



Title	Survivin 2Bがん関連抗原を用いた免疫療法のマウス評価系モデルに関する研究
Author(s)	高橋, 正二郎
Description	配架番号 : 2181
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11934号
Issue Date	2015-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11934
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59672
Type	doctoral thesis
File Information	Shojiro_Takahashi.pdf



学 位 論 文

Survivin 2B がん関連抗原を用いた免疫療法の

マウス評価系モデルに関する研究

(Studies on a mouse model for immunotherapy
targeting cancer-associated antigen survivin 2B)

2015 年 6 月

北 海 道 大 学

高 橋 正 二 郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験材料と方法	7 頁
結果	18 頁
考察	26 頁
総括および結論	31 頁
謝辞	32 頁
引用文献	33 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Jun Kasamatsu, Shojiro Takahashi, Masahiro Azuma, Misako Matsumoto, Akiko Morii-Sakai, Masahiro Imamura, Takanori Teshima, Akari Takahashi, Yoshihiko Hirohashi, Toshihiko Torigoe, Noriyuki Sato, Tsukasa Seya
PolyI:C and mouse survivin artificially embedding human 2B peptide induce a CD4⁺ T cell response to autologous survivin in HLA-A*2402 transgenic mice
Immunobiology volume 220. Issue 1, January 2015, Pages 74-82

緒 言

担癌状態の生体では、がん細胞自身から放出される IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインによって樹状細胞が活性化され、アポトーシスに陥ったがん細胞が貪食され、CD4 陽性 T 細胞の補助を受けながら腫瘍関連抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞が活性化されている (Fig.1)。

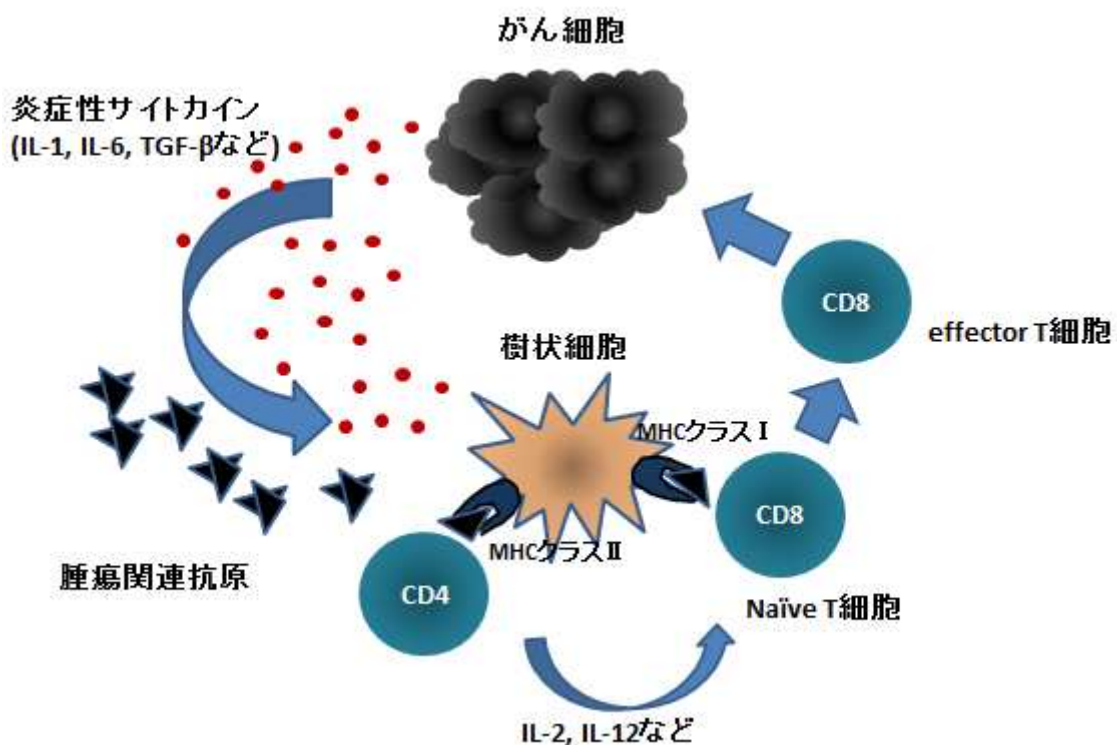


Figure 1 担癌生体における樹状細胞の活性化と CD8 陽性エフェクターT 細胞の起動

樹状細胞は外来抗原を取り込んで、プロセッシングによって抗原蛋白を断片化し MHC クラス I 上に提示し、その結果抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の増殖が引き起こされる。腫瘍に由来する外来抗原の MHC クラス I 分子への提示は主に transporter associated with antigen processing(TAP)やプロテアソーム依存性^{1,2}であり、このことは内因性抗原が MHC クラス I に提示される経路が部分的にシェアされていることを示唆している。このように、外来抗原が樹状細胞に取り込まれ、MHC クラス I 分子に提示されることはクロスプレゼンテーション

オンと呼ばれており 3、抗腫瘍免疫において中心的な働きを担っている

polyI:C は RNA を認識するパターン認識受容体(pattern recognition receptor; PRR)経路を活性化する二重鎖 RNA アナログである 4,5。また polyI:C はマウスモデルにおいて CD11c/CD8 α 陽性樹状細胞において TICAM-1 経路依存的に CD8 陽性 T 細胞のクロスプライミングを促進することが報告されている 6 (Fig.2)。

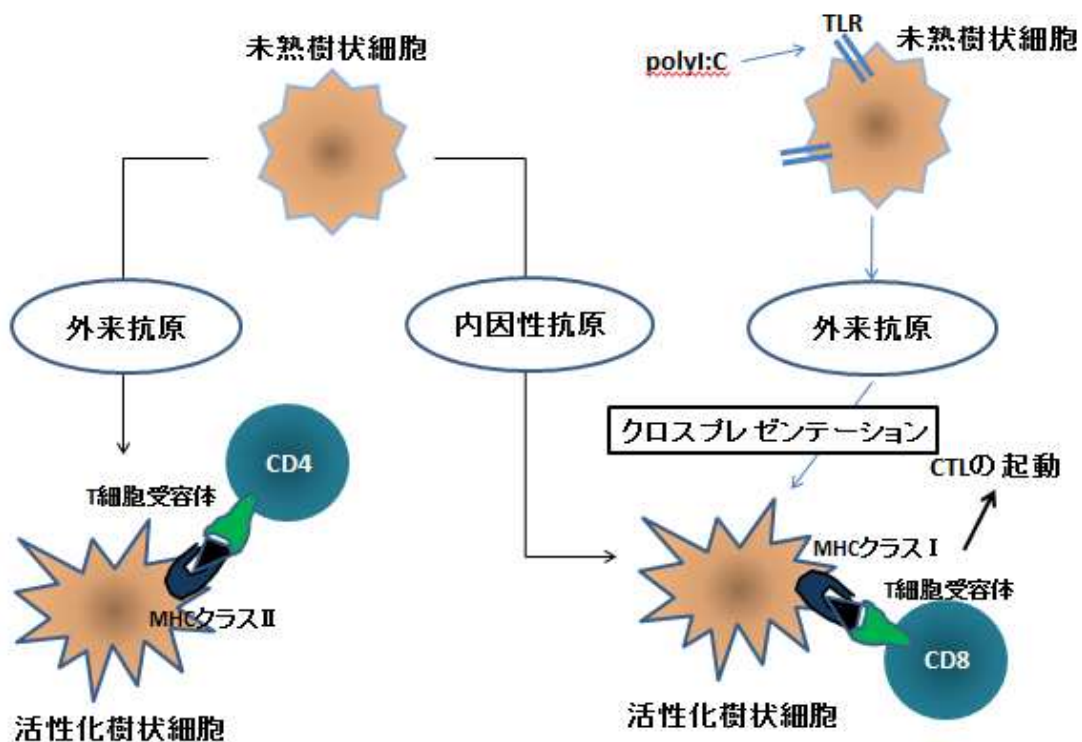


Figure 2 外来抗原、内因性抗原による T 細胞の活性化とクロスプレゼンテーション

腫瘍関連抗原(Tumor associated antigen; TAA)は多くの場合その発現レベルは低く、TAA 特異的な CTL の誘導にはパターン認識受容体の活性化による補助が必要と考えられている 7。

これまでに多くの TAA が同定され、実際のがん患者に対する免疫療法の標的として研究され、また実臨床での使用が検討されており、ペプチドワクチンによる癌免疫療法の臨床試験も行われている 8。

TAA を癌免疫療法における標的とする場合、腫瘍細胞に高発現する一方で正常細胞には発現していないことが理想的である。

Survivin(SVN)は抗原特異的な細胞障害性 T 細胞(Cytotoxic T Lymphocyte;

CTL)を起動しうる腫瘍関連抗原である^{9,10}。ヒト SVN(HsSVN)は 16.5kDa の細胞質内の蛋白で caspase3,7 を阻害することでアポトーシスを阻害する働きを持っている¹¹。SVN はアポトーシス阻害蛋白ファミリーの一つで胎生期の発生に関わる分子であるため、精巣や胸腺、胎盤を除いた正常組織においてはほとんど発現がないとされている^{11,12}。また SVN は CD4/8 double negative のリンパ球から double positive のリンパ球へという初期の胸腺細胞の分化・成熟に重要な役割を果たしている¹³。SVN はまたさまざまな種類の腫瘍細胞に発現していることが知られている^{11,14}。いくつかのスプライシングバリエントが存在し、そのうち HsSVN2B と呼ばれるスプライシングバリエントはエクソン 2B とよばれる余剰のエクソンが付加された形をとり、このエクソン 2B の転写産物には CTL エピトープとなるペプチド AYACNTSTL が含まれている。

HsSVN2B のペプチドである AYACNTSTL は HLA-A*2402 拘束性で CD8 陽性 T 細胞によって認識されるペプチドである¹⁵。癌種によっては HsSVN2B が mRNA レベルで高発現していることが知られているが、発癌に関わっているのかどうかという点については一定の見解は得られていない¹⁶。

癌患者を対象とした SVN2B ペプチドワクチンの研究もいくつか行われている。乳がん患者や尿路上皮癌を対象とした第 1 相臨床試験では Incomplete Freund's Adjuvant(IFA)併用で SVN2B ペプチドワクチンが投与され、2B ペプチド特異的な CTL の誘導が報告されている^{17,18}。また進行膵癌患者を対象とした第 1 相臨床試験においては IFN α 併用下で SVN2B ペプチドの投与が行われ、有意な治療効果を認めたと報告されている¹⁹。このように抗原提示を促進したり IFN を産生させるように働くアジュバントは SVN を用いた癌免疫療法において有益と考えられる。

抗原提示の促進、IFN 産生誘導に働くアジュバントを併用するペプチドワクチン療法は臨床効果を期待しうる癌免疫療法ではあるが、現状ではいまだ満足いく臨床効果を得るには至っていない。今後 SVN を標的とした癌免疫療法を最適化していくためには、マウスモデルを用いた検討の蓄積が必要であると考えられる。

本研究では SVN2B を標的とした癌免疫療法の確立に向けて、マウスモデルにおいて SVN2B を免疫源として polyI:C と併用した場合の T 細胞の応答を評価した。

略 語 表

APC : Allophycocyanin
bp : base pair
CD : Cluster of differentiation
cDNA : complementary deoxyribonucleic acid
CTL : cytotoxic T lymphocyte
DC : Dendritic cell
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA : Deoxyribonucleic Acid
DW : distilled water
EDTA : Etylenediaminetetraacetic acid
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
FACS : Fluorescence activated cell sorter
FBS : Fetal Bovine serum
FITC : Fluoresceine isothiocyanate
GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
IFA : Incomplete Freund's Adjuvant
IFN : Interferon
IgG : Immunoglobulin G
IRES : Internal ribosome entry sites
IRF : Interferon-regulatory factor
kDa : kilo dalton
LINE : Long interspersed elements
LPS : lipopolysaccharide
MDA-5 : Melanoma differentiation associated gene 5
MHC : Major histocompatibility complex
mRNA : messenger ribonucleic acid
OVA : Ovalbumin
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : phycoerythrin
PBS : Phosphate Buffered Saline

PRR : pattern recognition receptor
RIG-I : Retinoic acid-inducible gene1
RNA : ribonucleic acid
RNA : Ribonucleic Acid
rpm : round per minute
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR : Reverse Transcription Poly Chain Reaction
SINE : short interspersed elements
SVN : survivin
TAA : tumor associated antigen
TAE : Tris acetate etylenediaminetetraacetic acid
TAP : transporter associated with antigen processing
Th1 : T helper cell 1
TLR : Toll like receptor
Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane

実験材料と方法

1. 実験材料

1-1. バイオインフォマティクス

HsSVN、MmSVN の遺伝子構造を精査するにあたっては Ensembl のヒトおよびマウスゲノムデータベース(<http://asia.ensembl.org/index.html>)を用いた。

1-2. 使用動物

C57BL/6 マウス・・・日本クレアより購入

HLA-A*2402 Tg マウス・・・SLC Japan より購入

1-3. 細胞

溶液および緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
トリプシン液	0.25% Trypsin-0.02% EDTA-PBS(-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

L-Glutamine	GIBCO-Invitrogen
FBS	BioSource Intl., Inc.
DMEM (1.0 g/l Low Glucose)	GIBCO-Invitrogen
100 mU/ml PenicillinG, 100 µg/ml Streptomycin	GIBCO-Invitrogen
NEAA	GIBCO-Invitrogen

B16D8 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose) (以下完全培養液) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は 90-100% confluent になり次第行った。

YAC-1 細胞

あらかじめ 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の

条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

BW5147 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、2mM L-glutamine を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

P815 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM (1.0 g/l Low Glucose) を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

Ba/F3 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、IL-3 (終濃度 10ng/ml) を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

G1 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

NIH3T3 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した DMEM を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 倍希釈程度で行った。

EL4 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。継代は 3-4 日ごとに 10 外希釈程度で行った。

RAW 細胞

予め 56°C で 30 分間加熱し非働化した 10% (v/v) ウシ胎児血清 FBS、100 mU/ml PenicillinG、100 µg/ml Streptomycin、0.1mM NEAA を添加した RPMI1640 を用いて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は 90-100% confluent になり次第行なった。

2. 実験方法

2-1 マウス正常組織、マウス細胞株におけるマウス SVN(MmSVN)の mRNA 発現の検討

溶液及び緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
--------	---

以下の試薬を各メーカーより購入した。

RNeasy mini kit	Qiagen
10×DNase I buffer	TaKaRa
Recombinant DNase I	TaKaRa
RNase inhibitor	TaKaRa
EDTA	Sigma
10×RT buffer	Applied Biosystems
dNTP mix	Applied Biosystems
10×Random primer	Applied Biosystems
MRTase	Applied Biosystems

<トータル RNA の抽出>

C57BL/6 マウスより、食道、胃、肝臓、筋、脳、肺、腎臓、子宮、精巣、胸腺、脾臓、リンパ節を取出した。それぞれの組織は速やかに液体窒素中に入れ、乳鉢、乳棒を用いて破碎した。破碎した組織および各培養細胞株トータル RNA を RNeasy mini kit を用いて抽出した。

<DNase 処理と cDNA 合成>

上記の方法で得たトータル RNA 500ng と RNase free の滅菌純水計 17μl に 10 倍希釈 DNase buffer を 2μl、DNase 0.8μl、RNase inhibitor を 0.2μl 添加し、37 度で 30 分インキュベートして DNase 処理を行った。その後、0.5M EDTA を 2μl 添加し 80°C で 2 分インキュベートし DNase の不活化を行った。

DNase 処理したトータル RNA に 10 倍希釈 RT buffer 4μl、25 倍希釈 dNTP mix 1.6μl、10 倍希釈 Random primer 4μl、MRTase 2μl、RNase inhibitor 2μl、滅菌純水 4.4μl を添加し、cDNA 合成を行った。cDNA 合成の反応条件は添付

マニュアルに従った。

<RT-PCR>

組織および培養細胞における MmSVN の mRNA 発現を調べるために、RT-PCR 解析を施行した。内因性コントロールとして Gapdh を用いた。MmSVN の検出プライマーには Forward primer: 5´-ACTACCGCATCGCCACCT-3´ と Reverse primer: 5´-GCTTGTTGTTGGTCTCCTTTG-3´ を用い(増幅断片: 315bp)、Gapdh の検出プライマーには Forward primer: 5´-TGTAACCAACTGGGACGATAT-3´、Reverse primer: 5´-CTTTTCACGGTTGGCCTTAG-3´ を用いた。(増幅断片: 249bp)。PCR には TaqEx を用い、反応条件はいずれも 94℃・3 分で熱変性後、94℃・39 秒、65℃・30 秒、72℃・30 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル反復した後、72℃で 7 分最終伸長を行った。PCR 産物は 3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、増幅バンドを確認した。

2-2 MmSVN2B キメラ抗原の作製

2-2-1 MmSVN2B キメラ遺伝子作製

溶液及び緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO ₄
--------	---

以下の試薬を各メーカーより購入した。

RNeasy mini kit	Qiagen
10×DNase I buffer	TaKaRa
Recombinant DNase I	TaKaRa
RNase inhibitor	TaKaRa
EDTA	Sigma
10×RT buffer	Applied Biosystems
dNTP mix	Applied Biosystems
10×Random primer	Applied Biosystems
MRTase	Applied Biosystems

以下のように 2 段階の PCR 法によってヒト 2B 領域をもつ MmSVN2B キメラ

遺伝子を作製した。

① MmSVN のエクソン 1-2 とエクソン 3-4 領域の増幅

MmSVN エクソン 1-2 を増幅するために、マウス脾臓由来 cDNA をテンプレートに Forward primer: 5´-CCGCTCGAGATGGGAGCTCCGGCGCT-3´ (下線は XhoI site) と Reverse primer: 5´

-ACCGTGCCCGGCCCAATCGGGTTGTCA-3´ (斜字体は HuSVN2B エクソン 2B の 5´ 末端配列) を用いて PCR をおこなった (増幅断片: 245bp)。また、エクソン 3-4 を増幅するために、Forward primer:

-GGGCGGATCACGAGAGAGGAGCATAGAAAGCA-3´ (斜字体は HuSVN2B エクソン 2B の 3´ 末端) と Reverse primer: 5´

-CGGGATCCTTAGGCAGCCAGCTGCTCAAT-3´ (下線は BamHI site) を用いて PCR を行った (増幅断片: 224bp)。PCR には KOD plus を用い、反応条件はいずれも 94℃・2 分で熱変性後、94℃・15 秒、55℃・30 秒、68℃・60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル反復した後、68℃で 7 分最終伸長を行った。その後アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物をアガロースゲルから精製した。

② HuSVN2B のエクソン 2B 領域の増幅

HuSVN2B のエクソン 2B 領域を増幅するために HsSVN2B cDNA (NBRC より購入) をテンプレートとして、Forward primer: 5´

-CGATGACAACCCGATTGGGCCGGGCACGG-3´ (斜字体は MmSVN エクソン 2 の 3´ 末端) と Reverse primer: 5´

-TTTCTATGCTCCTCTCTCGTGATCCGCC-3´ (斜字体は MmSVN エクソン 3 の 3´ 末端) をもちいて PCR を行った (増幅断片: 99bp)。PCR には LA Taq を用い、反応条件は 94℃・1 分で熱変性後、98℃・10 秒、55℃・30 秒、68℃・60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル反復した後、68℃で 7 分最終伸長を行った。その後アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR 産物をアガロースゲルから精製した。

③ MmSVN2B キメラ遺伝子の作製

上記①と②によって得られた 3 つの PCR 産物 (各 40ng) をテンプレートとして、Forward primer: 5´-CCGCTCGAGATGGGAGCTCCGGCGCT-3´ (下線は XhoI site) と Reverse primer: 5´

-CGGGATCCTTAGGCAGCCAGCTGCTCAAT-3´ (下線は BamHI site) を用いて PCR を行なった (増幅断片: 509bp)。

PCR には ExTaq を用い、反応条件は 94℃・2 分で熱変性後、94℃・30 秒、60℃・30 秒、72℃・60 秒を 1 サイクルとして 35 サイクル反復した後、72℃で

7分最終伸長を行った。その後アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR産物をアガロースゲルから精製した。

④ HsSVN2B 抗原の作製

HsSVN2Bを増幅するためにHsSVN2B cDNA(NBRCより購入)をテンプレートとして、Forward primer: 5´-CGGGATCCATGGGTGCCCGACG-3´(下線はBamHI site)とReverse primer: 5´-GGAATTCTCAATCCATGGCAGC-3´(下線はEcoRI site)をもちいてPCRを行った(増幅断片: 513 bp)。PCRにはKOD plusを用い、反応条件はいずれも94℃・2分で熱変性後、94℃・15秒、55℃・30秒、68℃・60秒を1サイクルとして35サイクル反復した後、68℃で7分最終伸長を行った。その後アガロースゲルにて電気泳動を行い、PCR産物をアガロースゲルから精製した。

2-2-2 MmSVN2B と HsSVN2B 抗原蛋白精製

溶液及び緩衝液の組成

LB 液体培地 LB-broth20g+DW1000ml

以下の試薬を各メーカーより購入した。

LB-broth	Sigma
pCold II vector	TaKaRa
XhoI	TaKaRa
BamHI	TaKaRa
Buffer K	TaKaRa
T4 ligase	ProMega
2X ligation buffer	ProMega
IPTG	Wako
ポリミキシン B	Sigma

pCold II ベクターに MmSVN2B および HsSVN2B 遺伝子を遺伝子導入するために、増幅断片の両末端に付加した制限酵素サイトを切断し、ライゲーションを行なった。MmSVN2B と pCold II ベクターを XhoI と BamHI で、HsSVN2B と pCold II ベクターを BamHI と EcoRI で添付書類に従い制限酵素処理した。制限酵素処理した PCR 産物と pCold II ベクターをアガロースゲルにて電気泳動

を行い、アガロースゲルから精製した。Ligation には T4 ligase(Promega)を用い、反応液の組成は T4 ligase 1 μ l、2 \times ligation buffer 5 μ l、制限酵素処理後の pCold II と MmSVN2B あるいは HsSVN2B と DW を合わせて 4.0 μ l 添加しトータル 10 μ l 系とし、16 $^{\circ}$ C・終夜で ligation を行った。得られた Ligation 産物を BL21 コンピテートセル(当研究室で作製)に導入し、陽性クローンを単離することで各 SVN 発現大腸菌株を樹立した。

LB 液体培地にて室温振盪培養し、OD600 値が 0.2~0.3 となったら 16 $^{\circ}$ C で急冷した。その後、最終濃度 1.0mM となるように IPTG を添加し、16 $^{\circ}$ C で低温培養をおこなった。24 時間後、4 $^{\circ}$ C・8000rpm・30 分の条件で遠心して得られた大腸菌ペレットから蛋白精製機器 ProfiniaTM および IMAC purification kit を用いて MmSVN2B 蛋白、HsSVN2B 蛋白を精製した。

Lipopolysaccharide(LPS)の混入の影響を排除するために、精製蛋白はすべてのポリミキシン B(終濃度 200 μ g/ml)を添加し 37 度で 30 分インキュベートし(20)、-50 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

2-2-3 精製蛋白の確認

上記で精製した蛋白は SDS-PAGE によって精製度を確認した。

溶液及び緩衝液の組成

2X sample buffer	50mM Tris-HCl, 4%SDS,20%グリセロール,DW,pH6.8
45%メタノール/10%酢酸	メタノール 900ml、酢酸 200ml
酸	
0.25%クーマシーブリリアントブルー	クーマシーブリリアントブルーR2.5g、45%メタノール
アントブルー (CBB) 溶	/10%酢酸 1000ml
液	

サンプルの調整は、精製蛋白に 2X sample buffer を添加し vortex したあと 95 $^{\circ}$ C で 5 分処理することで行い、使用まで-20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。泳動には 12.5% のアクリルアミドゲルを使用した。電気泳動後、ゲルをパッドに入れ 0.25%クーマシーブリリアントブルー溶液に完全に付け数時間攪拌しながら染色した。その後蒸留水でゲルを洗浄し、45%メタノール/10%酢酸を加え攪拌し脱色を行い精製蛋白のバンドを確認した。

2-3 マウスにおける抗原特異的 T 細胞の査定

polyI:C 併用下での MmSVN2B あるいは HsSVN2B 蛋白による抗原特異的 T 細胞の起動を査定するために、C57BL/6 マウス(日本クレアから購入)、HLA-A*2402 Tg マウス(SLC Japan から購入)を用いて実験を行った。マウスは北海道大学内の動物管理部門において SPF 環境で維持され、実験には 8-12 週のマウスを用い、すべての実験は北海道大学の動物実験のガイドラインに従って行った(実験計画番号 08-0243)。

2-3-1 マウスへの抗原投与と脾細胞の調整

溶液及び緩衝液の組成

PBS(-)	137 mM NaCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.68 mM KCl, 1.49 mM KH ₂ PO
ACK lysis buffer	150 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0.1 mM Na ₂ EDTA

以下の試薬を各メーカーより購入した。

PolyI:C	Sigma
OVA	Sigma

C57BL/6 マウスあるいは HLA-A*2402 Tg マウスに対して 100 μ g の抗原 (MmSVN2B または HsSVN2B) と 100 μ g の polyI:C とともに皮下注にて投与した。1 週間に 1 回、4 回反復免疫した。陰性コントロールとして PBS 投与群を設け、陽性コントロールとして OVA+polyI:C 投与群を設けた(6)。最後の投与から 1 週間後に脾臓を摘出し、スライドガラスを用いてすりつぶしホモジナイズして細胞浮遊液とした。1500rpm・10 分・4 $^{\circ}$ C の条件で遠心分離後、ACK lysis buffer を 1ml 添加し 1 分程度反応させたのち 9ml のメディウムを添加し 1500rpm・10 分・4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を破棄し再びメディウムを添加して脾細胞の調整を行った。

2-3-2 抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の検出

溶液及び緩衝液の組成

FACS buffer 0.5%BSA+0.05% NaN₃/PBS(-)

以下の試薬を各メーカーより購入した。

OVA323-339 ペ プ チ ド	Sigma
(ISQAVHAAHAEINEAGR)	
OVA257-264 ペプチド(SIINFEKL: SL8)	MBL
HLA-A*2402 survivin-2B テトラマー	MBL
HIV テトラマー	MBL
MmSVN13-27 ペプチド	Biologica
(YLKNYRIATFKNWPF)、	
HsSVN13-27 ペプチド	Biologica
(FLKDHRISTFKNWPF)	
Hs/Mm SVN53-67 ペ プ チ ド	Biologica
(DLAQCFFCFKELEGW)	
Gout serum	Cedarlane
抗 CD3 ϵ (145-2C11)	BioLegend
抗 CD8 α (53-6.7)	BioLegend
抗 IFN γ (XMG1.2)抗体	BioLegend
抗 CD4 抗体(L3T4)	eBiosciences
ViaProbe	BD Bioscience
Anti-CD8 α /FITC	BioLegend
Anti-IFN γ /APC	BioLegend
Brefeldin A	Sigma

以下の試薬は札幌医科大学病理学第一講座の佐藤昇志博士より供与いただいた。

SVN2B ペプチド(AYACNTSTL)

HLA-A*2402/2B CTL クローン

抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出のために、脾細胞は 100nM の SL8 もしくは SVN2B ペプチドを添加して 2 時間培養し、その後 10 μ g/ml の濃度で brefeldin A を添加してさらに 4 時間培養を行った。

抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の検出のために、脾細胞は 100nM の OVA323-339 ペプチドあるいは SVN ヘルパーペプチドを添加して 1 時間培養し、その後 10 μ g/ml の濃度で brefeldin A を添加してさらに 5 時間培養を行った。

培養終了後、細胞を 96well プレートに回収し FACS buffer 120 μ l を加え、2000rpm、2 分、4°C の条件で遠心分離し上清を破棄し、以後 FACS サンプル作成を行なった。

ブロッキングはヤギ血清で行った。ブロッキングののち、抗原特異的 Tetramer 陽性細胞の検出には PE ラベル HLA-A*2402 survivin-2B テトラマーを用いた。抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の IFN γ 検出のためには PE ラベル抗 CD8 α /FITC 抗 CD3 ϵ 、CD4 陽性 T 細胞の検出のためには PE 抗 CD4/FITC 抗 CD3 ϵ を用いて細胞表面の染色をおこなった。

細胞表面の染色完了後に Cytofix/Cytoperm™ fixation/permeabilization kit (BD Bioscience から購入) を用いて細胞の固定と膜透過処理を行い APC ラベル抗 IFN γ 抗体で染色し、FACS Calibur にて測定をおこなった。

2-3-3 ELISA 法による抗原特異的抗体産生の査定

投与した抗原に対する抗体産生について評価をするために ELISA 法を用いて抗原特異的抗体産生の有無を評価した。

以下の試薬を各メーカーより購入した。

OVA	Sigma
eBioscience 10x coating buffer	eBioscience
eBioscience 5x Assay Diluent	eBioscience
Goat anti-mouse IgG1-HRP	southernBiotech
Goat anti-mouse IgG2a-HRP	southernBiotech
Goat anti-mouse IgG2b-HRP	southernBiotech
TMB(tetramethylbenzidine)	Sigma

週に 1 度、4 週間にわたって抗原投与を受けたマウスから血清を回収し、OVA、MmSVN2B および HsSVN2B に対する抗体産生の有無を ELISA 法を用いて評価した。

96well プレートに終濃度 10 μ g/ml で OVA、MmSVN2B あるいは HsSVN2B を添加した coating buffer を 100 μ l/well で添加し 4°C で一晩インキュベートした。次に 0.05% tween20 含有 PBS を用いて 5 回洗浄し、100 μ l/well の 1 \times assay diluent を添加して室温で 1 時間インキュベートののち 0.05% tween20 含有 PBS を用いて 5 回洗浄した。その後 80 μ l のサンプル血清 (IgG2a/b 測定時は 1000 倍希釈、IgG1 測定時は 10000 倍希釈) を添加し室温で 2 時間インキュベートした。その後 0.05% tween20 含有 PBS で 5 回洗浄し、80 μ l/well の二次抗体

(0.2 μ g/ml の goat anti-mouse IgG1-HRP 抗体、0.5 μ g/ml の goat anti-mouse IgG2a-HRP 抗体、0.2 μ g/ml の goat anti-mouse IgG2b-HRP 抗体) を添加して室温で 1 時間インキュベートし、0.05% tween20 含有 PBS で 5 回洗浄した。その後 100 μ l/well で TMB を添加して室温で 15 分発色し 50 μ l/well の 2 規定硫酸を添加して反応を終了させ、450nm で吸光度を測定した。

結 果

1. バイオインフォマティクスとマウス正常組織、細胞株における survivin 発現解析

ヒトの survivin は4つのエクソンと2つの cryptic エクソンからなっている。正常な survivin はエクソン 1-4 に由来する 142 アミノ酸からなる蛋白である。それに対し、HsSVN2B はエクソン 1、2、2B、3、4 に由来する 165 アミノ酸からなる蛋白であり、エクソン 2B は本来は2番目のイントロンの中の Alu 配列の中にある配列で、HsSVN2B においてはエクソン 2 と 3 の間に接合する構造を取る。この Alu 配列は SINE(short interspersed nuclear element)の一種でありみずからは転写活性を持たない。HsSVN2B は多くの腫瘍細胞、腫瘍細胞株において発現が認められており、細胞の癌化との関連が示唆されている²¹。

Ensembl のデータベースによると、HsSVN のイントロン 2 には2つの Alu 配列が含まれており、エクソン 2B は2番目の Alu に由来するものである(Fig.3A)。それと比較して、MmSVN 遺伝子は3つのイントロンによって区切られた4つのエクソンで構成されているが、イントロン 2 に Alu 配列は持たない。そのかわり MmSVN はイントロン 2 にげっ歯類に特徴的ないくつかの SINE 配列を有している。

このようにヒトとマウスの間では2つのイントロンの配列に相違があるが、エクソンの配列はヒトとマウスの survivin の間で高い相同性が保たれている。。これらの結果はヒトにおけるエクソン 2B は進化の過程で Alu 配列の挿入ののちに integration されたことを示唆している。Survivin 遺伝子は酵母とヒトの間でも保存されているがエクソン 2B については進化の過程でヒトがマウスからわかれた後に形成されたものと考えられる。

我々は RT-PCR 法を用いて MmSVN においてエクソン 2 の前後にヒトにおけるエクソン 2B にあたるような構造がないかを確認した。マウス正常組織から抽出した mRNA、マウス細胞株から抽出した mRNA を対象として RT-PCR を施行したが、ヒトのエクソン 2B にあたる構造は認められなかった(Fig.3B)。

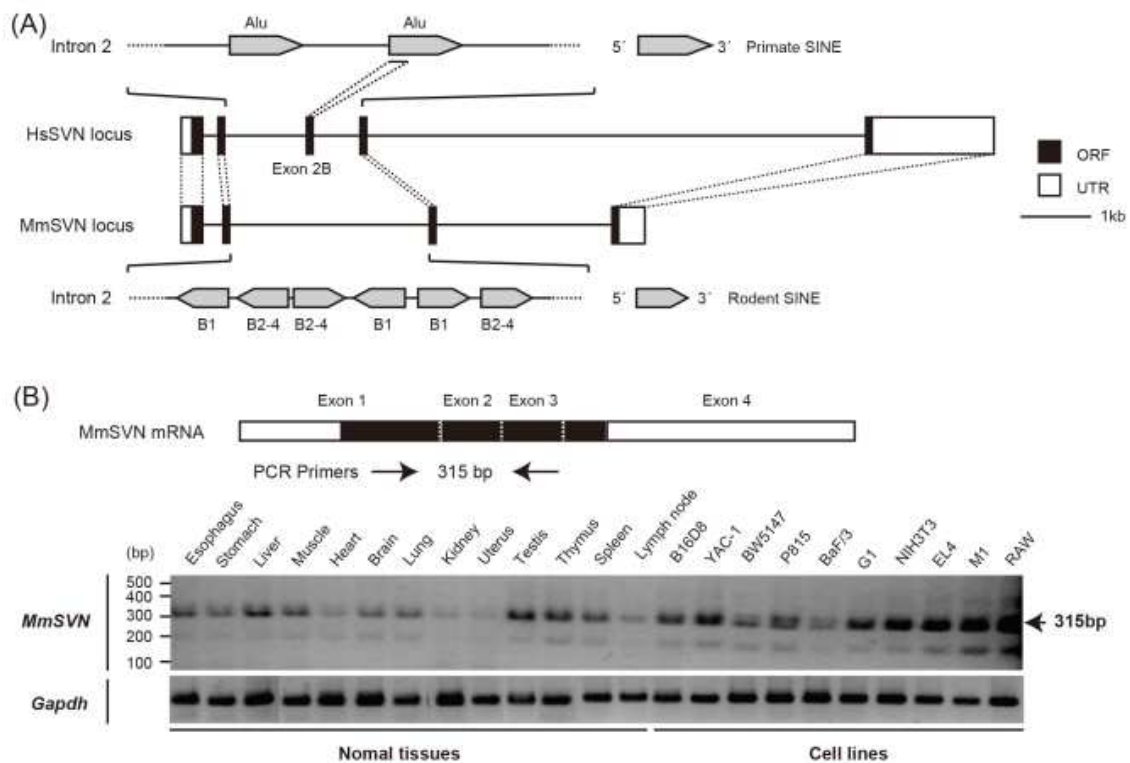


Figure 3

A. ヒトおよびマウスにおける *Survivin* の遺伝子構造の比較

Ensemble ヒトおよびマウスゲノムデータベースをもとにヒトおよびマウスの *survivin* 遺伝子構造を模式化した。霊長類およびげっ歯類の SINE は repeat masked program から予測されたものである。

B. マウス *survivin* の転写産物および正常臓器と細胞株における発現の RT-PCR 法による解析。矢印は検出に用いたプライマーの配置を示したものである。

2. 抗原の作製

HsSVN2B 蛋白のアミノ酸配列の中で、エクソン 2B に由来するペプチドの中に特異的な CTL を起動する配列が含まれていることが報告されている^{15,17,18}。実際の担癌患者においても SVN2B 特異的 CTL が起動することが確かめられ、CTL クローンも作成されている²²。

ヒトとマウスの *survivin* は高い相同性を有しているもののアミノ酸配列には若干の違いがある。今回我々の実験系においては、より HsSVN2B に特化した免疫応答を評価する目的で、MmSVN2B と名付けたキメラ蛋白を人工的に作製した。すなわちマウス SVN のエクソン 2 と 3 の間にヒト SVN2B のエクソン 2B を挿入したキメラ遺伝子を 2step PCR で作製し (Fig.4A, 4B)、pCold II ベクターを用いて BL21 大腸菌を transformation しキメラ蛋白 MmSVN2B を作製した。

ペプチドマップをみるとエクソン1のN末に変異が集中しており、この領域の中にCD4エピトープのSVN13-27^{16, 21}が存在する(Fig.4B)。マウスではなくヒトにおいてだが、既報においてはヒトSVN13-27によって特異的なCD4陽性T細胞が誘導されたと報告されている²³。

今回我々の実験系においてはpCold IIベクターにMmSVN2B、HsSVN2Bを組み込んで大腸菌に作らせてprofiniaTMをつかって精製した。最後に200 μg/mlのポリミキシンBを添加したものを以後のマウス実験に用いた。

精製した蛋白についてはSDS-PAGEで精製の確認を行い、目的サイズ(MmSVN2B 20.5kDa、HsSVN2B 20.6kDa)付近にバンドが形成されることを確認した(Fig.4C)。

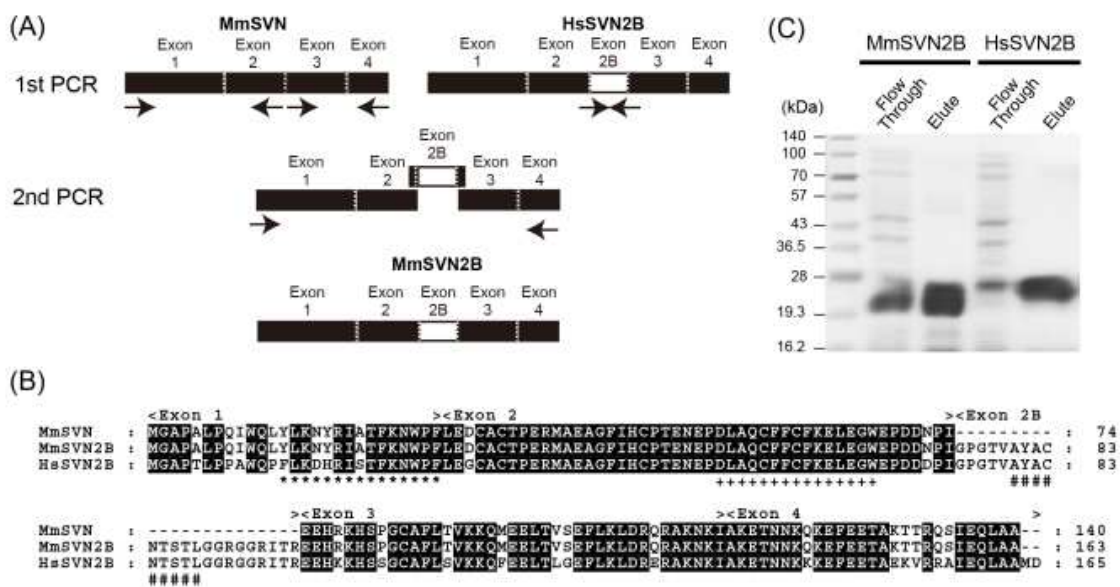


Figure 4 MmSVN2B 蛋白の構造と精製

A.MmSVN2B キメラ遺伝子の作製方法。MmSVN のエクソン 1-2、3-4 および HsSVN2B のエクソン 2B をそれぞれの配列に重なるように増幅 (1step PCR) し、それらをテンプレートとして MmSVN2B キメラ遺伝子を作製 (2nd PCR)。

B.HsSVN2B と MmSVN、MmSVN2B のアミノ酸配列。黒塗り部分は同一配列部分。*は Hs/MmSVN13-27 ペプチド、+は Hs/MmSVN53-67 ペプチド、#は SVN2B ペプチド。

C.ProfiniaTM による His タグ MmSVN2B、HsSVN2B 蛋白の精製。12.5%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にて確認を行った。精製蛋白の溶媒は段階的に 2M 尿素含有 PBS に置換した。

3. MmSVN2B、HsSVN2B 抗原蛋白に対する免疫応答の評価

HLA-A*2402 Tg マウスに対して、polyI:C 併用下に MmSVN2B、HsSVN2B 蛋白を投与した際の免疫応答の評価を行った。

陽性コントロール群は PBS、OVA+polyI:C 投与群を設定した。

実験群は PBS、MmSVN2B、HsSVN2B、MmSVN2B+polyI:C、HsSVN2B+polyI:C の 5 群に分けた(**Fig.5**)。それぞれ週に 1 回皮下注射にて、4 回反復投与した。抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、抗体産生についての評価は抗原の最終投与から 1 週間後に脾臓を摘出し脾細胞を調整しておこなった。

3-1. CD8 陽性 T 細胞の応答

最終免疫から 1 週間後に HLA-A*2402 Tg マウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調整した。CD8 陽性 T 細胞の応答の評価方法として、テトラマー陽性細胞の査定と、抗原ペプチドによる再刺激後の IFN γ 産生 CD8 陽性 T 細胞の査定を行った。OVA+polyI:C 投与群における再刺激は SL8(SIINFEKL)で行い、MmSVN2B、HsSVN2B +/-polyI:C 投与群における再刺激は SVN2B ペプチド (AYACNTSTL)を用いた。

抗原特異的なテトラマー陽性細胞の検出を行うために、陽性コントロール群においては viaprobe 陽性細胞を除外し、CD3 ϵ 陽性の細胞群をゲートして CD8 α 陽性かつ OVA-tetramer 陽性細胞の評価を行った。

実験群においては viaprobe 陽性細胞を除外し、CD3 ϵ 陽性の細胞群をゲートして CD8 α 陽性かつ SVN2B-tetramer 陽性細胞の評価を行った。

陽性コントロールにおいては、OVA+polyI:C 投与群において OVA-tetramer 陽性 CD8 陽性 T 細胞の有意な増加を認め、SL8 で再刺激後の IFN γ 産生 CD8 陽性 T 細胞の有意な増加が確認され実験系に問題がないことを確認した(**Fig.5A, 5B,5C, 5E**)。

実験群においては、MmSVN2B+polyI:C 投与群においてのみ SVN2B-tetramer 陽性 CD8 陽性 T 細胞の有意な増加を認めた。SVN2B ペプチドによる再刺激においてはいずれの群においても IFN γ 産生 CD8 陽性 T 細胞の有意な増加は認められなかった(**Fig.5A, 5B, 5D, 5F**)。

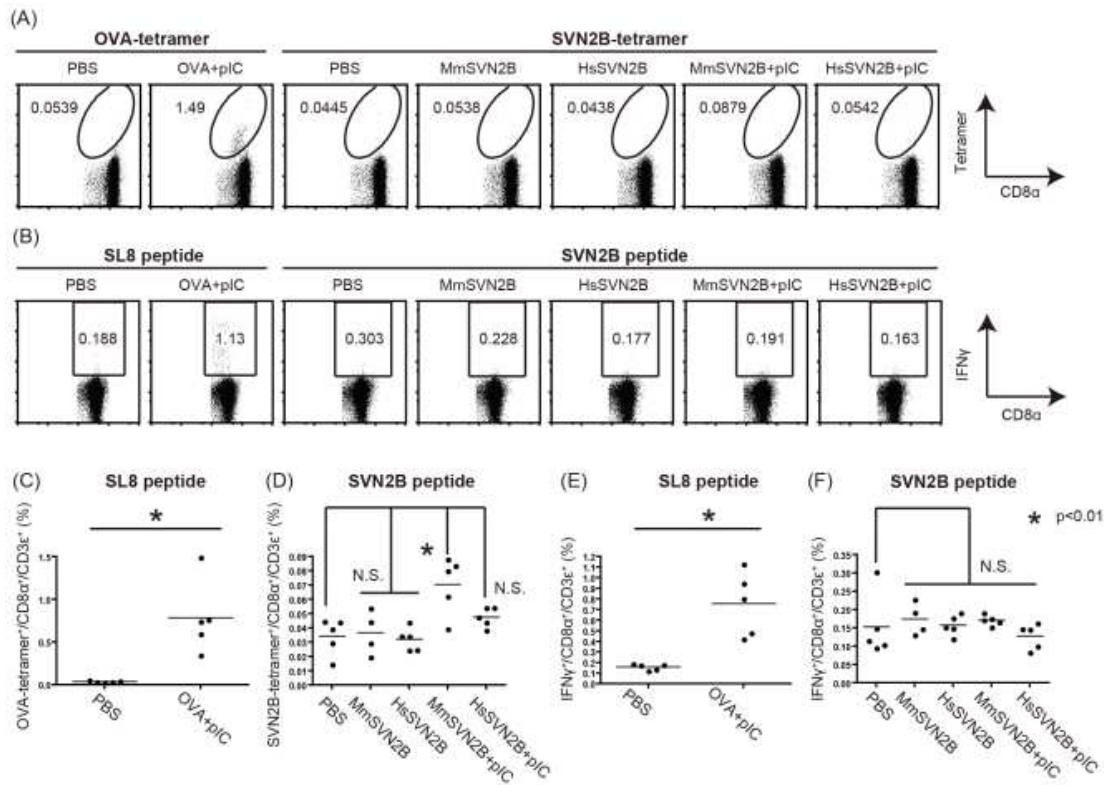


Figure 5 OVA ならびに MmSVN2B、SVN2B 特異的 CD8 陽性 T 細胞の増幅
 A. 抗原蛋白 100 μg +/- polyI:C 100 μg を週に 1 回、4 週免疫し、最終免疫から 1 週間後に脾細胞を調整して tetramer 陽性細胞を評価した。OVA+polyI:C 群、MmSVN2B+polyI:C 群において tetramer 陽性細胞の有意な増加を認めた。
 B. 調整した脾細胞に SL8 あるいは SVN2B ペプチドを添加して 6 時間培養した際の IFN-γ 産生を FACS で評価した。SL8 群では有意な IFN-γ 産生を認めたが、SVN2B ペプチド群では有意な IFN-γ 産生は認められなかった。
 C,D. OVA あるいは SVN2B tetramer 陽性細胞の割合の平均
 E,F. SL8 あるいは SVN2B ペプチド特異的 IFN-γ 産生細胞の割合の平均

3-2. CD4 陽性 T 細胞の応答

最終免疫から 1 週間後に HLA-A24b マウスより脾臓を摘出し、脾細胞を調整した。CD4 陽性 T 細胞の応答を評価するため、陽性コントロール群については OVA323-339 ペプチドで再刺激を行い、IFN-γ 産生 CD4 陽性細胞の評価を行った(Fig.6A, 6B)。

実験群においてはヒトとマウスで同一の配列である Hs/MmSVN2B53-67 ペプチド、MmSVN2B 投与群に対して MmSVN2B13-27 ペプチドあるいは Hs/MmSVN2B53-67 ペプチド、HsSVN2B 投与群に対して HsSVN2B13-27 ペ

プチドあるいは HsSVN2B53-67 ペプチドを用いて再刺激を行い、IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞の評価を行った。

陽性コントロールの OVA+polyI:C 群において OVA323-339 特異的な IFN γ 産生 CD4 陽性細胞の有意な増加を認めた。

MmSVN2B 投与群、HsSVN2B 投与群における MmSVN2B13-27、HsSVN2B13-27 それぞれに対する特異的な IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞の増加は認められなかったが、ヒトとマウスで共通の配列である Hs/MmSVN2B53-67 で再刺激した際には抗原と polyI:C を併用した群において、すなわち MmSVN2B+polyI:C、HsSVN2B+polyI:C 投与群において Hs/MmSVN2B53-67 特異的な IFN γ 産生 CD4 陽性 T 細胞の有意な増加を認めた(Fig.6C, 6D)。

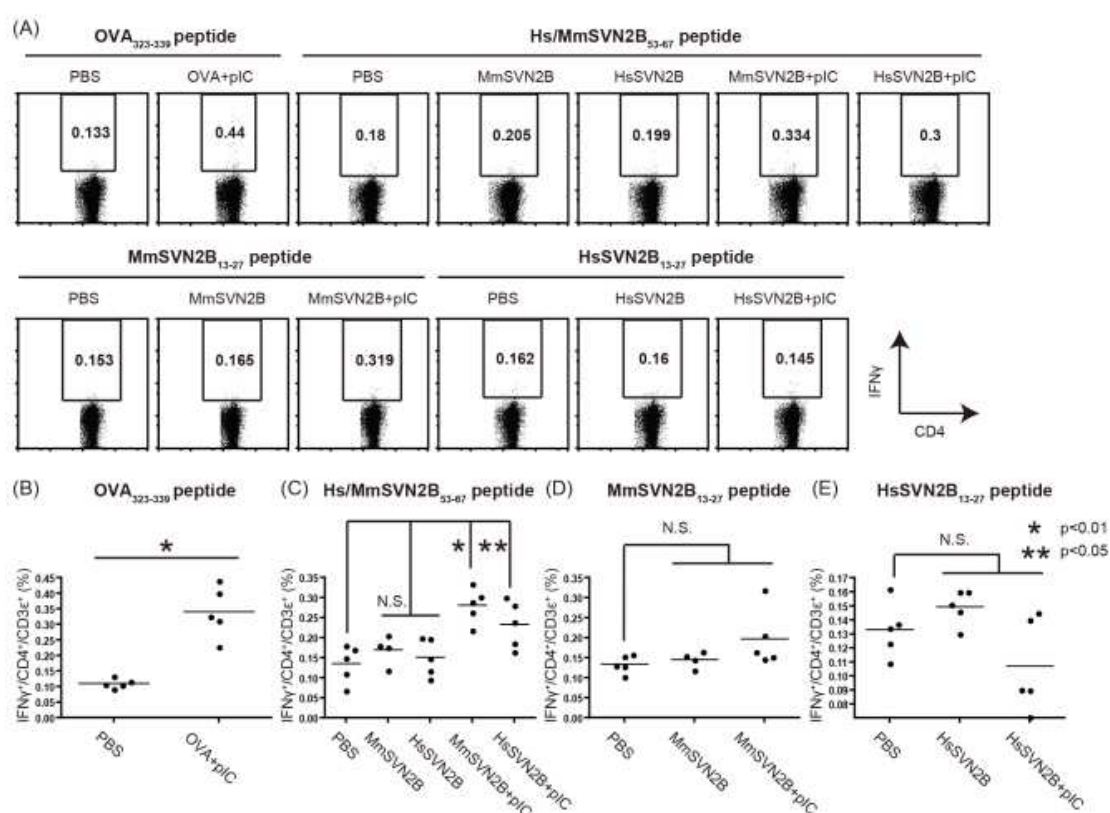


Figure 6 OVA および survivin 特異的 CD4 陽性 T 細胞の増幅

A. HLA-A*2402 Tg マウスに抗原 100 μ g +/- polyI:C 100 μ g の投与を週に 1 回、4 週間行い、最終免疫から 1 週間後に脾細胞を調整した。脾細胞は 100nM の OVA323-339 もしくは各種 survivin ペプチド(Hs/MmSVN53-67、MmSVN13-27、HsSVN13-27)を添加し 6 時間培養し、最後の 5 時間は brefeldinA を終濃度 10 μ g/ml で添加した。それぞれのペプチド特異的 CD4 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生を FACS で評価した。

B. OVA323-339 ペプチドに対する特異的 IFN- γ 産生細胞の割合の平均

- C. Hs/MmSVN53-67 ペプチドに対する特異的 IFN- γ 産生細胞の割合の平均
- D. MmSVN13-27 ペプチドに対する特異的 IFN- γ 産生細胞の割合の平均
- E. HsSVN13-27 ペプチドに対する特異的 IFN- γ 産生細胞の割合の平均

3-3. polyI:C 併用下での MmSVN2B、HsSVN2B 投与による抗体産生の評価
抗体のクラススイッチには Th1 細胞の活性化が不可欠であることが知られている。

polyI:C 投与の有無によって抗体産生に差があるかどうかを検討した。

最終免疫から 7 日後にマウスから血清を採取して抗原特異的な抗体の産生の有無を評価した。

陽性コントロールは OVA+polyI:C 群とし、IgG1、IgG2a、IgG2b いずれのサブクラスにおいても OVA 特異的な抗体産生が起きていることが ELISA 法で確認された (**Fig.7 左側**)。

一方実験群においては、MmSVN2B、HsSVN2B いずれにおいても抗原単独では有意な抗体産生は認められなかったが、polyI:C 併用時には IgG1、IgG2a、IgG2b いずれのサブクラスにおいても有意な抗原特異的な抗体産生が認められた (**Fig.7 中央および右側**)。

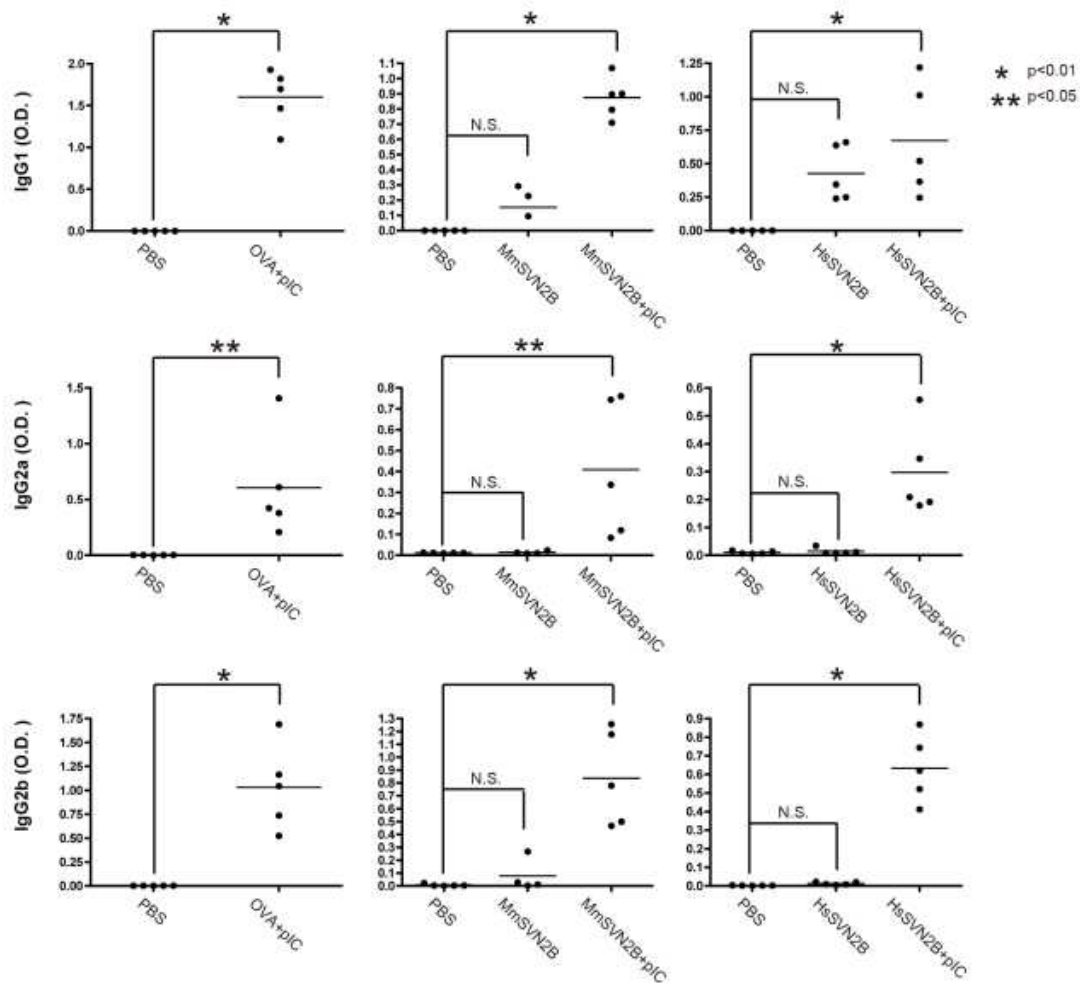


Figure 7 OVA および SVN 特異的抗体の産生の評価

抗原蛋白 100 μ g +/- polyI:C100 μ g で週に 1 回、4 週間免疫されたマウスの血清を回収し、IgG2a/b および IgG1 の抗血清を用いて抗 OVA、抗 SVN 抗体の産生を評価した。

OVA+polyI:C 投与群においては IgG1、IgG2a、IgG2b いずれのサブクラスにおいても抗体産生が認められた (左側)。MmSVN2B、HsSVN2B 単独投与では有意な抗体産生が認められなかったが、polyI:C 併用時には IgG1、IgG2a、IgG2b いずれのサブクラスにおいても有意な抗原特異的抗体産生が認められた (中央、右側)

考 察

今回我々は、HLA24b-Tg マウスにおいて、polyIC および MmSVN2B タンパク質の投与によって Th1 細胞活性化およびそれに引き続いての Hs/MmSVN53-67 特異的 CD4+ T 細胞、SVN 特異抗体を誘導されることを実証した。

この結果は、DEC205 モノクローナル抗体に結合させた HsSVN を Balb/c マウスに投与した Charalambous らの先行報告と、部分的にことなっている²³。その違いというのは、我々の C57BL/6 マウスに polyI:C と MmSVN2B を投与する系では MmSVN13-27 特異的 CD4 陽性 T 細胞の有意な増加が検出できなかったという点である。MmSVN2B と HsSVN2B という異種間のアミノ酸配列の違いが必ずしも CD4 陽性 T 細胞を起動させるとは限らないことが示唆される。また、Balb/c マウスと C57BL/6 マウスでの MHC クラス II 分子のハプロタイプの違いや先行研究における Dec205 モノクローナル抗体の使用による違いによって結果が異なっているのかもしれない。

SVN2B 特異的な CD8 陽性 CTL は、特異的に検出できるテトラマー試薬 (Fig.8) を用いても検出することはできなかった。つまり polyI:C は同系の抗原に应答して自己反応性の CD4 陽性 Th1 細胞の増殖を引き起こした一方で、異種である SVN2B ペプチド特異的 CTL の増殖は起こさなかった。

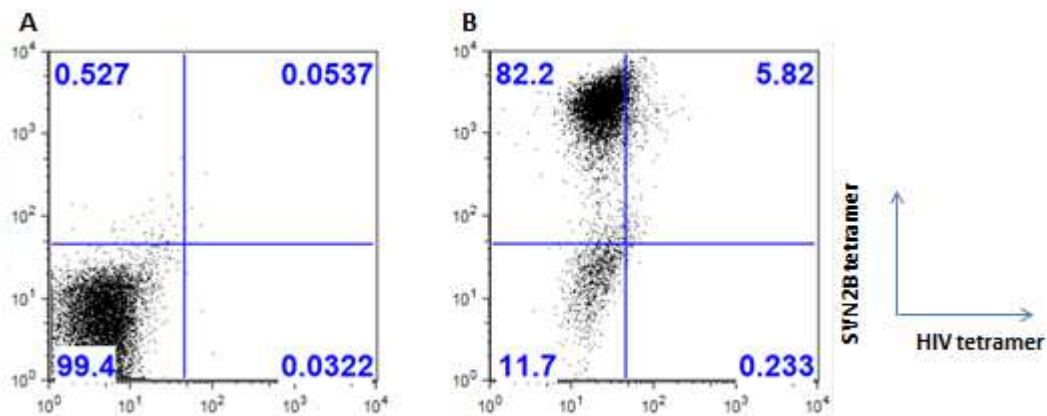


Figure 8 SVN2B tetramer 試薬の検討

A. C57BL/6 WT マウスの脾細胞をサンプルで SVN2B tetramer 陽性細胞を検討。

B. HsSVN2B CTL クローンをサンプルにしたところ SVN2B tetramer 陽性細胞が正しく検出され、試薬に問題のないことが確認された。

本実験において OVA は陽性コントロールとして用い (Fig.5A, B 左側)、SL8(SIINFEKL)特異的 CTL は OVA テトラマーを用いてモニターした⁶。本研究においては polyI:C と MmSVN2B 併用による T 細胞の活性化に注目した。しかしながら polyI:C にもロット間で T 細胞の活性化作用の強さに差ばらつきがあるようであり⁶、ロットによって polyI 鎖と polyC 鎖の長さにはばらつきがあることと関連があるかもしれない。また Azuma らの実験での抗原の量は、本実験におけるものよりも多い。

特異抗体による CD40 の刺激は CD8 陽性 T 細胞のクロスプライミングを増強し²³、CD40 刺激は CD8 α 陽性 DC において polyI:C 投与によって増強されるが、この効果も polyI:C のロット間でのばらつきがある。こういった問題点は RNA 二重鎖を決められた長さに合成する方法の開発によって解決されると考えられる。

ポイントは 2 点あげられる。まず第一に polyI:C はこれまで報告されている CD8 陽性 T 細胞の誘導に加えて、CD4 陽性 T 細胞の増殖をも引き起こすという点である。

polyI:C によってどのように、どのサブセットの CD4 陽性 T 細胞が増殖するのかは明らかでない。

polyI:C は主に IFN 誘導経路 RIG-I/ MDA5 と TLR3⁴ の活性化しうる因子である。これらの経路によって、宿主の免疫細胞は I 型、III 型 IFN 及びサイトカインを産生し、また抗腫瘍的に作用する液性因子が産生される。TLR3 は、CD8 α 陽性 DC において polyI:C を含む二重鎖 RNA の刺激によってクロスプレゼンテーションを引き起こす^{6, 24}。

polyI:C によって誘導される CD4+ T 細胞のヘルパー機能は増強されるが、通常担癌マウスにおいては CD4 陽性 T 細胞の機能は抑制されており、自然免疫応答によってその抑制を緩和することができるとされている²⁵。

SVN 抗原と polyI:C による刺激は腫瘍によってもたらされた抑制的な環境を、抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の活性化と維持に適した環境へと変化させる可能性がある^{26, 27}。近年の報告によると養子免疫された CD4 陽性 T 細胞は CD8 陽性 T 細胞とは独立して腫瘍の拒絶を起こすとされている^{28, 29}。この場合の腫瘍の拒絶は CD4 陽性 T 細胞から放出されるサイトカイン²⁸や CD4 陽性 T 細胞とマクロファージや NK 細胞といった他の免疫担当細胞との相互作用によって引き起こされるようである²⁹。

polyI:C で刺激された DC は細胞同士の接触によって NK 細胞の活性化を引き起こす³⁰。腫瘍内のマクロファージは二重鎖 RNA の直接的な標的である可能性があり、polyI:C によって腫瘍支持的なマクロファージから殺腫瘍活性をもったマクロファージへと変換される可能性も報告されている³¹。IL-12p40 は二重鎖

RNA に応答して、TICAM-1/ Batf3 経路を介して優先的に産生される³²。したがって、二重鎖 RNA と TAA ペプチド/蛋白を投与することで様々なエフェクター細胞を誘導しうる。我々は、Th1 特性を有する CD4⁺ T 細胞は polyI:C によって誘導されたエフェクターであることを見出し、polyI:C は SVN を TAA として有する腫瘍細胞に対して抗腫瘍的に働きうることを示した。エピトープの配列と疎水性がマウスの Th1 指向性に影響した可能性があるが、MmSVN2B と polyI:C の投与によって CD4 陽性エフェクター T 細胞を誘導することができた。したがって *in vivo* での RNA アジュバントと抗原の投与は MHC クラス II の抗原提示及び I 型 IFN とサイトカインの産生に引き続いて CD4 ヘルパー T 細胞を誘導する。

CD4 陽性 T 細胞は B 細胞の発生刺激によって抗体の産生を促進する³³。注目すべきことに、これは RNA アジュバントにみられる特異的な特徴である。TLR2 アゴニストの Pam2CSK4 などの Pam2 リポペプチドや MALP2 は潜在的には十分な抗腫瘍活性を持っている³⁴ものの、DC を介した抗腫瘍 NK 活性を誘導することはできていない^{35, 36}。

Treg や Tr-1 といった制御性の CD4 陽性 T 細胞や IL-10 は抗原の存在下で Pam2 ペプチドによって誘導される³⁵。それにもかかわらず Pam2 リポペプチドは強固な抗腫瘍 CTL の増殖をも引き起こす³⁴。このように CD8 陽性 T 細胞の増殖の様式は TLR2 アゴニストと TLR3/MDA5 アゴニストの間では違いがあるようである。

もう一つのポイントは SVN を免疫する系においてどのようにして Th1 エフェクターとして働く自己反応性の CD4 陽性 T 細胞が発生したかということである。自己反応性の T 細胞の増殖は正常マウスにおいては抑制されているため、通常は検出感度以下にとどまるはずである³⁷。マウスは DNA や RNA にさらされると蛋白に対する自己免疫疾患を発症するため³⁸、自己反応性の CD4 陽性 T 細胞は抗原存在下に投与される polyI:C によって正の選択を受ける可能性も考えられる。しかしながら我々の検討においては既報と同じく、たとえ抗原と一緒に投与したとしても polyI:C はわずかなクロスプライミングしか起こさなかった²³。我々の検討でも既報においても、同系・異種いずれの CD4 エピトープも CD4 陽性 T 細胞を起動し抗体産生と抗腫瘍活性を持つ Th1 指向性を刺激するものの、CTL の起動はほとんど起こらない²³。

我々の実験結果から、自己反応性 CD4 エピトープはヒトとマウスにおいて同一で、Th1 に指向させる働きをもっていると考えられ、DC やマクロファージを刺激し T 細胞と B 細胞を起動すると示唆される。しかしそう考えると、マウス SVN へのエクソン 2B 配列の挿入によってなぜ、配列の異なる SVN13-27 ではなく共通配列の SVN53-67 に対する自己反応性 CD4 陽性 T 細胞が誘導されたのか

という疑問が残る。一般に IL-10 などの調節性サイトカインや Treg の存在は自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の機能を抑制するため、自己免疫反応は検出されないというのが通説である 39, 40。

担癌マウスでは polyI:C は Treg によって抑制されていた T 細胞の自己反応性を解除し、腫瘍微小環境における CD4 陽性 T 細胞の機能を増幅する。MALP2 で刺激されたマウスにおいて Treg のレベルがふえる 35 が、Treg の数は polyI:C の投与による影響を受けなかった 34。

我々の条件の下では自己免疫疾患の兆候を示す polyI:C 投与後のマウスは認められていない。さまざまなアジュバント投与後の担癌マウスにおいて、CD4 陽性エフェクター細胞と Treg を含む制御性の細胞のバランスをとるための調節因子についてはさらなる研究が必要である 28, 40。

マウスのグリオーマの実験系において、マウス SVN のロングペプチドをローディングした DC を用いる DC therapy が生存期間の延長に寄与すると報告されている 41。先行研究の一つに担癌患者を対象に SVN2B ペプチドを IFN α と併用して投与したものがあり、臨床効果とペプチド特異的な免疫応答が認められたと報告されている 19。しかしながら SVN2B ペプチド単独では生存期間の延長や腫瘍の退縮効果は得られていない 17, 18。これらの結果から示唆されることは、腫瘍退縮を引き起こすためには、キラーT とヘルパーT 細胞の両方が起動する必要があるということである 29。

polyI:C と併用する形で抗原蛋白あるいは CD4 エピトープを含むペプチドを投与する実験系での研究報告によると、RNA アジュバントに加え Th1 ヘルパーペプチドが TAA 特異的なキラー、ヘルパーT 細胞の効率的な起動に必要と報告されており 44、投与するペプチドは CD4 陽性 T 細胞と抗体産生細胞の増殖を促進するために、クラス I およびクラス II ペプチドの両方を含むように設計されるべきと考えられる。また腫瘍に対する CD8 陽性 T 細胞の誘導方法についてはさらなる検討が必要と考えられる。

HLA-A*2402 トランスジェニックマウスにおいて、SVN2B キラーペプチドを埋め込んだ MmSVN2B および HsSVN2B が CD8 陽性 CTL を誘導しなかった理由は、CD8 T cell が誘導されていないか生存が持続しないかなどの解析を待つ必要がある。1. マウスで抗原エピトープが適切にプロセスされない、2. 2B ペプチド/HLA-A*2402 複合体の発現または抗原提示が十分高くない、3. 共刺激分子 CD80/CD86 は上昇したが、PD-1 などのチェックポイント阻害剤因子のレベルは不明である、4. T リンパ球の生存と増殖の経時的な変化が不明である、5. 制御系が強く起動する、などの可能性があり、今後の解決すべき問題点となると考えられる。

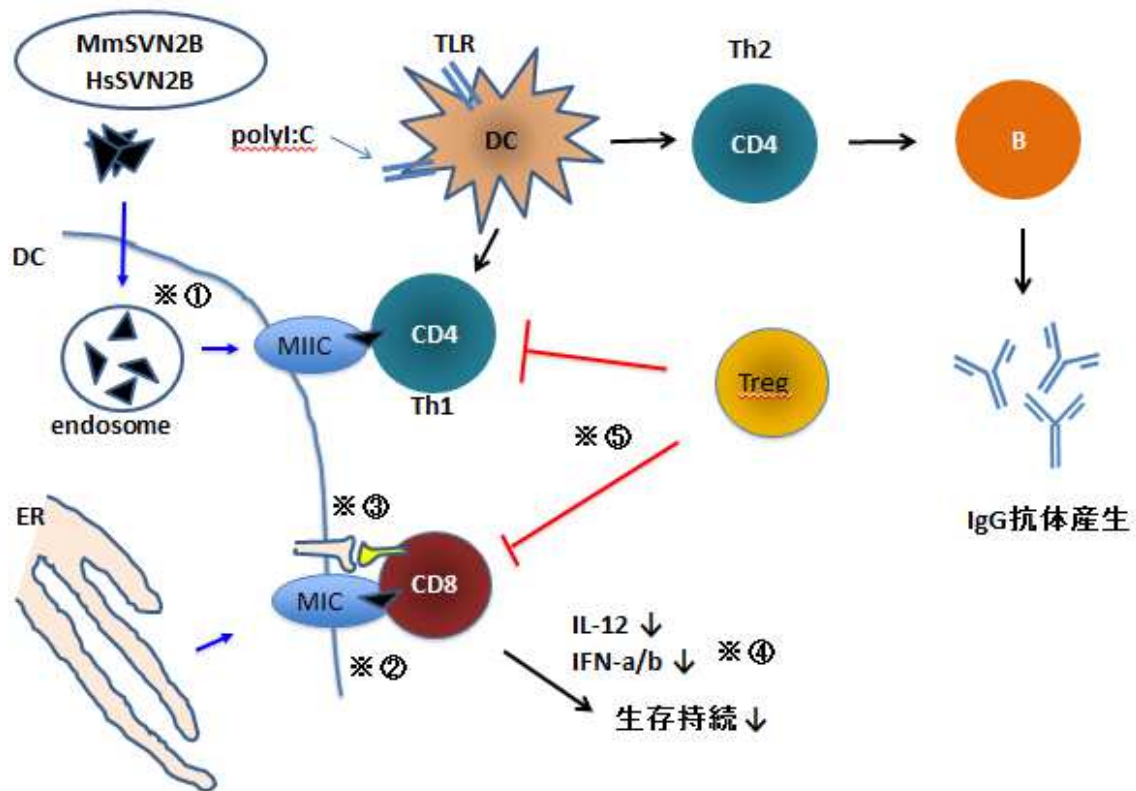


Figure 9 本研究から考えられた MmSVN2B、HsSVN2B に対する免疫応答 polyI:C 併用下で Th1 細胞を起動するが、抗原特異的 CTL の十分な起動には結びつかない一方、抗原特異的 IgG 抗体の産生を認めた。CTL 起動が認められない原因として、①抗原蛋白の適切なプロセッシングがなされていない、②2B ペプチド/HLA-A*2402 複合体の発現、または抗原提示が十分になされていない、③共刺激分子(PD1、CTLA4 など)のチェックポイント阻害因子が高い可能性、④2B ペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞が起動できていたとしてもその生存が短縮している可能性、⑤Treg をはじめとした制御系が強く起動している、などの可能性が考えられた。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. HLA-A*2402 トランスジェニックマウスに対して polyI:C 併用下で MmSVN2B 蛋白を免疫すると、Hs/MmSVN53-67 に対する特異的 CD4 陽性 T 細胞が起動する。
2. HLA-A*2402 トランスジェニックマウスに対して、polyI:C 併用下に MmSVN2B 蛋白、HsSVN2B 蛋白を免疫するとそれぞれに特異的な抗体産生が引き起こされるが、SVN2B エピトープに特異的な CD8 陽性 T 細胞は起動されない。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科医学専攻免疫学分野、瀬谷司教授ならびに松本美佐子准教授に深く感謝いたします。

本研究は札幌医科大学病理学第一講座、佐藤昇志教授、鳥越俊彦准教授、廣橋良彦助教をはじめ多くの方のご助力によって行われました。ここに深く感謝申し上げます。

研究を始める際に、右も左もわからなかった筆者に的確なご助言を下さり送り出してくださった北海道大学医学研究科内科学講座血液内科学分野、今村雅寛前教授に深く感謝いたします。そして研究を完遂するまで寛大に見守ってくださった北海道大学医学研究科内科学講座血液内科学分野、豊嶋崇徳教授に深く感謝いたします。

また、研究に関して素人であった筆者に、研究の考え方、進め方等懇切丁寧にご指導くださった北海道大学大学院医学研究科医学専攻免疫学分野特任助教、笠松純博士には言葉に尽くせぬほどのご助力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

研究生活のあらゆる面で筆者にお力添えいただいた、北海道大学医学研究科医学専攻免疫学分野の皆様、および病棟業務の間に研究のための時間を筆者に提供下さった北海道大学医学研究科内科学講座血液内科学分野の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究生生活を支えてくれた家族に感謝します。

2015年3月

引用文献

1. Pierre, G. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells *Nature*.425, 397-402(2003).
2. Burgdorf, S. *et al.* distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation *Science*. 316, 612-616(2007).
3. Bevan, MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J.Exp. Med.* **143**, 1283-1288(1976).
4. Matsumoto, M. & Seya, T. TLR3 : interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 805-812(2008).
5. Seya, T., Matsumoto, M. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1175-1184(2009).
6. Azuma, M. *et al.* Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8 α (+) dendritic cells. *Oncoimmunol.* **1**,581-592(2012).
7. Seya, T., Azuma, M., Matsumoto, M. Targeting TLR3 with no RIG-I/MDA5 activation is effective in immunotherapy for cancer. *Exp. Opin. Ther. Targets.* **17**, 533-544(2013).
8. Rosenberg, SA., Yang, JC., Restifo, NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* **10**, 909-915(2004).
9. Schmitz, M. *et al.* Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* **60**, 4845-4849(2000).
10. Andersen, MH. *et al.* Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* **61**, 869-872(2001).
11. Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends.Mol. Med.* **7**,542-547(2001).
12. Ambrosini, G. Adida, C. Altieri, DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**,917-921(1997).
13. Okada, H. *et al.* Survivin loss in thymocytes triggers p53-mediated growth arrest and p53-independent cell death. *J. Exp. Med.* **199**,

399-410(2004).

14. Fukuda, S. & Pelus, LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1087-1098(2006).

15. Hirohashi, Y. *et al.* An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin. Cancer Res.* **8**, 1731-1739(2002).

16. Li, F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* **92**, 212-216(2005).

17. Tsuruma, T. *et al.* Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J. Transl. Med.* **6**, 24(2008).

18. Honma, I. *et al.* Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1801-1807(2009).

19. Kameshima, H. *et al.* Immunotherapeutic benefit of α -interferon(IFN α) in 17 survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Sci.* **104**, 124-129(2013).

20. Nishiguchi, M. *et al.* Mycoplasma fermentans lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J. Immunol.* **166**, 2610-2616(2001).

21. Mahotka, C. *et al.* Differential subcellular localization of functionally divergent surviving splice variants. *Cell Death Differ.* **9**, 1334-1342(2002).

22. Idenoue, S. *et al.* A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1474-1482(2005).

23. Charalambous, A. *et al.* Dendritic cell targeting of survivin protein in a xenogeneic form elicits strong CD4+ T cell immunity to mouse survivin. *J. Immunol.* **177**, 8410-8421(2006).

24. Schulz, O. *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* **433**, 887-892(2005).

25. Lee MK 4th, Xu S, Fitzpatrick EH, Sharma A, Graves HL, Czerniecki BJ. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T cell function and conversion into Th1-like effectors by a Toll-like receptor-activated dendritic cell vaccine. *PLoS One* **8**, e74698(2013).

26. Ridge, JP., Di Rosa, F., Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474–478(1998).
27. Janssen, EM. *et al.* CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856(2003).
28. Corthay, A. *et al.* Primary antitumor immune response mediated by CD4⁺ T cells. *Immunity* **22**, 371–383(2005).
29. Perez-Diez, A. *et al.* CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood* **109**, 5346-5354(2007).
30. Akazawa, T. *et al.* Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**, 252-257(2007).
31. Shime H. *et al.* Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**, 2066-2071(2012).
32. Azuma, M. Matsumoto, M. Seya, T. PolyI:C-derived dendritic cell maturation and cellular effectors depend on TICAM-1-Batf3 axis in mice. *Proceedings Jpn. Cancer Assoc.* **72**,126(2013).
33. Mak, TW. *et al.* Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat Immunol.* **4**, 765-72(2003).
34. Chua, BY. *et al.* The use of a TLR2 agonist-based adjuvant for enhancing effector and memory CD8 T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.* **92**, 377-383 (2014).
35. Yamazaki, S. *et al.* TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS One.* **6**, e18833(2011).
36. Sawahata, R. *et al.* Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes. Infect.* **13**, 350-358(2011).
37. Gebe, JA. *et al.* Low-avidity recognition by CD4⁺ T cells directed to self-antigens *Eur. J. Immunol.* **33**, 1409-1417(2003).
38. Mills, KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 807-822(2011).
39. Danke, NA. *et al.* Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol.* **172**,5967-572(2004).

40. Quezada, SA. *et al.* Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637-650.(2010).
41. Michael, J *et al.* Therapeutic effect of a T helper cell supported CTL response induced by a surviving peptide vaccine against murine cerebral glioma. *J. Neurosci.* **28**, 1827-1835(2008).
42. Müller-Hermelink, N. *et al.* TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell* **13**, 507-518(2008).
43. Coussens, LM. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867(2002).
44. Casares, N. *et al.* Immunization with a tumor-associated CTL epitope plus a tumor-related or unrelated Th1 helper peptide elicits protective CTL immunity. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1780-1789(2001).