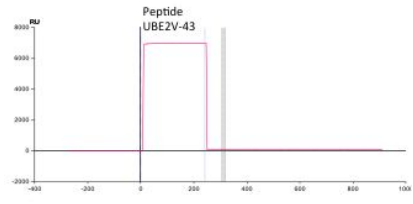


図 1-3
ペプチドの結合例

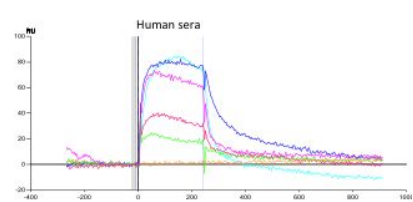


図 1-4
試料の解析例

(3) 抗体精製とその pMHC 複合体との分子間相互作用の解析

pMHC 複合体と微弱ながら相互作用を認めた試料について Protein G 並びにペプチドアフィニティーによる精製を行った。多くの試料は精製により活性を消失する結果であった。C 型肝炎ウイルス由来ペプチドを提示した MHC と相互作用する検体が精製後の活性を微弱ながら認めた (図 2)。

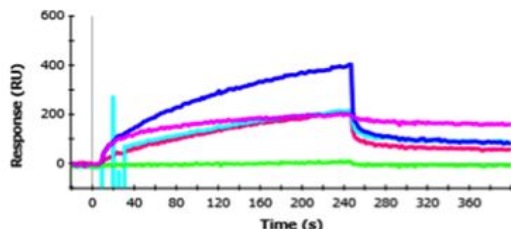


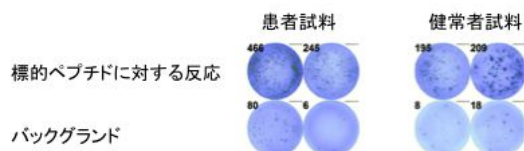
図 2
Protein G 並びにペプチドアフィニティー精製後の pMHC 複合体と試料の相互作用例
ProteinG 精製: 黄緑・ワクチン投与前試料、
ピンク・ワクチン投与 42 回後試料
ペプチドアフィニティー精製: 赤: ワクチン投
与前試料、水色・ワクチン投与 42 回後試料、
青色・ワクチン投与 52 回後試料

(4) 抗体の生物活性についての検討

まず、試料の補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性について検討した。陰性コントロールとして健常者試料を用いた場合、7-AAD 染色陽性細胞が 15.2%、陽性コントロールとしてリツキシマブを使用した場合が 27.2%であったのに対し、pMHC 複合体と相互作用を有する試料は 14.5%となり、CDC 活性は検出されなかった。また、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性についても同様に、健常者試料と比して有意な差は認められなかった。

次に患者 PBMC 培養に対する試料の影響について検討した。患者 PBMC 培養時にペプチドを添加し、さらに試料を添加したものとしていないものを設定し 2 週間培養した。その後、ペプチドパルス標的細胞と共培養し、インターフェロンガンマの産生を ELISPOT 法により検出した。その結果、患者試料を添加して培養したものが、添加なしのもの及びコントロールである健常者試料を添加して培養したものよりインターフェロンガンマの産生が多いような傾向にあったが、統計学的な有意差は得られなかった (図 3)。

図 3



患者 PBMC 培養・活性化における抗体試料の影響

以上の結果より、ペプチドワクチン投与患者の一部の患者の血液中には pMHC を認識する抗体の存在が認められたが、その反応は微弱なものであった。それらの CDC や ADCC 活性は認められなかったが、PBMC 培養においてインターフェロンの産生を増強する傾向が認められたものの統計学的な有意差は得られなかった。調べた生物活性について、強力な作用は認められなかったことから、pMHC を認識する抗体はペプチドワクチンの抗腫瘍効果における主たる作用機序ではなく、副次的なものと推察された。

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 4 件)

Yutani S, Komatsu N, Yoshitomi M, Matsueda S, Yonemoto K, Mine T, Noguchi M, Ishihara Y, Yamada A, Itoh K, Sasada T. A phase II study of a personalized peptide vaccination for chemotherapy-resistant advanced pancreatic cancer patients. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1094-100. doi: 10.3892/or.2013.2556. 査読有

Matsueda S, Komatsu N, Kusumoto K, Koga S, Yamada A, Kuromatsu R, Yamada S, Seki R, Yutani S, Shichijo S, Mine T, Fukuda T, Okamura T, Okuda S, Sata M, Honda J, Kaji M, Itoh K, Sasada T.

Humoral immune responses to CTL epitope peptides from tumor-associated antigens are widely detectable in humans: a new biomarker for overall survival of patients with malignant diseases. *Dev Comp Immunol.* 2013 Sep;41(1):68-76. doi: 10.1016/j.dci.2013.04.004. 査読有

Komatsu N, Jackson HM, Chan KF, Oveissi S, Cebon J, Itoh K, Chen W.

Fine-mapping naturally occurring NY-ESO-1 antibody epitopes in melanoma patients' sera using short overlapping peptides and full-length recombinant protein. *Mol Immunol.* 2013 Jul;54(3-4):465-71. doi: 10.1016/j.molimm.2013.01.014. 査読有

Komatsu N, Matsueda S, Noguchi M, Yamada A, Itoh K, Sasada T.

Personalized peptide vaccine as a novel immunotherapy against advanced cancer. *Molecular Vaccines 2013 PartIV:* 361-369. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1419-3_21 査読無

[学会発表](計 1 件)

Itoh K, Noguchi M, Tamada A, Shichijo S, Sasada T, Matsueda S, Komatsu N. Recent advances of peptide-based cancer vaccine. 2014/09/25-2014/09/27, 第 73 回日本癌学会

学術総会，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔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：
出願年月日：
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

小松 誠和 (Komatsu, Nobukazu)
久留米大学医学部・講師
研究者番号：50343687

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：