

主論文の要旨

Identification of a naturally processed HLA-Cw7-binding peptide that cross-reacts with HLA-A24-restricted ovarian cancer-specific CTLs

（ HLA-A24 拘束性に卵巣がん細胞を認識する CTL が、
交差アロ反応性に HLA-Cw7 上のペプチドを認識する ）

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）

山田 英里

【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。CTL は細胞表面上の T 細胞抗原受容体(TCR)を介して、標的細胞表面にある HLA と抗原由来のペプチドの複合体を認識する。任意の HLA 上のがん抗原を特異的に認識する CTL とその標的抗原の同定は免疫療法の構築において必須である。本研究では、卵巣がんが発現する新規のがん抗原の同定を目的とし、卵巣がん細胞株をもとに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、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。その過程でアロ交差性に自己抗原を認識する CTL が誘導されたので、その機序についても検討を行った。

【方法及び結果】

卵巣明細胞がんから樹立された TOV21G 細胞の HLA 発現を short interfering (si)RNA で一時的に抑制した。コドン変換によって siRNA 耐性となった HLA-A*24:02 をレンチウイルスベクターで導入し、HLA-A*24:02 のみ発現する TOV21G 細胞を抗原提示細胞として使用した。この細胞と HLA-A*24:02 を保有する健常人末梢血 CD8 陽性 T リンパ球を、サイトカインの存在下で共培養し CTL 株を樹立し、さらに限界希釈法で CTL クローンを得た。これらの CTL クローンの中から、HLA-A*24:02 導入 TOV21G 細胞を特異的に認識・傷害し、HLA-A*24:02 陽性の正常細胞を認識・傷害しないクローンを選別した (Figure 1)。CTL クローン 1G3 は、HLA-A*24:02 を導入した TOV21G 細胞と KOC7C 細胞に反応するため、卵巣がんに共通して発現する抗原に特異的であると考えられた。そこで、抗原を同定するためにまず、TOV21G 細胞の mRNA から cDNA ライブラリーを作製した。各プラスミッドを HLA-A*24:02 導入 293T 細胞にトランスフェクションし CTL クローンと共培養後、上清中のインターフェロン γ を指標に標的遺伝子を探索し、標的とする抗原として RNA binding motif protein 4 (RBM4) を同定した (Figure 2A)。遺伝子短縮法や合成ペプチドを用いて 9 アミノ酸からなるエピトープペプチド VRTPYTMSY (RBM4₁₉₇) を決定した (Figure 2B-D)。しかしこのペプチド配列は、HLA-A24 の結合モチーフとは異なっていたため、HLA-A24 拘束性について再度検討を行った。A24-293T 細胞に RBM4₁₉₇ を添加すると、CTL クローンによって認識されたが、293T 細胞に同じウイルスベクターで HLA-A*02:06 を導入した細胞でも同様の結果がみられた。さらに 293T 細胞は RBM4₁₉₇ を添加しなくても CTL クローンに認識されたことから、CTL クローンは HLA-A24 拘束性ではなく、293T 細胞の内因性の HLA 拘束性に RBM4₁₉₇ を認識していると考えられた (Figure 3A)。そこで、T2 細胞に 293T 細胞が内因性に発現している HLA、HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-Cw*07:02 (Table 1) をそれぞれ導入し、RBM4₁₉₇ を添加したところ、HLA-Cw*07:02 を導入した T2 細胞に RBM4₁₉₇ を添加した時のみ CTL クローンに認識され、RBM4₁₉₇ は HLA-Cw*07:02 によって提示されていることが明らかになった (Figure 3B)。さらにこのペプチド配列は Cw-7 の結合モチーフとも一致していた (Table 2)。誘導に用いた CD8 陽性 T リンパ球のドナーは

HLA-Cw*07:02 を保有しておらず、この RBM4₁₉₇+Cw7 に対する CTL クローンの反応は、アロ反応であることが確認された (Table 1)。RBM4₁₉₇ と Cw-7 のテトラマー (VRT-テトラマー) を作成し、CTL クローンを染色しフローサイトメトリーで解析すると、多数の細胞が VRT-テトラマーで染色されることから、CTL クローンは A24 拘束性に抗原 X を認識し、同時にアロ交叉性に Cw7 拘束性に RBM4₁₉₇ を認識していることが証明された (Figure 4)。アロ免疫応答のメカニズムとして、CTL が HLA とペプチドを 1 対 1 対応で認識するパターン、ペプチドの有無に関わらず HLA のみを認識するパターン、特定の何種類かのペプチドがアロの HLA 上にのった場合に認識するパターンの 3 種類が報告されており、今回の CTL クローンがどのような性質かを検討した。今まで HLA-Cw7 に結合すると報告されてきた 3 つのペプチドを合成し、それらに対する認識能を比較すると、ペプチド毎にそれぞれ固有の濃度で CTL クローンによって認識されることが分かり、CTL クローンは HLA-Cw7 に結合する複数のペプチドを認識する性質を持つことが判明した (Figure 5)

【考察】

今回誘導された CTL クローン 1G3 は、自己の HLA-A*24:02 拘束性に抗原 X を認識するのに加えて、交差反応性にアロ抗原である HLA-Cw*07:02 上に提示されている RBM4 由来のペプチドも認識していた。TCR レパトアの一部には、このような交差アロ反応を有するものが含まれており全体の 10%ともいわれている。同じ HLA 間 (A-A, B-B, C-C など) で起きるアロ反応では、HLA の構造が似ている場合におきやすいといわれているが、今回のように HLA-A と Cw の間など、異なる HLA 間におきるアロ反応については報告が少なく、認識の機序についてもまだ不明な点が多い。また同じ抗原やエピトープで誘導した CTL でも TCR の遺伝子配列の違いによって、全く異なる HLA に対してアロ反応を起こすため、アロ反応の予測は困難である。近年、特定の HLA 上のがん抗原ペプチドを認識する TCR 遺伝子を導入したリンパ球輸注療法が臨床応用されつつある。その際に、導入された TCR が目的の HLA 上のペプチドを認識すると同時に、患者が持つ他の HLA に対して予期せぬアロ反応を惹起する可能性が示唆された。

【結語】

本研究で、HLA-A24 拘束性に腫瘍細胞を認識する CTL クローンが、同時にアロ交叉性に HLA-Cw7 拘束性に自己抗原を認識することが示された。また、アロ反応はより広汎な HLA の組み合わせで起こり、その予測は困難であることも示唆された。今後免疫治療を行っていくにあたり、アロ反応の機序を解明して行くことが、予期せぬ重篤な合併症を予防するにあたり重要であると考えられる。