

高悪性度骨軟部肉腫抗原 P B 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 ペプチドがもっとも 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 10 kbps 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、30 bps の領域に reporter 活性があることがわかった。
- () この領域より BioT 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。