

HLA 班報告

班長 生越喬二

研究組織

HLA 班報告 (W'Waves 1(1): 44-46, 1995) を参照

研究目的および今年度の計画

HLA 研究の目的は、HLA 抗原を測定することと、治療前に個人個人に適した癌治療が予測できるかどうか検討を行うことである。

昨年度に引き続き、胃癌、大腸癌で比較対照試験を行って、1996年6月に終了予定である。本研究班で集積されている症例数は表1のごとくである。

研究成果/1995年度

1. HLA 抗原と mucin 産生

基礎委員 (入村達郎 [東京大学薬学部生体異物免疫化学], 竹内利直 [千葉がんセンター臨床病理部]) との共同研究として、HLA 抗原と mucin 産生との関係の検討を行った。

① 対照と方法: 対象は東海大学第二外科で切除された胃癌34例で、MUC I 抗体 (MY. IE 12) による免疫組織染色を行い、同一病理医 (竹内) にて判定した。

② 判定基準: (1) 腺管形成を示す癌では細胞質が陰性でも腺管腔内 (主に brush border) が

表 1

| 施設名 | 代表者 | HLA採血例 | |
|------------------|-------|--------|------|
| | | 胃 | 大腸 |
| 弘前大学第1外科 | 鯉江久昭 | 1 | -- |
| 弘前大学第2外科 | 今 充 | 3 | 6 |
| 福島県立医科大学第1外科 | 元木良一 | -- | -- |
| 福島県立医科大学第2外科 | 阿部力哉 | 10 | 3 |
| 東北大学第1外科 | 松野正紀 | -- | -- |
| 宮城県立がんセンター外科 | 吉田弘一 | -- | 1 |
| 群馬大学第1外科 | 長町幸雄 | 28 | 25 |
| 筑波大学外科 | 深尾 立 | 3 | 2 |
| 千葉大学第2外科 | 磯野可一 | 13 | 56 |
| 東海大学第2外科 | 三富利夫 | 316 | 36 |
| 日本大学第1外科 | 黒須康彦 | -- | -- |
| 東京大学第1外科 | 武藤徹一郎 | -- | 1 |
| 順天堂大学第1外科 | 榊原 宣 | -- | -- |
| 東京医科歯科大学第2外科 | 三島好雄 | -- | -- |
| 東京医科歯科大学第3外科 | 小柳泰久 | 2 | -- |
| 東京女子医科大学第2外科 | 浜野恭一 | 3 | -- |
| 東京女子医科大学第2病院外科 | 梶原哲朗 | 1 | -- |
| 東邦大学大橋病院第3外科 | 炭山嘉伸 | -- | 1 |
| 浜松医科大学第2外科 | 馬場正三 | -- | 1 |
| 岐阜大学第2外科 | 佐治重豊 | 8 | -- |
| 藤田保健衛生大学第2教育病院外科 | 松本純夫 | 4 | 1 |
| 滋賀医科大学第1外科 | 小玉正智 | 19 | 5 |
| 大阪医科大学一般消化器外科 | 岡島邦雄 | -- | -- |
| 大阪市立大学第1外科 | 曾和融生 | 63 | -- |
| 関西医科大学第2外科 | 日置紘士郎 | -- | -- |
| 近畿大学第1外科 | 安富正孝 | -3 | -- |
| 久留米大学第1外科 | 掛川暉夫 | -- | -- |
| 熊本大学第2外科 | 小川道雄 | -- | 4 |
| 自治医科大学消化器外科 | 金澤曉太郎 | -- | -- |
| 自治医科大学大宮医療センター | 宮田道夫 | 8 | -- |
| 島根医科大学第1外科 | 田村勝洋 | 3 | -- |
| 山口大学第2外科 | 鈴木 | -- | -- |
| 合計 | | 488 | 142 |
| (脱落例) | | (179) | (90) |

脱落例は胃癌を含む

染まっている場合には陽性とする。その割合 (%) は形成されている腺管のうち内腔が陽性となっている割合である。(2) 割合が低い場合でも一部がはっきりと陽性を示す場合は陽性と判定する。

③ 結果：染色度を50%以下と50%を超える症例に分類すると、染色度が50%以下の症例は若年者(平均年齢：57歳 vs 66歳)で、腫瘍径(5.95 cm vs 3.64cm)が有意に大きかったが、その他の臨床的マーカーやHLA抗原とは有意の差はみられなかった(少数例の検討であるため)。正常腺粘液がMUC I抗体で陽性となることから、この抗体が認識する抗原は正常組織に存在するものである(全症例で検討されていないが)、正常部に染色されたかどうかで検討すると、正常部に染色が認められた症例ではリンパ節転移が少なく(20% vs 69.2%)、HLA-DR2抗原の発現が少ない(30% vs 69.2%)ことが判明したが、今後、症例数を増やす必要があるかどうか検討中である。

2. HLA DNA assay

いまだでHLA抗原を測定した種々な癌患者のHLA-DR, DQ, DP抗原の測定をDNA assayで行い、症例を集積し検討中である。

(文責 生越喬二)

3. 胃癌細胞株KATO-IIIより得られたHLA-A2結合ペプチドの解析(大沼均, 小幡文弥, 柏木登 [北里大学医学部免疫学教室])

免疫系による腫瘍排除に際し、細胞傷害性T細胞(CTL)は、癌細胞表面のHLA分子に結合した癌特異的ペプチドを認識し攻撃する。したがって、癌特異的抗原が分子レベルで同定されるならば、その抗原分子は癌免疫治療のためのワクチンに利用できる道を開くばかりでなく、その癌に特異的なCTLを*in vitro*で大量に作製可能な方法の確立にも役立つことになる。事実、メラノーマにおいては、いくつかの癌ペプチドが同定され、治療応用もはじまっている。

本研究では、日本人に多い胃癌についてHLA分子に結合している癌ペプチドを同定することを目的として以下の実験を行った。

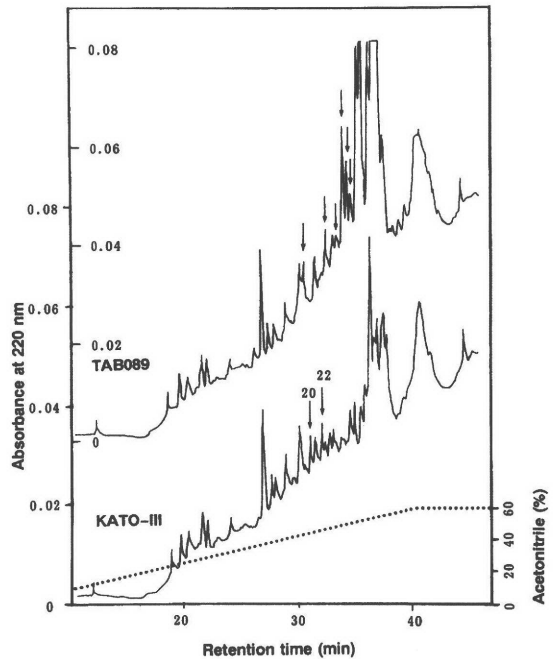


図1 胃癌細胞株KATO-IIIおよびBリンパ球株TAB089から分離したHLA-A2結合ペプチドのHPLCパターン

26gのヒト胃癌細胞株KATO-IIIを出発材料とし、膜蛋白質を界面活性剤で可溶化した。KATO-IIIが表現するHLA-A2を分離するため、可溶化成分を抗A2単クローン抗体結合アガロースカラムに添加し、洗浄のち、アルカリ性緩衝液で溶出した。SDS電気泳動・ELISAによりA2分子の純度を確認したのち、酸処理によりA2分子が担うペプチドを解離させた。解離した多様なペプチドを相互に分離するため、C18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行った。同様の操作により正常対照Bリンパ球株TAB089からもA2結合ペプチドを調整し、HPLCを行った。両HPLCパターンを比較した結果、二つのペプチドピーク(p20, p22)がKATO-IIIにのみ存在することがわかった(図1)。

これらのピークを回収し、エドマン分解法によりアミノ酸配列決定を行った。その結果、① 両ピークに含まれるペプチドの長さはともに9残基であり、多くのMHCクラスI結合ペプチドで報告されている長さ一致した(表2)。② p20の

表2 KATO-IIIから分離したHLA-A2結合ペプチドのアミノ酸配列

| | residue No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KATO-III Peak 20 | | X | V | | D | V | L | A | Q | |
| | | | | | D | | | | | L |
| | | X | L | | E | L | F | H | F | |
| E. coli acetohydroxyacid synthase I (326-334) | | D | V | D | D | V | L | A | Q | L |

| | residue No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------------------------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| KATO-III Peak 22 | | Q | | D | D | L | K | V | E | |
| | | | L | | | | | | | L |
| | | V | | I | E | N | V | A | S | |
| rat ribosomal protein L35 (20-28) | | Q | L | D | D | L | K | V | E | L |
| human glutathione peroxidase (37-45) | | L | L | I | E | N | V | A | S | L |

p20の1残基目(X)はアミノ酸同定不能を示す。

2残基目はロイシンまたはバリンで9残基目がロイシンであり、p22の2残基目および9残基目はロイシンであり、報告されているA2結合ペプチドに共通なモチーフと一致した。③両ピークとも、7箇所にも2種のアミノ酸が検出され(p20の1残基目は同定不能)、異なる2種のペプチドが混在していると考えられた。

蛋白質データベースに対する検索では、p20に理論的に可能な配列(2⁷=128種類)のうちの一つがE. coli acetohydroxyacid synthase Iと1残基違いで一致し、またp22に理論的に可能な配列のうちの一つがrat ribosomal protein L35と完全に一致した。しかし、両ピークにおける理論的

に可能ないずれの配列のなかにも、既知ヒト蛋白質の配列と完全に一致するものはなく、p22に可能な配列の一つがヒト glutathione peroxidaseと1残基違いで一致したのみであった。

今後、高速液体クロマトグラフィーの条件を検討し、より純度の高いペプチドを精製することで、KATO-IIIが表現する癌ペプチドのアミノ酸配列が確定できるものとする。

文 献

Ohnuma, H. et al.: Endogenous peptides bound to the HLA-A2 molecules expressed by a stomach cancer cell line. J. Exp. Clin. Res. 14(2): 163-170, 1995.

(文責 小幡文弥)