

主論文の要旨

**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**

HLA 改変卵巣癌細胞株を用いて、HLA-A\*24:02 に提示される  
クローデイン-1 由来のエピトープに対し  
特異的に反応する CTL を誘導した

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

近藤 紳司

## 【緒言】

がん特異的な免疫応答の主役は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) である。がん特異的 CTL の抗原ペプチドが同定できれば、腫瘍免疫療法は有効な治療法となり得る。抗原ペプチドの同定によく用いられる方法が、リンパ球腫瘍細胞混合培養法で誘導した CTL を利用した cDNA 発現クローニング法である。この場合、担がん患者のリンパ球を自己のがん細胞株で刺激するため、自己のがん細胞を細胞株として樹立する必要があり、樹立が困難な場合には用いることができない。すでに樹立されている他のがん細胞株を代用すると、一致していない HLA に対する強いアロ反応が、がん特異的 CTL の誘導を阻害してしまう。本研究では、アロ反応を起こさない汎用性の高い任意の単一 HLA のみ発現する癌細胞株を作製した。これを人工抗原提示細胞 (aAPC) としてがん特異的 CTL を誘導し、抗原の同定を試みた。

## 【方法及び結果】

①aAPC の作製：aAPC のベースのがん細胞株として HLA を発現している卵巣癌細胞株 TOV21G (HLA-A24 陰性) を使用した。内因性 HLA -class I を完全に抑制するため HLA-class I 遺伝子共通の塩基配列部位を標的とした 3 種類の short interfering RNA (siRNA) を合成した。合成した siRNA を TOV21G に導入し、フローサイトメトリーで解析した。siRNA 導入後 Day3 から HLA class I の完全な抑制を認め、Day6 まで抑制は持続した (Fig. 1A)。次に、導入する任意の単一 HLA の作製を行った。HLA-A24 を選択し、同義コドンを利用して siRNA 標的部位のコドンを変換した siRNA 抵抗性の HLA-A24 を作製した。これらを用いて、まず TOV21G に作製した HLA-A24 と共刺激分子 CD86 をレンチウイルスベクターで遺伝子導入した。続いて合成した siRNA を導入し、内因性の HLA-class I を完全に抑制した HLA-A24 のみ発現する aAPC を作製した。作製した aAPC の CTL 誘導に必要な免疫シナプスを構成する細胞表面分子をフローサイトメトリーで確認した。HLA-A24 および CD86 は遺伝子導入後、発現を認めた (Fig. 1B, C)。②CTL 株誘導および CTL クローンの樹立：HLA-A24 陽性健常人末梢血単核細胞から naïve CD8<sup>+</sup> T 細胞を単離した。作製した aAPC と共培養し CTL 株を誘導した。誘導された CTL 株の特異性を検討するため、目的のがん細胞株と共培養し、IFN- $\gamma$  産生細胞の比率をフローサイトメトリーで調べた (Fig. 1D)。HLA-A24 陰性である TOV21G で刺激した場合、誘導された CTL 株では IFN- $\gamma$  産生細胞はほぼ認めなかった。一方、HLA-A24 を導入した TOV21G では、IFN- $\gamma$  産生細胞を多く認めた (donor1: 69.3%, donor2: 97.7%)。donor2 の CTL 株を用いて限界希釈法でクローニングを行い、CTL クローン (クローン D2) を樹立した。③クローン D2 の特異性の解析：クローン D2 に対し、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay を行った。標的細胞として TOV21G、HLA-A24 導入 TOV21G、HLA-A24 陽性の線維芽細胞株及び B リンパ芽球様細胞株 (B-LCL) を用いた。クローン D2 は HLA-A24 導入 TOV21G では多数の SPOT を認めたが、親株の TOV21G や正常細胞株である線維芽細胞株、B-LCL では SPOT を認めなかった (Fig. 2A)。次に <sup>51</sup>Cr release assay による細胞傷害性試験を行った。標的細胞として、卵巣癌細胞株である RMG I (HLA-A24 陽性)、RMG II (HLA-A24

陽性)、KOC7C(HLA-A24 陰性)、HLA-A24 導入 KOC7C を用いた。KOC7C では細胞傷害性は見られなかったが、HLA-A24 を遺伝子導入すると、細胞傷害性の上昇を認めた(Fig. 2B)。また、RMG I や RMG II に対しても細胞傷害性を認めたが、B-LCL や線維芽細胞株に対しては認めなかった(Fig. 2C)。④クローン D2 の抗原およびエピトープの同定: TOV21G の mRNA から cDNA ライブラリーを作製、発現スクリーニング法及び ELISA によってクローン D2 が認識する抗原を同定した(Fig. 3A)。抗原として検出されたのは claudin-1(CLDN1)であった。次にクローン D2 が認識する CLDN1 のエピトープ配列を、N 末および C 末短縮遺伝子を用いてクローン D2 の IFN- $\gamma$  産生を指標に調べ、エピトープとなり得るアミノ酸配列を絞り込み、T 細胞エピトープ予測アルゴリズムである BIMAS を用いてエピトープ候補を同定した(Fig. 3B)。エピトープ候補の合成ペプチドを用いて、HLA-A24 を導入した T2 細胞(細胞内在性の抗原を HLA 上に提示できない細胞)に各濃度でペプチドパルスしクローン D2 を加え、ELISA で peptide titration assay を行った(Fig. 3C)。その結果、同定したエピトープ候補がクローン D2 のエピトープペプチド(CLDN1<sub>158</sub> ペプチド)であることが分かった。同定した CLDN1<sub>158</sub> ペプチドのテトラマーを作製し、誘導した CTL 株及びクローン D2 を染色してフローサイトメトリーで解析した。donor2 から誘導した CTL 株では CLDN1 テトラマー陽性細胞を少数ではあるが認めた。コントロールの HIV-ENV<sub>584</sub> ペプチドのテトラマー陽性細胞は認めなかった(Fig. 4A)。クローン D2 では CLDN1 テトラマー陽性細胞を多数認めた(Fig. 4B)。⑤正常上皮細胞における CLDN1 発現及びクローン D2 による認識:本研究で用いた標的細胞および正常気管支上皮細胞である NHBE(HLA-A24 陽性)における CLDN1 の mRNA 発現を RT-PCR で確認した。B-LCL や線維芽細胞株では発現を認めなかったが、卵巣癌細胞株及び NHBE では発現を認めた(Fig. 5A)。次にクローン D2 の NHBE に対する認識を調べるために、IFN- $\gamma$  ELISA 及び<sup>51</sup>Cr release assay による細胞傷害性試験を行った。ELISA では、HLA-A24 導入 TOV21G と比較して低い値ではあるが、NHBE でも INF- $\gamma$  の産生を認めた(Fig. 5B)。<sup>51</sup>Cr release assay でも、低いながらも細胞傷害性を認めた(Fig. 5C)。

### 【考察】

今回、内因性 HLA の発現を抑制した上で、目的の HLA-A24 のみ発現する aAPC を用いて、HLA-A24 拘束性 CTL 株及びクローンを樹立することができた。このことから、siRNA によって完全に内因性 HLA 発現が抑制することができるがん細胞株に、目的の HLA のみを発現させて aAPC として利用できることが示唆された。樹立したクローン D2 の標的抗原は上皮細胞に発現する CLDN1 であった。CLDN1 は上皮及び内皮細胞の tight junction の主要蛋白質で、その構造や機能に重要な働きをしている。CLDN1 は自己抗原であるにもかかわらず、クローン D2 は健常人の naïve CD8<sup>+</sup>T 細胞から誘導された。これは、胸腺のネガティブセレクションによる中枢性免疫寛容が不完全なことを示し、また制御性 T 細胞が自己抗原に反応する T 細胞の活性化を抑制し、末梢性の免疫寛容を誘導していることを示唆している。そのため、自己免疫反応は腫瘍免疫と強く関連

している可能性がある。実際、悪性黒色腫や腎細胞癌に対する抗 CTLA-4 抗体療法の著明な抗腫瘍効果が示され、副作用である自己免疫性の腸炎や肝炎と臨床効果の相関関係が報告されている。これは、T 細胞の自己抗原に対する反応性のレパトリーが癌の退縮に関係している可能性を示唆する。今回同定された CLDN1 のエピトープペプチドは、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体のような免疫チェックポイントをブロックする治療を行う HLA-A24 陽性のがん患者の免疫モニタリングに有用である可能性がある。

#### **【結論】**

本研究で、siRNA を利用して HLA を遺伝子操作した aAPC が、任意の HLA 拘束性に抗原を提示して CTL を誘導できることが明らかとなり、この手法は他のがん細胞株および HLA アレルにも応用が可能で、汎用性の高い CTL 認識抗原の探索法であると考えられる。