

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871227

研究課題名(和文) 活性型変異Rasによって誘導されるオートファジー介在性抗原提示機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of antigen presentation mediated with constitutively active autophagy that induced by K-ras mutation

研究代表者

岡村 文子 (Demachi-Okamura, Ayako)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・主任研究員

研究者番号：10546948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：活性型K-ras変異が誘導するオートファジーと、それに依存した抗原提示機構を検討した。K-rasの変異を持たない不死化した正常細胞株に活性型K-ras変異(G12V)遺伝子を導入したところ、高活性オートファジーが誘導された。それに伴い、オートファジーを介したCTLエピトープが生成されるようになった。これらのことから、K-rasの変異を持ち、高活性オートファジーが働いている膵臓癌においては、抗原提示機構としてその過程を利用していることが推測された。このことからがん免疫において新たな抗原提示機構の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The association of K-ras mutation and constitutively active autophagy was investigated. To this end, immortalized normal epithelial cell line was transduced with mutated K-ras gene (G12V). The mutated K-ras-expressing cells had constitutively active autophagosomes. As a results, the cells produced autophagosome-dependent epitopes. These data suggest that the pancreatic cancerous cells having mutated K-ras gene possess tumor-specific antigen presenting machinery.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CTL がん 免疫 オートファジー 膵臓癌

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が認識するエピトープペプチドの生成過程の概略は以下のとおりである。すなわち、抗原となるタンパク質が細胞質内でプロテアソームによっておおまかに切断された後、トランスポーター蛋白質を介して小胞体内へ運ばれる。小胞体内へ輸送されたペプチド断片はペプチダーゼによって弱冠の短縮を受けた後、いくつかのシャペロン蛋白質の助けを借りてHLAとの複合体を形成する。完成したHLA/ペプチド複合体はゴルジ装置を経由して細胞表面に提示される。この抗原提示システムは正常細胞とがん細胞において基本的に共通しているため、CTLが腫瘍細胞に提示されている標的抗原を認識するか否かは、標的となる蛋白質の発現が「あるか否か」、あるいは発現程度が「高いか低い」によってのみ決定されると考えられてきた。言い換えると、がん細胞を選択的に傷害するCTLは、がん細胞を選択的に発現している標的蛋白質由来エピトープを認識するものに限られている、と考えられてきた。

(2)一方、我々は正常細胞にも発現している puromycin-sensitive aminopeptidase (以下、PSA と略) 内にコードされるペプチドは、正常細胞表面には提示されないが、膵がんなど一部のがん細胞の表面には HLA-A*24:02 分子によって提示されていることを見出した。その結果、このエピトープに特異的な CTL クローン 16F3 は、あたかもがん細胞に特異的な抗原を認識するかのごとく振舞うことを明らかにした (Demachi-Okamura A, et al. *PLoS ONE*, 2012)。この現象は膵臓癌細胞株において、高活性のオートファジーを介していることを明らかとした。さらに高活性のオートファジーの有無は膵臓癌に多くみられるがん遺伝子である

2. 研究の目的

これまでの結果を踏まえて、がん化に伴う *K-ras* 遺伝子の活性型変異と恒常的高活性オートファジーの誘導およびエピトープ産生の関連を詳細に検討して、その分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

この現象が真に活性型変異を有する *K-ras* 遺伝子によって引き起こされるものであるかを明らかにするために、正常細胞への活性型 *K-ras* 変異遺伝子導入実験を行う。使用する活性型変異は膵臓癌を含む多くの癌で変異が見られる 12 番目のグリシンに対するもので、バリンに置換された G12V である。活性型 *K-Ras* 変異(G12V)遺伝子導入後、オートファジーが誘導されたかどうかを、オートファゴソームマーカーである LC3 の有無を調べて検討する。LC3 の有無は特異的抗体を用いる免疫染色を行った後、蛍光顕微鏡で観察して特徴的なドットが顕れるかで判定するか、ウ

ェスタンプロット法にてオートファジーによる分解を特異的に阻害した状態としない状態のサンプルを比較することで判定する。オートファジーが亢進したことが明らかとなった後に、PSA エピトープが提示されているかどうかを、オートファジー介在性エピトープを認識する CTL クローン(16F3)との混合培養した後に培養上清中の IFN- γ 産生量を ELISA 法にて定量することで解析する。

4. 研究成果

(1)*K-ras* 遺伝子の活性型変異と恒常的高活性オートファジーの誘導およびエピトープの産生の関連を明らかにするために、まず正常細胞株を用いて検討した。*K-ras* 遺伝子の活性型変異を持たない正常細胞株として、ヒト正常乳腺上皮細胞(MCF10A)を用いた。この細胞に *K-ras* 遺伝子の活性型変異(G12V)遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて安定発現細胞を作製し、ウェスタンプロット法にて *ras* の発現が増加していることを確認した(図1)。

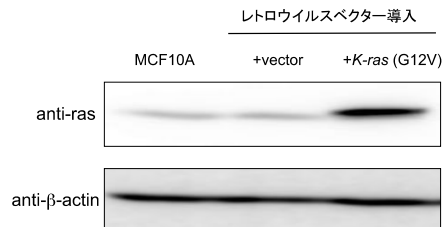


図1 MCF10A細胞および*K-ras*遺伝子導入細胞における *ras*蛋白質の発現確認(ウェスタンプロット法)

次にこの細胞におけるオートファジーレベルをマーカーである LC3 の免疫染色法にて確認したところ、活性型 *K-ras* 変異(G12V)遺伝子の導入細胞において、顕著に高活性のオートファゴソームが観察された(図2)。

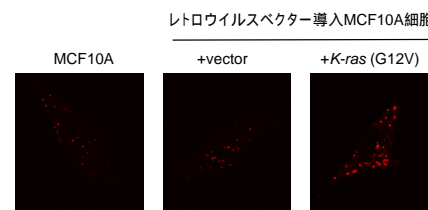


図2 MCF10A細胞および*K-ras*遺伝子導入細胞における LC3蛋白質の発現確認(免疫染色法)

この細胞に対する免疫応答を検討するために、抗原ペプチドを提示する HLA-A24 が発現しているかどうか調べたところ、MCF10A は発現していなかった(図3)。そこで、レトロウイルスベクターで HLA-A24 およびコントロールとして HLA-A02 をそれぞれ導入して、発現細胞を作製した。HLA 導入細胞における細胞表面における HLA の発現は、それぞれ特異的抗体を用いて染色した後、フローサイトメ

ーターにて測定した(図3)。

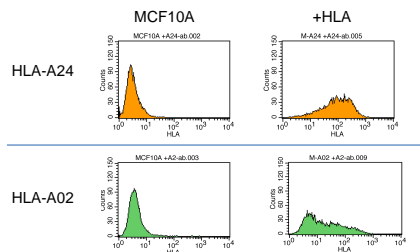


図3 MCF10A細胞およびHLA遺伝子導入細胞における細胞表面HLAの発現確認 (FACS解析)

次に、オートファジー依存性かつ HLA-A24 拘束性である PSA 特異的 CTL クローン(16F3) によってこれらの細胞が認識されるかいなかを共培養することによって産生される IFN- γ を ELISA 法にて測定した(図4)。その結果、MCF10A 細胞に活性型変異を持つ *K-ras*(G12V) 遺伝子と HLA-A24 の両方を発現する細胞に対して、免疫応答があった。このことから、活性型 *K-ras*(G12V) 遺伝子の変異によって高活性オートファジーが誘導された結果、PSA エピトープが産生されるようになったという過程が実証された。

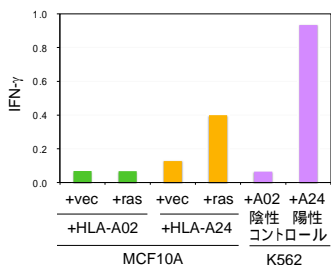


図4 MCF10A細胞および*K-ras*およびHLA遺伝子導入細胞に対するCTL応答(ELISA法)

次に、活性型 *K-ras* 変異(G12V) 遺伝子を有する膵臓癌発生過程においても同様の現象が観察されるか検討するために、ヒト正常膵管上皮細胞を用いて、同様の実験を行った。ところが、活性型 *K-ras* 変異(G12V) 遺伝子を導入した細胞において、oncogene-induced senescence(OIS)が生じてしまった。これは正常細胞にがん遺伝子を導入した場合にしばしば見られる現象で、発癌因子によって細胞老化が誘導され、正常細胞であるために発癌防御機構が働いたことに起因すると考えられる。このため、正常膵管上皮細胞に癌抑制遺伝子である p53 の発現を抑制したり、癌遺伝子である c-myc の強制発現させて、膵臓癌発生過程に働く機構を模倣しつつ、活性型 *K-ras* 変異(G12V) 遺伝子による OIS を回避しようと試みた。その結果、OIS を回避することに成功し、細胞老化は見られなかった。ところが、活性型 *K-ras* 変異(G12V) 遺伝子を導入しても、オートファジーの誘導はみられなかった。これは p53 の発現抑制および c-myc 遺伝子の強制発現の順番を変えて、活性型

K-ras 変異(G12V) 遺伝子を導入しても同様にオートファジーの誘導は起きなかった。これらのことから、正常細胞において活性型 *K-ras* 変異(G12V) 遺伝子によるオートファジーの誘導は、p53 の発現抑制や c-myc の強制発現以外にも必要な因子や環境が存在する可能性が示唆された。

PSA エピトープの抗原提示の生成には、プロテアソームとオートファゴソームが必要であることをこれまでに明らかにしてきた。プロテアソームと同様に抗原提示機構で働いている transporter associated with antigen (TAP)が必要であるかどうかを検討した。TAP1 の発現を siRNA で抑制した膵臓癌細胞株に対しても、CTL クローン(16F3)が非常によく認識した。このことから、TAP の発現が低下した細胞においても本エピトープが生成されていることが明らかとなった。TAP 遺伝子の欠損や発現低下はがん細胞においてのみ見られ、TAP 非依存性エピトープはがんを対象とした免疫療法においては有用性が高いと考えられる。

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4件)

(1)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*. 査読有 172, 2016, 131-134. doi: 10.1111/bjh.13464.

(2)Yamada E*, Demachi-Okamura A*, Kondo S, Akatsuka Y, Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Kuzushima K. (Equal contribution) Identification of a naturally processed HLA-Cw7-binding peptide that cross-reacts with HLA-A24-restricted ovarian cancer-specific CTLs. *Tissue Antigens*. 査読有 86, 2015, 164-171. doi: 10.1111/tan.12607.

(3)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*. 査読有 21, 2014, 575-584. doi: 10.1038/gt.2014.30.

(4)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. (*Equal contribution) 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. 査読有 74, 2013, 1103-1110. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.030.

〔学会発表〕(計5件)

(1)招待口演

岡村文子、葛島清隆 人工抗原提示細胞を用いたCTLの誘導とがん細胞特異的エピトープ生成過程について 第18回日本がん免疫学会総会 2014年8月1日 愛媛県松山市 ひめぎんホール

(2)一般口演

岡村文子、赤塚美樹、葛島清隆 An analysis of TAP-independent epitope created in cancerous cells 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場

赤塚美樹、赤塚泰、稲熊容子、西村泰治、岡村文子、葛島清隆、恵美宣彦 異なった親和性を持つHLA-A2拘束性マイナー抗原HA-1を認識する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 愛媛県松山市 ひめぎんホール

赤塚美樹、岡村文子、山本幸也、西村泰治、高橋利忠、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-1認識抗体の開発と応用 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

岡村文子、葛島清隆 K-rasの活性化変異に伴う高活性オートファジーによるCTLエピトープの産生 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会 2013年8月24日 愛知県名古屋市 ウィンク愛知

〔図書〕(計1件)

(1)岡村文子、葛島清隆、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、2014、645-648

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/05shuyo_menekii/index.html#member

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 文子 (DEMACHI-OKAMURA AYAKO)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・主任研究員(常勤)

研究者番号: 10546948

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし