

消化器癌細胞及び樹状細胞と Autophagy とにおける抗原提示機構の解明

和田 聡

群馬大学病態総合外科 第一外科

【目的】

細胞性癌免疫治療の攻撃の標的となる癌細胞表面の癌抗原を、癌細胞や樹状細胞等の抗原提示細胞が効率的に提示するメカニズムは、癌免疫療法の根幹である。しかし癌患者では癌細胞や樹状細胞の癌抗原提示能が高頻度に発現低下～消失していることが報告され、癌細胞や患者抗原提示細胞の抗原提示能の回復・効率化は癌免疫療法の現在の課題となっている。本研究では癌細胞における癌抗原の発現メカニズム、特に癌細胞に多い低栄養状態における autophagy (自己消化) と抗原提示との関係の解明に焦点を当て、患者の免疫細胞に対しより効果的に癌抗原を提示して、より強力な抗腫瘍免疫応答の誘導を目指す。

【研究の学術的特色・意義】

2005年に Blum や Munz らのグループによって、相次いで autophagy を介した HLA class II 分子による抗原提示 (ヘルパー T 細胞を活性化する) が報告された。正常細胞の抗原提示メカニズムにおける autophagy の役割は、その後研究が進むにつれてその重要性を増すばかりで、現在では HLA class II 系のみならず class I を介した細胞障害性 T 細胞の活性化にも関及すると考えられ (Munz, 2010)、癌細胞での autophagy と抗原提示の関係の解明は、癌免疫療法の更なる進歩のために不可欠な条項となっている。しかしながら、癌細胞や抗原提示細胞の癌抗原提示メカニズムにおける autophagy の役割についての研究はあまり行われていない。その理由として、癌細胞、特に癌の臨床サンプルでの抗原提示システムを効率的に解析できる抗体が限られているからである。本研究ではその限られた抗体 (実際には癌抗原提示を直接行う様々な HLA 分子や HLA class I 経路に関わる全ての分子を、パラフ

イン包埋病理標本で認識できる抗体) を使用することにより、消化器癌における autophagy を介した HLA class II / I 両経路による抗原提示が、宿主の抗腫瘍免疫応答にどのような影響を与え、患者の予後にいかに関係しているかを理解し、消化器癌の診療に応用する。

【一年間の研究計画と具体的な方法】

- 1 消化器癌のパラフィン包埋 (FFPE) 病理サンプルにおいて、Beclin1 や LC3 等の autophagy 関連分子と HLA class I / II 抗原提示機構に関わる分子の発現を、免疫組織化学染色によって調べる。さらには腫瘍細胞の Bax/Bak 等 starvation に関わるマーカーや hsp90 等のストレス蛋白、HLA-G や HLA-E のなどの免疫寛容を誘導する non-classical HLA class I の発現も、FFPE サンプルの免疫染色にて解析する。
- 2 一方で癌細胞の IL-10 や TGF β などの免疫抑制性サイトカイン産生や、腫瘍浸潤リンパ球の IFN γ を中心としたサイトカイン産生を免疫染色にて評価する。それにより癌組織の microenvironment における免疫細胞とのダイナミックな相互作用を明らかにするとともに、HLA 等の抗原提示に関わる分子発現や autophagy との相関を見る。
- 3 同定されている癌抗原を用い、その抗原に対する特異的免疫応答の誘導に際し、これまでの研究による抗原提示の効率化を応用する。すなわち特定腫瘍抗原陽性の腫瘍を持つ、HLA-A2、A24 あるいは DP5 陽性の患者の末梢血より CD4+/CD8+T 細胞を分離し、特定腫瘍抗原あるいは消化器癌細胞株に対する免疫応答を ELISPOT にて評価する。
- 4 上記の臨床サンプルにおける分子レベルの動向と、臨床 / 病理学的パラメータ、さらには予後因

平成24年度奨励研究報告

子との相関を解析する。個々の癌の autophagy の程度や抗原提示の具合と臨床予後との相関を解明することにより、消化器癌の免疫治療への応用を図る。

【これまでの研究経過・成果】

肝外胆管癌細胞株 (HuccT-1, TFK-28) による autophagy 関連分子 (Beclin1, LC3) 発現と、HLA class I / class II による抗原提示機構に関わる分子 (Antigen Presenting Machinery; APM (TAP1、TAP2、 β 2microglobulin、HLA I hc、HLA II、HMW-MAA、LMP2、LMP7、LMP10、Calnexin、Delta、Calreticulin、ERpS7、Tapasin、Z、MB1)) の発現を Western Blot にて解析した。平常培養状態では autophagy 関連分子の発現は弱いが、serum free media や低酸素状態での培養により発現の増強を認めた。APM の発現解析では Calnexin 分子においてのみ高発現を認め、この発現は両細胞株共に高発現であった。また、TAP1、 β 2microglobulin、HLA I hc、HMW-MAA、MB1 の発現は HuccT-1細胞株において発現を認めるも、TFK-28細胞株ではほとんど発現を認めなかった。逆に Tapasin は TFK-28細胞株におい

て発現を認め、HuccT-1細胞株では認めなかった。これらの結果から抗原提示機構に関わる分子は癌細胞においていずれかの経路において発現低下を認めており、このことにより宿主からの免疫逃避の一原因に成り得ると考えられる。また、同じ癌腫であっても細胞株により発現が異なることから個々の患者において逃避機構の機序が異なることが考えられる。次に大腸癌肝転移患者の病理標本サンプルを用いて APM の発現を免疫組織染色 (IHC) にて解析した。正常組織および大腸癌原発巣においては HLA II 以外は同程度に高発現を示しており、HLA II の発現は正常組織では高発現であったが原発巣ではほとんど発現を認めなかった。さらに同患者の肝転移巣の解析を行うと、原発巣と同様に HLA II の発現はほとんど認めず、また原発巣では高発現であった LMP7、LMP10、Delta、Calreticulin、Tapasin、Z の発現は肝転移巣にて発現の低下を認めた。この結果から大腸癌の肝転移に際し、抗原提示機構に関わる分子の一部に異常を起こすことにより免疫逃避獲得につながると考えられる。これらの事象と免疫逃避との関係をさらに解析し、autophagy との関係をも今後さらに追及していく。