

腫瘍特異的CD4 + T細胞の樹立と CD8 + CTLの誘導に及ぼす影響； 同一腫瘍抗原に対する液性および 細胞性免疫応答の解析

産業医科大学 第二外科

竹之山 光広 市来 嘉伸 安元 公正

はじめに

ヒトの悪性腫瘍を対象とした免疫学において、1991年にBoon T.らが悪性黒色腫において細胞障害性Tリンパ球（CTL）の認識する腫瘍抗原の単離に成功して以来、約10年間でCTLの認識する腫瘍抗原エピトープの同定が次々となされている。また、1995年にPfreundschuhらが報告した癌患者血清中の抗体を用いた抗原の単離法であるSEREX（serological identification of antigens by recombinant cDNA expression cloning）法は、癌細胞およびT細胞培養の生物学的困難さを回避することにより広く癌腫を問わず行われ、現在までに抗体に認識される多数の抗原遺伝子が報告されている。CD4陽性T細胞が抗原特異的免疫反応において、CTLの誘導に重要であることはマウスモデルでよく理解されている事実であるが、ヒト腫瘍免疫におけるCD4陽性T細胞の役割はそれ自身が認識する腫瘍抗原の単離・同定という報告しかない。本研究では、肺癌患者においてB細胞に認識される腫瘍抗原（変異型p53）に対するCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞の抗原特異的免疫応答を解析することによりCTL誘導におけるCD4 + T細胞の意義を検討したので報告する。

1. 肺癌患者腫瘍内浸潤B細胞が認識する腫瘍抗原の同定

肺癌症例 A904において、切除標本より癌細胞株（A904L）を樹立した。同時に、腫瘍組織を抗B細胞抗体で染色すると腫瘍内に浸潤したB細胞が検出され、これらを一塊としてSCID mouseに移植した。その後定期的にSCID mouse血清を調べたところ、血清中にヒト型IgG抗体の産生を認め、その産生量は移植したSCID mouseの腫瘍の大きさと逆相関を認めた。このことは、腫瘍内浸潤B細胞（TIB：tumor infiltrating lymphocytes）から産生された抗体の中に、腫瘍を退縮させる抗体が存在することを示唆すると考えられた。そこでTIB由来抗体が認識する腫瘍抗原遺伝子を同定するために、TIB由来抗体をプローブとして用い、樹立した自己癌細胞株（A904L）からcDNA libraryを作成し、SEREX法を行った。 2.3×10^6 個のcDNA libraryのscreeningを行い、118個のcDNA clonesを単離し、22種類の遺伝子が同定された。22遺伝子は、機能のわかっている14の既知遺伝子と、9の未知遺伝子であった。既知遺伝子の中で抗原抗体反応を強く認めたcloneの一つが変異型p53で、g to tのpoint mutationにより

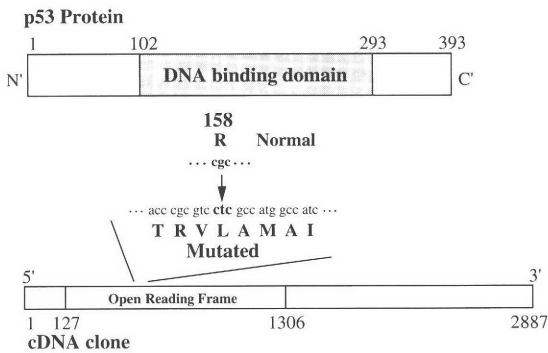


図1 腫瘍内浸潤B細胞由来抗体の認識する変異型p53

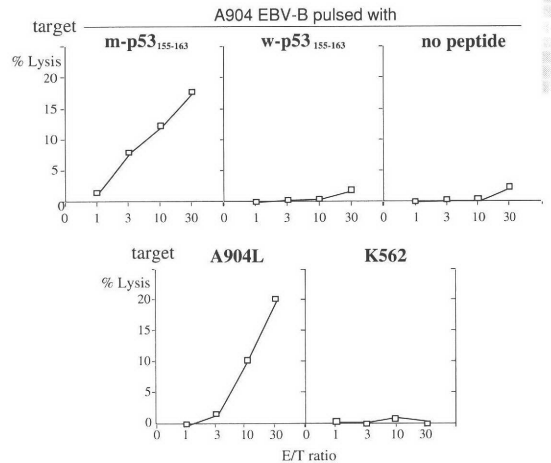


図2 変異型p53ペプチド特異的CTLの細胞障害活性

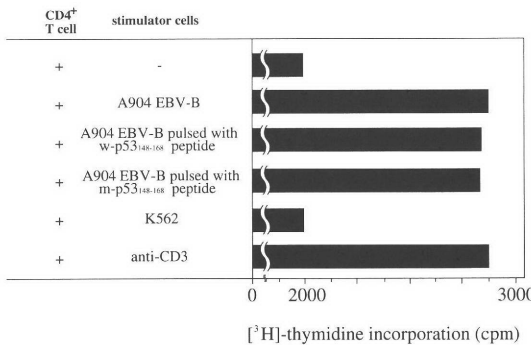


図3 変異型p53ペプチド刺激により得られたCD4陽性T細胞クローンの活性

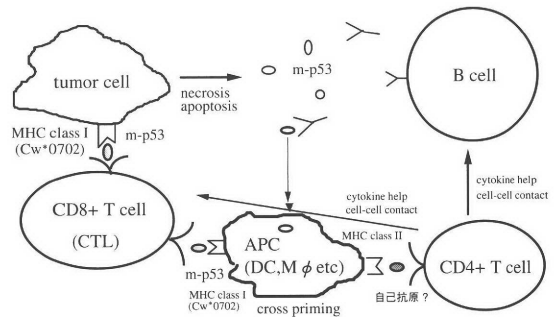


図4 同一腫瘍抗原に対するB細胞、CD8+T細胞、CD4+T細胞の役割

158番目のアルギニンがロイシンに変異していた(図1)。TIB由来抗体がp53の変異部分を認識するか否か検討するために、A904患者EBV-virus transformed B cell (EBV-B) より wild type p53 を cloning し、phage vector に組み込み wild type p53 蛋白に対する反応をみたところ、変異型p53 蛋白と同様の抗原抗体反応を認めた。さらにA904Lを抗p53抗体で免疫染色したところ overexpression を認めた。以上の結果より、腫瘍組織には、p53 の変異により過剰発現したp53 に反応し、変異以外のp53 蛋白をエピトープとして認識するB細胞が存在することが示唆された。

2. 変異型p53特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導

変異型p53がCD8 (CTL) の認識する腫瘍抗原となりうるか調べるために、変異を含むp53 peptideのうち、肺癌細胞株A904LのHLA type (HLA-A*2402, B*0702, Cw*0702) に親和性の高いpeptideをbinding motifを参考に合成した。A904症例の手術時に採取凍結保存していた所属リンパ節リンパ球(2.4 × 10⁷個)を解凍し、自己抗原提示細胞、interleukin-2, interleukin-4, interleukin-7存在下に、合成したpeptidesを用いて、刺激培

養を行った。さらに限界希釈法を行いCD8陽性T細胞クローンを樹立した。このCD8陽性クローンは変異型p53 peptideをpulseしたA904 EBV-B cellに対して、特異的に細胞障害活性を有していたが、wild type p53 peptideをpulseしたA904 EBV-B cellに対しては、細胞障害活性はなく、変異型p53ペプチド特異的CTL活性を示した(図2)。さらに、自己腫瘍細胞であるA904Lに対しても、細胞障害活性を有していた。CTL cloneのHLA拘束性を調べたところ、CTL活性は、抗class I, 抗HLA B/C抗体にてblockされ、HLA class I分子のtransfectionの実験によりHLA-Cw*0702拘束性であった。以上より、1) 変異型p53蛋白由来の変異ペプチド特異的CTLが同患者の所属リンパ節に存在すること、2) 自己腫瘍が変異型p53ペプチドを内因性に腫瘍抗原としてCTLに提示していることが示された。

3. p53蛋白由来ペプチドに対するCD4陽性T細胞の誘導

SEREX法で同定したp53に対する抗体はIgG抗体であり、このことは抗体のクラススイッチに必要なCD4陽性T細胞がin vivoで存在したことを示唆している。そこで、変異を含む21merのp53 peptide (m-p53₁₄₆₋₁₆₈:DSTPPPGTRVLAMAIYKQSQH)を用いて、自己抗原提示細胞存在下に刺激培養を行い、限界希釈法によりCD4陽性T cell cloneを得た。[³H]-thymidineの取り込みによるproliferation assayを行ったところ、CD4陽性T cell cloneは、自己EBV-Bに反応したが、m-p53₁₄₆₋₁₆₈やwild type p53 peptide (w-p53₁₄₆₋₁₆₈)には特異性を示さず、自己反応性のCD4と考えられた(図3)。この自己反応性CD4陽性T細胞のin vitroにおけるp53特異的CTLの誘導に及ぼす影響について現在検討中である。

まとめ

今回、腫瘍抗原の一つとして肺癌の約50%に過剰発現を認めるp53に注目し、液性および細胞性免疫からの解析を行った(図4)。腫瘍内浸潤B細胞(抗体)とCTLのエピトープは同一部位ではないが、同一抗原内に存在することが判明した。また、抗p53抗体はIgGであり、このことはin vivoでp53特異的B cellのクラススイッチにCD4が関与していたことを示唆している。変異型p53ペプチドで刺激し得られたCD4は、今回の解析では抗原特異的活性を有さず、自己反応性を示した。しかしながら、この自己反応性CD4陽性T細胞がin vivoにおいてp53特異的B細胞、T細胞の活性化に関与したのではないかと考えられる。CD4陽性T細胞はサイトカインや、cell-cell contactを介してB細胞、T細胞を活性化していることが予想されるが、今後、この自己反応性CD4のin vitroにおけるCTL誘導に及ぼす役割を検討する必要がある。