

ヒトメラノーマにおいて細胞障害性T細胞に
認識されるペプチド抗原

林 田 素子

①

ヒトメラノーマにおいて細胞障害性T細胞に認識されるペプチド抗原

神田奈緒子

目次

	頁
要約	1
緒言	3
材料および方法	5
実験結果	9
Ⅰ. ペプチド抗原#810の発現および細胞障害活性における機能	9
1. ヒト細胞におけるペプチド抗原#810の発現	9
2. メラノーマ患者の末梢血単核球によるペプチド抗原#810の認識	11
3. <i>In vitro</i> におけるペプチド抗原#810による再刺激の効果	14
4. ペプチド抗原#810の提示および認識のメカニズム	16
5. ペプチド抗原#810を標的抗原とする細胞障害活性のHLA拘束性	17
6. #810を標的抗原とする細胞障害活性に及ぼす抗#810抗体L92の抑制効果	20
Ⅱ. ペプチド抗原#707の発現および細胞障害活性における機能	21
1. ヒト細胞におけるペプチド抗原#707の発現	21
2. メラノーマ患者の末梢血単核球によるペプチド抗原#707の認識	22
3. <i>In vitro</i> におけるペプチド抗原#707による再刺激の効果	25
4. ペプチド抗原#707の提示および認識のメカニズム	27
5. ペプチド抗原#707を標的抗原とする細胞障害活性のHLA拘束性	29
Ⅲ. 細胞障害活性におけるペプチド抗原#810と#707の関連性	31
考察	33
Ⅰ. ペプチド抗原#810の発現および細胞障害活性における機能	33
Ⅱ. ペプチド抗原#707の発現および細胞障害活性における機能	37
Ⅲ. ペプチド抗原#810および#707の臨床的意義	38
謝辞	39
文献	39

要約

メラノーマ患者由来のモノクローナル抗体L92およびL94を用いて、メラノーマのcDNAライブラリーから同定されたペプチド抗原#810および#707の免疫原性を、細胞障害活性における機能を中心に検討した。

ペプチド抗原#810は抗体L92の認識するデカペプチド (QDLTMKYQIF) であり、そのアミノ酸配列は、メラノーマUCLASO-M14の細胞質に存在する分子量約43kDの蛋白の一部として同定されている。In situハイブリダイゼーション法およびウエスタンブロッティング法により検討した結果、#810のmRNAおよび43kD蛋白はメラノーマに特異的ではなく、正常細胞を含む種々のヒト細胞においても検出された。しかし、#810でバルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性は、メラノーマ患者の末梢血単核球においては認められたのに対して、健康者の末梢血単核球ではほとんど認められなかった。メラノーマ患者の末梢血単核球による細胞障害活性は、非自己メラノーマ細胞から成るワクチン療法により増大した。また、ワクチン療法後の患者の末梢血単核球をin vitroで#810により再刺激した結果、#810バルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性はさらに増大した。非標識標的細胞による抑制実験の結果、#810バルスした自己Bリンパ芽球と自己メラノーマ細胞は互いに細胞障害活性を抑制し合い、メラノーマ細胞表面においても#810が細胞障害活性の標的抗原として提示されていることが示された。抗体を用いた抑制実験により、標的細胞を破壊するエフェクター細胞は、主としてCD8陽性の細胞障害性T細胞と考えられた。またこの細胞障害性T細胞は、標的細胞表面でHLAクラスI抗原の拘束のもとに提示されたペプチド抗原#810を認識することにより、細胞障害活性を生じるものと考えられた。HLAタイプが判明しているメラノーマ患者の末梢血単核球を用いて検討した結果、HLAクラスI抗原のうち、HLA-A2およびA11が#810提示能を有することが判明した。

ペプチド抗原#707 (RVAALARDAP) は、カルボキシル末端がalanine-proline(AP)で終了するペプチドを特異的に認識する抗体L94を用い、M14のcDNAライブラリーより同定さ

れている。#707のmRNAは、メラノーマを含むヒト腫瘍細胞で検出されたが、正常末梢血単核球では検出されなかった。#707の起源となる蛋白は同定されていないが、L94の結合活性から、メラノーマを含む多くの腫瘍細胞の表面に存在し、正常末梢血単核球の表面には存在しないと考えられた。メラノーマ患者の末梢血単核球は#707でバルスした自己Bリンパ芽球に対して有意な細胞障害活性を示し、この活性はワクチン療法により増大した。一方、健常者ではこのような活性はほとんど認められなかった。ワクチン療法後の患者末梢血単核球を*in vitro*で#707により再刺激した結果、#707でバルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性はさらに増大した。また、非標識標的細胞による抑制実験の結果、#707もメラノーマ細胞において細胞障害活性の標的抗原として提示されていることが示された。標的細胞を破壊するエフェクター細胞はCD8陽性の細胞障害性T細胞と考えられ、標的細胞表面で#707はHLAクラスI抗原の拘束のもとに提示されていると思われた。HLAクラスI抗原のうち、HLA-A2、A11およびA24はいずれも#707提示能を有することが判明した。また、#707のアミノ酸配列からカルボキシル末端APを除去することにより、細胞障害活性の標的抗原としての機能は完全に失われた。したがって、このカルボキシル末端APは細胞障害性T細胞による認識に不可欠なアミノ酸残基と考えられた。

ペプチド抗原#810と#707を標的抗原として同時に用い、その関連性を検討した結果、これらのペプチド抗原はメラノーマにおいてそれぞれ独立に、細胞障害性T細胞のエピトープとして機能していると考えられた。また、両者を提示しているメラノーマ細胞を標的細胞とした場合、自己の末梢血単核球を両ペプチドで再刺激することにより、各ペプチド単独で再刺激した場合と比べ、相乗的に高い細胞障害活性を誘導することができた。

緒言

ヒト腫瘍細胞に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を用いて、今日までに種々の腫瘍関連抗原が発見された(1-5)。これらの抗原はマウスの実験系においては強力な液性あるいは細胞性免疫反応を誘導するが、腫瘍患者の免疫療法に応用するためにヒトに投与した場合、免疫応答は全く見られないかきわめて微弱である(1-5)。これは、マウスの免疫系においては有効な抗原も、ヒトの免疫系においては必ずしも有効な抗原として機能しないことを示す。一方、腫瘍患者由来のモノクローナル抗体の反応性は、腫瘍細胞に対するヒトの免疫応答を直接反映していると考えられる。したがって、これらのモノクローナル抗体により認識される腫瘍関連抗原は、マウスモノクローナル抗体により認識される腫瘍関連抗原に比べ、ヒトの免疫系においてははるかに高い免疫原性を示すものと考えられる。Irie et al. は、メラノーマ患者由来のモノクローナル抗体により同定したメラノーマ関連抗原であるガングリオシドGM₂とGD₂が、メラノーマ患者において強力な抗体産生反応を誘導することを明らかにした(6,7)。しかし、これらの糖脂質抗原は大量に分離精製するのが困難であるばかりでなく、現時点では合成することも不可能であり、メラノーマ患者の免疫療法に用いるには限界がある。また、腫瘍細胞の破壊には、抗体を中心とした液性免疫よりも、細胞障害性T細胞による細胞性免疫反応の方がはるかに有効であると考えられている(8,9)。一般にT細胞は短鎖のペプチドをエпитープとして認識するとされ(8,9)、メラノーマ細胞表面でも、細胞障害性T細胞のエпитープである共通の短鎖ペプチド抗原が、HLA-A抗原の拘束のもとに提示されていると考えられている(10,11)。したがって、メラノーマにおいても、細胞障害性T細胞に認識されるペプチド抗原を同定することが極めて重要である。

Irie et al. はメラノーマ患者由来のIgM型モノクローナル抗体L92およびL94を用いて、同患者より樹立したメラノーマ細胞株UCLASO-M14のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、それぞれの抗体が認識する蛋白抗原を同定しようと試みた(12,13)。そ

の結果、現時点では目的とする高分子蛋白抗原は完全には同定されていないものの、それ
その抗体に認識される二つのペプチド抗原が同定された(12,13)。ペプチド抗原#810

(QDLTMKYQIF) は、抗体L92により認識されるデカペプチドで、UCLASO-M14の細胞質
内蛋白(分子量 \approx 43kD)の一部として存在する。この43kD蛋白の全アミノ酸配列および
生物学的機能は明らかではないが、#810をコードするDNAの塩基配列は既報の塩基配列
と相同性を示さず、したがって#810は新しいペプチド抗原と考えられた(12)。一方、ペプ
チド抗原#707 (RVAALARDAP) は抗体L94を用い、UCLASO-M14のcDNAライブラリーよ
り得られたペプチド抗原である。L94は、カルボキシル末端がアラニン-プロリン(AP)で終
了するペプチドを特異的に認識する抗体である。L94を用いることにより、カルボキシル
末端がAPで終わるペプチド抗原をコードする数種類の塩基配列が、メラノーマUCLASO-
M14およびM12のcDNAライブラリーより同定されたが、いずれの塩基配列も既報の塩基
配列と相同性を示さず、したがって#707も新しいペプチド抗原と考えられた(13)。

これら二種類のペプチド抗原のうち、#810は非自己メラノーマ細胞から成るワクチ
ンを投与されたメラノーマ患者の末梢血単核球を刺激し、増殖反応を誘導した(12)。この
結果は#810がT細胞によって認識される可能性を示唆する。抗体の結合に必要な最低限の
アミノ酸残基の長さは3~5残基(14)。T細胞による認識では5残基であると考えられてい
る(15)。したがって、ペプチド#810や#707のごとく10~20残基のペプチド抗原において
は、その全アミノ酸配列がB細胞とT細胞のエピトープをともに含んでいる可能性があ
る。Jacobson et al. はhuman T lymphotropic virus type-1 envelope glycoproteinの全アミノ酸配列
の中で、B細胞に認識される20残基のペプチド分画sp4aが、ヘルパーT細胞および細胞障
害性T細胞の反応も誘導することを報告している(16)。これは、sp4aではB細胞とT細胞の
エピトープは完全には一致しないが、その大部分が共有されているためと考えられてい
る(21)。また、同一の蛋白抗原において、B細胞とT細胞の認識する領域が異なる場合もあ
るが、両者が同じ領域を認識する場合も多い(17-19)。したがって、B細胞のエピトープと
して同定された#810および#707についてもT細胞、特に細胞障害性T細胞の反応を誘導し

うる可能性がある。

本論文では、ペプチド抗原#810および#707をメラノーマ患者の免疫療法に用いることを目的に、これらのペプチド抗原が細胞障害性T細胞のエピトープとして機能するか否かについて検討した。現時点では両ペプチドの起源となる蛋白は同定されておらず、それらを抗原として用いることはできない。また、高分子蛋白に比べ、短鎖のペプチドは抗原提示細胞によるプロセッシングを必要とせず、T細胞のエピトープとなる部位のアミノ酸配列を限定しやすいという利点を有する。したがって、ここでは合成ペプチドを抗原として用い、これら二種類のペプチド抗原の免疫原性を細胞障害活性における機能を中心に研究した。

材料および方法

1. ペプチド合成

ペプチド抗原#810および#707はF-moc法により合成した(20)。#810 (QDLTMKYQIF)のコントロールとして#810と関連性がなく、既報の配列と相同性を示さないアミノ酸配列を有するテカペプチド (IMTQLFQDYK) を、#707 (RVAALARDAP) のコントロールとして#707のカルボキシル末端APを除去したオクタペプチド #707(-AP) (RVAALARD) と、アミノ末端を除去したオクタペプチド (AALARDAP)、ヘキサペプチド (LARDAP)、テトラペプチド (RDAP) およびダイペプチド (AP) を同様に合成した。合成したペプチドはC-18を担体とする逆相高速液体クロマトグラフィーにて精製し(純度>95%)、高分解能マスマススペクトルで確認して用いた。

2. 腫瘍細胞の調整

用いた腫瘍細胞は、ヒトメラノーマ9株(UCLASO-M10, M12, M14, M15, M24, M25, M101, M111, M112), 神経芽細胞腫1株 (SHN), 結腸癌2株(SW48, SW480), 胃癌2株(MKN28, MKN45), 肺癌2株(130, 135), 乳癌1株(645), 赤白血病1株 (K562), Bリンパ芽球腫1株(L14)の計19株である。これらの腫瘍細胞は、10%牛胎児血清加RPMI1640 (JRH

Biosciences, Kansas, USA)で培養維持し、用時PBSで3回洗浄して用いた。

3. *In situ*ハイブリダイゼーション

目的とするmRNAの腫瘍細胞における発現は、既報の*in situ* ハイブリダイゼーション法(21)により検討した。ペプチド抗原#810および#707をコードするmRNAの検出に用いたプローブ(アンチセンスプローブ)は、それぞれに対応する塩基配列に相補的な30塩基対のオリゴデオキシヌクレオチドをホスホロアミダイト法で合成し、DNA tailing kit (Boehringer Mannheim, Indiana, USA)により digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim)で標識して作成した。同様にして、両アンチセンスプローブに相補的なセンスプローブも作成し、陰性コントロールとして用いた。また、 β -アクチンに特異的な27塩基対のオリゴデオキシヌクレオチド(Clontech, California, USA)を同様に標識して、陽性コントロールのプローブとして用いた。

4. ウェスタンブロッティング

腫瘍細胞および正常末梢血細胞中のペプチド抗原#810と#707は、ウェスタンブロッティング法(22)により検出した。培養した腫瘍細胞(約 1×10^7)はPBSで3回洗浄し、3000rpmで10分遠心した後、上清を捨て、1mlの細胞溶解用緩衝液(5% 2-メルカプトエタノール、2% SDS、0.1% ブロムフェノールブルー、10% グリセロールを含む50mM トリス塩酸緩衝液 pH 4.4)を加えて溶解した。この細胞溶解液10 μ lをSDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル(4-20%)電気泳動法で分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体にはヒトIgMモノクローナル抗体L92あるいはL94を、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識したヒツジ抗ヒトIgM抗体(Boehringer Mannheim)を用いた。ペルオキシダーゼ活性は、4-クロロ-1-ナフトールを基質として検出した。

5. 免疫粘着反応

腫瘍細胞および正常末梢血細胞表面のペプチド抗原#810と#707は、免疫粘着反応(23)により検出した。標的細胞を抗体L92あるいはL94とインキュベートした後、モルモッ

ト補体。さらにヒト赤血球と順次インキュベートし。標的細胞表面の赤血球ロゼットの形成を観察した。結果は下記のとおり判定した：－、赤血球ロゼットを形成する標的細胞数が全細胞数の $<5\%$ ； \pm 、 $5-10\%$ ； $+$ 、 $10-20\%$ ； $++$ 、 $20-50\%$ ； $+++$ 、 $50-75\%$ ； $++++$ 、 $>75\%$ 。

6. 非自己メラノーマワクチンによる免疫療法

メラノーマワクチンは、3種類のヒトメラノーマ細胞(UCLASO-M10, M24, M101)を γ 線照射により不活化して作成した(24)。ワクチンは -70°C で冷凍保存し、用時BCGと混合して用いた。投与方法は皮下注とし、投与量は1回につき、メラノーマ細胞 2.4×10^7 個とした。投与間隔は初めの3回を2週間間隔、次の12回を1ヶ月間隔、続く4回を3ヶ月間隔とし、それ以降は6ヶ月間隔とした。

7. 末梢血単核球およびBリンパ芽球の調整

末梢血単核球は、John Wayne Cancer Clinic, St John's Hospital (Santa Monica, California, USA)に通院中のメラノーマ患者19名(American Joint Committee on Cancer stage III)より得た末梢血、およびアメリカ赤十字社より購入した健常者19名の末梢血から、フィコールを用いた比重遠心法により分離した。Bリンパ芽球は、これらの末梢血単核球をEpstein-Barr virusでトランスフォームすることにより確立した(25)。これらの細胞は10%の加熱不活化したヒトAB型血清(Irvine Scientific, California, USA)を加えたRPMI1640(末梢血単核球用培養液)で培養した。

8. 細胞障害活性の検討

末梢血単核球の細胞障害活性は ^{51}Cr release assay(10, 11)により測定した。標的細胞はメラノーマ細胞またはBリンパ芽球を $100 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr で 37°C 、2時間インキュベートして標識し、作成した。標的細胞はRPMI1640で3回洗浄後、末梢血単核球用培養液に浮遊させ、 $5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ / ウェルの細胞数にて96ウェルの丸底マイクロカルチャープレートに分配した。次にエフェクター細胞として末梢血単核球 $5 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5 / 150 \mu\text{l}$ / ウェルを加えた。

37°C、5%CO₂の条件下で4時間インキュベートした後、各ウェルより100μlの上清を採取し、放出された⁵¹Crを測定した。測定は3重測定とし、細胞障害活性は以下の式による% lysisで表した。

$$\% \text{ Lysis} = 100 \times [\text{実験解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}] / [\text{最大解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}]$$

9. ペプチド刺激による末梢血単核球の増殖反応の測定

メラノーマ患者の末梢血単核球を $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ /ウェルの細胞数にて96ウェルマイクロプレートに分配し、これに100μl/ウェルの#810または#707ペプチド溶液を加えた。ペプチド溶液は、ペプチドを末梢血単核球用培養液に2倍濃度で溶解したものをを用い、終濃度が0.01, 0.1, 1.0および10.0μMとなるようにした。この培養条件にて37°Cで72時間培養した後、さらに0.5μCi/20μl/ウェルの³H-thymidineを加え、18時間培養して³H-thymidineの取り込みを測定した。測定は3重測定とし、結果は以下の式によるstimulation index (SI)で表した。

$$\text{SI} = [\text{ペプチド存在下での取り込み(cpm)}] / [\text{ペプチド非存在下での取り込み(cpm)}]$$

10. モノクローナル抗体

ヒトIgMモノクローナル抗体L92, L94, L612 (抗ガングリオシドGM₃) はIrie et al. により作成された (12,13,26)。抗HLAクラスI, 抗HLA-DR, 抗CD3, 抗CD4, 抗CD8抗体 (AMAC, Inc., Maine, USA) は、いずれもマウスIgGモノクローナル抗体である。抗HLAクラスI抗体はHLAクラスI分子 (HLA-ABC) の、抗HLA-DR抗体はHLA-DR分子の monomorphic determinantを認識する。

11. HLAタイピング

HLAのタイピングは補体による細胞障害試験(10, 11)によって行った。

12. 統計学的処理

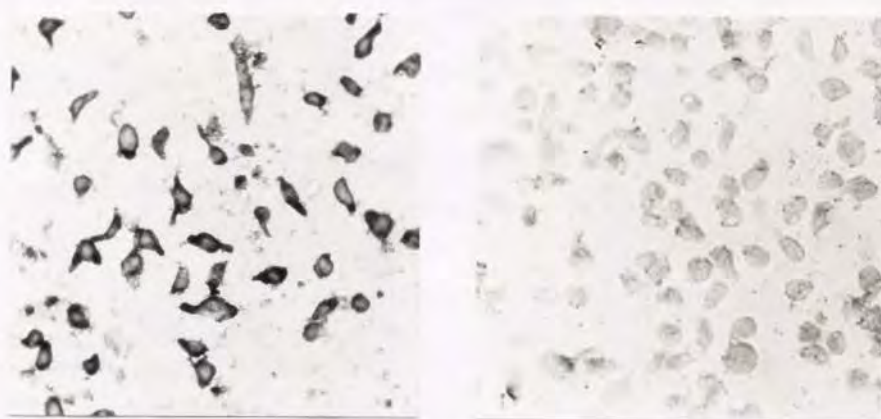
結果の統計学的有意性はStudent's t testにより検定した。

実験結果

1. ペプチド抗原#810の発現および細胞障害活性における機能

1. ヒト細胞におけるペプチド抗原#810の発現

A



B

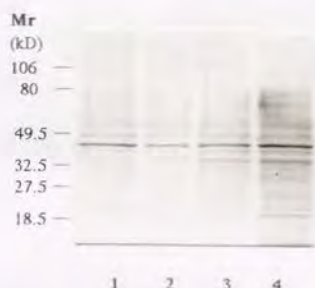


図1 A. *In situ*ハイブリダイゼーションによる#810mRNAの検出。#810mRNAに相補的なアンチセンスプローブを用いると、メラノーマUCLASO-M25は陽性所見を示す（左）。コントロールのセンスプローブに対しては陰性である（右）。B. ウェスタンブロッティングによるペプチド抗原#810の検出。モノクローナル抗体L92は、各細胞溶解液中の分子量43kDの蛋白に結合活性を示す。Lane 1, メラノーマUCLASO-M14; lane 2, メラノーマUCLASO-M12; lane 3, 乳糖645; lane 4, 正常末梢血中のT細胞。

各種腫瘍細胞および末梢血細胞におけるペプチド抗原#810の発現を、*in situ*ハイブリダイゼーション法、ウエスタンブロッティング法および免疫粘着反応により検討し、結果を図1および表1に示した。*In situ*ハイブリダイゼーションの結果、ペプチド抗原#810のmRNAは、メラノーマを含む種々の腫瘍細胞および正常の末梢血細胞に検出された。抗体

表1. ヒト細胞におけるペプチド抗原#810の発現

標的細胞	#810mRNA	ペプチド抗原#810	
	<i>In situ</i> ハイブリダイゼーション	ウエスタンブロッティング ^{a)}	免疫粘着反応 ^{b)}
メラノーマ			
UCLASO-M10	+	+	+
M12	+	+	+++
M14	+	+	—
M15	+	+	—
M24	+	+	—
M25	+	+	+++
M101	+	+	+
M111	+	+	—
M112	+	+	—
神経芽細胞腫SHN	+	+	++++
結腸癌 SW48	+	+	++
SW480	+	+	+
胃癌 MKN28	+	+	—
MKN45	+	+	++
肺癌 130	+	+	+
135	+	+	—
乳癌 645	+	+	—
赤白血病 K562	+	+	—
Bリンパ芽球腫L14	+	+	—
正常末梢血中の細胞			
単球	+	+	—
T細胞	+	+	—
B細胞	+	+	—
赤血球	ND ^{c)}	—	ND
phytohemagglutininで刺激した			
正常末梢血単核球	+	+	—

^{a)} 一次抗体にはモノクローナル抗体L92を用いた。^{b)} L92による免疫粘着反応の結果は下記のとおり判定した：—, 赤血球ロゼットを形成する標的細胞数が全細胞数の<5%; ±, 5-10%; +, 10-20%; ++, 20-50%; +++, 50-75%; +++, >75% (方法参照)。^{c)} ND, 未検討。

L92を用いたウエスタンブロッティング法による検討においても、ペプチド抗原#810は赤血球を除き、検討したすべての細胞に検出され、メラノーマに特異的ではなかった。また、その分子量はSDS-ポリアクリルアミドグラジエントゲル電気泳動により43kDと推定され、検出されたペプチド抗原#810は43kD蛋白のものと思われた(図1B)。一方、その細胞表面における発現は免疫粘着反応の結果にみられるように、細胞の種類によって異なっていた。メラノーマUCLASO-M12、M25や神経芽細胞腫SHNなどでは、ペプチド抗原#810が細胞表面に発現されていると考えられるのに対して、メラノーマUCLASO-M14、M24や正常末梢血単核球などではその存在を検出できなかった。

2. メラノーマ患者の末梢血単核球によるペプチド抗原#810の認識

ペプチド抗原#810が細胞障害活性の標的抗原として認識されるか否かを調べるため、患者の末梢血単核球をエフェクター細胞、ペプチドパルスした自己Bリンパ芽球を標

表2. メラノーマ患者の末梢血単核球の、#810パルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性

	標的細胞(自己Bリンパ芽球)をパルスしたペプチド			
	#810 ^{a)}		コントロールのペプチド ^{b)}	
	% Lysis ^{c)} の mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	% Lysis ^{c)} の mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)
メラノーマ患者(n=19)	19.68±6.61 ^{e)}	16(84.2)	6.30±3.70	1(5.3)
健常者(n=19)	6.16±3.26	1(5.3)	5.90±3.50	0(0)

エフェクター細胞には末梢血単核球を、標的細胞には自己のBリンパ芽球を#810およびコントロールペプチドでパルスして用いた。

a) (QDLTMKYQIF)。b) (IMTQLFQDYK)。c) % Lysis (E:T=80:1) = $100 \times [\text{実験解離}(\text{cpm}) - \text{自然解離}(\text{cpm})] / [\text{最大解離}(\text{cpm}) - \text{自然解離}(\text{cpm})]$ 。各種標的細胞における自然解離および最大解離の平均値(cpm)は以下のとおりである：メラノーマ患者の#810パルスしたBリンパ芽球、1,521および16,343；メラノーマ患者のコントロールペプチドでパルスしたBリンパ芽球、1,428および18,235；健常者の#810パルスしたBリンパ芽球、1,340および17,641；健常者のコントロールペプチドでパルスしたBリンパ芽球、1,623および19,412。各種標的細胞における自然解離はいずれも最大解離の10%未満であった。d) 健常者の末梢血単核球による% lysisの平均値+3SDは15.9%であり、またメラノーマ患者の末梢血単核球による、コントロールのペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球に対する% lysisの平均値+3SDは16.7%であった。したがって、% lysis ≥ 17%をペプチドパルスによる反応陽性と判定した。e) 健常者の平均値と比べ、有意に高い(p<0.005)。

的細胞として細胞障害活性を測定し、結果を表2に示した。ペプチドパルスは自己Bリンパ芽球を ^{51}Cr 標識する際に、 $10\mu\text{M}$ の#810を同時に加えてインキュベートすることにより行った。19名のメラノーマ患者中16名(84.2%)は、#810でパルスした自己Bリンパ芽球に対して陽性の細胞障害活性を示したが、コントロールのペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球に対して、陽性の細胞障害活性を示したのは19名中1名(5.3%)のみであった。したがって、この細胞障害活性は#810に対する特異的な反応と考えられた。また、このような活性は健常者では、19名中1名(5.3%)に認められたに過ぎなかった。この結果は、メラノーマ患者の末梢血単核球が*in vivo*で自己のメラノーマ細胞の提示するペプチド抗原#810に感作され、潜在的に#810に特異的な免疫応答の能力を用意しているのに対し、健常者の末梢血単核球はそのような免疫応答能を準備していないことを示す。

次に非自己メラノーマ細胞ワクチンによる免疫療法の前後で、この細胞障害活性がどのように変化するかを検討し、結果を表3に示した。#810に特異的な細胞障害活性はワ

表3. #810に特異的な細胞障害活性におよぼす非自己メラノーマワクチン接種の影響

	標的細胞(自己Bリンパ芽球)をパルスしたペプチド			
	#810 ^{a)}		コントロールのペプチド ^{b)}	
	% Lysis ^{c)} mean \pm SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	% Lysis ^{c)} mean \pm SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)
0 週 ^{e)}	19.68 \pm 6.61	16(84.2)	6.30 \pm 3.70	1(5.3)
4 週	36.79 \pm 10.25 ^{f)}	17(89.5)	5.98 \pm 3.23	0(0)
8 週	27.95 \pm 9.53 ^{f)}	16(84.2)	6.40 \pm 3.40	0(0)

エフェクター細胞にはメラノーマ患者の末梢血単核球を、標的細胞には自己のBリンパ芽球を#810およびコントロールペプチドでパルスして用いた。

a) (QDLTMKYQIF)。b) (IMTQLFQDYK)。c) % Lysis (E:T=80:1) = $100 \times [\text{実験解離}(\text{cpm}) - \text{自然解離}(\text{cpm})] / [\text{最大解離}(\text{cpm}) - \text{自然解離}(\text{cpm})]$ 。各種標的細胞における自然解離および最大解離の平均値(cpm)は以下のとおりである：#810パルスしたBリンパ芽球、1,521および16,343；コントロールペプチドでパルスしたBリンパ芽球、1,428および18,235。各種標的細胞における自然解離はいずれも最大解離の10%未満であった。d) 表2に示したとおり。% lysis $\geq 17\%$ をペプチドパルスによる反応陽性と判定した。e) ワクチン療法開始後の週数。f) 0 週の平均値と比べ、有意に高い($p < 0.005$)。

ワクチン療法開始前（0週）と比べ開始後（4および8週）に高値を示し、この差は統計学的に有意であった（ $p < 0.005$ ）。ワクチン投与後の細胞障害活性の増大は、19名の患者中15名（78.9%）で認められた。これは、患者の末梢血単核球が非自己メラノーマ細胞の提示するペプチド抗原#810によっても感作され、その結果、#810に特異的な細胞障害活性が増強されたことを示す。

さらに、#810がメラノーマ患者の末梢血単核球の増殖反応を誘導しうるか否かを、 ^3H -thymidineの取り込みを指標として検討し、結果を表4に示した。ワクチン療法開始後8週では、メラノーマ患者19名中13名（68.4%）の末梢血単核球が、#810に対して陽性の増殖反応を示したが、健常者19名の末梢血単核球ではこのような反応は全く認められなかった。また、コントロールのペプチドに対する増殖反応は、メラノーマ患者19名中1名（5.3%）に認められたに過ぎなかった。したがって、メラノーマ患者の末梢血単核球が示した#810に対する増殖反応は、非特異的なマイトゲンに対する反応性の亢進によって生じた

表4 メラノーマ患者の末梢血単核球の#810に対する増殖反応

		刺激に用いたペプチド			
		#810 ^{a)}		コントロールのペプチド ^{b)}	
		最大SI ^{c)} 値の mean \pm SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	最大SI ^{c)} 値の mean \pm SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)
メラノーマ患者 (n=19)	0週 ^{e)}	1.62 \pm 0.31 ^{f)}	3(15.8)	0.95 \pm 0.30	1(5.3)
	4週	2.43 \pm 0.45 ^{f)}	12(63.2)	0.94 \pm 0.38	1(5.3)
	8週	2.50 \pm 0.43 ^{f)}	13(68.4)	0.90 \pm 0.35	0(0)
健常者(n=19)		0.98 \pm 0.33	0(0)	0.93 \pm 0.37	1(5.3)

^{a)} (QDLTMKYQIF). ^{b)} (IMTQLFQDYK). ^{c)} SI, stimulation index = [ペプチド存在下の ^3H -thymidineの取り込み(cpm)]/[ペプチド非存在下の取り込み(cpm)]。各種末梢血単核球のペプチド非存在下の取り込みの平均値(cpm)は以下のとおりである：メラノーマ患者0週, 1,950；メラノーマ患者4週, 1,823；メラノーマ患者8週, 1,835；健常者, 2,041。 ^{d)} 健常者の末梢血単核球を用いた時、SIの平均値 \pm 3SDはいずれの濃度においても1.97以下であった。またコントロールペプチドを用いた時は同様に1.94であった。したがってSI \geq 2.0をペプチドに対する増殖反応陽性と判定した。 ^{e)} ワクチン療法開始後の週数。 ^{f)} 健常者の平均値と比べ、有意に高い($p < 0.001$)。

ものではなく、このペプチドに対する特異的な反応と考えられた。しかし、その反応性は細胞障害活性と比較すると明らかに小さかった。

3. *In vitro*におけるペプチド抗原#810による再刺激の効果

ワクチン接種した患者の末梢血単核球を*in vitro*で#810により再刺激することによって、#810に特異的な細胞障害活性がさらに増大するか否かを検討し、結果を図2に示した。ワクチン療法開始後4週のメラノーマ患者A(HLA-A2,3 B7,8)の末梢血単核球を、 $10 \mu\text{M}$ の#810と 37°C で5日間培養することにより再刺激し、エフェクター細胞として用い

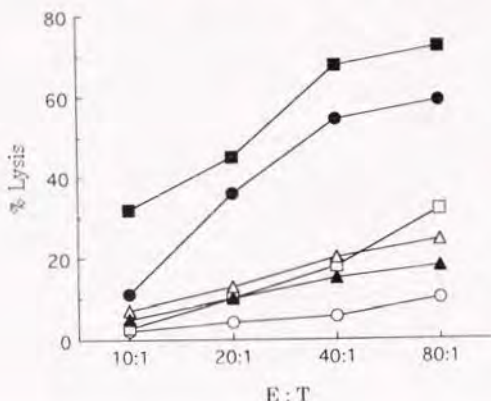


図2. *In vitro*で#810により再刺激したメラノーマ患者末梢血単核球の細胞障害活性。ワクチン療法開始後4週の患者A(HLA-A2,3 B7,8)の末梢血単核球をエフェクター細胞とし、#810ハルスした自己Bリンパ芽球、自己メラノーマおよびK562に対する細胞障害活性を検討した。

エフェクター細胞の#810による再刺激

標的細胞

■	+	#810ハルスした自己Bリンパ芽球
●	+	自己メラノーマ
▲	+	K562
□	-	#810ハルスした自己Bリンパ芽球
○	-	自己メラノーマ
△	-	K562

コントロールのペプチドでハルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=80:1)はいずれのエフェクター細胞においても8%未満であった(図中略)。患者Aについて3回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B(HLA-A2,29 B44,-)、患者C(HLA-A2,28 B27,58)および患者D(HLA-A11,30 B18,70)についても、患者Aと同じ条件で3回ずつ実験を行い、いずれも患者Aと同様の結果を得た。

た。再刺激して得たエフェクター細胞は、再刺激しないエフェクター細胞と比べ、2～4倍の細胞障害活性を示した。このような再刺激の効果は、K562（ナチュラルキラー細胞の標的細胞）やコントロールのペプチドでバルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性には認められなかった。したがって、このエフェクター細胞の細胞障害活性は#810を標的抗原とする特異的なものであり、非特異的なナチュラルキラー活性とは異なるものと考えられた。また再刺激したエフェクター細胞は、自己メラノーマに対しても強い細胞障害活性を示した。これは、#810バルスしたBリンパ芽球と同様にメラノーマにおいても、#810が細胞障害活性の標的抗原として提示されていることを示唆する。そこで、#810で再刺激したエフェクター細胞に対し、自己メラノーマと#810バルスした自己Bリンパ芽

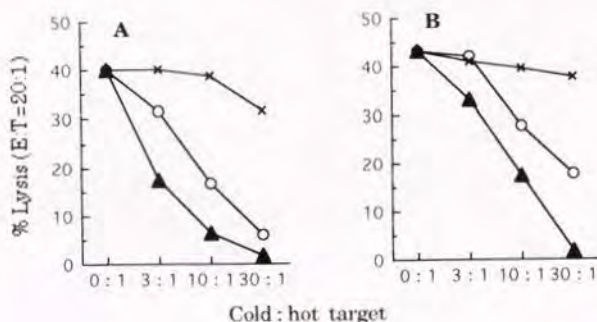


図3. #810バルスした自己Bリンパ芽球 (A) および自己メラノーマ (B) に対する細胞障害活性の、非標識標的細胞による抑制。図2と同様、患者Aの末梢血単核球を#810で再刺激してエフェクター細胞とし、#810バルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマを標識標的細胞 (hot target) として、細胞障害活性 (E:T=20:1) を測定した。非標識標的細胞 (cold target) として、ペプチドバルスしていない自己Bリンパ芽球 (x), #810バルスした自己Bリンパ芽球 (▲) および自己メラノーマ (○) を、それぞれ図に示す非標識: 標識標的細胞 (cold: hot target) の細胞数比となるように加え、細胞障害活性に対する抑制効果を検討した。患者Aについて4回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B, C, Dについても患者Aと同じ条件で4回ずつ実験を行い、いずれも患者Aと同様の結果を得た。

球が標的細胞として競合するか否かを検討するために、非標識標的細胞による抑制実験を行い、結果を図3に示した。末梢血単核球用培養液に浮遊させた非標識標的細胞50 μ l / ウェルおよびエフェクター細胞100 μ l / ウェルを96ウェルプレートに分配し、37°Cで1時間インキュベートした後、 ^{51}Cr 標識した標的細胞 5×10^3 / 50 μ lを各ウェルに加え、 ^{51}Cr release assayを行った。標識標的細胞数は常に一定とし、非標識標的細胞数を変化させることにより、両者の比を設定した。標識標的細胞として#810バルスした自己Bリンパ芽球を用いた場合（図3A）、細胞障害活性は#810バルスした非標識自己Bリンパ芽球と同様、非標識自己メラノーマ細胞によっても抑制された。また、標識標的細胞として自己メラノーマ細胞を用いた場合（図3B）も、細胞障害活性は非標識自己メラノーマ細胞と同様、#810バルスした非標識自己Bリンパ芽球によっても抑制された。この結果は、#810バルスしたBリンパ芽球と同様に、メラノーマ細胞においても#810が細胞障害活性の標的抗原として提示され、エフェクター細胞に認識されていることを裏付けるものである。

4. ペプチド抗原#810の提示および認識のメカニズム

ペプチド抗原#810を標的とする細胞障害活性のエフェクター細胞を同定するために、各種抗CD抗体による抑制効果を検討し、結果を図4Aに示した。エフェクター細胞を10 μ g/mlの抗CD3、抗CD4または抗CD8抗体と1時間ブレインキュベートした後、細胞障害活性を測定した。標的細胞として#810バルスした自己Bリンパ芽球あるいは自己メラノーマ細胞のどちらを用いた場合も、細胞障害活性は抗CD3抗体と抗CD8抗体によって抑制され、抗CD4抗体では抑制されなかった。これは、エフェクター細胞がCD3とCD8陽性の細胞、すなわち細胞障害性T細胞に分類されることを示す。

一方、標的細胞についてはペプチド抗原#810の提示に関与するHLA抗原を明らかにするため、同様に各種抗HLA抗体を用いて抑制効果を検討し、結果を図4Bに示した。#810バルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞のどちらを標的細胞に用いた場合も、細胞障害活性は抗HLA-クラスI抗体により抑制され、抗HLA-DR抗体では抑制されなかった。これは標的細胞表面でのペプチド抗原#810の提示が、HLA-クラスI抗原に

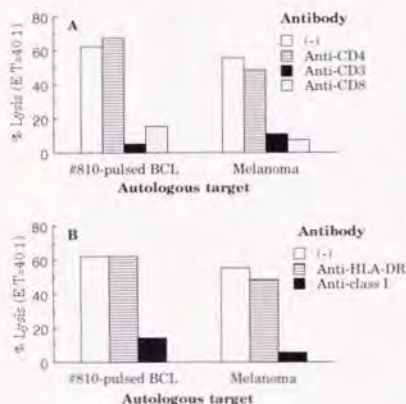


図4. 各種抗体の細胞障害活性に対する抑制効果。#810で再刺激したメラノーマ患者Aの末梢血単核球をエフェクター細胞とし、#810パルスした自己Bリンパ芽球(#810-pulsed BCL)および自己メラノーマ(Melanoma)を標的細胞として、細胞障害活性(E:T=40:1)を測定した。Aではエフェクター細胞を、Bでは標的細胞を、それぞれ各抗体10 μ g/mlと1時間プレインキュベートした後、 51 Cr release assayを行った。コントロールのペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は6%未満であった(図中略)。患者Aについて実験は4回行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B,C,Dについても患者Aと同じ条件で4回ずつ実験を行い、いずれも患者Aと同様の結果を得た。

よって拘束されていることを示す。

5. ペプチド抗原#810を標的抗原とする細胞障害活性のHLA拘束性

細胞障害性T細胞がメラノーマ細胞表面の標的抗原を認識する際には、HLA-A抗原の拘束を受け、特にHLA-A2, A11およびA24は重要な拘束性因子であると考えられている(10, 11)。そこでペプチド抗原#810についても、その認識を拘束するHLA-クラスI抗原を同定するため、HLAタイプの判明しているメラノーマ患者の末梢血単核球を用い、#810パルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性を測定し、結

表5. #810の認識のHLA拘束性

患者	HLA		標的細胞の% lysis ^{a)}	
	A	B	#810パルスした自己Bリンパ芽球	自己メラノーマ
A	2,3	7,8	64.3(18.0)	55.1(5.4)
B	2,29	44,—	25.9(13.5)	17.4(5.9)
C	2,28	27,58	31.8(14.9)	24.1(3.2)
D	11,30	18,70	29.7(19.0)	37.5(9.6)
E	28,31	39,60	30.3(21.4)	12.0(8.0)
F	24,—	48,53	11.0(10.0)	3.0(3.0)
G	29,—	49,—	3.4(7.2)	3.0(4.0)
H	24,32	7,44	0 (0)	11.0(10.4)

a) ワクチン接種後のメラノーマ患者の末梢血単核球を *in vitro* で5日間、#810の存在下、あるいは非存在下に培養した後、エフェクター細胞として用い、E:T=40:1で細胞障害活性を測定した。()内の値は#810非存在下に培養したコントロールのエフェクター細胞の細胞障害活性を示す。コントロールのペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は、いずれのエフェクター細胞においても7%未満であった。各患者について3回以上の実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。

果を表5に示した。HLA-A2陽性の患者A, B, CおよびHLA-A11陽性の患者Dにおいては、*in vitro* の#810再刺激により、#810パルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性が増大した。この結果は、ペプチド抗原#810の認識において、HLA-A2およびA11が拘束性因子として機能している可能性を示す。また、HLA-A24陽性の患者FおよびHでは細胞障害活性は増強されず、この結果はHLA-A24が#810の認識には関与しないことを示す。一方、HLA-A2, A11陰性の患者Eにおいても細胞障害活性の増大が認められ、その他のHLAクラスI抗原(HLA-A28, A31, B39, B60)が#810の認識に関与している可能性も示された。

次に、HLA-A2およびA11による拘束性を確認するために、患者B(HLA-A2陽性)とD(HLA-A11陽性)より得たエフェクター細胞を用い、#810パルスした非自己のBリンパ芽球に対する細胞障害活性を測定し、結果を図5に示した。HLA-A2陽性患者Bより得たエフェクター細胞は、#810パルスした非自己のBリンパ芽球のうち、HLA-A2陽性の患者A, C, NおよびOの標的細胞は破壊したが、HLA-A2陰性の患者D, E, F, GおよびHの標的細胞は破壊しなかった。HLA-A11陽性患者Dより得たエフェクター細胞についても同様の結果

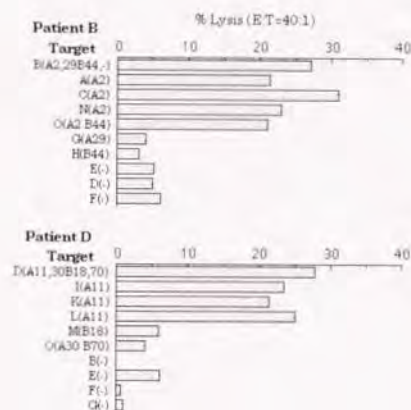


図5. #810/パルスした非自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性とHLA抗原との関係。患者B(HLA-A2陽性)およびD(HLA-A11陽性)の末梢血単核球を#810で再刺激して得たエフェクター細胞を用い、#810パルスした非自己Bリンパ芽球を標的細胞として、細胞障害活性(E:T=40:1)を測定した。Targetの欄の()内はエフェクター細胞と標的細胞の共有するHLA-AおよびB抗原を示す。コントロールのペプチドでパルスした非自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は、いずれのエフェクター細胞においても5%未満であった(図中略)。患者B, Dにつき3回ずつ実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。

が得られた。一方、これらのエフェクター細胞はいずれもHLA-A抗原の一致、不一致に関係なく、#810パルスしていない非自己Bリンパ芽球は破壊しなかった(図中略)。したがって、エフェクター細胞による細胞障害活性は、#810を標的抗原とする特異的なもので、非自己Bリンパ芽球のアロ抗原に対する反応ではないと考えられた。これらの結果は、HLA-A2およびA11がエフェクター細胞による、抗原#810の認識を拘束する因子であることを裏付けるものである。さらに非自己メラノーマ細胞を標的細胞とした場合にもこの拘束性が存在するか否かを検討し、結果を表6に示した。HLA-A2陽性の患者AおよびBでは、#810再刺激により誘導したエフェクター細胞は、HLA-A2陽性の非自己メラノーマを破壊したが、A2陰性のメラノーマに対しては有意な細胞障害活性を示さなかった。HLA-A11陽性患者Dにおいても同様の結果が得られた。これらの結果はメラノーマ細胞に

表6. 自己および非自己メラノーマに対する細胞障害活性とHLA-A抗原との関係

患者	#810による誘導	[HLA-A]	標的細胞の% lysis ^{a)}									
			M10	M24	M101	MA ^{b)}	MB ^{b)}	MD ^{b)}	MP ^{b)}	MQ ^{b)}	K562	
			24,33	11,33	2,29	2,3	2,29	11,30	1,2	2,9	—]
A	—		9.8	9.1	<u>8.6</u>	<u>5.4</u>	<u>9.5</u>	3.0	<u>6.4</u>	<u>7.4</u>	15.1	
[HLA-A2,3]	+		9.3	1.6	<u>37.8</u>	<u>55.1</u>	<u>23.6</u>	4.0	<u>20.2</u>	<u>18.0</u>	16.0	
B	—		8.2	11.6	<u>9.1</u>	<u>8.6</u>	<u>5.9</u>	6.0	<u>9.3</u>	<u>11.1</u>	15.7	
[HLA-A2,29]	+		9.2	11.9	<u>35.1</u>	<u>31.4</u>	<u>17.4</u>	7.0	<u>16.1</u>	<u>31.7</u>	14.6	
D	—		8.2	<u>9.0</u>	3.1	11.7	4.9	<u>9.6</u>	6.3	8.7	17.7	
[HLA-A11,30]	+		7.1	<u>37.4</u>	2.0	8.0	5.0	<u>37.5</u>	6.9	9.8	16.1	

^{a)} ワクチン接種後のメラノーマ患者の末梢血単核球を *in vitro* で5日間、#810の存在下（#810による誘導+）、あるいは非存在下（—）に培養した後、エフェクター細胞として用い、種々のメラノーマを標的細胞として、E:T=40:1にて細胞障害活性を測定した。[]内は標的細胞あるいはエフェクター細胞のHLA-Aタイプを示す。下線部はエフェクター細胞の自己メラノーマ、あるいは共通のHLA-A抗原を有する非自己メラノーマに対する細胞障害活性である。陰性コントロールの標的細胞として、K562に対する細胞障害活性も測定した。各患者につき4回の実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。

^{b)} MA, MB, MD, MP, MQはそれぞれ患者A, B, D, P, Qのメラノーマ細胞を示す。

においても、エフェクター細胞の標的抗原である#810の認識は、HLA-A2およびA11の拘束を受けていることを示す。

6. #810を標的抗原とする細胞障害活性に及ぼす抗#810抗体L92の抑制効果

ペプチド抗原#810がHLA-A2またはA11の拘束のもとに細胞障害活性の標的抗原として提示される際に、その抗原性がどのように変化するかを調べるため、細胞障害活性に対する抗体L92の抑制効果を検討し、結果を表7に示した。エフェクター細胞には#810で再刺激した患者A(HLA-A2陽性)の末梢血単核球を、標的細胞には#810バルスした自己Bリン芽球および自己メラノーマ細胞を用いた。標的細胞はあらかじめ10 μg/mlの抗体L92により37℃で1時間ブレインキュベートした。#810バルスした自己Bリン芽球および自己メラノーマのどちらを標的細胞とした場合でも、細胞障害活性の低下はブレインキュベートしない時に比べ20～25%、また、陰性コントロールとして用いた抗体L612(26)とブレインキュベートした時に比べ17～20%と小さく、陽性コントロールとして用いた抗

表7 抗体L92の細胞障害活性に対する抑制効果

抗体処理 ^{a)}	標的細胞の% lysis ^{b)}	
	#810パルスした自己Bリンパ芽球	自己メラノーマ
(-)	67.3	58.2
L92(抗#810抗体)	54.4	43.6
L612(抗GM ₃ 抗体)	65.3	54.3
抗クラス I 抗体	5.2	8.0

a) ワクチン接種後のメラノーマ患者A(HLA-A2,3)の末梢血単核球を#810で再刺激したものをエフェクター細胞として用い、E:T=40:1で細胞障害活性を測定した。コントロールのペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は8%未満であった。患者Aについて実験は3回行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B,C,Dについても患者Aと同じ条件で3回ずつ実験を行い、いずれも患者Aと同様の結果を得た。b) 標的細胞をモノクローナル抗体で1時間ブレインキュベートした後、エフェクター細胞を加えた。各抗体の終濃度は10 µg/mlであった。L612、抗クラス I 抗体はそれぞれ陰性、陽性コントロールの抗体として用いた。

HLA-クラス I 抗体において得られたような大きな抑制効果は認められなかった。そこで、両標的細胞に対するL92の反応性を免疫粘着法により直接検討した結果、反応性はいずれも陰性であった。これらの結果は、ペプチド抗原#810がHLA-クラス I 抗原の拘束のもとに、細胞障害活性の標的抗原として提示される際には、免疫粘着法によって検出される#810とは異なり、抗体L92に認識されにくい形で発現されていることを示す。

II. ペプチド抗原#707の発現および細胞障害活性における機能

ペプチド抗原#707についても#810と同様に以下の実験を行い、細胞障害活性におけるその機能を検討した。

1. ヒト細胞におけるペプチド抗原#707の発現

各種ヒト細胞におけるペプチド抗原#707の発現を検討し、結果を表8に示した。#707のmRNAは、メラノーマUCLASO-M111、神経芽細胞腫SHN、赤白血病K562およびBリンパ芽球腫L14を除き、他のすべての腫瘍細胞で検出されたが、正常細胞では検討したすべての末梢血細胞で検出されなかった。この結果は、細胞表面における抗原の発現を検討した免疫粘着反応の結果と完全に一致した。一方、ウエスタンブロッティング法では、ペ

表 8. ヒト細胞におけるペプチド抗原#707の発現

標的細胞	#707mRNA		ペプチド抗原#707	
	<i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	ウエスタンブロッティング ^{a)}	免疫粘着反応 ^{b)}	
メラノーマ				
UCLASO-M10	+	—	+	
M12	+	—	+	
M14	+	—	++	
M15	+	—	+	
M24	+	—	+	
M25	+	—	++	
M101	+	—	+	
M111	—	—	—	
M112	+	—	+	
神経芽細胞腫SHN	—	—	—	
結腸癌				
SW48	+	—	+	
SW480	+	—	+	
胃癌				
MKN28	+	—	+	
MKN45	+	—	+	
肺癌				
I30	+	—	+	
I35	+	—	+	
乳癌				
645	+	—	+	
赤白血病				
K562	—	—	—	
Bリンパ芽球腫L14	—	—	—	
正常末梢血中の細胞				
単球	—	—	—	
T細胞	—	—	—	
B細胞	—	—	—	
赤血球	ND ^{c)}	—	ND	
phytohemagglutininで刺激した				
正常末梢血単核球	—	—	—	

a) 一次抗体にはモノクローナル抗体L94を用いた。b) L94による免疫粘着反応の結果は表1に示したとおり判定した。c) ND, 未検討。

ペプチド抗原#707の起源となる蛋白は、いずれの細胞でも検出されなかった。この結果は、ペプチド抗原#707が細胞質内ではその起源となる蛋白の一部として存在し、モノクローナル抗体L94によって認識できない状態にあることを示唆する。

2. メラノーマ患者の末梢血単核球によるペプチド抗原#707の認識

ペプチド抗原#707が細胞障害活性の標的抗原となりうるか否かを調べるために、メ

表9. メラノーマ患者の末梢血単核球の、#707ハルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性

	標的細胞(自己Bリンパ芽球)をハルスしたペプチド			
	#707 ^{a)}		#707(-AP) ^{b)}	
	% Lysis ^{c)} mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	% Lysis ^{c)} mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)
メラノーマ患者 (n=19)	17.47±5.02 ^{e)}	14(73.7)	6.98±3.23	1(5.3)
健常者 (n=19)	6.21±3.38	1(5.3)	5.68±4.50	0(0)

エフェクター細胞には末梢血単核球を、標的細胞には自己のBリンパ芽球を#707およびコントロールペプチド#707(-AP)でハルスして用いた。

a) (RVAALARDAP)。b) (RVAALARD)。c) % Lysis (E:T=80:1) = 100 x [実験解離(cpm) - 自然解離(cpm)] / [最大解離(cpm) - 自然解離(cpm)]。各種標的細胞における自然解離および最大解離の平均値(cpm)は以下のとおりである：#707ハルスしたメラノーマ患者のBリンパ芽球、1,745および19,635；#707(-AP)ハルスしたメラノーマ患者のBリンパ芽球、1,921および20,571；#707ハルスした健常者のBリンパ芽球、1,163および15,634；#707(-AP)ハルスした健常者のBリンパ芽球、1,832および19,410。各種標的細胞の自然解離はいずれも最大解離の10%未満であった。d) 表2に示したとおり、% lysis ≥ 17%をペプチドハルスによる反応陽性と判定した。e) 健常者の平均値と比べ、有意に高い(p<0.001)。

表10. #707に特異的な細胞障害活性におよぼす非自己メラノーマワクチン接種の影響

	標的細胞(自己Bリンパ芽球)をハルスしたペプチド			
	#707 ^{a)}		#707(-AP) ^{b)}	
	% Lysis ^{c)} mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	% Lysis ^{c)} mean±SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)
0週 ^{e)}	17.47± 5.02	14(73.7)	6.98±3.23	1(5.3)
4週	35.32±11.52 ^{f)}	16(84.2)	5.40±3.70	0(0)
8週	28.22±10.39 ^{f)}	14(73.7)	7.21±5.20	1(5.3)

エフェクター細胞にはメラノーマ患者の末梢血単核球を、標的細胞には自己のBリンパ芽球を#707およびコントロールペプチド#707(-AP)でハルスして用いた。

a) (RVAALARDAP)。b) (RVAALARD)。c) % Lysis (E:T=80:1) = 100 x [実験解離(cpm) - 自然解離(cpm)] / [最大解離(cpm) - 自然解離(cpm)]。各種標的細胞における自然解離および最大解離の平均値(cpm)は以下のとおりである：#707ハルスしたBリンパ芽球、1,745および19,635；#707(-AP)ハルスしたBリンパ芽球、1,921および20,571。各種標的細胞の自然解離はいずれも最大解離の10%未満であった。d) 表2に示したとおり、% lysis ≥ 17%をペプチドハルスによる反応陽性と判定した。e) ワクチン療法開始後の週数。f) 0週と比べ、有意に高い(p<0.001)。

メラノーマ患者の末梢血単核球をエフェクター細胞として用い、#707でパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性を測定し、結果を表9に示した。メラノーマ患者19名中14名(73.7%)の末梢血単核球は、#707でパルスした自己Bリンパ芽球に対して有意な細胞障害活性を示したが、#707のアミノ酸配列からカルボキシル末端のAPを除去した#707(-AP)でパルスした自己Bリンパ芽球に対する有意な細胞障害活性は、ほとんど認められなかった。したがって、この細胞障害活性は#707に特異的であり、また末梢血単核球が#707を認識するためには、カルボキシル末端のAP残基が不可欠と考えられた。一方、このような活性は健常者19名中1名(5.3%)に認められたにすぎなかった。これは#810と同様、メラノーマ患者の末梢血単核球のみが*in vivo*で抗原#707に感作されていたためと考えられる。次に#707でパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性を、ワクチン投与の前後で比較したところ(表10)、メラノーマ患者の末梢血単核球による細胞障害活性はワクチン療法開始前と比べ、開始後に有意に高い値を示し($p<0.001$)、活性の増大が19名中16名(84.2%)の患者に認められた。

さらに表11に示したように、メラノーマ患者の末梢血単核球は#707に対して有意

表11. メラノーマ患者の末梢血単核球の#707に対する増殖反応

		刺激に用いたペプチド			
		#707 ^{a)}		#707(-AP) ^{b)}	
		最大SI ^{c)} 値の mean \pm SD	反応陽性者数 ^{d)} (%)	最大SI値の mean \pm SD	反応陽性者数 (%)
メラノーマ患者 (n=19)	0週 ^{e)}	1.45 \pm 0.35 ^{f)}	3(15.8)	1.16 \pm 0.69	2(10.5)
	4週	3.16 \pm 0.68 ^{f)}	14(73.7)	1.13 \pm 0.58	1(5.3)
	8週	3.11 \pm 0.76 ^{f)}	12(63.2)	1.09 \pm 0.70	1(5.3)
健常者(n=19)		0.98 \pm 0.40	1(5.3)	1.12 \pm 0.57	1(5.3)

^{a)} (RVAALARDAP). ^{b)} (RVAALARD). ^{c)} SI, stimulation index = [ペプチド存在下の³H-thymidineの取り込み(cpm)]/[ペプチド非存在下の取り込み(cpm)]. 各種末梢血単核球のペプチド非存在下の取り込みの平均値(cpm)は以下のとおりである: メラノーマ患者0週, 1,950; メラノーマ患者4週, 1,823; メラノーマ患者8週, 1,835; 健常者, 2,041. ^{d)} 表3に示したとおり, SI \geq 2.0をペプチドに対する増殖反応陽性と判定した. ^{e)} ワクチン療法開始後の週数. ^{f)} 健常者の平均値と比べ、有意に高い($p<0.005$).

な増殖反応も示した。メラノーマ患者19名中14名(73.7%)が#707に対して陽性の増殖反応を示し、13名(68.4%)のメラノーマ患者においてその反応性はワクチン療法開始後に増大していた。一方、このような増殖反応は健常者19名中1名(5.3%)で認められたのみであった。また、患者の末梢血単核球は#707(-AP)に対し、有意な増殖反応はほとんど示さなかった。したがって、この増殖反応もペプチド抗原#707に特異的と考えられたが、その反応性は細胞障害活性に比べ、小さかった。

3. *In vitro*におけるペプチド抗原#707による再刺激の効果

ワクチン療法開始後のメラノーマ患者の末梢血単核球を*in vitro*で#707により再刺激

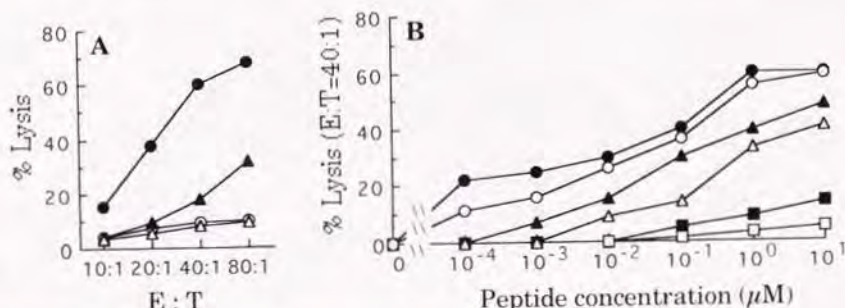


図6. #707で再刺激したメラノーマ患者の末梢血単核球による細胞障害活性。ワクチン接種した患者H(HLA-A24.32 B7.44)の末梢血単核球を#707の存在下、あるいは非存在下に培養した後、エフェクター細胞として用いた。A. #707および#707(-AP)でパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性。#707で再刺激して得たエフェクター細胞の#707(●)および#707(-AP)(○)でパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性を示す。同じ末梢血単核球を#707の非存在下に培養して得たエフェクター細胞の#707(▲)および#707(-AP)(△)でパルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性を、コントロールとして示した。ペプチドパルスしていない自己Bリンパ芽球を障害する活性(E:T=80:1)はいずれのエフェクター細胞においても8%未満であった。また、#707で再刺激して得たエフェクター細胞およびコントロールのエフェクター細胞のK562に対する細胞障害活性(E:T=80:1)はそれぞれ14%および25%であった(いずれも図中略)。B. ペプチド存在下での自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性。#707で再刺激して得たエフェクター細胞の細胞障害活性は下記のペプチドの存在下にE:T=40:1にて測定した：#707(●, RVAALARDAP)、オクタペプチド(○, AALARDAP)、ヘキサペプチド(▲, LARDAP)、テトラペプチド(△, RDAP)、ダイペプチド(■, AP)および#707(-AP)(□, RVAALARD)。ペプチド非存在下での自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は1%未満であり、AP以外のダイペプチド(AV, GPあるいはPA)の存在下では5%未満であった(図中略)。図6A,Bのいずれにおいても患者Hについて3回ずつ実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。また、患者B(HLA-A2.29 B44.1), D(HLA-A11.30 B18.70)についても患者Hと同じ条件で3回ずつ実験を行い、いずれも患者Hと同様の結果を得た。

した結果、#707パルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性は著しく増大した(図6A)。K562やペプチドパルスしない自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性は増強されなかった(図中略)ことから、この細胞障害活性は、#707を標的抗原とする特異的なものであると考えられた。また#707(-AP)でパルスした自己Bリンパ芽球は破壊されなかったことから、このエフェクター細胞においても#707の認識にはカルボキシル末端APの配列が不可欠であると考えられた。

さらに#707のアミノ末端よりアミノ酸2残基ずつ順に短縮したオクタペプチド、ヘキサペプチド、テトラペプチド、ダイペプチドを合成し、これら一連のペプチドが、#707再刺激で誘導したエフェクター細胞に認識されるか否かも検討した。すなわち、自己Bリンパ芽球を各ペプチドによりパルスしたものを標的細胞として細胞障害活性を比較し、結果を図6Bに示した。一連のペプチドのうち、#707を標的抗原とする細胞障害活性が最も高く、 $0.01\mu\text{M}$ で30% lysisを誘導することができた。オクタペプチドの誘導する細胞障害活性は#707よりわずかに低く、30% lysisを誘導できる濃度は $0.025\mu\text{M}$ であった。ヘキサペプチド、テトラペプチドでは、さらに誘導できる細胞障害活性が低く、30% lysisを誘導するにはそれぞれ 0.1 および $0.7\mu\text{M}$ の濃度が必要であった。ダイペプチドは $100\mu\text{M}$ においても30% lysisを誘導することはできなかった。

次に*in vitro*での#707による再刺激が自己メラノーマに対する細胞障害活性も増強するか否かを検討した。ワクチン接種後の患者B(HLA-A2,29 B44,-), D(HLA-A11,30 B18,70)およびH(HLA-A24,32 B7,44)の末梢血単核球を、#707で再刺激して得たエフェクター細胞を用いて細胞障害活性を測定し、結果を図7に示した。これらの患者の自己メラノーマは*in situ*ハイブリダイゼーションにより、#707 mRNAを発現していることが確認されている。自己メラノーマに対する細胞障害活性は、いずれの患者においても#707の再刺激により増大した。特に患者Hでは#707による再刺激の効果が著しく、自己メラノーマに対する細胞障害活性は、#707パルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性と同レベルまで増大した。一方、患者B、Dでは自己メラノーマに対する細胞障害活性は、#707パルス

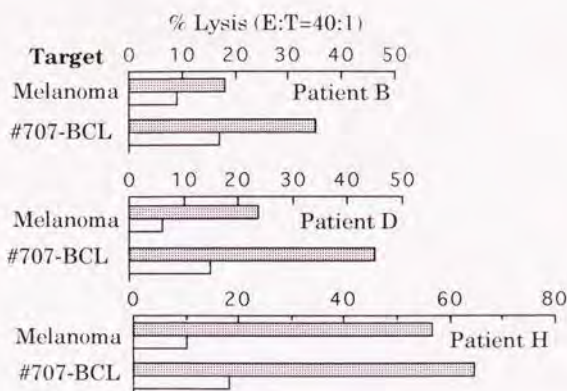


図7. #707で誘導したエフェクター細胞の自己メラノーマ(Melanoma)および#707バルスした自己Bリンパ芽球(#707-BCL)に対する細胞障害活性。ワクチン接種したメラノーマ患者B, DおよびHの末梢血単核球を#707の存在下(■)あるいは非存在下(□)に5日間培養して得たエフェクター細胞の細胞障害活性(E:T=40:1)を示した。#707(-AP)でバルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)はいずれのエフェクター細胞においても7%未満であった(図中略)。各患者につき3回ずつ実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。

した自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性よりも小さかったが、#707の再刺激により、有意に増大していた。この結果は#810と同様、#707もメラノーマ細胞の表面においても細胞障害活性の標的抗原として提示されていることを示唆する。さらに抗原特異性を検討するために、非標識標的細胞による抑制実験を行い、結果を図8に示した。標識標的細胞として#707バルスした自己Bリンパ芽球を用いた場合(図8A)も、自己メラノーマ細胞を用いた場合(図8B)も、細胞障害活性は非標識自己メラノーマ細胞と#707バルスした非標識自己Bリンパ芽球の両者により抑制された。この結果は、メラノーマ細胞の表面においても、#707が細胞破壊の標的抗原として提示されていることを裏付ける。

4. ペプチド抗原#707の提示および認識のメカニズム

#707を標的抗原とする細胞障害活性に対し、抗体による抑制実験を行い、結果を図9に示した。標的細胞として、#707でバルスした自己Bリンパ芽球あるいは自己メラノーマ

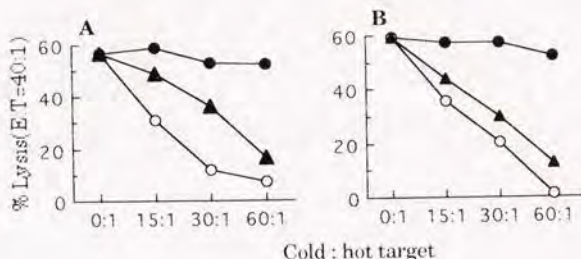


図8. #707バルスした自己Bリンパ芽球(A)および自己メラノーマ(B)に対する細胞障害活性の、非標識標的細胞による抑制。図6に示したとおり、ワクチン接種したメラノーマ患者Hの末梢血単核球を#707で再刺激して得たエフェクター細胞を用い、細胞障害活性(E:T=40:1)を測定した。非標識標的細胞(cold target)として、ペプチドバルスしていない自己Bリンパ芽球(●)、#707バルスした自己Bリンパ芽球(○)および自己メラノーマ(▲)を使用した。患者Hについて4回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B,Dについても患者Hと同じ条件で4回ずつ実験を行い、いずれも患者Hと同様の結果を得た。

マ細胞のどちらを用いた場合にも、細胞障害活性は、抗CD3および抗CD8抗体により完全に抑制され、抗CD4抗体には抑制されなかった(図9A)。したがってエフェクター細胞は、CD3およびCD8陽性の細胞障害性T細胞であると考えられた。また、この細胞障害活性は抗HLA-クラスI抗体により完全に抑制され、抗HLA-DR抗体には抑制されなかった

(図9B)。この結果は標的抗原#707の提示が、HLA-クラスI抗原に拘束されていることを示す。一方、#707を認識する抗体L94は、両標的細胞においてコントロールの細胞障害活性と比べ約50%の抑制効果を示したが、完全に抑制することはできなかった。免疫粘着反応により、両標的細胞表面での#707の発現を検討した結果、自己メラノーマ細胞では陽性であったが、#707バルスした自己Bリンパ芽球では陰性であった。この結果は、細胞障害活性の標的抗原として提示される際には、#707も#810と同様、免疫粘着反応によって検出されるものとは異なる形で発現されていることを示唆する。

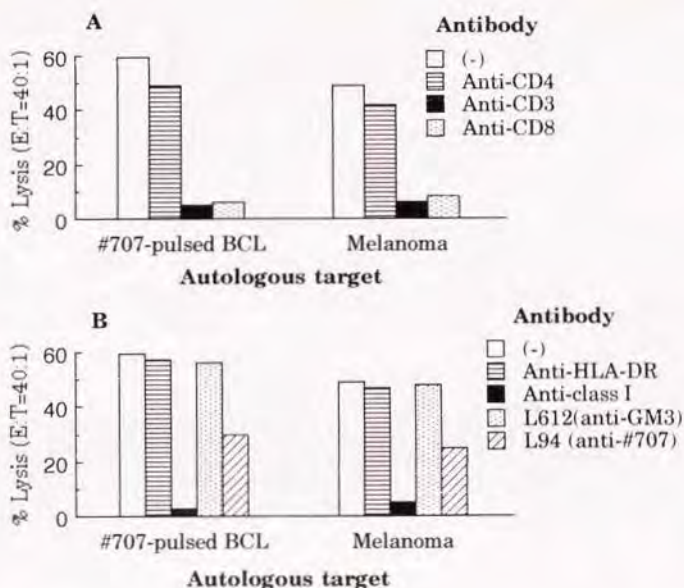


図9. 各種抗体の細胞障害活性に対する抑制効果。ワクチン接種したメラノーマ患者Hの末梢血単核球を#707で再刺激して得たエフェクター細胞を用い、#707ハルスした自己Bリンパ芽球(#707-pulsed BCL)および自己メラノーマ(Melanoma)を標的細胞とする細胞障害活性(E:T=40:1)を測定した。Aではエフェクター細胞を、Bでは標的細胞をそれぞれ各抗体10 μ g/mlと1時間プレインキュベートした後、 51 Cr release assayを行った。ヒトIgMモノクローナル抗体L612 (抗ガングリオシドGM $_3$)はL94の抑制能に対する陰性コントロールとして用いた。#707(-AP)でハルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は6%未満であった(図中略)。患者Hについて4回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者B,Dについても患者Hと同じ条件で3回ずつ実験を行い、いずれも患者Hと同様の結果を得た。

5. ペプチド抗原#707を標的抗原とする細胞障害活性のHLA拘束性

ペプチド抗原#707の認識を拘束するクラスI抗原を同定するため、HLAタイプの判明しているメラノーマ患者の末梢血単核球をエフェクター細胞として用い、クラスI抗原と細胞障害活性との関係を比較検討した。表12に示したとおり、8名の患者のうち、

表1 2. #707の認識のHLA拘束性

患者	HLA		標的細胞の% lysis ^{a)}		
	A	B	#707ハルスした自己Bリンパ芽球	自己メラノーマ	自己メラノーマにおける#707 mRNAの発現 ^{b)}
A	2,3	7,8	25.0(12.0)	20.3(3.6)	+
B	2,29	44,-	35.0(17.0)	18.0(9.0)	+
C	2,28	27,58	39.3(10.9)	21.2(4.8)	+
D	11,30	18,70	45.0(15.0)	23.6(6.0)	+
E	28,31	39,60	6.0(5.0)	10.2(9.0)	-
F	24,-	48,53	38.0(15.7)	22.7(2.0)	+
G	29,-	49,-	5.5(4.9)	8.6(9.0)	-
H	24,32	7,44	64.7(18.0)	56.5(10.0)	+

a) ワクチン接種後のメラノーマ患者の末梢血単核球を *in vitro* で5日間、#707の存在下、あるいは非存在下に培養した後、エフェクター細胞として用い、E:T=40:1で細胞障害活性を測定した。()内の値は#707非存在下に培養して得たコントロールのエフェクター細胞の細胞障害活性を示す。#707(-AP)でハルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は、いずれのエフェクター細胞においても9%未満であった。各患者について3回以上の実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。b) #707 mRNAは、これに相補的な配列を有するオリゴデオキシスクレオチドプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出した。

HLA-A2陽性の患者A, B, C, HLA-A11陽性の患者DおよびHLA-A24陽性の患者F, Hの6名の末梢血単核球では、*in vitro* の#707再刺激により、#707ハルスした自己Bリンパ芽球および自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性が増大した。この結果は、#707の提示がHLA-A2, A11およびA24により拘束されることを示唆する。また#707のmRNAはこれら6名のメラノーマ細胞において検出されたが、細胞障害活性が増強されなかった他の2名では検出されなかった。

さらに、#707ハルスした非自己のBリンパ芽球に対する細胞障害活性を測定したところ(図10)、患者H(HLA-A24陽性)のエフェクター細胞は、#707ハルスしたA24陽性の非自己のBリンパ芽球を破壊したが、A24陰性の標的細胞は破壊しなかった。患者B(A2陽性)、患者D(A11陽性)においても、エフェクター細胞はそれぞれA2, A11陽性の非自己の標的細胞のみを破壊し、A2, A11陰性の標的細胞は破壊しなかった。以上の結果は、HLA-A2, A11およびA24が#707の提示を拘束していることを裏付ける。この関係は非自己

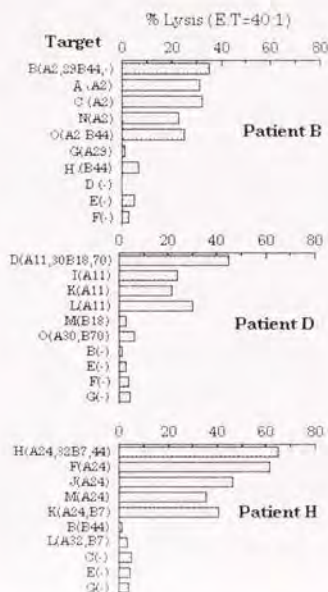


図10. #707バルスした非自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性とHLA抗原との関係。ワクチン接種したメラノーマ患者 B(A2陽性), D(A11陽性), H(HLA-A24陽性)の末梢血単核球を#707で再刺激して得たエフェクター細胞を用いた。Targetの欄の()内はエフェクター細胞と標的細胞の共有するHLA-AおよびB抗原である。#707(-AP)でバルスした非自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)は、いずれのエフェクター細胞においても6%未満であった(図中略)。各患者につき3回ずつ実験を行い、いずれも常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。

メラノーマ細胞を標的細胞とした場合(表13)も同様であった。

Ⅲ. 細胞障害活性におけるペプチド抗原#810と#707の関連性

初めに、これらペプチド抗原#810と#707が同時に標的抗原となった場合、細胞障害活性がどのように変化するかを検討し、結果を図11に示した。エフェクター細胞には患者B (HLA-A2陽性、自己メラノーマ細胞での#707 mRNA陽性)の末梢血単核球を、標的細胞には自己メラノーマ細胞および両ペプチドでバルスした自己Bリンパ芽球を用いた。自己メラノーマ細胞を標的細胞とした場合、末梢血単核球を両ペプチドで同時に再刺激す

表13. 自己および非自己メラノーマに対する細胞障害活性とHLA-A抗原との関係

		標的細胞の% lysis ^{a)}									
		M10	M24	MB ^{b)}	MD ^{b)}	ME ^{b)}	MG ^{b)}	MH ^{b)}	MP ^{b)}	MQ ^{b)}	K562
[HLA-A		24,33	11,33	2,29	11,30	28,31	29,-	24,32	1,2	2,9	-]
[#707 mRNA		+	+	+	+	-	-	+	+	+	-]
患者	#707による誘導										
B	-	9.2	8.4	<u>9.0</u>	3.1	7.5	<u>7.0</u>	5.1	<u>9.2</u>	<u>11.1</u>	15.7
[HLA-A2,29]	+	9.2	8.5	<u>18.0</u>	2.0	7.0	<u>6.0</u>	5.3	<u>29.1</u>	<u>31.7</u>	12.6
D	-	8.2	<u>9.0</u>	7.1	<u>6.0</u>	5.5	6.0	6.5	6.3	8.7	11.7
[HLA-A11,30]	+	9.3	<u>27.1</u>	4.9	<u>23.6</u>	6.3	4.9	7.0	5.4	9.3	10.6
H	-	<u>17.2</u>	9.2	9.3	6.0	9.0	8.0	<u>10.0</u>	9.1	5.0	13.5
[HLA-A24,32]	+	<u>54.9</u>	7.6	9.6	5.0	9.5	9.0	<u>56.5</u>	12.7	6.0	11.0

a) ワクチン接種後のメラノーマ患者の末梢血単核球を *in vitro* で5日間、#707の存在下（#707による誘導+）、あるいは非存在下（-）に培養した後、エフェクター細胞として用い、種々のメラノーマを標的細胞として、E:T=40:1にて細胞障害活性を測定した。[]内は標的細胞あるいはエフェクター細胞のHLA-Aタイプ。また標的細胞における#707 mRNAの発現の有無を示す。下線部はエフェクター細胞の自己メラノーマ、あるいは共通のHLA-A抗原を有する非自己メラノーマに対する細胞障害活性である。陰性コントロールの標的細胞として、K562に対する細胞障害活性も測定した。各患者につき4回ずつ実験を行い、それぞれ常に同様の結果を得たため、代表的な結果を示した。b) MB, MD, ME, MG, MH, MP, MQそれぞれ患者B, D, E, G, H, P, Qのメラノーマを示す。

ることにより、それぞれ単独のペプチドで再刺激した時に比べ、細胞障害活性は相乗的に増大した（図11A）。両ペプチドでパルスした自己Bリンパ芽球を標的細胞とした時も同様の効果が得られた（図11B）。

次に、非標識標的細胞を用いた抑制実験によって細胞障害活性の抗原特異性を検討し、結果を図12に示した。標識標的細胞として自己メラノーマ細胞を用いた場合

（図12A）も、#810および#707の両者でパルスした自己Bリンパ芽球を用いた場合（図12B）も、細胞障害活性は非標識自己メラノーマ細胞と、両ペプチド抗原でパルスした非標識自己Bリンパ芽球により、完全に抑制された。しかし、#810あるいは#707単独でパルスした非標識自己Bリンパ芽球を用いた場合、抑制効果は半減し、細胞障害活性を完全に抑制することはできなかった。これらの結果は細胞障害活性において、#810と#707が互

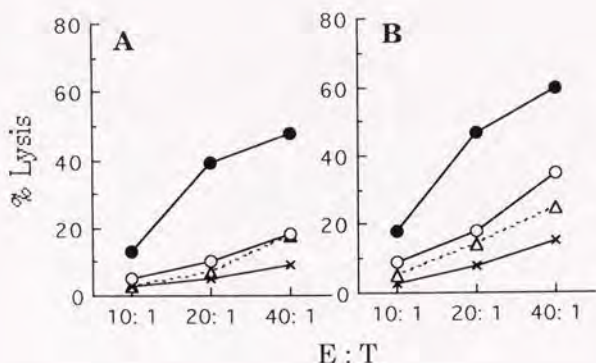


図1 1. ペプチド抗原#810および#707で誘導したエフェクター細胞の、自己メラノーマ(A)および両ペプチドでバルスした自己Bリンパ芽球(B)に対する細胞障害活性。ワクチン接種した患者Bの末梢血単核球を2種類のペプチド#810、#707各 $10\mu\text{M}$ で5日間、同時に再刺激して得たエフェクター細胞(●)の細胞障害活性を測定した。コントロールとして $10\mu\text{M}$ の#810単独(△)、#707単独(○)と、またはペプチド非存在下に(x)5日間培養して得たエフェクター細胞の細胞障害活性をともに示した。Bでは、自己Bリンパ芽球を2時間の ^{51}Cr 標識の間、各 $10\mu\text{M}$ の2種類のペプチドで同時にバルスしたものを標的細胞として用いた。それぞれのコントロールペプチドでバルスした自己Bリンパ芽球に対する細胞障害活性(E:T=40:1)はいずれのエフェクター細胞においても6%未満であった(図中略)。患者Bについて4回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者D(HLA-A11陽性、自己メラノーマでの#707mRNA陽性)についても患者Bと同じ条件で3回の実験を行い、患者Bと同様の結果を得た。

いに独立して機能していることを示す。また、独立した複数の標的抗原を用いることにより、より効果的な細胞障害活性が誘導できる可能性を示す。

考察

1. ペプチド抗原#810の発現および細胞障害活性における機能

ペプチド抗原#810は、正常末梢血単核球を含む種々の細胞において発現されており、メラノーマに特異的な抗原ではなかった。しかし、メラノーマ患者の末梢血単核球が#810に特異的な細胞障害活性を示したのに対し、健常者の末梢血単核球ではこのような

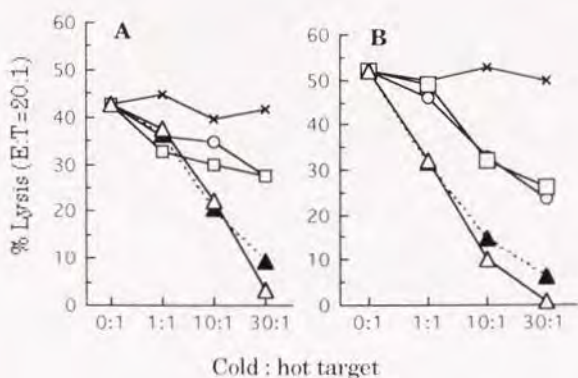


図1 2. 自己メラノーマ(A)および#810、#707両者でパルスした自己Bリンパ芽球(B)に対する細胞障害活性の。非標識標的細胞による抑制。図1-1に示したとおり、患者Bの末梢血単核球を#810および#707の両者で同時に再刺激して得たエフェクター細胞を用いて細胞障害活性(E:T=20:1)を測定した。非標識標的細胞(cold target)として、ペプチドパルスしていない(x)、#810単独で(□)、#707単独で(○)、#810と#707の両者で(△)パルスした自己Bリンパ芽球、および自己メラノーマ(▲)を用い、図に示す非標識:標識標的細胞(cold:hot target)の細胞数比となるよう加えた。患者Bについて3回の実験を行い、常に同様の結果を得たため、その代表的な結果を示した。また、患者Dについても患者Bと同じ条件で3回の実験を行い、患者Bと同様の結果を得た。

活性はほとんど認められなかった。この結果は、*in vivo*ではペプチド抗原#810が正常細胞によっては提示されておらず、患者自身のメラノーマ細胞によって特異的に提示されていることを示唆する。また、#810に特異的な細胞障害活性が、非自己メラノーマ細胞からなるワクチン療法により増強されたことは、#810が非自己メラノーマ細胞によっても標的抗原として提示されうることを示す。すなわち、自己および非自己のメラノーマ細胞は、ペプチド抗原#810を細胞障害活性の標的抗原として提示することにより、末梢血単核球のうち主としてCD8陽性のT細胞を刺激して、#810を標的抗原とする細胞障害性T細胞の前駆細胞を誘導したものと考えられる。非自己メラノーマ細胞による標的抗原の提示については Hayashi et al. によっても検討されており、メラノーマ患者と共通あるいは相互に交叉反応

を示すHLA-A抗原を有する非自己メラノーマ細胞は、自己メラノーマ細胞と同様に患者のT細胞を刺激して、細胞障害活性を増強することが明らかにされている(10,11)。一方、*in vitro*において、ワクチン療法後のメラノーマ患者の末梢血単核球を#810で再刺激することにより、#810に特異的な細胞障害活性はさらに増大した。これは、末梢血単核球のうち単球など抗原提示能を有する細胞が、その細胞表面で#810を細胞障害性T細胞の前駆細胞に提示することにより、この前駆細胞のもつ細胞障害活性をさらに増強したためと考えられる。

ペプチド抗原#810はメラノーマ細胞表面で、クラスI抗原の拘束のもとに提示されており、CD8陽性の細胞障害性T細胞はこの#810/クラスI抗原複合体を標的抗原として認識することによって、腫瘍細胞を破壊すると考えられる。ペプチド抗原#810は、43kD蛋白がメラノーマ細胞内でプロセッシングを受けることにより生じ、粗面小胞体でクラスI抗原と結合した後、ゴルジ装置を経て細胞膜上に提示されると思われる。種々のクラスI抗原のうち、#810の提示を拘束するのはHLA-A2およびA11であった。HLA-A2の拘束のもとに提示されるペプチドのモチーフは、anchor residuesとしてアミノ末端より数えたposition 2にLあるいはM、position 9にI,V,AあるいはTを有するノナペプチドであることが明らかにされている(27,28)。テカペプチド#810 (QDLTMKYQIF)をこのモチーフと比較した場合、position 9のIはanchor residueと一致するが、position 2のDは一致しない。しかしposition 3にLがあり、アミノ末端側のanchor residueとして機能している可能性もある。一方、HLA-A11により提示されるペプチドのモチーフは、anchor residuesとしてposition 2にL,D,M,IあるいはV、position 9にK,R,HあるいはYを有するノナペプチドであると報告されている(28,29)。テカペプチド#810のposition 2のDあるいはposition 3のLは、HLA-A11との結合においてアミノ末端側のanchor residueとして機能しうが、position 8のQ、position 9のI、position 10のFはいずれもカルボキシル末端側のanchor residueとなり得ない。しかし、これらクラスI抗原のモチーフは、各々のクラスI抗原と結合しているself-peptidesを抽出し、それらのアミノ酸配列を決定することにより解明されたものである。すなわち、

これらのモチーフは各々のクラス I 抗原に結合するペプチドの特異性だけではなく、細胞内でのペプチドのプロセッシングの結果を示すものであり、クラス I 抗原の種類には無関係なプロテアーゼ活性などの影響も反映しているものと考えられる。したがって各々のクラス I 抗原に結合し、細胞障害性T細胞に認識されうるペプチドのすべてがそのクラス I 抗原のモチーフに一致しているわけではない(27)。HLA-A2は、細胞障害性T細胞によるメラノーマの認識を拘束するクラス I 抗原として最も重要であり(30)、白色人種の49%に陽性である(31)。また、HLA-A11は白色人種の10%に陽性である(31)。したがって、白色人種のメラノーマ患者の過半数において、#810が自己メラノーマ細胞により提示され、細胞障害性T細胞に認識されうると期待される。さらに、HLA-A2とA11が陰性の患者Eにおいても細胞障害活性が誘導されたことから(表5)、HLA-B、C抗原を含め、#810の提示を拘束するクラス I 抗原は他にも存在すると思われる。

正常細胞では#810のアミノ酸配列を含む43kD蛋白が存在するにもかかわらず、細胞障害性T細胞の反応を誘導できなかった。この結果は、正常細胞表面において#810が、細胞障害性T細胞の標的抗原として認識されうる形態では提示されていないことを示す。この原因として、一つには43kD蛋白全体の構造の中での#810の表現様式が、正常細胞とメラノーマ細胞とで異なることが考えられる。正常細胞では#810のアミノ酸残基の全体あるいは一部が糖鎖結合などの修飾により隠蔽されているが、メラノーマ細胞ではこのエピソードが露出され、細胞障害性T細胞により認識されやすくなっている可能性がある。MUC-1 geneのコードするヒト上皮細胞性ムチンのアミノ酸配列は種々の細胞間できわめて相対性が高いが、糖鎖結合の部位および結合様式は、細胞の種類により大きく異なる(32)。また、他の原因として、43kD蛋白からペプチド抗原#810が生じクラス I 抗原と結合して細胞表面に提示されるまでのプロセスの全体あるいは一部が、本来、正常細胞では抑制されているがメラノーマでは亢進していることも考えられる。メラノーマにおける#810の提示と認識のメカニズムについては、その起源となる43kD蛋白の構造や機能を明らかにした上で、さらに詳細に検討する必要がある。

ペプチド抗原#810でバルスしたBリンパ芽球およびメラノーマ細胞の表面に存在すると思われる#810/クラス I 抗原複合体は、細胞障害性T細胞には認識されたが抗体L92には十分認識されなかった(表7)。^{#810}の全アミノ酸配列(QDLTMKYQIF)のうち、抗体L92の認識するエпитープは(KYQI)であることが明らかにされている(12)。したがって、^{#810}/クラス I 抗原複合体においては、このアミノ酸残基(KYQI)が、クラス I 抗原のペプチド結合部位であるクレバス部分にはまりこみ隠蔽されていると考えられる。また、表1の免疫粘着反応においてL92が結合した標的細胞表面の抗原は、この^{#810}/クラス I 抗原複合体ではなく、細胞膜に存在する43kD蛋白またはその一部であると思われる。

II. ペプチド抗原#707の発現および細胞障害活性における機能

ペプチド抗原#707は^{#810}とは異なり、多数のメラノーマ細胞において発現されているが、正常末梢血細胞では発現されておらず、腫瘍細胞に特異的な抗原であると考えられる。しかし、^{#707}も^{#810}と同様にメラノーマ細胞において、HLA-クラス I 抗原の拘束のもとに細胞障害性T細胞のエピトープとして提示されており、HLA-A2, A11およびA24はいずれも^{#707}を提示しうるものと考えられた。白色人種におけるHLA-A24の発現頻度は15%であり(31)、^{#810}提示能をもたないHLA-A24が^{#707}を提示しうることは、^{#810}と比べ^{#707}がより多くの患者のメラノーマ細胞表面で提示されていることを意味する。したがって、白色人種のメラノーマ患者においては、^{#707}が高い頻度で標的抗原として認識されうると予測される。この予測は、ワクチン療法開始後に細胞障害活性の亢進した患者の頻度が、極めて高い(84.2%)ことによっても裏付けられる。メラノーマワクチンを構成するUCLASO-M10, M24, M101はそれぞれHLA-A24, A11, A2を有し、いずれの細胞もペプチド抗原^{#707}を発現していることから、これら3種類のメラノーマ細胞はいずれも^{#707}を標的抗原として提示していると考えられる。また、^{#707}を標的抗原とする細胞障害性T細胞の、自己メラノーマ細胞に対する細胞障害活性の強さは患者によって異なり、患者H(A24陽性)で最も強い活性が誘導できた。このような細胞障害活性の違いは、患者の有す

るHLA-A抗原のペプチド抗原との結合親和性、または患者のメラノーマ細胞が有するペプチド抗原の量、あるいはその両者を反映していると思われる。

ペプチド抗原#707はカルボキシル末端APの除去により、細胞障害性T細胞の標的抗原としての機能を完全に失ったが、アミノ末端側のアミノ酸残基を一部除去しても、その影響は小さかった(図6B)。したがって、ペプチド抗原#707を構成する10個のアミノ酸残基のうち、カルボキシル末端APは細胞障害性T細胞による認識に不可欠であると考えられる。また、このカルボキシル末端APはモノクローナル抗体L94が直接結合する部位とも考えられている(13)。しかし、抗体L94の反応性は細胞障害性T細胞の反応性とは異なり、#707のアミノ末端側のアミノ酸残基を除去しても低下しないことが明らかにされている(13)。これらの結果は、#707において細胞障害性T細胞の認識するエピトープと抗体L94の認識するエピトープが、カルボキシル末端APの部分と共有するが完全には一致しないことを示す。この違いは、両者のペプチド認識のメカニズムの相違、特にクラスI抗原がその認識に関与するか否かを反映しているものと考えられる。また、クラスI抗原の拘束のもとに提示されている#707は免疫粘着反応では検出できず、#810と同様、抗体L94には認識されにくい状態にあると考えられる。一方、#707のアミノ酸配列

(RVAALARDAP)をHLA-A2のモチーフと比較すると、position 9のAはanchor residueと一致するが、position 2は一致しない。またHLA-A11のモチーフと比較するとposition 2のVはanchor residueと一致するが、position 9は一致しない。HLA-A24のモチーフについては現在のところ明らかにされておらず、したがって#707がHLA-A24のモチーフとどのような関係にあるのかは不明である。

Ⅲ. ペプチド抗原#810および#707の臨床的意義

ペプチド抗原#810および#707はいずれもメラノーマ細胞において、細胞障害性T細胞のエピトープとして、互いに独立して機能しているものと考えられる。これらのペプチドは、極めて均質な製品を安価で大量に合成することができる。したがって、現在用いている非自己メラノーマ細胞ワクチンと比べ、これらの合成ペプチドから成るワクチンの方が

安全性も高く、より臨床応用に適しているものと考えられる。メラノーマ細胞のHLAタイプおよびペプチド抗原の量は患者ごとに異なるため、#810あるいは#707単独のペプチド抗原から成るワクチンよりも、両者より成るワクチンを使用することにより、より多くの患者のメラノーマ細胞に対する強力な細胞障害活性を期待できる。また、ペプチド抗原#810および#707は、患者の末梢血単核球の免疫能を診断する試薬としても有用である。#810および#707を標的とする細胞障害活性をワクチン接種の前後で比較することにより、ワクチン療法の効果を評価し、これによって患者の予後を予測することも可能である。

本研究において、患者由来のモノクローナル抗体を利用して細胞障害性T細胞の認識する二種類のペプチド抗原を同定することができた。従来、これらの抗原は主に患者由来の細胞障害性T細胞をクローン化することにより検討されてきた(33,34)。細胞障害性T細胞のクローンのみならず、モノクローナル抗体も利用できる可能性を示したことは、今後、細胞障害性T細胞の認識するペプチド抗原の研究をさらに容易にするものと思われる。また、抗体により認識されたペプチド抗原が細胞障害性T細胞にも認識される可能性を示したことは、B細胞に認識されるエピトープとT細胞に認識されるエピトープとの関連性を示唆するものであり、今後の検討が期待される。

謝辞

本研究はJohn Wayne Cancer Institute (Santa Monica, California, USA) において行われた。当研究所独自の手法で同定されたペプチド抗原の研究というテーマおよび研究の環境を、著者に提供してくださった入江 礼子副所長に深謝いたします。

文献

- 1) Brown JP, Nishiyama K, Hellstrom I, Hellstrom KE. Structural characterization of

- human melanoma-associated antigen p97 with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1981;127:539.
- 2) Mittelman A, Chen ZJ, Yang H, Wong GY, Ferrone S. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with Stage IV melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992;89:466.
- 3) Samonigg H, Wilders-Trusching M, Loibner H, Plot R, Rot A, Kuss I, Werner G, Stoger H, Wrann M, Herlyn D, Koprowski H. Immune response to tumor antigens in a patient with colorectal cancer after immunization with anti-idiotypic antibody. *Clinical Immunol. Immunopathol.* 1993;65:271.
- 4) Bhattacharya-Chatterjee M, Foon KA, Kohler H. Anti-idiotypic monoclonal antibodies as vaccines for human cancer. *Intern. Rev. Immunol.* 1991;7:289.
- 5) Estlin CD, Stevenson US, Plowman GD, Hu SL, Sridhar P, Hellstrom I, Hellstrom KE. Recombinant vaccinia virus vaccine against the human melanoma antigen p97 for use in immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:1052.
- 6) Tai T, Paulson VC, Cahan LD, Irie RF. Ganglioside GM2 as a human tumor antigen (OFA-I-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983;80:5392.
- 7) Cahan LD, Irie RF, Singh R, Cassidenti A, Paulson JC. Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982;79:7629.
- 8) Ding L, Lalani E-N, Reddish M, Koganty R, Wong T, Samuel J, Yacyszyn MB, Meikle A, Fung PYS, Taylor-Papadimitriou J, Longenecker BM. Immunogenicity of synthetic

- peptides related to the core peptide sequence encoded by the human MUC1 mucin gene: effect of immunization on the growth of murine mammary adenocarcinoma cells transfected with the human MUC1 gene. *Cancer Immunol. Immunother.* 1992;36:9.
- 9) Whitton JL, Tishon A, Lewicki H, Gebhard J, Cook T, Salvato M, Joly E, Oldstone MBA. Molecular analyses of a five-amino-acid cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitope: an immunodominant region which induces nonreciprocal CTL cross-reactivity. *J. Virol.* 1989;63:4303.
- 10) Hayashi Y, Hoon DSB, Park MS, Terasaki PI, Foshag LJ, Morton DL. Induction of CD4+ cytotoxic T cells by sensitization with allogeneic melanomas bearing shared or cross-reactive HLA-A. *Cell. Immunol.* 1992;139:411.
- 11) Hayashi Y, Hoon DSB, Park MS, Terasaki PI, Morton DL. Cytotoxic T cell lines recognize autologous and allogeneic melanomas with shared or cross-reactive HLA-A. *Cancer Immunol. Immunother.* 1992;34:419.
- 12) Oka T, Kikumoto Y, Itakura K, Morton DL, Irie RF. A human monoclonal antibody identified an immunoreactive tetrapeptide sequence (Lys-Tyr-Gln-Ile) in 43kD protein of human melanoma. *Cancer Res.* (in press).
- 13) Kikumoto Y, Morioka N, Oka T, Cao JN, Irie RF. Identification of antigenic epitope of human monoclonal antibody against melanoma cells. Manuscript in preparation.
- 14) Briggs S, Price MR, Tendler SJB. Fine specificity of antibody recognition of carcinoma-associated epithelial mucins: antibody binding to synthetic peptide epitopes. *Eur. J. Cancer* 1993;29A:230.
- 15) Reddehase MJ, Rothbard JB, Koszinowski UH. A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature*

1989;337:651.

16) Jacobson S, Reuben JS, Streilein RD, Palker TJ. Induction of CD4+, human T lymphotropic virus type-1-specific cytotoxic T lymphocytes from patients with HAM/TSP. *J. Immunol.* 1991;146:1155.

17) Takahashi H, Cohen J, Hosmalin A, Cease KB, Houghton R, Cornette JL, DeLisi C, Moss B, Germain RN, Berzefsky JA. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope protein gp160 recognized by class II major histocompatibility complex molecule- restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:3105.

18) Thomas DB, Skehel JJ, Mills KHG, Graham CM. A single amino acid substitution in influenza hemagglutinin abrogates recognition by monoclonal antibody and a spectrum of subtype-specific L3T4+ T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 1987;17:133.

19) Palker TJ, Matthews TJ, Langlois A, Tanner ME, Martin ME, Scarce RM, Kim JE, Berzofsky JA, Bolognesi DP, Haynes BF. Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *J. Immunol.* 1989;142:3612.

20) Atherton E, Logan CJ, Sheppard RC. Peptide synthesis. Part 2. Procedures for solid phase synthesis using N α -fluorenylmethyloxycarbonylamino-acid on polyimide supports synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. *J. Chem. Soc.* 1981;1:538.

21) Morisaki T, Yuzuki DH, Lin RT, Foshag LJ, Morton DL, Hoon DSB. Interleukin 4 receptor expression and growth inhibition of gastric carcinoma cells by interleukin 4. *Cancer Res.* 1992;52:6059.

- 22) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76:4350.
- 23) Irie RF, Irie K, Morton DL. Natural antibody in human sera to a neoantigen in human cultured cells grown in fetal bovine serum. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974;52:1051.
- 24) Morton DL, Foshag LJ, Hoon DSB, Nizze JA, Wanek LA, Chang C, Davtayan DG, Gupta RK, Elashoff R, Irie RF. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann. Surg.* 1992;216:463.
- 25) Issekutz T, Chu E, Geha RS. Antigen presentation by human B cells: T cell proliferation induced by Epstein Barr virus B lymphoblastoid cells. *J. Immunol.* 1982;129:1446.
- 26) Yamamoto S, Yamamoto T, Saxton RE, Hoon DSB, Irie RF. Anti-idiotypic monoclonal antibody carrying the internal image of ganglioside GM3. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990;82:1757.
- 27) Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290.
- 28) Engelhard VH. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Biol.* 1994;6:13.
- 29) Zhang, QJ, Gavioli R, Klein G, Masucci MG. An HLA-A11-specific motif in nonamer peptide derived from viral and cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993;90:2217.
- 30) Kawakami Y, Zakut R, Topalian SL, Stotter H, Rosenberg SA. Shared human

melanoma antigens: recognition by tumor-infiltrating lymphocytes in HLA-A2.1-transfected melanomas. *J. Immunol.* 1992;148:638.

31) Marincola FM, Venzon D, White D, Rubin JT, Lotze MT, Simonis TB, Balkissoon J, Rosenberg SA, Parkinson DR. HLA association with response and toxicity in melanoma patients treated with interleukin 2-based immunotherapy. *Cancer Res.* 1992;52:6561.

32) Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* 1990;265:15294.

33) Traversari C, van der Bruggen P, Luescher IF, Lurquin C, Chomez P, Van Pel A, De Plaen E, Amar-Cosressec A, Boon T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 1992;176:1453.

34) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Vand Den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643.

