

高悪性度骨軟部肉腫抗原PBFの免疫応答と分子機能の解析

塚原 智英 [札幌医科大学 / 日本学術振興会特別研究員]

背景・目的

近年の化学療法の進歩で、多くの上皮系癌の生命予後は改善した。一方、若年者に好発する骨肉腫を代表とする骨原発悪性腫瘍は未だ予後不良であり、新しい治療法が強く求められている。

本研究では、我々がcDNAライブラリ発現クローニング法により同定したヒト骨肉腫抗原PBFについて、HLA-A24拘束性ペプチドワクチンの一次構造決定を行い、患者における免疫応答を判定する。同時に、PBFの新規転写調節因子としての機能を明らかにするために、PBFによる肉腫発生、増殖、アポトーシスの制御機構についての生物学的検討を行うことを目指した。

内容・方法

1. HLA-A24拘束性PBFペプチドワクチンの開発

日本人に多いHLA型はHLA-A24およびA24である。これらのHLA型で全人口の60%以上を網羅する。我々が同定したPBF抗原ペプチドはHLA-B55拘束性であった。PBFペプチドワクチンを広く臨床応用するために、今回A24拘束性ペプチドを同定した。

- () PBFの全アミノ酸配列よりHLA-A24に結合モチーフをもつペプチド配列を検索する。合成ペプチドを作製して、HLA分子に対して結合能力が高いペプチドを選択する。
- () HLA-A24陽性で、PBFを発現する腫瘍患者より末梢血を採取し、PBFペプチド特異的CTL前駆細胞の存在頻度をMHC-ペプチドテトラマーを用いて解析した。
- () MHC-ペプチドテトラマー陽性細胞の骨肉腫細胞株に対する細胞傷害活性を評価した。

2. 正常細胞および癌細胞におけるPBFの機能解析

PBFはDNA結合ドメインをもつ転写調節因子として報告された。しかし、その生理機能や発癌に関する機能は明らかにされていない。そこでPBFを制御する新規転写調節因子を同定するためにPBF promotor配列をgenome DNAよりクローニングしてluciferase assayを行った。同定したPromotor DNAをプローブとしてgel-shift assayにより新たな転写調節因子をスクリーニングした。

結果・成果

HLA-A24拘束性PBFペプチドワクチンの開発

- () PBF A24.2ペプチドがもともとHLA-A24分子と

の結合能が高かった。

- () 限界希釈法、in vitro抗原刺激、テトラマーを組み合わせた方法によりPBF A24.2ペプチド特異的CTLはHLA-A24陽性骨肉腫7/8例で検出された。CTLの存在頻度は全CD8陽性細胞中 6×10^{-7} ~ 7×10^{-6} (平均 4×10^{-6})であった。健常者では3/3例でPBF A24.2ペプチド特異的CTLが検出され、存在頻度は 9×10^{-7} から 5×10^{-6} であった。
- () 骨肉腫症例においてテトラマー陽性CTLはHLA-A24陽性PBF陽性の骨肉腫細胞株を傷害した。またテトラマー陽性細胞数と骨肉腫細胞傷害活性には有意な相関があった。

正常細胞および癌細胞におけるPBFの機能解析

genome DNAにおけるPBF転写調節開始点より10kbps上流までの領域をPBF promotor領域の候補とした。

- () 候補領域よりreporter plasmidを作成し、PBF陽性骨肉腫細胞株U2OSに遺伝子導入しreporter活性をスクリーニングした。
- () 計30種のreporter plasmidを用いてスクリーニングした結果、30bpsの領域にreporter活性があることがわかった。
- () この領域よりビオチン化oligo-dsDNA probeを作成した、このprobeを用いてgel-shift assayを行い、PBFプロモーター候補蛋白のバンドを検出した。現在この蛋白質の構造決定を行っている。

今後の展望

新規骨肉腫抗原PBFよりHLA-A24陽性患者に応用可能なペプチドを決定することができ、またペプチド特異的CTLの免疫応答を検出できた。今後このPBFペプチドワクチンを用いた第一相臨床試験のプロトコールを作成する。臨床試験委員会の承認を得た後に試験を開始する。ペプチドワクチンの副作用と抗腫瘍効果を判定する。患者末梢血における細胞性免疫応答をMHC-ペプチドテトラマー、細胞傷害試験により解析する。

また、PBFの機能をさらに明らかにしていくため、(1)PBFプロモーター候補蛋白の構造決定、(2)PBFノックアウトマウスの作成、(3)siRNAを用いたPBFノックダウン系の解析、もさらに進めていく。