

病原性微生物抗原を利用した新規癌免疫療法の開発

研究課題名：感染および抗腫瘍免疫における交差性生体制御機構の意義

京都大学大学院生命科学研究科 助手
田中 義正

はじめに

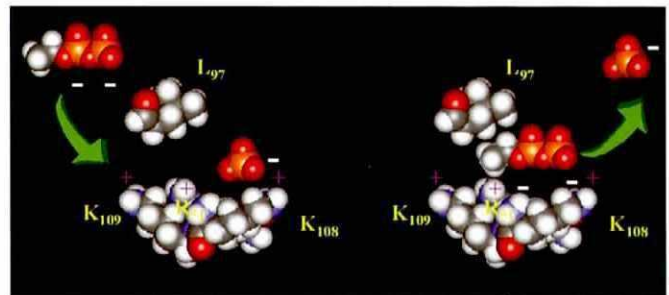
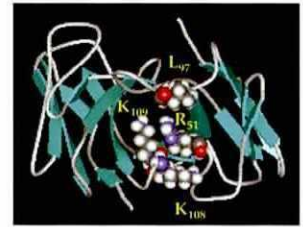
ヒトT細胞は $\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型の二種類に大別される。ヒト $\alpha\beta$ 型T細胞は、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞上に提示された抗原性ペプチド/主要組織適合性抗原(MHC)複合体をT細胞受容体により認識し、その際、CD4あるいはCD8分子がコレセプターとして作用する。一方、ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞は、その多くがV γ 2J γ 1、2V δ 2の表現型を示し、CD4およびCD8のコレセプターを有せず、MHC依存性も認められない。また、抗原もペプチドではなく、結核菌、マラリア原虫、ピロリ菌など、病原性微生物の産生するピロリン酸モノエステル、あるいは、アルキルアミンなどの非ペプチド性化合物であり、その認識は $\gamma\delta$ 型T細胞受容体(TCR)依存的事であることが知られている。このようにヒト $\gamma\delta$ 型T細胞の抗原認識は $\alpha\beta$ 型T細胞のそれとは大きく異なり、その詳細はまだ明らかにされていない。一方、その機能に関しては、抗原として病原性微生物の産生する、いわゆるPAMPsを認識し、炎症性サイトカイン等を産生することから、自然免疫系と適応性免疫系との間を繋ぐブリッジの役割をしていると考えられている。また、腫瘍細胞に対しては、ナチュラルキラー細胞様の活性も示すが、RPMI8226細胞やDaudi細胞などに対してはTCR依存的な細胞傷害性も示す。さらに、非ペプチド性抗原で処理したほとんどのヒト腫瘍細胞に対して、強いTCR依存的な細胞傷害性を示すことから、腫瘍免疫と感染免疫との交差性も有している。本研究課題においては、 $\gamma\delta$ 型T細胞を構造学的に解析するとともに、それをもとにした構造・機能相関を検討することにより、 $\gamma\delta$ 型TCRによる非ペプチド性抗原認識機構を分子レベルで解析した。さらに、非ペプチド性抗原で処理したヒト腫瘍細胞を認識する際の副シグナル分子の同定を行った。また、本研究課題によって得られた基礎的知見をもとに、病原性微生物の産生する非ペプチド性抗原あるいはその類縁体を用いた新しい抗腫瘍標的免疫療法の開発を行った。

結果と考察

$\gamma\delta$ 型T細胞は、 $\alpha\beta$ 型T細胞と比較して、その抗原、抗原認識機構、生理的役割など様々な面において大きく異なるため、まず、構造解析と機能解析を行い、分子レベルでの抗原認識機構を構造・機能相関の立場から検討した。構造解析には、 $\gamma\delta$ 型TCRの大腸菌での発現、リフォールディング、結晶化、放射光解析の手法を用いた。まず、大腸菌での発現において、 $\gamma\delta$ 型TCRの γ 鎖および δ 鎖の細胞外領域をコードする遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込んだが、いずれも全く発現しなかったため、リボソーム結合領域に点変異を導入し、リボソーム結合性を上昇させ、さらに、分子動力学と最小自乗法を組み合わせ、ステムループ解除のための点変異を導入した。また、大腸菌コドンインデックスに従い分子全体に点変異を導入し、低使用コドンで解消した。これらの操作により、 γ 鎖および δ 鎖ともに大腸菌培養1リットルあたり100mgから300mgの収量で封入体を産生することができた。得られた封入体はグアニジンと尿素の混合溶液に溶解し、アルギニンおよびグリセロール含有トリス緩衝液に迅速希釈してリフォールディングを行った。この際、リドックスシステムとして還元型および酸化型のグルタチオンを用いた。希釈液は尿素およびトリス緩衝液に対して透析し、バッチ法により陽イオン交換体に吸着させ、引き続きカラムクロマトグラフィーを行った。得られたタンパク質はさらにゲル濾過にかけ電気泳動的に単一になるまで精製を行った。タンパク質精製標品は、円偏光二色性スペクトル解析により免疫グロブリンフォールドをとっていることが確認された。この標品を高濃度に濃縮し、結晶化スクリーニングを行った結果、高塩濃度の条件下において単結晶を生じることが明らかとなった。この結晶は、SPRING8における放射光解析において、2.4Åの解像度のデータを得るのに十分なものであった。このようにして、野性型の $\gamma\delta$ 型TCRの結晶構造が明らかとなった。

次に、この結晶構造に基づき $\gamma\delta$ 型TCR上のアミノ酸残基を検討した結果、 γ K108、 γ K109、 δ R51、 δ L97の4残基が非ペプチド性抗原の認識に関わっていることが推測された。そこで、アラニン置換を行い γ K108A、 γ K109A、 δ R51A、 δ L97Aの点変異体を構築し、これらの遺伝子をTCR欠損Jurkat細胞に導入し、

それぞれの $\gamma\delta$ 型Jurkat細胞を樹立した。この細胞の非ペプチド性抗原認識能を検討した結果、 γ K108A、 δ R51A、 δ L97Aの3種類の点変異において非ペプチド性抗原に対する認識能が完全に消失した。また、 γ K109Aに関しては、ピロリン酸モノエステル系抗原に対しては30%程度の反応性しか示さなかったが、アルキルアミン系の抗原に関しては野生型と全く同じ反応性を示した。これらのことから、 γ K108、 δ R51、 δ L97の3種のアミノ酸残基が非ペプチド性抗原の認識において重要な役割を果たしていることが明らかになった(図1)。また、これらのアミノ酸残基はCDR3、あるいはその近傍に位置していることから、 γ 鎖および δ 鎖のCDR3領域にアラニンをタンデムに挿入しCDR3ループの鎖長が抗原認識能にどのように影響するか検討した。その結果、 γ 鎖においては、アラニンを2つまで挿入しても抗原認識能は確認されたが、3つ以上では認識能は完全に消失した。また、 δ 鎖においては、アラニンを9つまで挿入したが、その抗原認識においては全く影響がみられなかった。このことから、 $\gamma\delta$ 型TCRによる非ペプチド性抗原の認識には γ 鎖のCDR3領域鎖長が重要な役割を果たしており、 δ 鎖のCDR3領域鎖長に関しては、 δ L97が存在していればその認識能には影響がないことが明らかになった。以上の結果より、非ペプチド性抗原の認識機構は次のようになると考えられる。認識の中心は γ K108、 δ R51、 δ L97の各アミノ酸残基であり、通常ポジティブにチャージしている γ K108および δ R51と環境中のネガティブにチャージしている無機リン酸が相互作用していると考えられる。ピロリン酸モノエステル系抗原の場合には、無機リン酸が環境中に放出され、そのかわりにピロリン酸モノエステル系抗原のネガティブにチャージしているピロリン酸基がポジティブにチャージしている γ K108、 δ R51と相互作用し、さらに疎水性を示す炭化水素鎖が同じく疎水性を示す δ L97と相互作用することにより認識されると考えられる(図2)。アルキルアミン系抗原の場合には、ネガティブにチャージしている無機リン酸はそのまま、ポジティブにチャージしているアミン残基と同じくポジティブにチャージしている γ K108、 δ R51との相互作用をチャージブリッジし、さらにピロリン酸モノエステル系抗原の場合と同様に疎水性を示す炭化水素鎖が同じく疎水性を示す δ L97と相互作用することにより認識されると考えられる。



次に、非ペプチド性抗原の提示について検討を行った。通常、ヒト $\gamma\delta$ 型T細胞はRPM18226やDaudi細胞など一部の腫瘍細胞のみをTCR依存的に認識するが、非ペプチド性抗原をパルスしたほとんどのヒト腫瘍細胞において、 $\gamma\delta$ 型T細胞によるTCR依存的認識がみられた。この認識は種特異的であり、他の動物種由来の腫瘍細胞株では非ペプチド性抗原パルスの影響はみられなかった。そこで、非ペプチド性抗原パルスの可能なヒト腫瘍株を認識し、非ペプチド性抗原パルスのできないヒト腫瘍細胞株を認識しないモノクローナル抗体の作成を試みた結果、8種のモノクローナル抗体を樹立することができた。マスマスペクトル解析の結果から、これらはいずれもCD166分子を認識することが明らかとなった。CD166分子の受容体はCD6であり、この分子が $\gamma\delta$ 型T細胞上に発現していることが確認されたため、 $\gamma\delta$ 型T細胞による非ペプチド性抗原認識においてCD6/CD166の相互作用が重要な役割をしていることが示唆された。そこで、CD166分子のトランスフェクタントをK562腫瘍細胞株において樹立したところ、非ペプチド性抗原をパルスした場合において、 $\gamma\delta$ 型T細胞の抗原認識能が上昇した。また、逆にRNAiによりCD166分子の発現を減少させたLK-2腫瘍細胞株においては、非ペプチド性抗原パルスによる $\gamma\delta$ 型T細胞活性化能が減少した。以上の結果より、CD6/CD166のシグナルは $\gamma\delta$ 型T細胞の非ペプチド性抗原認識を正に制御していることが示唆された。

このようにして得られた基礎的知見から、新しい癌標的免疫療法の開発を試みた。すなわち、 $\gamma\delta$ 型T細胞をin vitroで培養し、非ペプチド性抗原により十分増殖させ、次に、癌細胞を非ペプチド性抗原により標識し、続いて $\gamma\delta$ 型T細胞を体内に戻し、TCR依存的腫瘍細胞傷害性を惹起するというものである。まず、 $\gamma\delta$ 型T細胞のin vitroでの培養に関しては、様々な非ペプチド性抗原を検討した結果、2-メチル-3-ブチル-1-ピロリン酸が最も良い増殖性を示し、200 μ Mで用いた場合において2週間で約1万倍の $\gamma\delta$ 型T細胞数の増加がみられた。次に、腫瘍細胞の標識に用いる非ペプチド性抗原に関しては、ピロリン酸モノエステルの場合、血中

のアルカリホスファターゼにより速やかに加水分解されてしまうため、実際の臨床応用には適さないことが明らかとなった。また、アルキルアミンに関してもパルス能が弱い実用には向かないことが明らかとなった。そこで、ピロリン酸モノエステル系抗原とアルキルアミン系抗原の両者の特徴を兼ね備えた分子である窒素含有型ビスホスホン酸を用いた結果、体内でも使用可能であることが明らかとなった。この分子種にはパミドロネート、リセドロネート、ゾレドロネートなど実際の医療において、高カルシウム血症治療薬として用いられているものもあり、安全性に関してはすでに樹立されている。そこで、まだ、安全性の確認されていない $\gamma\delta$ 型T細胞の養子療法に関して検討をおこなった。その結果、末梢血単核球を2-メチル-3-ブテン-1-ピロリン酸で刺激して1万倍に増殖させた $\gamma\delta$ 型T細胞を担癌患者に約 10^{10} 個程度戻しても副作用は認められなかった。また、この $\gamma\delta$ 型T細胞はin vitroにおいて、窒素含有型ビスホスホン酸をパルスした癌細胞株を効率よく傷害することが明らかとなった。

● 今後の展望

基礎面においては、まず、結晶構造の解像度を1 Å台まで上げ、より詳細なTCR表面構造を描出できるようにする。さらに、非ペプチド性抗原との共結晶の作成も試みる。また、機能の変化する点変異体の構造を解析することにより、構造・機能相関をより具体的に分子論的に検討する。抗原提示に関しては、CD6/CD166以外の分子を探索するとともに、非ペプチド性抗原提示分子の存在も可能なのでその同定を試みる。応用面に関しては、本研究課題において、 $\gamma\delta$ 型T細胞のin vitroでの大量培養法が確立され、また、それによって得られた細胞の抗腫瘍活性が確認され、さらに、その細胞を用いた免疫養子療法の安全性が認められたので、今後は、実際の体内での非ペプチド性抗原による癌細胞の標的化のための投与ルート、用量、投与時間、さらに、移入細胞数の検討などを行い、実際の医療応用を目指していきたい。

主要業績リスト

- (1) Ying Li, Takaaki Koshiba, Atsushi Yoshizawa, Yukihide Yonekawa, Kosuke Masuda, Atsushi Ito, Mikiko Ueda, Takehide Mori, Hiroshi Kawamoto, Yoshimasa Tanaka, Shimon Sakaguchi, Nagahiro Minato, Kathryn J. Wood, and Koichi Tanaka
Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation
Am. J. Transplant. 4: 2118-2125 (2004)
- (2) Taku Okazaki, Yoshimasa Tanaka, Ryosuke Nishio, Tamotsu Mitsuiye, Akira Mizoguchi, Jian Wang, Masayoshi Ishida, Hiroshi Hiai, Akira Matsumori, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo
Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for the dilated cardiomyopathy in PD-1 deficient mice
Nature Med. 12: 1477-1483 (2003).
- (3) Seiji Yamashita, Yoshimasa Tanaka, Masashi Harazaki, Bunzo Mikami, and Nagahiro Minato
Recognition mechanism of non-peptide antigens by human gd T cells
Int. Immunol. 15: 1-7 (2003).
- (4) Yu Kato, Yoshimasa Tanaka, Hidenori Tanaka, Seiji Yamashita, and Nagahiro Minato
Requirement of species-specific interactions for the activation of human gd T cells by pamidronate
J. Immunol. 170: 3608-3613 (2003).
- (5) Yoshiko Iwai, Masayoshi Ishida, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Tasuku Honjo, and Nagahiro Minato
Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002).
- (6) Masayoshi Ishida, Yoshiko Iwai, Yoshimasa Tanaka, Taku Okazaki, Gordon J. Freeman, Nagahiro Minato, and Tasuku Honjo
Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues
Immunol. Lett. 84: 57-62 (2002).
- (7) Fumi Miyagawa, Yoshimasa Tanaka, Seiji Yamashita, Bunzo Mikami, Kiichiro Danno, Masami Ueyehara, and Nagahiro Minato
Essential contribution of germline-encoded lysine residues in J α 1.2 segment to the recognition of nonpeptide antigens by human gd T cells
J. Immunol. 167: 6773-6779 (2001).
- (8) Yoshimasa Tanaka and Takehiko Uchiyama
2-Methyl-3-butenyl-1-pyrophosphoric acid salts and agents for treating lymphocytes
United States Patent, US 6,534,050 B1, Mar. 18, 2003.