

学位論文題名

Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)
-derived peptides can induce HLA-A2-restricted
and tumor-specific CTLs in the majority
of gastrointestinal cancer patients

(消化器癌患者において腫瘍特異的 CTL を誘導可能な Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)由来 HLA-A2 拘束性ペプチド)

学位論文内容の要旨

【背景、目的】CTLs (Cytotoxic T Lymphocytes) により認識される腫瘍抗原の解析は、メラノーマを中心に近年急速に進歩しつつある。メラノーマ抗原由来のペプチドを用いた癌免疫療法の臨床試験において、一部の症例で HLA 拘束性 CTL の増加と腫瘍の縮小がみられている。しかしながら、世界的に多数の患者が死亡する消化器癌においては癌免疫の分子機構は十分に解明されておらず、消化器癌患者において抗腫瘍免疫を惹起しうる腫瘍抗原ペプチドは少数にとどまっている。CTL 抗原を用いた癌免疫療法は、HLA により拘束されるが、HLA-A2 は日本人の 40%、中国人の 53%、白人の 50%にみられる。本研究は、大腸癌由来 HLA-A2 拘束性腫瘍傷害性 CTL 株が認識する腫瘍抗原を消化器癌より同定し、抗腫瘍ワクチンとして臨床応用可能なペプチドを同定することを目的とした。

【検体、方法】腫瘍細胞特異的傷害活性を示す CTL 株は、癌手術標本中の TIL (Tumor infiltrating lymphocyte)を、IL-2 存在下に長期培養することにより樹立した。表面マーカーは抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体等をもちいて FACs により検索した。HLA-A2 拘束性腫瘍細胞傷害活性は、クロム遊離試験および IFN- γ 産生試験により確認した。本研究で使用した OKp-CTL 株は、大腸癌患者の TIL culture により樹立されたもので、クロム遊離試験および IFN- γ 産生試験において HLA-A2 拘束性腫瘍細胞傷害活性を示した。腫瘍抗原遺伝子の同定は、expression gene cloning method (1991, Boon, et al)を用いて行った。即ち、膵癌細胞株 Panc-1 より、発現ベクター pCMV-SPORT-2 に組み込み cDNA library を作成した。RT-PCR 法にて得た HLA-A0207 および HLA-A2402 の cDNA も同様に発現ベクターに組み込んだ。Panc-1 cDNA library と HLA cDNA を Lipofectamine により COS7 細胞に double transfection し、これを標的細胞として OKp-CTL 株を用いて IFN- γ 産生試験により陽性クローンのスクリーニングを施行した。1 \times 10⁵ 個の cDNA clone をスクリーニングし陽性クローンを同定した。陽性クローンは dideoxynucleotide method により sequence を行い homology

検索を施行した。陽性クローンの発現レベルの検討は Northern blot 法によりおこなった。mRNA 発現量は画像解析ソフトを用いて定量化し、 β -actin をコントロールとし、相対的発現量を計算した。陽性クローンがコードする蛋白より、HLA-A2 分子に高親和性を示すことが予想される 9-10 アミノ酸からなるペプチドを文献的に予測し、32 種類のペプチドを合成した。これらのペプチドは T2 細胞に pre-load し、OKp-CTL 株に認識されるかを IFN- γ 産生試験により検索した。これにより、OKp-CTL 株に認識される 6 種類のペプチドを同定し、OKp-CTL 株から限界希釈法により各ペプチドを認識する CTL クローンを樹立した。癌患者（胃癌、大腸癌、膵癌、計 16 例）末梢血から、この 6 種類のペプチドによる in-vitro 刺激により、腫瘍細胞傷害性 CTL を誘導できるかをクロム遊離試験で検索した。さらに、末梢血から誘導された細胞傷害性 CTL のペプチド特異性および HLA 拘束性を証明するため、cold target による競合抑制試験および抗 HLA 分子抗体による抑制試験を施行した。

【結果】大腸癌由来で HLA-A2 拘束性腫瘍細胞傷害活性を有する OKp-CTL 株により Panc-1 腫瘍細胞株 cDNA library から 1×10^5 個の cDNA clone をスクリーニングし、陽性クローンを同定した。Dideoxynucleotide method により陽性クローンの遺伝子配列の決定を行い homology 検索したところ、この陽性クローンは Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) の 160 kD-subunit と同一であり、mutation は有していなかった。CPSF は HLA-A2 と double-transfection された時のみ OKp-CTL 株により認識されることから、この細胞傷害性は HLA-A2 拘束性と確認された。いろいろな細胞での CPSF の発現を Northern blot 法にて検討した。CPSF は実験にもちいたすべての癌細胞株で強発現を示した。CPSF は正常細胞でも発現していたが、その発現は精巢を除くと低いレベルであった。次に、CPSF 蛋白のアミノ酸配列から、HLA-A2 結合性を有する 9 又は 10 アミノ酸からなるペプチドを 32 種類合成し、これらを T2 細胞にパルスすることにより、どのペプチドが OKp-CTL 株により認識されるかを検討した。その結果、CPSF250-258、CPSF392-400、CPSF456-465、CPSF534-542、CPSF1296-1304、CPSF1359-1368 の 6 種類のペプチドが OKp-CTL 株により認識されることがわかった。またその認識は dose-dependent であり、HLA-A2 拘束性であり、抗 CD8 抗体によりブロックされた。これら 6 種類のペプチドが癌患者に投与された場合、ペプチド特異的 CTL を誘導できるかを検討するため、CTL 誘導試験を in vitro で施行した。CPSF1359-1368 ペプチドは、単独で 44%(7/16)の消化器癌患者においてペプチド特異的 CTL を誘導した。またこれらのペプチドを合わせて使用すれば 69%(11/16)の症例で CPSF ペプチド特異的 CTL を誘導可能であった。またこれらの CPSF ペプチド特異的 CTL はクロム遊離試験において、HLA-A2 陽性癌細胞株を強く傷害した。一方、これらの CTL は、正常細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。さらに、この細胞傷害性は、CPSF ペプチドをパルスした cold target により抑制されたことから、CPSF ペプチド特異的であることが証明された。

【考察】CPSF は 4 つの sub-unit からなる蛋白であり、pre-mRNA 中の AAUAAA 配列を認識、切断し、poly A 配列を付加するのに中心的な役割を演じており、mRNA の processing に必要不可欠な蛋白である。本研究は、CPSF が腫瘍抗原として大腸癌 TIL 由来 HLA-A2 拘束性腫瘍特異的 CTL 株に認識されることを示した。また、CPSF 蛋白由来の 6 種のペプチドは、69% の HLA-A2 陽性消化器癌患者の末梢血から腫瘍傷害性 CTL を誘導可能であることが証明さ

れた。これらの結果は、CPSF 由来ペプチドが抗腫瘍ワクチンとして HLA-A2 陽性癌患者の免疫療法に応用可能であるという根拠を示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) -derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients

(消化器癌患者において腫瘍特異的 CTL を誘導可能な Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) 由来 HLA-A2 拘束性ペプチド)

腫瘍抗原の解析はメラノーマを中心に急速に進歩しつつあり、ペプチドを用いた臨床試験において一部の症例で腫瘍の縮小がみられている。しかしながら、消化器癌においては癌免疫の分子機構は十分に解明されておらず、抗腫瘍免疫を惹起しうる腫瘍抗原ペプチドは少数にとどまっている。本研究は、大腸癌由来 HLA-A2 拘束性腫瘍傷害性 CTL 株が認識する腫瘍抗原を同定し、抗腫瘍ワクチンとして臨床応用可能なペプチドを同定することを目的とした。OKp-CTL 株は、大腸癌患者の TIL culture により樹立され、クロム遊離試験および IFN- γ 産生試験において HLA-A2 拘束性腫瘍細胞傷害活性を示した。腫瘍抗原遺伝子の同定は、expression gene cloning を用いて行った。膵癌細胞株 Panc-1 より cDNA library を作成し、HLA-A0207 および -A2402 とともに COS7 細胞に double transfection し、これを標的細胞として OKp-CTL 株を用いて IFN- γ 産生試験によりスクリーニングを施行した。陽性クローンの遺伝子配列の決定を行い homology 検索したところ、このクローンは Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) の 160 kD-subunit と同一であり、mutation は有していなかった。CPSF は HLA-A2 と double-transfection された時のみ認識され、この細胞傷害性は HLA-A2 拘束性と確認された。CPSF の発現を Northern blot 法にて検討したところ、CPSF はすべての癌細胞株で強発現を示した。CPSF は正常細胞でも発現していたが、精巢を除くと低いレベルであった。次に、CPSF 蛋白のアミノ酸配列から、HLA-A2 結合性を有するペプチドを 32 種類合成し、どのペプチドが OKp-CTL 株に認識されるか検討した。その結果、CPSF₂₅₀₋₂₅₈、CPSF₃₉₂₋₄₀₀、CPSF₄₅₆₋₄₆₅、CPSF₅₃₄₋₅₄₂、CPSF₁₂₉₆₋₁₃₀₄、CPSF₁₃₅₉₋₁₃₆₈ の 6 種類のペプチドが OKp-CTL 株により認識された。その認識は HLA-A2 拘束性であり、

抗 CD8 抗体によりブロックされた。これら 6 種類のペプチドによる CTL 誘導試験では、CPSF1359-1368 ペプチドは 44%の消化器癌患者においてペプチド特異的 CTL を誘導した。またこれらのペプチドを合わせて使用すれば 69%の症例で CPSF ペプチド特異的 CTL を誘導可能であった。これらの CPSF ペプチド特異的 CTL はクロム遊離試験において、HLA-A2 陽性癌細胞株を強く傷害したが、正常細胞は傷害しなかった。この細胞傷害性は、CPSF ペプチドをパルスした cold target により抑制され、CPSF 特異的であることが証明された。CPSF は 4 つの sub-unit からなる蛋白であり、pre-mRNA 中の AAUAAA 配列を認識、切断し、poly A 配列を付加するのに中心的な役割を演じており、mRNA の processing に必要不可欠な蛋白である。これらの実験結果は、CPSF が腫瘍抗原として大腸癌 TIL 由来 HLA-A2 拘束性腫瘍特異的 CTL 株に認識されることを示している。また、CPSF 蛋白由来の 6 種のペプチドは、69%の HLA-A2 陽性消化器癌患者の末梢血から腫瘍傷害性 CTL を誘導可能であることが証明された。これらの結果は、CPSF 由来ペプチドが抗腫瘍ワクチンとして HLA-A2 陽性癌患者の免疫療法に応用可能であるという根拠を示している。

審査にあたっては、まず秋田教授より 1) CPSF のような正常分子が腫瘍抗原として認識されることの意味 2) CTL 株の多クローン的な抗原認識について 3) 臨床応用にむけての次のステップ、等の質問があった。それに対し 1) 癌と正常組織での発現量の差が免疫機構に認識されていると考えられること、文献からもエピトープは必ずしも変異を伴っていないことも認識されること 2) CTL 株は実際に多クローン的であり subline 化し確認されていること 3) 直接臨床応用へ進む他に、動物モデル系の確立の可能性もあること等の回答があった。藤堂教授より CTL による認識が、症例毎、ペプチド毎に差がみられる理由について質問があった。症例毎の CPSF 発現の差、ペプチドにより実際に HLA 分子上に提示される量が異なるなどの機序が回答として示された。西村教授からは、腫瘍抗原を応用した癌免疫療法の奏効率を向上させる手段についての質問があった。サイトカインの併用、DC の併用、投与前 CTL スクリーニング等が実際の例とともに回答として示され、さらに西村教授より Helper T 細胞の応用も有望な手段であるとの示唆があった。

この論文は CPSF が腫瘍抗原として CTL 株に認識され、消化器癌患者から CPSF 特異的 CTL を誘導可能であることを示した世界で初めての報告であり高く評価され、今後 HLA-A2 陽性癌患者に対して CPSF ペプチドの抗腫瘍ワクチンとしての臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。