

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430179

研究課題名(和文) 樹状細胞選択的がんワクチンデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of dendritic cell-selected, cell penetrating peptides useful for antigen presentation

研究代表者

葛島 清隆 (Kuzushima, Kiyotaka)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・部長

研究者番号：30311442

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)：ペプチド-cDNAライブラリーを用いて、樹状細胞に特異的に侵入する10個程度のアミノ酸からなる細胞透過性ペプチド(CPP)を同定した。蛍光物質としてFITCおよびGFPをこれらのペプチドに融合したものを種々の細胞にパルスする実験結果から、同定したペプチドは樹状細胞、B細胞、単球等のミエロイド系の細胞に透過し易い性質を有していることが判明した。非選択的CPP(R10;アルギニン10個)、2種類の同定したDC選択性CPP(H03LとF04L)にCTLエピトープを付加した長鎖ペプチドを用いた実験結果から、H03LとF04LはR10に比べて、DCおよびB細胞上での抗原提示が線維芽細胞上より優れていた。

研究成果の概要(英文)：By means of a peptide-conjugated cDNA library screening method, several dendritic cell (DC)-selected, cell penetrating peptides (CPP) have been identified. These CPP, namely H03L and F04L, when fused to a CTL target antigen, exert presentation more effectively on DC than on fibroblast cells. The antigen presentation by H03L and F04L on DC was superior to that of R10, which is a non-selective CPP. Then H03L and F04L were respectively fused to FITC or recombinant green fluorescence protein(GFP). R10 was used as a (non-selective) CPP control. These fluorescent molecules were pulsed on in vitro induced DC, peripheral lymphocyte, EBV-infected B-lymphoblastoid cells or fibroblast cells. After incubated and washed, they were analyzed on a flow cytometer. Both H03L and F04L effectively penetrated not only into DC but also peripheral monocytes and the B-lymphoblastoid cells. These results indicate the identified CPP are not exclusively selective to DC, but to myeloid lineage cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：樹状細胞 細胞透過性ペプチド 細胞傷害性Tリンパ球 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

がん細胞を特異的に認識して攻撃する細胞傷害性 T リンパ球 cytotoxic T-lymphocyte (CTL)の動きを利用した新しい治療法が期待されている。CTL は、がん細胞の細胞質内でプロテアソームによって切断された蛋白由来のエピトープペプチド (通常 8-10 個程度のアミノ酸から構成される) を認識する。このペプチドは細胞表面において、主要組織適合抗原複合体 major histocompatibility complex (MHC)によって CTL に提示される。MHC はマウスでは H-2、ヒトではヒト白血球型抗原 human leukocyte antigen (HLA) にそれぞれ相当する。

CTL の活性化には MHC/ペプチド複合体とともに、CD80, CD86, 4-1BBL などの副刺激分子が同じ細胞上に発現していることが必要である。樹状細胞 dendritic cell(DC)がプロフェッショナル抗原提示細胞と言われるのはこれらの分子を強く発現しているからである。副刺激分子の無い細胞においてエピトープペプチドが CTL に提示されると、その CTL はアナジーと呼ばれる活動不全状態に陥るかアポトーシスによって死滅する。以上が CTL 活性化の基礎的事項である。

次に臨床応用面についての背景を述べたい。がん患者体内の CTL を能動的に活性化する方法は広い意味で“がんワクチン”と称される。本邦では、エピトープペプチドを免疫原として接種する“ショートペプチド”ワクチンの臨床試験が広く実施されているが、この方法は免疫誘導においていくつかの本質的な問題が指摘されている(Hailemichael Y, et al. *Nature Medicine*, 2013)。要約すれば、「ショートペプチドは CTL の刺激誘導には適さない、DC 以外の細胞表面の MHC にも直接結合し提示されるため、CTL のアナジーやアポトーシスを引き起こしてしまうこと」である。

2. 研究の目的

このようなショートペプチドワクチンの問題点と解決の方向性を考察した結果、本研究では下記の仮説を実験レベルで検証することを目的とした。

- (1) 免疫原を DC に集積することができれば、がんワクチンの効果を改善する可能性が高い、
- (2) DC において蛋白抗原は一旦細胞室内に入り、その後切断を受けて細胞表面に提示される、
- (3) DC に選択的に侵入する細胞透過性ペプチド cell-penetrating peptide(CPP)を同定できればこれを達成することができる (図1)。

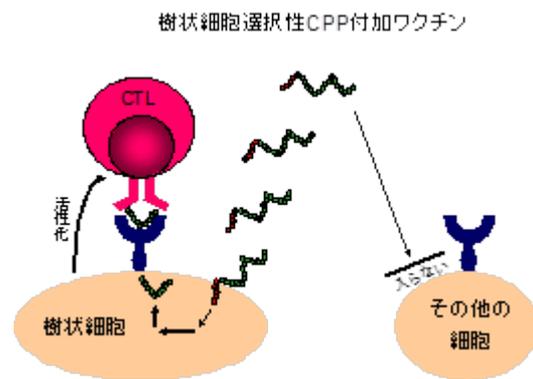


図1. 本申請の目的を表現した模式図。

樹状細胞(DC)に選択的に透過できる細胞透過性ペプチド cell-penetrating peptide(CPP)を付加した抗原蛋白は、DCの細胞内に侵入した後、抗原処理プロセスによってエピトープペプチドに切断され細胞表面に提示される。一方、このCPPはDC以外の細胞には侵入しないので、それらの細胞表面においてCTLに提示されることはない。この結果、CTLは増殖や分化に有利なシグナルのみをDCから受ける。

では具体的に、DCに選択的に侵入するCPPをどのような方法で得ることができるだろうか？ 研究分担者の近藤は、ランダムペプチドライブラリーの中から標的とする細胞系列に特異的に高浸透能を有するCPPを分離する技術を確立した(Kondo E, et al, *Nature Commun*, 2012)。mRNAディスプレイ法を基盤とする本技術を用いて、各種がん細胞に選択的に侵入し正常細胞には侵入し

ない CPP が多数同定された。がん細胞特異的に薬剤を導入する新しいデリバリーシステムとして注目されている。本研究では、この技術を用いて DC に選択的に侵入する CPP 配列を同定し、抗原デリバリーシステムとして応用の可能性を検討することを具体的な研究目標とした。

3. 研究の方法

(1) DC 透過性ペプチドの同定：

健康成人末梢 CD14 陽性細胞から GM-CSF と IL-4 で誘導した DC を、ペプチドライブラリー(実際にはペプチド-cDNA キメラ分子)と数時間混合培養し、細胞内に侵入したペプチドに結合している cDNA を PCR で増幅した。In vitro transcription 法および translation 法でライブラリーを再編し、再度 DC 透過実験を行った。この操作を数回繰り返すことでライブラリー内の DC 透過クローンを濃縮し、DC に高効率で透過する候補ペプチドの配列を決定した。

(2) 同定した CPP の細胞選択性の検討：

同定された DC 透過性ペプチドの N-末端に蛍光色素 FITC を結合させた分子および C-末端に蛍光発色タンパクの green fluorescence protein(GFP)を結合させた分子を作製した。細胞選択制のない CPP としてよく知られている R9 (アルギニンを 9 個繋げたペプチド) 2 種類の同定した DC 選択性 CPP、H03L と F04L をそれぞれ付加した GFP、および CPP を付加していない GFP を大腸菌リコンビナントタンパクとして作製・精製した。DC、末梢血単核球、EBV 感染 B-リンパ芽球 (lymphoblastoid cell line; LCL) および線維芽細胞に、これらの蛍光ラベル CPP を一定時間 5 μ M の濃度でパルスした後、十分に洗浄し、蛍光顕微鏡下に観察するとともにフローサイトメーターにて蛍光強度を測定した。

(3) CPP を融合した CTL エピトープの各種細

胞におけるプロセッシングと CTL への抗原提示の比較検討：

CPP 結合部位の検討：

まず初めに、CPP に融合した抗原が細胞質内に侵入し、プロセスを受けた後に細胞表面に提示される際に、抗原の N-あるいは C-末端のいずれに CPP を融合することが望ましいかを検討した。この目的で、ミエロイド系の細胞に選択性を持つ CPP44(アミノ酸配列 KRPTMRFRYTWNP MK, Kondo E, et al, *Nature Commun*, 2012)を使用した。抗原提示細胞として、レンチウイルスベクターで HLA-A*24:02 を導入した K562 細胞、HLA-A*24:02 を保有する健康成人末梢血リンパ球から樹立した LCL(以上 CPP44 好選択性)および HLA-A*24:02 陽性・線維芽細胞 (CPP44 非選択性)を使用した。ヒトサイトメガロウイルス (CMV) pp65 由来の HLA-A*24:02 拘束性エピトープに CPP を融合したペプチドを段階希釈してそれぞれの細胞にパルスした後、CMV 特異的 CTL クローンと混合培養し、上清に放出されたインターフェロン (IFN) を ELISA 法で測定した。

同定した DC 透過性 CPP の抗原デリバリー機能の検討：

次に、2 種類の同定した DC 透過性 CPP (H03L と F04L) の C-末端側に、リンカーに続き CMVpp65 由来の HLA-A*24:02 拘束性エピトープを含む 25 アミノ酸を付加した長鎖ペプチドを作製した。細胞選択制のない R10 (アルギニンを 10 個繋げたペプチド) を CPP とした同構造物も作製した。それぞれの長鎖ペプチドを段階希釈して HLA-A*24:02 導入 K562 細胞、HLA-A*24:02 陽性の LCL および線維芽細胞にパルスした後、CMV 特異的 CTL クローンと混合培養し、上清に放出された IFN を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) DC 選択的透過性ペプチドの同定：

同定されたペプチドは 10 個程度のアミノ酸から構成されていた。これらのペプチドの N-末端に蛍光色素 FITC を結合させた分子は、DC に高効率で透過し、ヒト線維芽細胞にはほとんど透過しなかった。代表的な蛍光顕微鏡での観察結果を図 2 に示す。

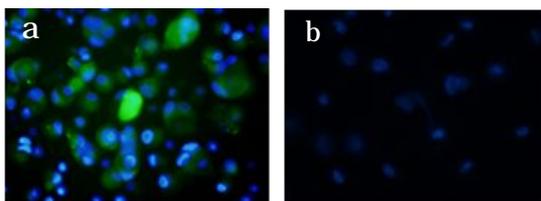


図 2. 同定した CPP は DC に選択的に取り込まれる。同定した CPP を蛍光色素 FITC 標識して樹状細胞(a)および線維芽細胞(b)に 5 μ M、3 時間、37 $^{\circ}$ C の条件で加えた後洗浄し、顕微鏡下に撮影した結果を示す。

(2) 同定した CPP の細胞選択性の検討：

FITC を各 CPP に融合したものを種々の細胞にパルスした後、フローサイトメーターを用いて解析した結果、同定したペプチドは樹状細胞、B 細胞、単球等のミエロイド系の細胞に透過し易い性質を有していることが判明した。

また、GFP 融合 CPP を用いた解析結果では、いずれの細胞においても R9 を付加した GFP が最も効率よく浸透した。同定した 2 種類の DC 選択性 CPP の中では、F04L が LCL (ミエロイド系の代表細胞として使用) により選択的に浸透している結果が得られた。

(3) CPP を融合した CTL エピトープの各種細胞におけるプロセッシングと CTL への抗原提示の比較検討：

CPP 結合部位の検討：

CMVpp65 由来の HLA-A*24:02 拘束性エピトープペプチドの N-末端に CPP44 を融合した場合に、CPP44 が有するミエロイド系の細胞への選択的透過性が発揮された。これに対して、抗原の C-末端に CPP44 を融合した場合には、この選択性が消失した (図 3)。

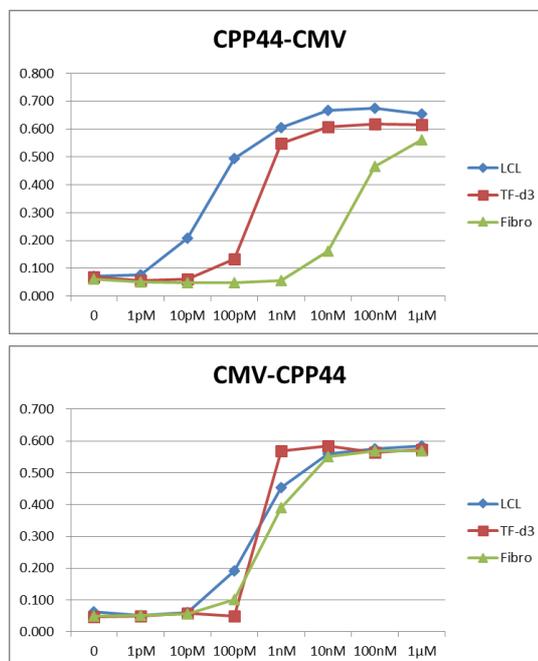


図 3. CTL エピトープの N-末端に CPP44 を融合したペプチド (図上: CPP44-CMV) は、CPP44 が有するミエロイド系の細胞 (ここでは LCL と TF-d3) へ選択的に透過し、プロセスされた後に細胞表面に提示されて CTL に認識された。CTL エピトープの C-末端に CPP44 を融合したペプチド (図下: CMV-CPP44) は、この選択性が消失した。LCL; EBV 感染 B-リンパ芽球、TF-d3; HLA-A24 導入 K562 細胞、Fibro; 線維芽細胞。

この結果から抗原デリバリーシステムとして使用する際には、CPP を抗原の N-末端側に融合することが望ましいと考えられた。

同定した DC 透過性 CPP の抗原デリバリー機能の検討：

DC 透過性 CPP、H03L および F04L と CTL エピトープを含む 25 アミノ酸を融合した長鎖ペプチドは、R10 と同 25 アミノ酸を融合したペプチドおよび同 25 アミノ酸のみのペプチドに比べて、DC 上において LCL や線維芽細胞よりもより低濃度条件においても CTL に提示された (図 4)。

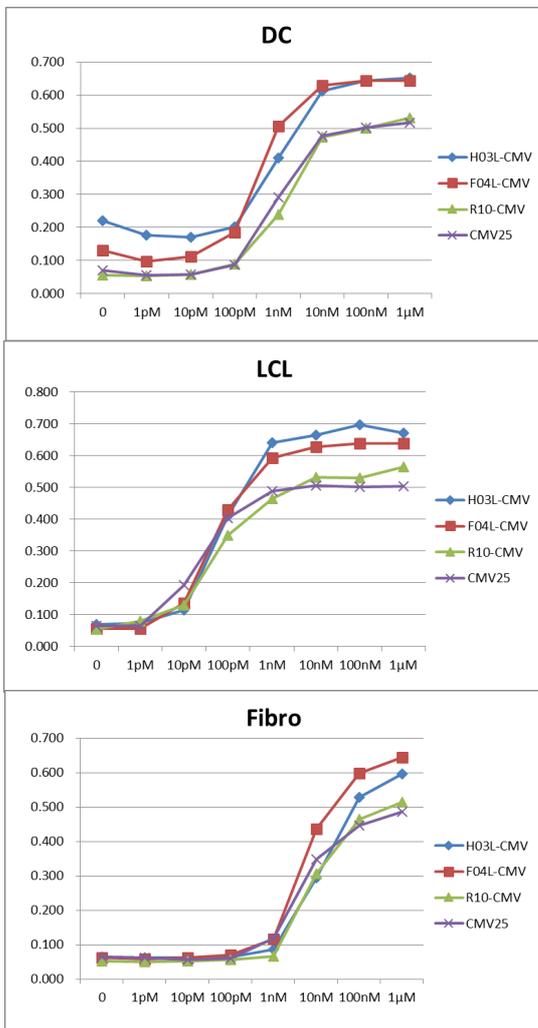


図4. DC 透過性 CPP、H03L および F04L と CTL エピトープを含む 25 アミノ酸を融合した長鎖ペプチド(H03L-CMV, F04L-CMV) は、R10 と同 25 アミノ酸を融合したペプチド(R10-CMV)および同 25 アミノ酸のみのペプチド(CMV25)に比べて、DC 上においてより低濃度で CTL に提示された。

DC ; 樹状細胞、LCL ; EBV 感染 B-リンパ芽球、Fibro ; 線維芽細胞。

以上の結果から、本研究において、ミエロイド系の細胞により選択的に侵入し、DC 上で効率よく CTL へ抗原提示を誘導する CPP、H03L および F04L を同定した。

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 5 件)

Shimizu K, Yamasaki S, Shinga J, Sato Y, Watanabe T, Ohara O, Kuzushima K, Yagita H, Komuro Y, Asakura M, Fujii S. Systemic DC Activation Modulates the Tumor Microenvironment and

Shapes the Long-Lived Tumor-Specific Memory Mediated by CD8+ T Cells. **Cancer Res.** 76(13):3756-66, 2016. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3219. 査読有

Ueda N, Zhang R, Tatsumi M, Liu TY, Kitayama S, Yasui Y, Sugai S, Iwama T, Senju S, Okada S, Nakatsura T, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S, Uemura Y. BCR-ABL-specific CD4+ T-helper cells promote the priming of antigen-specific cytotoxic T cells via dendritic cells. **Cell Mol Immunol.** [Epub ahead of print] 2016. doi: 10.1038/cmi.2016.7. 査読有

Yamada E, Demachi-Okamura A, Kondo S, Akatsuka Y, Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Kuzushima K. Identification of a naturally processed HLA-Cw7-binding peptide that cross-reacts with HLA-A24-restricted ovarian cancer-specific CTLs. **Tissue Antigens.** 86(3):164-71, 2015. doi: 10.1111/tan.12607. 査読有

Zhang R, Liu TY, Senju S, Haruta M, Hirose N, Suzuki M, Tatsumi M, Ueda N, Maki H, Nakatsuka R, Matsuoka Y, Sasaki Y, Tsuzuki S, Nakanishi H, Araki R, Abe M, Akatsuka Y, Sakamoto Y, Sonoda Y, Nishimura Y, Kuzushima K, Uemura Y. Generation of mouse pluripotent stem cell-derived proliferating myeloid cells as an unlimited source of functional antigen-presenting cells. **Cancer Immunol Res.** 3(6):668-77, 2015. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0117. 査読有

葛島 清隆, がん免疫療法における免疫モニタリング、実験医学増刊「がん免疫療法」、羊土社、34 巻 12 号、2015、2080-2084. 査読無

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

葛島 清隆 (KUZUSHIMA, Kiyotaka)
愛知県がんセンター (研究所) ・
腫瘍免疫学部 ・ 部長
研究者番号 : 30311442

(2) 研究分担者

近藤 英作 (KONDO, Eisaku)
新潟大学 ・ 分子細胞病理学分野 ・ 教授
研究者番号 : 30252951