

# 癌抗原発現EBウイルスベクターを用いた細胞性免疫誘導法の研究

神田 輝 [北海道大学・遺伝子病制御研究所/助手]

高田 賢蔵 [北海道大学・遺伝子病制御研究所/教授]

今村 雅寛 [北海道大学・大学院医学研究科・癌診断治療学講座・血液内科/教授]

三浦 りゅう [株式会社イーベック/研究員]

## 背景・目的

ヘルペスウイルスの一種であるEBウイルスは、試験管内で末梢血由来のBリンパ球に効率良く感染し、これを自律増殖するリンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell line、以下LCL) へと形質転換する性質を有する。研究代表者らはBAC (Bacterial Artificial Chromosome) システムを用いて、任意の外來遺伝子を組み込んだEBウイルスベクターを迅速に産生する技術を有している。そこで、様々な癌細胞において高発現している癌抗原であるWT1 (Wilms' tumor 1) の遺伝子を組み込んだWT1遺伝子組み込みEBウイルスベクターを用いて、WT1を発現するLCLを樹立し、これを抗原提示細胞として用いて、体外においてWT1特異的細胞性免疫を誘導することを目的に研究を行った。

## 内容・方法

### ①癌抗原WT1を発現する組み換えEBウイルスベクターの産生細胞の樹立

WT1 cDNAを組み込んだEBウイルスゲノムのBACクローンDNA (WT1-EBV) を試験管内ライゲーション法により作製した。このWT1-EBVのDNAを、EBウイルス産生細胞であるP3HR1細胞へとトランスフェクションし、薬剤選択してBACクローンを保持した細胞を選択した。

### ②WT1を恒常発現するLCLの樹立

上記細胞よりWT1発現EBウイルスベクターを産生し、採血で得た3人の健康成人ドナーの末梢血Bリンパ球に試験管内感染させた。その後、薬剤選択しつつ不死化Bリンパ球を増殖させて、WT1発現LCLを樹立した。

### ③樹立したWT1発現LCLを用いたCTL誘導実験

2名の健康人ドナーについて、末梢血単核球PBMCのCD56陰性分画と、放射線照射不活化したWT1発現LCL (同一人由来) を混合培養することで、CTLの誘導を行った。EBV特異的CTL、およびWT1特異的CTLを、それぞれ、両者に特異的に反応するテトラマーにより解析した。

## 結果・成果

### ①癌抗原WT1を発現する組み換えEBウイルスベクターの産生細胞の樹立

P3HR1細胞にWT1-EBVを導入し、薬剤選択を行って得られた細胞は、WT1蛋白質を発現し、しかもWT1-EBVのDNAが環状DNA (エピゾーム) として安定に維持された。この細胞を刺激して得られたウイルス液をEBウイルス陰性Daudi細胞へと感染させたところ、90%以上の細胞でWT1蛋白質の発現を認めたことから、WT1を発現するEBウイルスベクター産生細胞であることを確認した。

### ②WT1を恒常発現するLCLの樹立

上記で得られたWT1発現EBウイルスベクターのウイルス液を、健康人ドナー3名由来のBリンパ球に、それぞれ試験管内感染させたところ、Bリンパ球は芽球化して細胞増殖を開始し、3週間後には、自律増殖するLCLが得られた。得られたLCLについて、WT1蛋白質の発現をウェスタン法により調べたところ、予想されるサイズである約60 kDaのバンドが認められ、WT1蛋白質が恒常発現していることが確認された。また蛍光免疫染色法により、約80%の細胞においてWT1蛋白質が核内に恒常発現していることを確認した。

### ③樹立したWT1発現LCLを用いたCTL誘導実験

2名の健康人ドナーリンパ球由来のWT1発現LCLを用いて、それぞれ同一人の末梢血単核球 (CD56陰性分画) を刺激することで、CTLの誘導を試みた。2—4週間目まで毎週、細胞の一部をとって、EBV特異的テトラマー、WT1特異的テトラマーを用いてテトラマー解析を行った。

その結果、共培養刺激により得られた細胞は、いずれのドナーの場合もCD8陽性細胞が優位 (ドナー1で75%、ドナー2で68%) であった。ドナー1については、共培養開始後3週目において、WT1テトラマー陽性細胞が0.13%、EBVテトラマー陽性細胞が0.80% (CD8陽性分画中では、それぞれ0.17%、1.05%) の割合で認められた。ドナー2については、共培養開始後2週目において、WT1テトラマー陽性細胞が0.06%、EBVテトラマー陽性細胞が6.78% (CD8陽性分画中では、それぞれ0.09%、9.87%) の割合で認められた。

以上の結果より、①WT1発現EBウイルスベクターを用いて、任意の個人の末梢血Bリンパ球に由来するWT1発現LCLを迅速に樹立可能なこと、②WT1発現LCLとPBMCの共培養により、EBウイルス特異的CTLのみならず、WT1特異的CTLも誘導できることが明らかになった。WT1テトラマー陽性細胞の割合が低かったことに関しては、用いたWT1テトラマーが単一エピトープを認識するCTLしか検出できないこと、WT1に感作されていない健康人ドナーPBMCを用いた実験であること、

などが原因として考えられた。

#### 今後の展望

WT1発現LCLを用いた体外CTL誘導法については、担癌患者のリンパ球を用いた解析も含め、より多くの検体を用いた解析、さらにWT1発現細胞をターゲット細胞として用いた細胞

傷害活性の検証が必須である。また癌抗原発現LCLを抗原提示細胞として応用していく上では、EBウイルス抗原によるEBV特異的CTL増幅を排除していくことが課題となる。今後、個人由来のリンパ球をもとに自律増殖する癌抗原発現細胞を容易に樹立できるという利点を最大限に生かすことができるよう、さらにシステムの改良を加えていく必要がある。