

学位論文題名

An HLA-A3-binding prostate acid
phosphatase-derived peptide can induce CTLs
restricted to HLA-A2 and -A24 alleles

(HLA-A3 結合 PAP 由来ペプチドの HLA-A2 および
-A24 拘束性 CTLs への誘導能の研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

癌患者に対するペプチドワクチンの臨床研究は近年盛んに行われている。しかし、免疫療法に用いるペプチドは HLA 拘束性をもっているため、現在行われている多くの臨床試験も頻度の高い HLA である HLA-A2 もしくは-A24 陽性の患者に限られている。従ってそれら以外の癌患者はペプチドを用いた免疫療法を受ける事が出来ず、そのような患者にも広く使用できるペプチドの同定が必要と考えられた。

我々は HLA-A24 結合ペプチドで、異なる HLA に対し CTL 誘導能を持つペプチドを報告した。そこで今回我々は、いままでに我々が同定した 14 種の HLA-A3 スーパータイプ拘束性 CTL 誘導能を持つペプチドの中で HLA-A2 もしくは-A24 拘束性 CTL に対し同様に誘導能を持つペプチドが無いか検討した。

【材料と方法】

材料：

PBMC は HLA-A2 及び-A24 の前立腺癌患者の血液から分離したものをを用いた。使用した細胞株は、PAP の発現を確認した前立腺や大腸の癌細胞株や、RMA-S という HLA をトランスフェストしたマウスの細胞株を用いた。

ペプチドは、これまでに我々が同定してきた HLA-A3 スーパータイプ結合能を有する 14 種類と、HLA-A2 及び HLA-A24 に結合能を有する EBV 由来ペプチド、HIV 由来ペプチドをそれぞれポジティブターゲット、ネガティブターゲットとして用いた。

方法：

HLA 安定化試験では、HLA-A0201、-0206、-0207、-2402、-2601 をそれぞれトランスフェクトさせた RMA-S 細胞株を用いて、HLA-A3 スーパータイプに結合能をもつペプチドがそれらの HLA に対しても交差結合能を持つかを実際に結合させ検討した。

ペプチド特異的 CTL 誘導試験では、実際に HLA-A2 及び-A24 の PBMC に HLA-A3 スーパータイプ結合ペプチドで刺激し、HLA 拘束性 CTL 誘導能を持つかを、産生された IFN- γ を ELISA で測定することにより検討した。

細胞傷害活性試験では、ペプチドの刺激により IFN- γ を産生した PBMC を用い、実際に癌細胞に対し細胞傷害活性があるかを、 ^{51}Cr を取り込ませた癌細胞株を用いて、癌細胞が障害されて放出された ^{51}Cr を測定する事により検討した。またその細胞障害活性が HLA-class I 特異的なものをそれぞれの抗体を入れることにより、さらにペプチド特異的なものかを、ペプチドでパルスし ^{51}Cr を取り込ませていないコールドターゲットを混ぜて測定することによりそれぞれを検討した。

【結果】

HLA 安定化試験

14種類の HLA-A3 スーパータイプ結合ペプチドのうち、PAP₁₅₅₋₁₆₃だけが HLA-A0201、-A0206、-A2402 に対し濃度依存性を持って結合能を認めた。また HLA-A0207、-A2601 に対しては結合能を持たなかった。さらに β -tubulin₃₀₉₋₃₁₈ は HLA-A2402 にのみ結合能を認めた。

ペプチド特異的 CTL 誘導試験

PAP₁₅₅₋₁₆₃ で刺激した HLA-A0201、-A0206、-A2402 の PBMC は、ネガティブコントロールのペプチドで刺激した PBMC と比較し有意に IFN γ を産生した。

細胞傷害活性試験

PAP₁₅₅₋₁₆₃ で刺激し誘導された HLA-A0201、-A0206 及び -A2402 の CTL は、同じ HLA の癌細胞株に対して、異なる HLA の細胞株と比較し有意に細胞傷害活性を持っていた。またそれぞれの抗体を加える事により、その細胞傷害活性は HLA-class I 特異的であることが判った。さらに PAP₁₅₅₋₁₆₃ または HIV 由来ペプチドでパルスしたコールドターゲットを加えることにより、その活性はペプチド特異的である事も判った。

【考察】

ペプチドを用いた癌ワクチン療法とは、ペプチドが特定の MHC に結合し、その特定の MHC をもつ癌細胞やウィルス感染に反応する CTL を活性化させるものである。ペプチドと MHC の結合は非常に特異的なものだと考えられてきた。

近年の研究では、ペプチドが異なる HLA に結合できる可能性がある事が示唆されている。この研究でも、HLA-A3 スーパータイプ拘束性 CTL 誘導能を持つペプチドである PAP₁₅₅₋₁₆₃ が、異なる HLA である -A0201、-A0206、-A2402 に結合能をもち、CTL 誘導能を持つことが示された。PAP₁₅₅₋₁₆₃ の配列は YLPFRNCRP であり、BioInformatic and Molecular Analysis Section 上での HLA-A0201 や -A24 に対する結合スコアは、HLA-A3 スーパータイプに対するものと比べ、非常に低い。しかし実際は HLA-A0201、-A0206、-A2402 のトランスフェクタント細胞と結合能を有した。その矛盾がなぜかははっきりとは解っていない。

HLA-A2 結合ペプチドの特徴は、アミノ酸配列の 2 番目が I もしくは L、C 末端が V もしくは F、M である。しかしまれに HLA-A0207 のように確実に HLA-A2 スーパータイプだと言い切れないものもあり、HLA-A2 結合ペプチドでも HLA-A0207 に結合しないペプチドの報告もある。

一方、HLA-A2402 結合ペプチドはアミノ酸配列の 2 番目が F もしくは Y で C 末端が F もしくは L、I、W であるが、HLA-A2301、-A3001 と交差結合性を有している。したがって、それらを含む HLA-A24 スーパータイプの結合モチーフは 2 番目が (FWYLYIMT)、C 末端が (FIYWLM) と言える。

これらの事から、PAP₁₅₅₋₁₆₃ (YLPFRNCRP) は HLA-A0201、-A0206、-A2402 と結合し、かつ -A0207 と結合しない事の推測とできる。

また、PAP は前立腺関連抗体あり前立腺癌患者での癌ワクチンとして使用されている。しかし PAP は前立腺だけでなく、膵臓の神経内分泌腫瘍や膵島細胞腫瘍、小腸腫瘍、膀胱腺癌などでも免疫組織学的に陽性であり、また血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫の腫瘍マーカーとしても検討されている。また食道や肺小細胞癌でも発現しており、PAP 特異的 CTL はそれらの細胞傷害活性を示している。その上、正常組織や正常の肛門や尿道の腺組織、胃幽門の粘膜組織でも発現が確認されている。

前立腺癌患者に対する PAP 関連蛋白を含む樹状細胞を用いた第 1 相臨床試験では、PAP を標的とした免疫療法は安全で、病気の進行と PAP に対する免疫反応とが関連していることが明らかになっている。また我々はかつて前立腺癌に対するテラーメイド型癌ワクチンにおいて PAP₂₁₃₋₂₂₁ が HLA-A24 拘束性 CTL を誘導し、臨床的反応を誘導するペプチドの 1 つであることを報告している。また、その免疫反応が PAP 特異的なものであることも報告している。

【結論】

HLA-A2、-A24、-A3 スーパータイプを合わせるとアジア人では 98%、割合の少ない黒

人でも 59%をカバーしている。このペプチドは多くの前立腺癌だけでなく大腸癌や胃癌患者にとっての癌ワクチンになる可能性があると考ええる。

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

An HLA-A3-binding prostate acid phosphatase-derived peptide can induce CTLs restricted to HLA-A2 and -A24 alleles

(HLA-A3 結合 PAP 由来ペプチドの HLA-A2 および
-A24 拘束性 CTLs への誘導能の研究)

現在、世界的にペプチドワクチンを用いた癌免疫療法の臨床試験が行われている。しかし、治療に用いられているペプチドは HLA 拘束性を持っており、同じ HLA タイプによる患者の制限がある。しかし我々は以前に HLA-A24 結合ペプチドで、異なる HLA への交差結合能を有するペプチドを同定した。そこで今回我々は、現在までに我々が同定してきた HLA-A3 スーパータイプ結合ペプチドの中から、異なる HLA に対し交差結合能を有するペプチドを同定する事を目的とした。まず HLA 結合試験で HLA-A3 スーパータイプ 14 種類のペプチドを HLA-A0201、-A0206、-A0207、-A2402、-A2601 への結合能を検討した。結果、14 種類のうち PAP155 ペプチドだけが HLA-A0201、-0206、-A2402 に濃度依存性を持って結合能を有し、かつ HLA-A0207、-2601 に結合能を持たなかった。次にこの PAP155 ペプチドに対し HLA-A0201、-A0206 及び HLA-A2402 の癌患者末梢血へのペプチド刺激による CTL 誘導試験を *in vivo* で行った。結果、どちらの HLA に対してもペプチド特異的 CTL を誘導した。この PAP ペプチド特異的 CTL は、クロム遊離試験においても、HLA-A0201、-A0206、及び-A2402 の CTL は同じ HLA タイプの癌細胞を強く障害する一方、異なる HLA タイプの癌細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。さらに HLA 拘束性、CD8 依存性及びペプチド特異性を検討するため、CTL から CD8 を抽出した後、抗 HLA-class I 分子抗体による抑制試験及び cold target による競合抑制試験を施行した。誘導された CTL の細胞傷害活性は抗 HLA-class I 分子抗体添加により抑制された事、さらに PA ペプチドをパルスした cold target により抑制された事から、HLA-class I 拘束性、かつペプチド特異性である事が証明された。これらの結果より、HLA-A3 スーパータイプ結合ペプチドである PAP155 ペプチドは HLA-A0201、-0206、及び HLA-A2402 に対し交差結合能を有し、かつ CTL 誘導能を持つことが示された。

公開発表後、まず副査の秋田教授から、①PAP155 ペプチドが HLA-A2 と-A24 に結合する機序、②PAP155 ペプチドの、HLA-A3 スーパータイプ PBMC に対する反応と、HLA-A2 や-A24 の PBMC に対する反応の違いについて、③ペプチド療法 of 展望についての質問があった。それらに対し、①結合を規定するアミノ酸以外の立体的な配列が、HLA-A2 や-A24 に結合するのに適合している可能性がある。②IFN γ の産生能は HLA-A3 スーパータイプの PBMC に対するものよりも低い、細胞傷害活性に明らかな違いは認めなかった。③現在臨床試験により安全性が確認され、かつ臨床効果も認められてきている。今後も同様なペプチドを同定し、より多くの患者へのペプチドワクチンの使用が可能になる、等の回答があった。

藤堂教授からは、①ペプチド特異的 IgG 抗体を誘導する機序および evidence、②ペプチド療法の未来についての質問があった。それらに対し、①投与されたペプチドワクチンが CD4 のエピトープにもなり CD4 陽性 T 細胞を誘導する。臨床的に IgG 抗体が上昇した症例のほうが有意差を持って予後が良い。②腫瘍の HLA 発現低下の有無や、腫瘍による免疫抑制などの課題を克服しつつ、術後補助療法やあるいは術前の治療法としても確立することを期待する、等の回答がなされた。

また主査の西村教授より、①PAP155 ペプチドの HLA-A2 や-A24 の患者に対する臨床試験について、②HLA-A2、-A24 の患者に対する反応、③stabilisation assay の際の HLA-A3 スーパータイプとの違いについての質問があった。これらに対し、①実際にそれらを対照とする臨床試験はまだ行われていないが、HLA-A2、-A24 も併せ持つ HLA-A3 スーパータイプ患者に対しては使用されており、②ペプチド特異的 IgG の上昇を認めている。③stabilization assay に関しては、HLA-A0201、-A0206 と-A2402 への結合能は低くはない。等の回答がなされた。

本論文は本来 HLA 拘束性をもつペプチドが、異なる HLA への結合することを報告した論文であり、ペプチドワクチン療法の可能性を広げるものである。今後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、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。