

TOPICS

腫瘍拒絶抗原と癌ワクチン

生 越 喬 二*

- 1) Benoit Van den Eynde, Bernard Lethe, Aline Van Pel, Etienne De Plaen, and Thierry Boon : The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J. Exp. Med.* 173 : 1373-1384, 1991.
Ludig Institute for Cancer Research, Brussels Branch, 74 avenue Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium, and the Cellular Genetics Unit, University of Louvain, B-1200 Brussels, Belgium.
- 2) P. Van der Bruggen, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, Etienne De Plaen, Benoit Van den Eynde, and Thierry Boon : A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on human melanoma. *Science* 254 : 1643-1647, 1991.
Ludig Institute for Cancer Research, Brussels Branch.
- 3) Ofer Mandelbolm^{*1)}, Gideon Berke^{*1)}, Mti Fridkin^{*2)}, Michael Feldman^{*1)}, Miriam Eisenstein^{*3)}, and Lea Eisenstein^{*1)} : CTL induction by tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369 : 67-71, 1994.
^{*1)}Department of Cell Biology^{*2)}, Organic Chemistry and^{*3)} Structural Biology, The Weizmann Institute of A Science, Rehovot 76100, Israel.
- 4) Yajun Guo, Mengchao Wu, Hen Chen, Zxiaoning Wang, Guangluo Liu, Gauanglo Li, Jing Ma, and Man-Sun Sy. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 263 : 518-520, 1994

日本癌病態治療研究会のHLA班では、各種癌疾患患者のHLA抗原を測定しています。近年の分子生物学の目覚ましい発展で、HLAの分子レベルの研究が可能となり、細胞性免疫能の分子機構が解明されつつあります。

従来より、免疫システムの特異性を利用して癌治療を行うことは、理想とされてきました。すなわち、細胞傷害性Tリンパ球は特異的な抗原を有する細胞のみを破壊し、健全な（抗原を有していない）細胞は攻撃しないという免疫システムの特異性で、いわゆる癌治療に応用した場合には、その副作用が軽微であると考えられています。

腫瘍拒絶（または腫瘍特異）抗原は、1950年代にはすでに観察されていました。この方面の研究は、多量の発癌化合物をマウスに投与して発生した癌を手術的に摘出し、その後と同じ腫瘍細胞を注射したところ、そのマウスには癌の再発がみられなかったことから研究がはじまっています。

しかし、発癌物質で誘導された腫瘍や突然変異原にさらされた腫瘍——いわゆる免疫原性（immunogenicity）の強い癌（ヒトの癌でも免疫原性が強いものはメラノーマ、腎癌などと考えられ、従来より自然治癒症例が報告されています）——では、そのような抗原が発見されていますが、その後の検討で自然発生癌では、残念ながらほぼ否定される結果となりました。

しかし、昨年、イスラエルのWeizmann研究所のグループが動物の癌では2番目、ヒトのメラノーマを含めると3番目の腫瘍関連抗原を釣り上げ、そのアミノ酸配列を発表しました（*Nature* 369 : 67-71, 1994）³⁾。

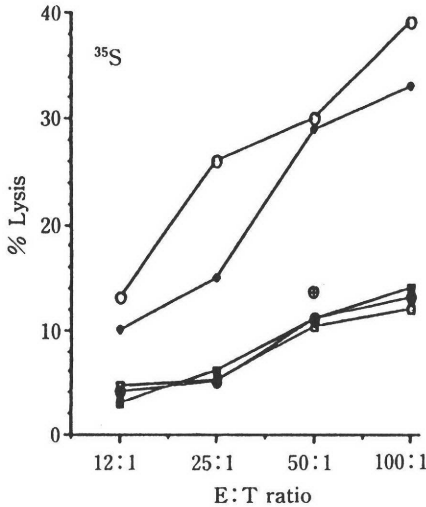
さらに、つづいて、新しい概念に基づくGuoらの癌ワクチン療法が報告されました（*Science* 263 : 518-520, 1994）⁴⁾。

本稿では、上掲した参考文献を紹介するとともに、腫瘍拒絶抗原（いわゆる癌抗原）と癌ワクチンの研究の現況につき述べてみたいと思います。

* 東海大学医学部第二外科学教室

表 1

MUT2	H-Phe-Glu-Gln-Asn-Thr-Ala-Gln-Ala-OH
MUT1	H-Phe-Glu-Gln-Asn-Thr-Ala-Gln-Pro-OH
Connexin 37	H-Phe-Glu-Cys-Asn-Thr-Ala-Gln-Pro-OH



Targets

- RMA-S
- MUT2
- MUT1
- connexin37
- VSV
- MUT1 preincubated with 20-8-4

図 1

(Nature 369 : 67-71, 1994 ; Science 263 : 518-520, 1994より)

腫瘍拒絶抗原の発見と同定

まず, Thierry Boonの率いるLudwig 研究所の業績ですが, 彼らは, *in vitro*で強い活性を有する細胞傷害性T細胞 (CTL) を樹立し, 抗原特異性の解析を行いました。DBA/2由来のマウス mastocytoma P815腫瘍から遺伝子を取り出し, トランスフェクトすることによってP1A拒絶抗原遺伝子を同定しました¹⁾。さらに, 彼らは同じ手法によって, ヒトメラノーマ患者由来のCTLが認識するメラノーマ抗原, MZ2-E (E抗原) の発現を支配するMAGE-1遺伝子を発見しました。E抗原のMHC成分はHLA-A1で, このHLA分子に結合するMAGE-1ペプチドは9個のアミノ酸であることを報告しています²⁾。このペプチドは, HLA-A1

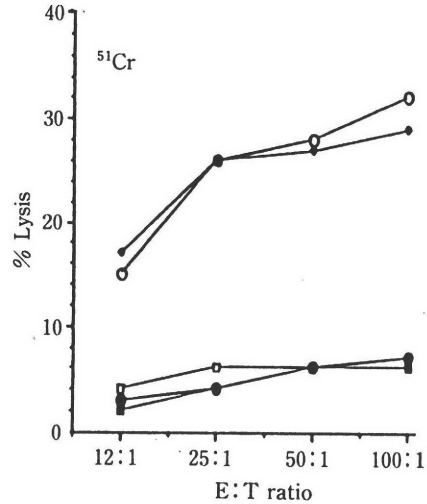


図 2

(Nature 369 : 67-71, 1994 ; Science 263 : 518-520, 1994より) (凡例は図1参照)

拘束性であることやHLA-A2拘束性のヒトメラノーマ抗原としてのチロシナーゼも報告していますが, アミノ酸配列の決定までには至っていません。

一方, Weizmann研究所の研究グループは, 3LL (Lewis lung) carcinomaの癌ペプチドを酸処置することによって抽出し, 逆相HPLCにて溶出し, CTL認識ペプチドのMUT1, MUT2を同定し, アミノ酸配列を発表しました。この8個のアミノ酸残基をもつペプチドは, マウスのgap-junction proteinであるconnexin 37とかなり似たアミノ酸配列をしていることが判明しました。すなわち, MUT1, MUT2はK^b拘束性の腫瘍関連抗原ペプチドであると考えられます。

彼らはいままでに, 高転移癌の3LL carcinomaのD122癌細胞クローンではH-2K^b分子の発現が少なく, 低免疫原性 (low immunogenic) でH-2K^bをトランスフェクトすれば, 転移が抑制され免疫原性を有することや, H-2D^bはD122細胞上に発現しているが, CTLに関与していないことを確認し

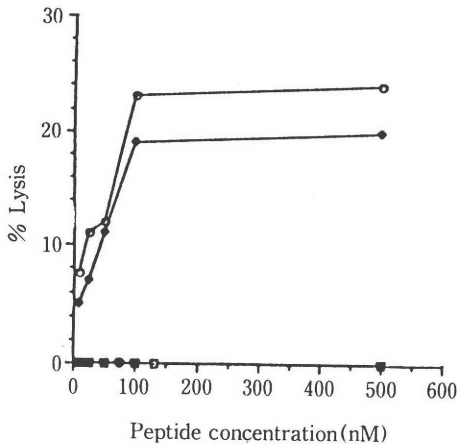


図 3

(Nature 369 : 67-71, 1994 ; Science 263 : 518-520, 1994より) (凡例は図1参照)

ています。H-2K^bをトランスフェクトされたK^b39.5細胞を酸処置することによってcrude peptide fractionを得、逆相HPLCを3回行い、100pmolの active peakからアミノ酸配列をまず、“Phe-Glu-Glu-Asn-Thr-Ala-Gln”と決定いたしました。8番目はAla (MUT2) かPro (MUT1), 9番目はGlycineだろうと述べています。

NBRFのデータバンクからhomologyを検討すると、マウスのgap-junction proteinであるconnexin 37 (Phe-Glu-Cys-Asn-Thr-Ala-Gln-Pro-Gly, positions 52-60) との相同性が認められています。いままでに報告されたK^b-restricted peptideは8個のアミノ酸と考えられているので、表1のようなペプチドを合成し、CTLを検討した結果、図1, 2, 3のごとくMut1, 2にのみCTL活性が認められたと報告しています。MUT1またはMUT2が本当にconnexin 37遺伝子からつくられるかどうかRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) で確認を行ったところ、TGT (Cys) を含んだprimerでは正常組織および腫瘍組織に、CAG (Gln) を含んだprimerでは腫瘍組織のみにその産物を認めています。さらに8番目のアミノ酸はPro (CCG) で、Ala (GCN) ではないと報告しています。

癌ワクチンの試み

一般的に、ワクチンは正常細胞に影響せず、特異的に標的とする病原菌や細胞を攻撃するということで、理想的な予防的治療法と考えられています。最良なワクチンといわれているジフテリアや破傷風に対するワクチンがありますが、病原細菌が産生した毒素の不活化した蛋白質だけからなっているサブユニットワクチンで、癌ワクチンを考えるうえで示唆に富む事実と考えられます。Adaは、ワクチンには、抗原提示細胞の活性化、免疫記憶細胞の産生、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞の産生、リンパ系組織内の濾胞樹状細胞上の抗原の存続などの作用が必要であると述べています。腫瘍細胞自体を利用した癌ワクチン療法が、メラノーマ、腎癌などで使用され、BCGなどのアジュバンドとの併用治療では有効例が報告されています。

抗原認識の分子機構を利用した癌ワクチン療法として、遺伝子治療があります。遺伝子的免疫修飾、すなわち、サイトカイン遺伝子 (インターロイキン-2あるいは4, インターフェロン腫瘍壊死因子(TNF)) やMHC遺伝子, B7遺伝子のトランスフェクションや, nm23遺伝子, P53遺伝子などの癌抑制遺伝子の腫瘍細胞内トランスフェクションによって腫瘍細胞の免疫原性が増すことが期待されています。

現在、ヒト固形癌に発現しているのが確認されている腫瘍拒絶抗原は、Boonらが報告したメラノーマ抗原-1(melanoma antigen-1 MAGE-1)のみであります。そのMHC成分はHLA-A1であり、MAGE-1遺伝子も同定されています。HLA-1・MAGE-1複合体はE抗原とよばれ、メラノーマ患者をE抗原で免疫する臨床治療研究が、外国では行われています。すなわち、HLA-A1遺伝子とMAGE-1遺伝子の発現が確認された患者には、このような特異的免疫療法が有効であると考えられています。臨床研究の結果が待たれます。

一方、Guoらは、ハイブリドーマを作成することで免疫原性を増強できることを示しています。すなわち、化学発癌で誘導されたWister ratの肝癌細胞と活性型B細胞のハイブリドーマ細胞 (BERH-

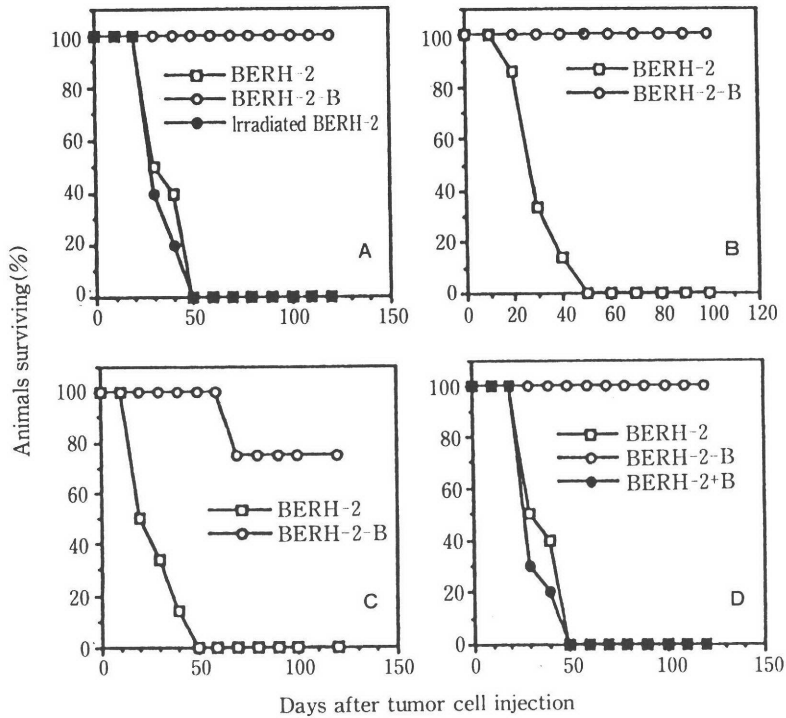


図 4

(Nature 369 : 67-71, 1994 ; Science 263 : 518-520, 1994より) (凡例は図1 参照)

2-B cell hybrid cell) は免疫原性が増し、免疫反応を惹起すると報告しています。

彼らは、MHC class I 抗原と intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) が発現し、MHC class II 抗原, leukocyte functional antigen-1 (LFA-1), B7 が細胞表面に発現していない肝癌細胞 (BERH-2) を、Freund's adjuvant を注射したあとに rat の脾臓より取り出した活性型 B 細胞と、polyethylene glycol (PEG) のもとで混合し、ハイブリドーマ細胞を作成しました。このハイブリドーマ細胞では、MHC class II 抗原, ICAM-1, leukocyte functional antigen-1 (LFA-1), B7 の発現と MHC class I 抗原の発現増強がみられています。

2×10^6 個の BERH-2 細胞を肝臓内に注入すると、肝臓に腫瘍をつくり、60 日以内に死亡していますが、ハイブリドーマ細胞を注入しても 180 日間腫瘍の形成がみられません。また、ハイブリドーマ細胞で免疫されたラットでは、BERH-2 細胞は 150 日以上腫瘍形成が認められていません (図 4)。また、CD4 または CD8 細胞をそれぞれの抗体で処

置したあとでは腫瘍を形成しますが、ハイブリドーマ細胞で免疫したあとに CD8 細胞を抗体で処置した場合には、腫瘍を形成し、CD4 細胞を抗体で処置した場合には腫瘍を形成を認めていません。この結果より、彼らは、免疫応答の誘導には CD8, CD4 細胞がともに必要であるが、細胞傷害に関しては CD8 細胞のみが重要であると結論しています。

MHC 拘束性からみた抗腫瘍効果の発現

癌ワクチンには、腫瘍細胞そのものを抗原として利用する場合と、癌特異的抗原による免疫反応を期待する場合があります。前者では、抗原そのものの分子学的な知識を必要としませんが、後者では、前述した癌拒絶抗原の同定と抗原認識の免疫反応機構の解明がぜひとも必要であると考えられます。

抗腫瘍効果を発揮する免疫学的機序に基づいた癌ワクチン療法を確立するためには、主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex, MHC)

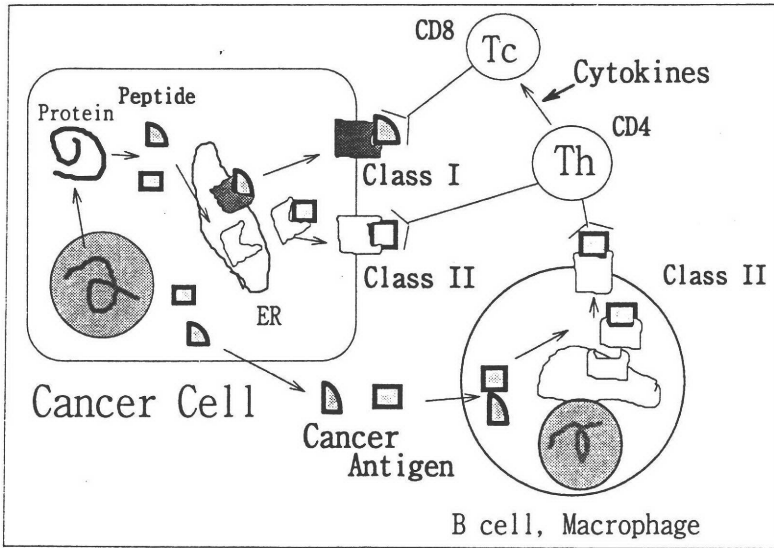


図5 MHC拘束性からみた抗腫瘍効果

分子に結合するペプチド、すなわち癌抗原の解析が必要で、分子生物学手法による主要組織適合抗原、T細胞レセプター (T cell receptor, TCR), 抗原ペプチド (peptide antigens) の相互関係の理解が必要となります。T細胞が認識できるのは、主要組織適合抗原と腫瘍拒絶抗原が酵素によって分解されたペプチド (MHC class Iでは8~12個のアミノ酸で、class IIではそれ以上のアミノ酸であるといわれています) に結合したcomplexであること、その結合にはペプチドのアミノ酸配列のみでなく、その立体構造が合致していることが重要であること、さらに、特異的なepitopesは個人個人異なっていると考えられています。臨床的には最後の項目、すなわち免疫療法で恩恵を受ける可能性のある患者をどのように選ぶかが問題であると考えます。

MHC拘束性からみた抗腫瘍効果の発現を図5にまとめてみました。詳細は他稿に譲り、私見を述べてみたいと思います。

癌細胞内で遺伝子により蛋白が合成され、さまざまな蛋白質分解酵素によって小さなペプチドに断片化されます。そのペプチドが transporter associated with antigen processing (TAP) とよばれるレセプターにより粗面小胞体 (ER) に取り込まれ、MHC class I分子と結合 (MHC class I・ペプチド複合体) します。その後細胞表面へ移動し、

細胞膜内にとどまります。一方、ペプチドのあるものは、非特異的にMHC class II分子と結合し、細胞表面へ移動し、細胞膜内にとどまります。この過程は、class I分子の結合とは異なることが判明しています。すなわち、ERのなかではclass II分子はインバリアント鎖 (I_i鎖) と結合しているためペプチドとの結合はなく、class II分子は細胞内のエンドゾームに移行し、そこではじめてMHC class II分子とします。

一方、pinocytosisなどにより抗原提示細胞内に取り込まれた抗原は、さまざまな蛋白質分解酵素によって小さなペプチドに断片化されます。class II分子とペプチドが結合し、抗原提示細胞膜内にとどまると考えられています。ヘルパー (CD4) 細胞が、MHC・ペプチド複合体を認識し、サイトカインが誘導され、細胞傷害性 (CD8) 細胞の活性化が行われ、癌細胞表面のMHC class I・ペプチド複合体を認識します。

一方、活性化されたヘルパー (CD4) 細胞も、癌細胞表面のMHC class II分子・ペプチド複合体を認識すると考えられ、活性化されたCD4およびCD8細胞がともに標的細胞を攻撃できるようになると考えられます。この機構には、MHC class IおよびII・ペプチド複合体が癌細胞表面に露出していること、細胞傷害性 (CD8) 細胞、ヘルパー

(CD4)細胞が活性化されていることが、必要であると考えられています。

おわりに

免疫原性の強いメラノーマから腫瘍特異抗原が確認されたことは、将来、ペプチドを用いた癌ワクチン療法が可能であることを示しています。しかし、他の固形癌ではいまだ腫瘍特異抗原が確認されていませんが、方法論的にはWeizmann研究所のグループが確立したと考えられます。

ヒトの癌では、どのようなタイプの癌がimmunogenetic tumorに相当するか、検討した報告は見当たりません。今回のHLA班の報告で、smokerと胃癌の印環細胞癌、癌の家族歴と低分化腺癌患

者でリンパ節転移とあるHLA抗原に相関があることが示されたことは興味ある結果と考えられます(すなわち、免疫応答が欠如している患者群が存在していた。しかし、逆も真なり)。

日本癌病態治療研究会のHLA班の検討から、免疫応答が存在している患者群の同定ができれば、基礎研究への橋渡しが可能であると考えられます。癌抗原が存在している癌患者のタイプを同定できれば、その患者の癌細胞からの癌抗原の抽出を精力的に行い、癌抗原が発見できる夢が現実のものとなり、癌ワクチンの開発に繋がるものと考えられます。HLA班の研究はこのような可能性を示唆しているものと考えられます。