

## 学内グラント 報告書

## 平成24年度 学内グラント終了時報告書

## 抗原表面結合リポソームを用いた抗腫瘍ワクチン開発の基礎研究

研究代表者 堀内 大 (医学部 微生物学)

研究分担者 赤塚 俊隆\*, 小林 信春\*

## 緒言

近年、腫瘍抗原に対して細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応を誘導し、活性化したCTLが腫瘍細胞を排除することを期待した免疫療法の開発研究が盛んに行われている。現在、腫瘍抗原ペプチドによるCTL誘導型ワクチンが開発の中心となっているが、現時点では、そのCTL誘導効率は十分ではない。

我々の教室では、リポソーム表面に抗原を化学結合させた抗原表面結合リポソームワクチンが、感染症において強力にCTLを誘導することを見いだした<sup>1)</sup>。この研究において、リポソーム表面結合により抗原ペプチドの免疫原性が変化し、ペプチド免疫では免疫原性が非常に低い抗原ペプチドでもリポソーム表面に結合することで十分なCTL反応を誘導できることがわかった。さらに、C型肝炎ウイルスの抗原ペプチドを表面に結合したリポソームをHLA-A2トランスジェニックマウス(HHDマウス)に免疫し、その免疫学的な反応を詳細に解析することで、リポソーム表面に結合すると高い細胞性免疫誘導能が得られる全く新しい抗原ペプチドを同定し、この抗原を用いた抗原表面結合リポソームワクチンとリンパ球抑制経路遮断法との併用でウイルス持続感染マウスモデルの治療に成功した。この新規抗原は、ウイルス感染では免疫系にほとんど認識されておらず、抗原表面結合リポソームの投与によってのみ強い免疫反応が誘導される特徴を持っていることもわかった。

抗原表面結合リポソームワクチンの腫瘍性疾患に対する応用については、本研究連携研究者の内田らが報告しており<sup>2)</sup>、卵白アルブミン抗原を遺伝子導入した腫瘍細胞を用いたマウス移植腫瘍モデルの治療実験の検討により、その有効性が示されているが、腫瘍抗原を用いた実用化に向けての検討はまだなされていない。

腫瘍抗原の多くは自己抗原由来でありMHCと高いアフィニティをもち宿主免疫系に認識されやすいエピ

トープは、腫瘍の生育過程で免疫寛容が誘導され、その結果十分な抗腫瘍効果を発揮するCTL誘導が難しいことが予想される。この免疫寛容を打破する方策として、本研究では、上で示した慢性ウイルス感染症での研究成果を応用した。すなわち、上で述べたHCV新規抗原のような、生体内では免疫系に認識されていないため免疫寛容に陥っておらず、リポソーム表面に結合することによって初めて免疫原性を発揮する腫瘍抗原ペプチドを探索/同定し、この抗原ペプチドを利用した抗原表面結合リポソームワクチンを用いて抗腫瘍CTL反応の誘導を試みた。

## 材料と方法

## 1. HLA-A2トランスジェニックマウス

マウスMHCクラスIと $\beta$ 2-ミクログロブリン( $\beta$ 2-m)をノックアウトしたマウスに、ヒトMHCクラスIの一つであるHLA-A\*0201(HLA-A2)とヒト $\beta$ 2-m遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(HHDマウス)<sup>3)</sup>を使用した。HHDマウスはフランス・パスツール研究所・Lemonnier博士より供与された。

## 2. コンピュータによるCTLエピトープの予測

今回の研究では腫瘍の無限の増殖に大きく拘る、あるタンパク質を標的腫瘍抗原として免疫実験を行った。今後の特許申請の可能性をふまえて抗原タンパク名を伏せ、Xとする。

ヒトXとマウスXのアミノ酸配列を、コンピュータプログラム「BIMAS」を用いてHLA-A2結合ペプチドモチーフを解析し、9個のアミノ酸からなるCTLを予測し、ヒトXとマウスXで共通のアミノ酸配列を持つエピトープから、BIMAS scoreの高い10種類を選定した。これらのエピトープに相当するペプチドはオペロン社により人工合成された。

## 3. プールペプチド表面結合リポソームワクチンによるCTL誘導エピトープの絞り込み

合成した10種類のペプチドを5種類ずつ2つのグループにプールし、それぞれのプールペプチド

\*医学部 微生物学

グループをリポソーム表面に結合させて2種類の抗原表面結合リポソームを作成した。これをCpGと混和してHHDマウス皮下に免疫した。初回免疫の7日後に同様の方法で追加免疫を行い、その5日後にX抗原特異的抗腫瘍CTLが誘導できるかどうかを検討した。

追加免疫5日後に脾細胞を分離し、FITC標識抗CD107a抗体存在下で各々のペプチドで抗原刺激した。その後、細胞表面をPerCP標識抗CD8抗体で染色し、細胞を固定、細胞膜の透過処理を行った後、細胞内部をPE標識抗IFN- $\gamma$ 抗体で染色し、それぞれのエピトープに特異的に反応するCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球の割合をフローサイトメトリーにより測定した。

#### 4. 抗原結合リポソームによるCTLの誘導

3.でCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球を誘導したエピトープペプチドを単独結合した抗原表面結合リポソームを作製した。このリポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離し、以下の方法でX抗原に反応するCTLが誘導されているかどうかを以下のa, bの方法で検討した。

##### a) X抗原陽性腫瘍細胞を標的としたCTLのIFN- $\gamma$ 産生の測定

3.でCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球を誘導した抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。別のナイーブなマウスの脾細胞に各々のペプチドをパルスし放射線照射をした細胞を抗原提示(APC)細胞とした。免疫マウスの脾細胞とAPC細胞を混和し7日間培養した後、X抗原陽性HLA-A2陽性腫瘍細胞であるRMAHHD細胞にペプチドをパルスしたもの、ペプチドをパルスしていないRMAHHD細胞、X抗原陽性HLA-A2陰性腫瘍細胞であるRMA細胞の三種類の標的細胞と免疫脾細胞をそれぞれ5時間培養し、3.と同様の方法でIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球の割合を測定した。ペプチドパルスRMAHHD細胞またはRMAHHD細胞に反応してIFN- $\gamma$ を産生する細胞の割合からRMA細胞に反応してIFN- $\gamma$ を産生する細胞の割合を減じたものを抗原特異的な反応とした。

##### b) X抗原陽性腫瘍細胞を標的としたCTLの細胞傷害活性の測定

3.でCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球を誘導した抗原表面結合リポソームでマウスを免疫し、追加免疫5日後に脾細胞を分離した。免疫マウスの脾細胞とAPC細胞を混和し7日間培養した後、RMAHHD細胞にペプチドをパルスしたもの、ペプチドをパルスしていないRMAHHD細胞、RMA細胞の三種類の標的細胞をDiOCで染色し、免疫脾細胞と混和してPropidium Iodide (PI) 存在下で4時間培養し、細胞死を引き起こされた標的細胞(DiOC<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>細胞)の割合をフローサイトメトリーで測定した。ペプチドパルスRMAHHD細胞またはRMAHHD細胞の死細胞の割合からRMA細胞の死細胞

の割合を減じたものを抗原特異的な反応とした。

(倫理面への配慮)

マウスは、埼玉医科大学実験動物管理運営規定に基づき飼育され、苦痛の軽減、安楽死等に配慮した指針に従って実験を行った。

## 結果

### 1. 抗原表面結合リポソームによるIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>リンパ球の誘導

今回検討した10種類のエピトープのうち、#7, #11, #13の3種類のエピトープで明らかなCD107aの脱顆粒とIFN- $\gamma$ の産生を認めた(Fig. 1)。この3種類のエピトープは、過去のペプチドワクチンやウイルスベクターを用いたX抗原ワクチンの検討では報告されていない新規エピトープであった。一方、ペプチドやウイルスベクターを用いたワクチン研究で既に報告されたエピトープである#1, #3, #19に対しては、抗原表面結合リポソームによる免疫では明らかなCD8リンパ球の反応誘導は認めなかった(Fig. 1)。

### 2. 抗原表面結合リポソームによるX抗原陽性腫瘍細胞に対するCTLの活性化

次に、CD8リンパ球の活性化を強く誘導した#7, #11, #13の3種類のエピトープと既報のエピトープの#1を各々単独結合したりポソームでマウスを免疫後、脾細胞を分離し、X抗原陽性腫瘍細胞に対するCD8リンパ球の反応を検討した。その結果、各々のペプチドをパルスした細胞に対しては、4つのエピトープ全てでIFN- $\gamma$ 産生CD8リンパ球が認められた。一方ペプチドパルスを行わなかった標的細胞に対する反応、すなわち内因性X抗原に対する反応は、#7と#13のみに認められた(Fig. 2)。

### 3. 抗原表面結合リポソームによるX抗原陽性腫瘍細胞に対するCTL killing活性の誘導

次に、#1, #7, #11, #13のエピトープを各々単独結合したりポソームでマウスを免疫後、脾細胞を分離し、X抗原陽性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、各々のペプチドをパルスした細胞に対しては、#1, #7で比較的強い細胞傷害活性が認められた(Fig. 3)。一方ペプチドパルスを行わなかった標的細胞に対する細胞傷害活性、すなわち内因性X抗原に反応したTumor killingの検討では、#7のみ強い細胞傷害活性を認めた(Fig. 3)。

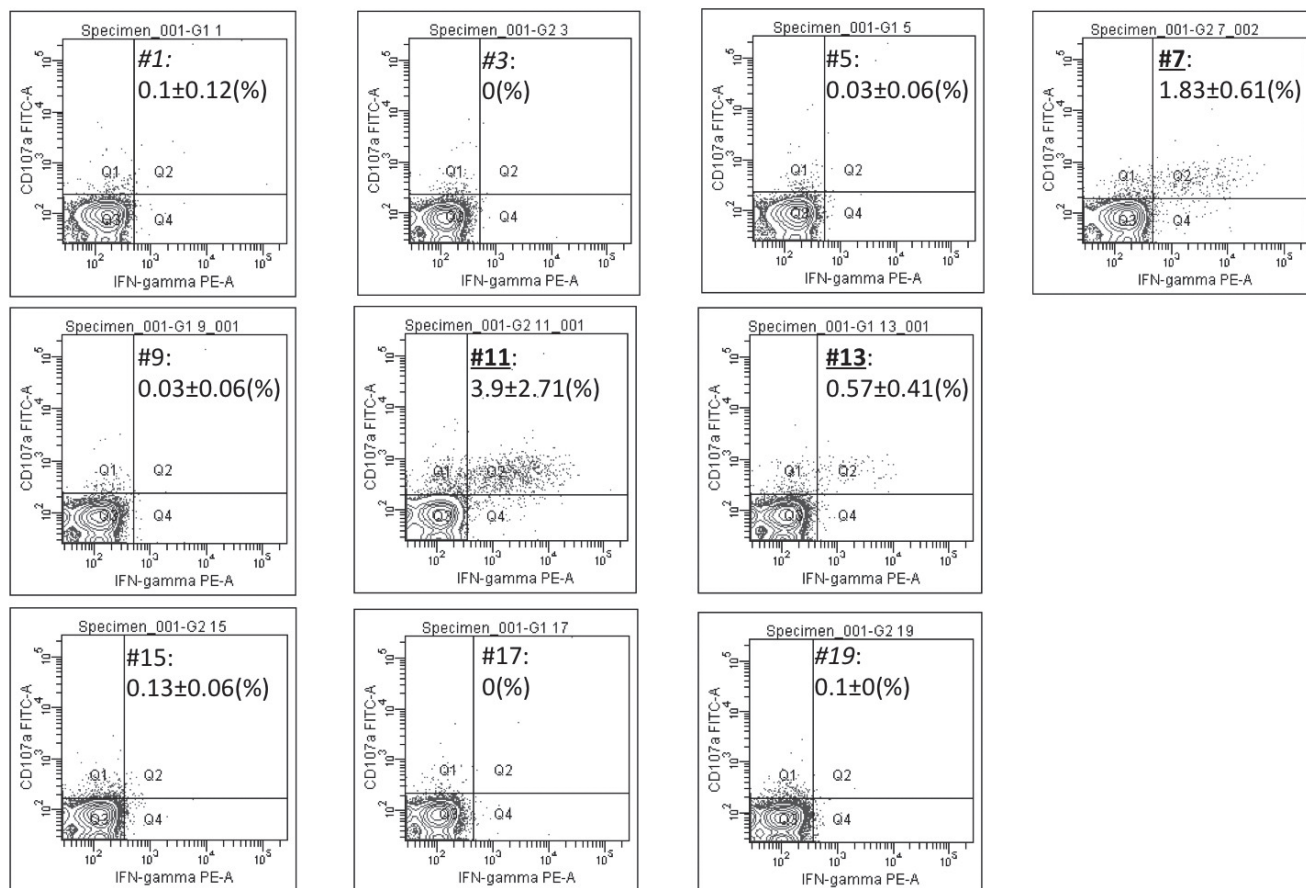
## 考察

X抗原を構成するタンパク質からリポソーム表面結合に適した新しいエピトープ#7を同定した。このエピトープペプチドを結合した抗原表面結合リポソームはX抗原陽性腫瘍細胞に対するCD8リンパ球のIFN- $\gamma$ 産生を誘導し、X抗原陽性腫瘍細胞に対して強いKilling

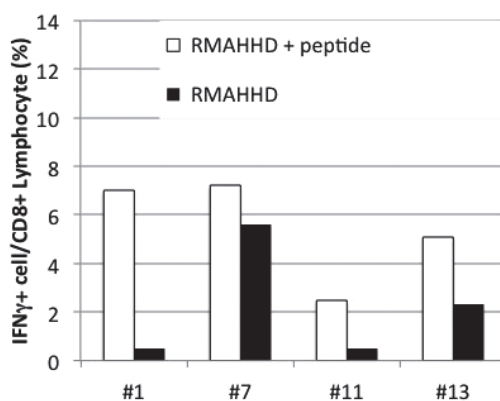
活性を示した. 今回検討したX抗原は様々なヒト腫瘍の8割以上で発現が認められていることから, #7エプトープを結合した抗原表面結合リポソームは汎腫瘍ワクチンになりうる可能性がある.

今後はX抗原陽性腫瘍細胞をマウスに移植した担癌

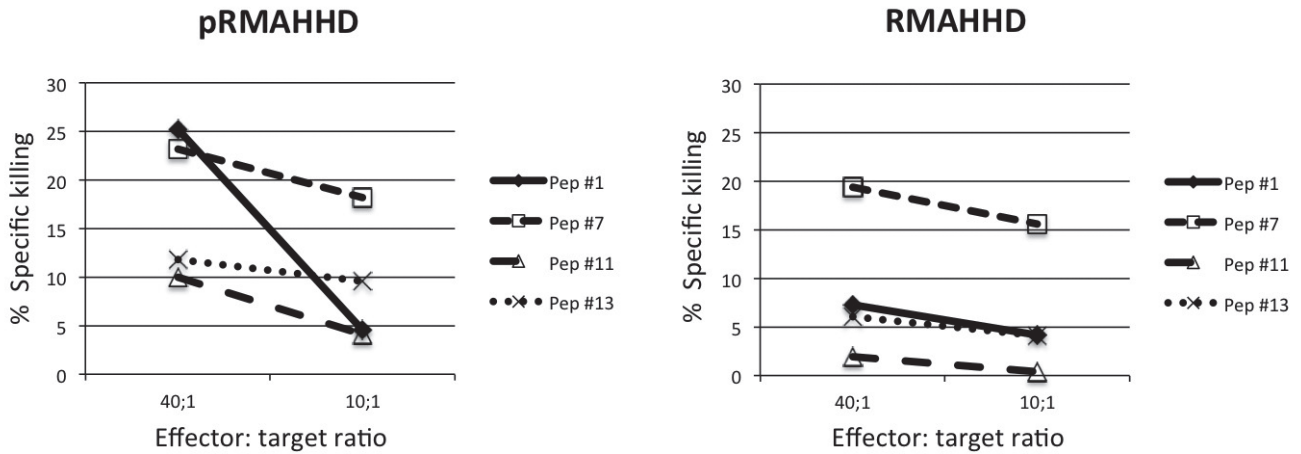
モデルを用いて, #7結合リポソームの抗腫瘍効果を検討するとともに, 担癌状態での#7エプトープに対する免疫寛容誘導についても検討し, 免疫寛容が誘導されるのであれば免疫チェックポイントの遮断の併用なども視野に入れて研究を進める予定である.



**Fig 1.** CD107a and intracellular IFN- $\gamma$  staining of CD8<sup>+</sup> lymphocytes specific for peptide derived from antigen X in mice immunized with surface-linked liposomal peptides. The numbers shown indicate the percentages of CD107a<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells within CD8<sup>+</sup> lymphocytes.



**Fig 2.** Recognition of antigen X positive tumor cells by CTLs raised against surface-linked liposomal peptides. CTL<sub>#1</sub>, CTL<sub>#7</sub>, CTL<sub>#11</sub> and CTL<sub>#13</sub> were tested against RMAHHD loaded with a cognate peptide (open bars) or RMAHHD (filled bars).



**Fig 3.** The ex vivo cytotoxicity of CTLs raised against surface-linked liposomal peptides was tested against RMAHHD loaded with a cognate peptide (pRMAHHD) or RMAHHD.

### 引用文献

- 1) Takagi A, Matsui M, Ohno S, Duan H, Moriya M, Kobayashi N, Taneichi M, Uchida T, Akatsuka T. Highly efficient antiviral CD8+ T-cell induction by peptides coupled to the surfaces of liposomes. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1383-92.
- 2) Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177:2324-30.
- 3) Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.