

主論文

学位申請論文

レトロウイルスで誘発したマウス腫瘍の
T細胞標的抗原の機能解析

理学研究科生物科学専攻生物物理学系

上西 博英

要旨

マウスのレトロウイルスであるフレンドウイルスで誘発された腫瘍 FBL-3 は細胞傷害性 T 細胞(CTL)及びヘルパー T 細胞(Th)の働きによって拒絶される。CTL 及び Th の標的抗原ペプチドについて、それぞれが T 細胞によって認識される際における各残基の寄与等の分子的機構についての解析を行った。CTL の標的抗原ペプチドは 2 つ同定されているが、それらが同一の T 細胞受容体によって認識され、またそれらのペプチドは一般的に知られている親水性のペプチドの主要組織適合抗原複合体(MHC)分子への結合モチーフと異なる様式で結合することを示した。Th の標的抗原ペプチドについても、MHC への結合及び TCR への認識に必要な残基を同定し、マウス MHC クラス II I-E^b 分子への新しい結合モチーフを明らかにした。また、FBL-3 の Th 標的抗原ペプチドと、フレンドウイルスと近縁のウイルスであるモロニー白血病ウイルスや内在性ウイルス由来のペプチドとの間の抗原特異性を決定する残基の同定を行った。以上の T 細胞標的抗原の解析から、T 細胞標的抗原ペプチドの MHC 分子への結合モチーフの多様性と、そのペプチド-MHC 複合体の T 細胞による認識の多様性が明らかとなった。これら T 細胞による標的抗原ペプチド認識機構の解析は抗腫瘍・抗ウイルスペプチドワクチン設計に寄与し得るものである。

目次

序論.....	1
材料と方法.....	5
結果.....	11
• 2つのCTL標的抗原ペプチドのMLTC細胞に対する細胞傷害能誘導.....	11
• 2つのCTL標的抗原ペプチドのCTLクローンに対する細胞傷害能誘導.....	14
• 2つのCTL標的抗原ペプチドの活性残基同定.....	17
• FBL-3特異的Thクローンの標的抗原ペプチドの詳細な位置決定.....	22
• ペプチドiの活性残基の同定.....	26
• フレンドマウス白血病ウイルスと近縁のモロニーウイルス, 及びマウス内在性ウイルス由来ペプチドとペプチドiの交差反応性の検討...	36
考察.....	44
• 疎水性の強い標的抗原ペプチドのCTLによる認識.....	44
• MHCクラスII分子結合ペプチドの結合モチーフの多様性.....	48
• MHCクラスII分子とペプチドの複合体のThによる認識の多様性.....	54
• Th標的抗原ペプチドの他のウイルス由来あるいは自己抗原ペプチドとの 抗原特異性決定.....	56
• まとめ.....	58
参考文献.....	60
謝辞.....	68

序論

脊椎動物はその生体防御のために高度に発達した免疫系を保持している。免疫系の働きは「非自己の排除」と換言でき、これら免疫系のシステムが全体として生体の調和を保つ方向に働く。

ウイルス感染細胞や腫瘍細胞は、非自己であるウイルスゲノム由来タンパク質あるいは変異タンパク質を発現するという点で非自己であると見なされ、免疫系による排除の対象となる。免疫系の機能は抗体や補体が担う液性免疫と、免疫系の細胞それ自体が主役となる細胞性免疫の二つに大別される。ウイルス感染細胞あるいは腫瘍細胞の排除においては、細胞性免疫がその主役となることが多い。直接これら異常細胞を殺傷するのは細胞傷害性 T 細胞 (CTL), あるいはナチュラルキラー (NK) 細胞であり、また抗体を産生する B 細胞も腫瘍排除にある程度の寄与があると考えられる(16)。これら異常細胞を殺傷する CTL 及び NK 細胞や、液性免疫を担う B 細胞などは、ヘルパー T 細胞 (Th) がサイトカイン等を分泌することによって制御される。このことからわかるように、生体防御の機構を理解するうえでは、CTL 等の直接防御にかかわる細胞群の解析だけでは不十分で、それらを制御する Th を含めた解析が重要となる。

これら免疫系が非自己を認識する際には、非自己であるという標識が必要となる。NK 細胞については、近年、細胞上に普遍的に発現している主要組織適合抗原複合体 (MHC) 分子が発現していないか、あるいは異常である場合に攻撃対象とすることが明らかにされた(34)。それに対して、CTL 及び Th 等の T 細胞は、T 細胞抗原受容体 (TCR) で、MHC 分子と非自己由来ペプチドの複合体を特異的に認識し、自己・非自己の識別を行うことが知られている(22, 41, 58)。通常 CTL 等の CD8⁺T 細胞は MHC クラス I 分子、Th 等の CD4⁺T 細胞は MHC クラス II 分子に提示されたペプチドを認識する。腫瘍あるいはウイルス感染細胞は正常細胞と異なるペプチドを MHC 分子上に提示しており、これによって CTL 及び Th は異常細胞の存在を感知する。この標的抗原ペプチドを同定、更に構造解析することにより、抗腫瘍、抗ウイルスペプチ

ドワクチンの設計が可能となる。本研究は、マウスのレトロウイルスであるフレンドウイルス(FV)誘発腫瘍のモデル系を用いて、CTL 及び Th 双方の標的抗原ペプチドを詳細に解析することにより、ペプチドワクチンの設計に寄与することを目的としたものである。

FV は、Friend murine leukemia virus (F-MuLV) と spleen focus forming virus (SFFV) との複合体である。F-MuLV は近縁のウイルスとして Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) や Rauscher murine leukemia virus (R-MuLV) があり、これらは FMR leukemia virus と総称されている。SFFV は *pol* 遺伝子内に変異を持ち単独では正常に複製できず、正常な *pol* を持つヘルパーウイルスである F-MuLV と共存しなければ増殖できない。FV 感受性の系統のマウスに FV 複合体を感染させると、SFFV 由来の gp55 タンパク質が赤芽球のエリスロポエチン受容体に結合して持続的な増殖刺激を行い、脾腫を発症し、引き続き行われる SFFV のマウスゲノム DNA への組み込みによって最終的に悪性化し腫瘍を生じる(7, 14, 28, 51)。ここで、FV によって樹立された腫瘍として C57BL/6(B6) マウス由来の FBL-3(2, 33)と呼ばれる細胞株が古くから得られている。FBL-3 は非常に免疫原性の強い細胞株で、同系マウスに接種後 2, 3 週間で拒絶される。この拒絶の過程では CTL 及び Th が関与していることが推察されている(16)。松林, 岩城らは多数の CTL 及び 4 つの Th クローンを樹立した(21, 32)。また、これら CTL クローン及び Th クローンを末梢の T 細胞を欠くヌードマウスに移入した際に、CTL クローンのみを移入するよりも FBL-3 を接種した際の延命効果が高いことが認められている(栗林ら, 私信)。このように、FBL-3 腫瘍を用いた系は、CTL 及び Th 双方が関わる腫瘍拒絶の解析を行うために適していると言える(16)。

FBL-3 腫瘍特異的 Th の標的抗原は、組換えワクシニアウイルスを用いた実験により、F-MuLV の Env タンパク内に局在することが判明し、更に岩城らによって C57BL/6 マウス由来の Th クローン 2 つに対し Env タンパク内の N 端よりに 1 つ (Env₁₂₂₋₁₄₁: DEPLTSLTPRCNTAWNRLKL, f_{n20} と呼称), (BALB/c × C57BL/6)F₁ マウス 由来の Th クローン 1 つに対し C 端よりに 1 つ (Env₄₆₂₋₄₇₉: HPPSYVYSQFEKSYRHKR, *i* と呼

称)の標的抗原ペプチドが同定された。前者は MHC クラス II の I-A^b, 後者は I-E^b を拘束分子とする(21)。ペプチド f_{n20} については, 既にその詳細な構造解析を行った。それによると, MHC への結合に深く関与している残基は R131, T134 の2つであり, TCR への結合に用いられる残基は L128, T129, N133 が主なものとして挙げられる(参考論文 1)。本研究では, もう 1 つの FBL-3 腫瘍特異的 Th 標的抗原ペプチドであるペプチド i の詳細な構造解析を行うことにより, MHC クラス II I-E^b 分子に結合するペプチドの構造を明らかにした。

FBL-3 腫瘍特異的 CTL の標的抗原は, Th の標的抗原と同様に, 組換えワクシニアウイルスを用いた実験により F-MuLV の gag 遺伝子の産物である非構造タンパク Pr75^{gag} のリーダーペプチド内に局在することを示し, 更に抗原ペプチドの1つとして 9 残基の配列 Pr75^{gag}71-79(SIVLCCLCL)を同定し, これの拘束分子が MHC クラス I H-2D^b であることを示した(参考論文 2)。FBL-3 腫瘍特異的 CTL の標的抗原については Chen らが同じリーダーペプチド内にもう 1 つ別のもの (Pr75^{gag}75-83: CCLCLTVFL)を報告している(6)。本研究においては, これら 2 つのペプチドが同じ TCR に認識されることを示した。

MHC 分子に結合できるペプチドは, その配列に特徴があることが知られており, 特にクラス I 分子においてはよく研究が行われている。ペプチドの MHC 分子への結合性を決定する残基はモチーフと呼ばれている。H-2D^b 分子に結合できるペプチドは通常 9 残基で, モチーフとして 5 番目に N, 9 番目に M, I, L のいずれかを持つことが知られている(39)。ところが, FBL-3 腫瘍特異的 CTL の標的抗原ペプチド 2 つは両者とも 5 番目の残基として N を持たない。本研究においてはこれら2つのペプチドの構造解析も併せて行い, 既知のモチーフに合致しない結合様式をとることを明らかにした。

MHC クラス II 分子に結合するペプチドのモチーフ構造は, クラス I 分子ほど判然としていないが, 現在までに多数の報告がなされている。I-E^b に結合する分子としては, Rudensky らがクラス II 分子から抽出したペプチドの配列を決定することによりモチー

フと考えられるものを提唱している(44)。しかしながらペプチド i は Rudensky らのモチーフと一部異なる構造を有している。本研究においては、I-E^b 拘束性である i ペプチドの結合様式を詳細に検討することにより、I-E^b 分子結合性ペプチドのモチーフ構造を解明することを試みた。

また、ペプチド i には、F-MuLV と近縁の M-MuLV やマウスの内在性ウイルスに対応した配列が存在する。しかし、ペプチド i 特異的 Th は、M-MuLV 誘発腫瘍や、M-MuLV や内在性ウイルス由来の i に対応するペプチドには反応性を持たない(21, 本研究)。本研究では、ペプチド i と、それに対応する M-MuLV や内在性ウイルス由来ペプチドとの間の抗原特異性を決定する残基の同定を行った。

これら本研究における CTL 及び Th の標的抗原ペプチドの解析は、既知のものとは異なる新たな MHC 結合モチーフの存在を提示するものである。これら FBL-3 腫瘍特異的 T 細胞標的抗原、特に Th の標的抗原については、FV に対する防御に強い効果があることが認められている(参考論文 3)。これら標的抗原ペプチドの解析は、より効果的な抗腫瘍、抗ウイルスペプチドワクチンの設計に寄与し得るものである。

材料と方法

- マウス

6~8 週齢の B6, BALB/c 及び(BALB/c × B6)F₁(以下 CB6F₁ と呼称) マウスは日本 SLC より購入した。

- 細胞株

FBL-3(33), MBL-2(3), RMA-S(30, 46) 及び LB27.4(24) は 10%のウシ胎児血清(FCS; Equitech Bio 社) 及び 5×10^{-5} M の 2-mercaptoethanol を添加した RPMI1640 培地(日水製薬) で継代した。以下この培地を完全培地(CM) と呼称する。アフリカミドリザル腎臓由来細胞 CV-1 に H-2D^b 遺伝子を導入した細胞(CV-1.D^b と呼称)(参考論文 2) は 10%の FCS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; 日水製薬) にて継代した。

- 抗体

抗 Thy1.2, 抗 pan-TCR $\alpha\beta$ (H57-597), 抗 CD3(145-2C11), 抗 CD4(GK1.5), 抗 CD8 (anti-Lyt2.2) (31) 及び N9-127 抗 TCR モノクローナル抗体(MAb) (32) は三重大学医学部栗林景容博士より供与を受けた。抗 H-2D^b 抗体(030-140) は明治乳業より購入した。

- ペプチド合成

ペプチドの合成は Wang レジンを用い, C 端より延長していく 9-fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc) 法に基づく固相合成の手法を用いた(10)。主として ABI 430A ペプチド合成機(Perkin Elmer 社)を用いて大量合成を行った。一連の

アラニン置換ペプチドについては 350 型マルチペプチド合成機 (Advanced ChemTech 社) を用いて合成を行った。leucine, isoleucine, valine を多く含むペプチドの大量合成に際しては、立体障害により ABI 430A 合成機による合成が困難であったため、1 残基ずつ Kaiser test(23) により残存アミド基が存在しないことを確認しながらカラム内での手動合成を行った。合成は以下のとおり行った。まず Wang レジンに C 端の Fmoc-アミノ酸を Wang レジンのアミノ酸受容量に対して 5 等量, diisopropylcarbodiimide (DIPCDI) 5 等量, dimethylaminopyridine 1 等量を加えることで反応させた。残存する Wang レジン上のアミノ酸結合可能部位は過剰量の無水酢酸及び pyridine を加えることで capping を行った。アミノ酸のアミド基を保護している Fmoc 基は piperidine によって塩基性に保つことで解離させ、十分に dimethylformamide (DMF) で洗浄後、更に Fmoc-アミノ酸 5 等量, ラセミ化防止剤として hydroxybenzotriazole 5 等量, DIPCDI 5 等量を加えて反応させた。合成ペプチドに対する N 末ビオチン標識も Fmoc-アミノ酸の代わりに (+) -ビオチンを用いたこと以外はこれと同様に行った。すべての反応は DMF 中で行った。合成したペプチド-レジンに 25 μ mol 当たりそれぞれ 150 μ l の thioanisole, *m*-cresol, 水, 及び ethanedithiol を解離した保護基のスカルベンジャーとして加えた上で 2.4ml のトリフルオロ酢酸を加えて保護基のペプチドからの解離及びレジンからのペプチドの解離を行った。ジエチルエーテルによってトリフルオロ酢酸よりペプチドを析出させ、更にエーテルによる十分な洗浄の後、1N 酢酸に溶解した。ペプチドが溶解しない場合は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。これを C18 逆相カラムを用いて高速液体クロマトグラフ (Waters 社) で 0.1% のトリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルの濃度勾配の系により精製を行った。精製後のペプチドは凍結乾燥により回収した。合成したペプチドの分子量は API III 四重極 mass spectrometry (Perkin Elmer 社) により測定し、確認を行った。

- 腫瘍接種マウスの脾細胞の調製

B6 マウスの皮下に 1×10^6 個の FBL-3 腫瘍細胞を接種し、2~3 週間経過して腫瘍塊が退縮した後、更に腹腔内に 1×10^7 個の FBL-3 を接種し、その 2 週間後に脾臓を摘出した。脾細胞 5×10^6 個に対して 40Gy の γ 線照射を行った 5×10^4 個の FBL-3 を混合して CM 中に懸濁して、腫瘍リンパ球混合培養 (MLTC) を 5% CO_2 存在下で 37°C で 24 穴プレートにて 5 日間行い、細胞傷害活性の測定に用いた。

- ペプチドによる Th クローンの樹立

CB6F₁ マウスに PBS に溶解したペプチドと完全フロイントアジュバント (CFA, Difco Laboratories 社) を等量混合して乳濁液とし、両後脚の foot pad 及び尾部の付け根に合計 200 μ l 皮下注射を行った。乳濁液に含まれるペプチドの量は 10 μ g とした。最初の免疫後 2 週間の間隔を置いて再度同様に免疫を行い、2 回目の免疫後 7 ないし 10 日目に免疫部位所属リンパ節である膝下、鼠径部、及び傍大動脈リンパ節を採取した。このリンパ節より採取した細胞をナイロンウールカラムを通過させて、B 細胞を除去した。B 細胞を除去したリンパ節細胞 4×10^6 個に対して 40Gy の γ 線照射を行った 2×10^6 個の免疫感作をしていない同系マウスの脾細胞を feeder cell として加え、更に 0.2 μ M の免疫感作に用いたペプチドを加え、5% CO_2 存在下で 37°C で 24 穴プレートにて CM 中で培養を行った。1 週間後に 5×10^5 個の 40Gy γ 線照射同系脾細胞と 0.2 μ M の感作ペプチド、及び 2.5ng/ml (14U/ml) の human recombinant interleukin-2 (hrIL-2; 武田薬品工業) を加えた CM を用いて限界希釈を行い、5% CO_2 , 37°C で 96 穴プレートにて 1~2 週間培養し、増殖してきた well の細胞の内、検鏡して単クローンであることが確認できたものの表現形を FACScan flowcytometer (Becton Dickinson 社) にて検定し、Thy1.2⁺TCR α β ⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻であることを確認し、Th クローンとした。

- T細胞クローンの維持

各 T 細胞クローンは、 1×10^5 個を 5×10^6 個の 40Gy γ 線照射同系脾細胞と混合して、hrlL-2 を 2.5ng/ml (14U/ml) 加え、腫瘍免疫によって樹立した CTL クローンについては γ 線を 40Gy 照射した FBL-3 を 3×10^5 個、Th クローンについては 5×10^4 個、ペプチド免疫によって樹立した Th クローンについては感作に用いたペプチドを終濃度が 0.2 μ M になるように加え、5% CO₂ 存在下で 37°C にて CM 中で培養を行った。継代は 7 日目ごとに行った。

- 細胞傷害性試験

MLTC 細胞あるいは CTL クローンの細胞傷害能の検定は、⁵¹Cr 放出試験によった (45)。傷害標的細胞 1×10^6 個当たり 3.7MBq の Na₂⁵¹CrO₄ (DuPont/NEN 社) を用い、20% FCS 存在下で 60 分間時折振盪しながら標識した。10% の FCS を含む RPMI1640 培地で 3 回洗浄して余分の ⁵¹Cr を除去した後、⁵¹Cr 標識細胞を 96 穴 V 底プレートに well 当たり 5×10^3 個ずつ播き、更に容量が 100 μ l になるようにして検定ペプチドを検定濃度の 2 倍加え、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分間保持してペプチドを提示させた。このときの培地は CM に 250 μ M の DTT を加えたものを用いた。その後、CM 中に懸濁した MLTC 細胞あるいは CTL クローンを加えて全量を 200 μ l にして、37°C、5%CO₂ の条件下で 6 時間培養した。培養後の上清 100 μ l を採取し、その γ 線放射能を 1470 WIZARD ガンマカウンター (Wallac Oy 社) を用いて測定した (①)。 5×10^3 個の標識細胞の放射能値を②、MLTC 細胞あるいは CTL クローンを加えずに放出された ⁵¹Cr の放射能値を①と同様に上清を採取して測定したものを③とすると、特異的な細胞傷害能は

$$\frac{\text{①} - \text{③}}{\text{②} - \text{③}} \times 100 (\%)$$
$$2$$

の式で表される。各実験は 3 サンプルの平均値を取り、標準偏差と共に示す。

競合阻害実験を行う際には、標的抗原ペプチドで標的細胞に提示させる前に、25 μ M の競合ペプチドを加えて上記と同様に 30 分間培養した後、標的抗原ペプチドを加えて、以下上記と同様に実験を行った。

- **細胞増殖試験**

1 \times 10⁵ 個の免疫マウスリンパ節細胞(以下 LN 細胞と略)あるいは Th クローンを 5 \times 10⁵ 個の 40Gy γ 線照射同系脾細胞と共に CM 中に懸濁し、増殖刺激活性を検定するペプチドを加えて容量を 200 μ l とし、96 穴平底プレート中で 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ の条件下で LN 細胞は 4 日間, Th クローンは 48 時間培養した。培養終了前の 8 時間, 各 well に 18.5kBq の methyl-[³H]-thymidine (比活性 74GBq/mmol; Amersham/Seale 社)を加えて標識し, Unifilter GF/C プレート(Packard 社)上に細胞を回収した。プレートの放射能は TopCount scintillation spectrometer(Packard 社)により測定し, 細胞増殖能を検定した。

- **MHC クラス I 分子へのペプチド結合試験**

MHC クラス I 拘束性ペプチドのクラス I 分子への結合性の検定は, RMA-S 細胞を用いる方法(6, 13)を若干修正して用いた。RMA-S 細胞は TAP2 遺伝子に変異があるために細胞質内のペプチドを MHC クラス I 分子に導入できないため, 外来性のクラス I 結合性ペプチドが存在しないと 37 $^{\circ}$ C で安定にクラス I 分子を発現できない(30, 46)。3 \times 10⁵ 個の RMA-S を 2.5mM の DTT の存在下で検定ペプチドと共に 0.1% のウシ血清アルブミン(BSA, Fraction V; Sigma 社)を含む 200 μ l の RPMI1640 培地中で 96 穴 V 底プレートを用いて 26 $^{\circ}$ C で 18 時間培養し, その後 37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養してペプチドの結合していないクラス I 分子を分解させた。1%の FCS 及び 0.1%のアジ化ナトリウムを含む PBS で 2 回洗浄後, 抗 H-2D^b 抗体を加え 4 $^{\circ}$ C で 15 分間保持した。その後同様に 2 回洗浄した。更に fluorescein isothiocyanate(FITC)標識ヤギ抗

マウス IgG F(ab')フラグメント(Cedarlane 社)を加え 4°Cで 15 分間染色し、同様に 2 回洗浄した後、FACScan flowcytometer で染色細胞の蛍光強度を測定した。

● MHC クラス II 分子へのペプチド結合試験

ペプチドの MHC クラス II への結合試験は、競合阻害を調べる Bartnes ら(1)及び Busch ら(4)の方法を若干修正したものによって行った。1 × 10⁵ 個の MHC クラス II 発現細胞 LB27.4 を、50μM のペプチド i alanine 置換アナログ等の競合阻害活性を検定するペプチド及び 0.1%の BSA を含む RPMI1640 培地中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で 3 時間培養し、終濃度 5μM となるようにビオチン標識ペプチド i を加え、更に 3 時間培養を行った。0.1%の BSA 及びアジ化ナトリウムを含む PBS で 3 回洗浄後、phycoerythrin 標識 avidin (Becton Dickinson 社)を well 当たり 7.5ng 加えて 4°C で 30 分間保持して染色し、更に同様に 2 回洗浄後、FACScan flowcytometer で染色細胞の平均蛍光強度を測定した。ペプチド i をビオチン標識したもののみを加え、競合ペプチドを加えなかったとき(①)、ペプチド i の非標識のものを検定ペプチドとして加えたとき(②)、alanine 置換ペプチドなどクラス II 分子への結合強度を検定するペプチドを競合ペプチドとして加えたとき(③)のそれぞれの平均蛍光強度を用いると、検定ペプチドの結合強度は非標識ペプチド i による競合阻害能との比として

$$(\text{①} - \text{③}) / (\text{①} - \text{②})$$

の式で表される。各実験は 3 サンプルの平均値をとり、標準偏差と共に示す。

結果

- 2つの CTL 標的抗原ペプチドの MLTC 細胞に対する細胞傷害能誘導

図 1 に 2 つの標的抗原ペプチドの F-MuLV ゲノム内における位置とその配列を示す。p71-79(SIVLCCLCL)及び p75-83(CCLCLTVFL)の FBL-3 接種マウス脾細胞による MLTC 細胞に対する細胞傷害能の誘導活性を検定した。図 2 にはマウス 4 匹の脾細胞に由来する MLTC 細胞の細胞傷害能を示す。いずれのマウス由来の MLTC も、どちらのペプチドを提示させた標的細胞に対しても細胞傷害活性を示したが、p71-79 を提示させた標的細胞に比較して p75-83 を提示させた標的細胞に対する活性はおよそ 10^3 倍程度高かった。

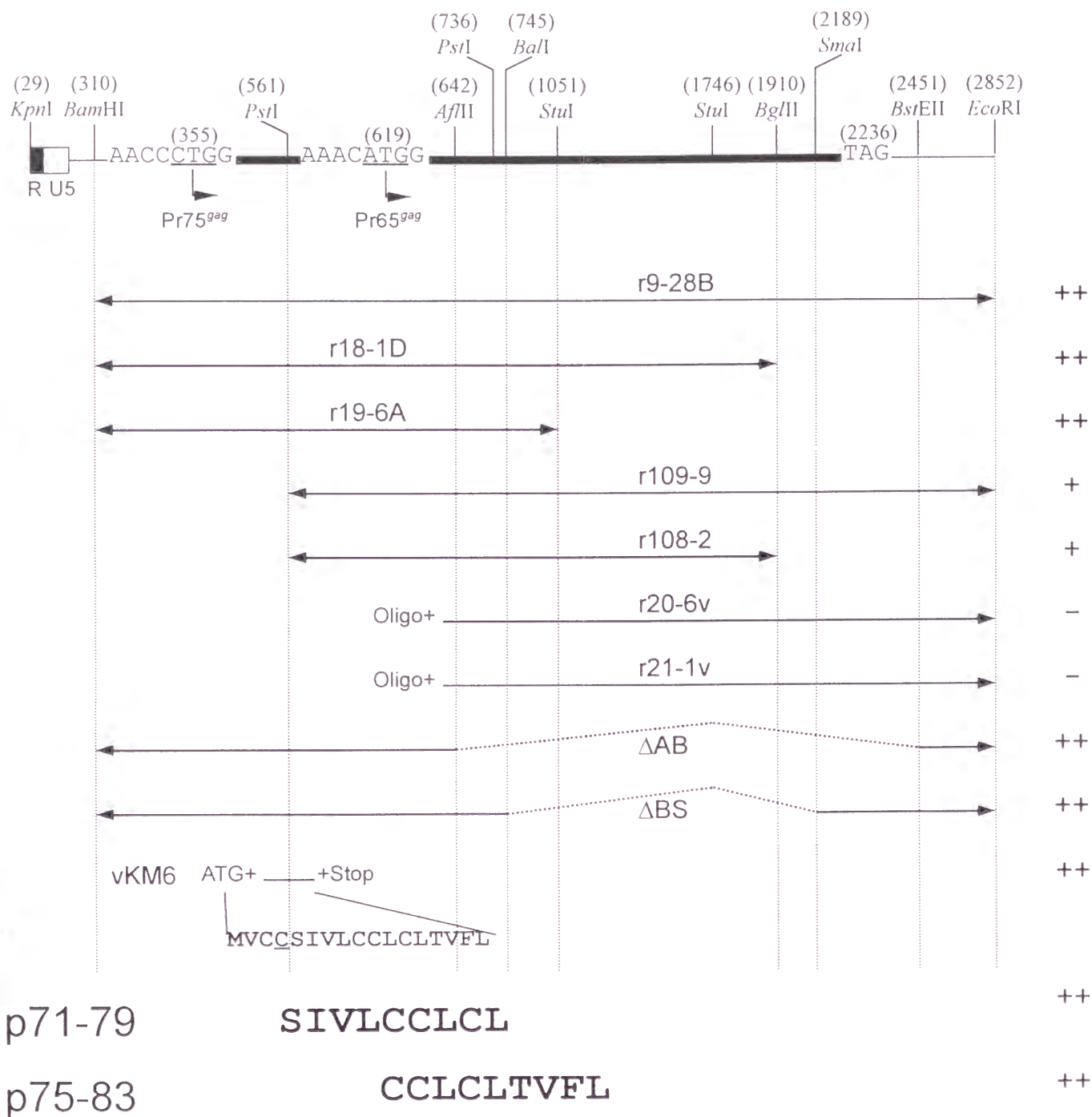


図 1 FBL-3 特異的 CTL の標的抗原ペプチドの F-MuLV ゲノム中の位置とその配列。
 標的抗原ペプチドの位置決定を行うために使用した F-MuLV の *gag* 遺伝子の各部位を組み込んだ組換えワクシニアウイルスの FBL-3 特異的 CTL に対する感作活性を併せ示す(参考論文 2)。

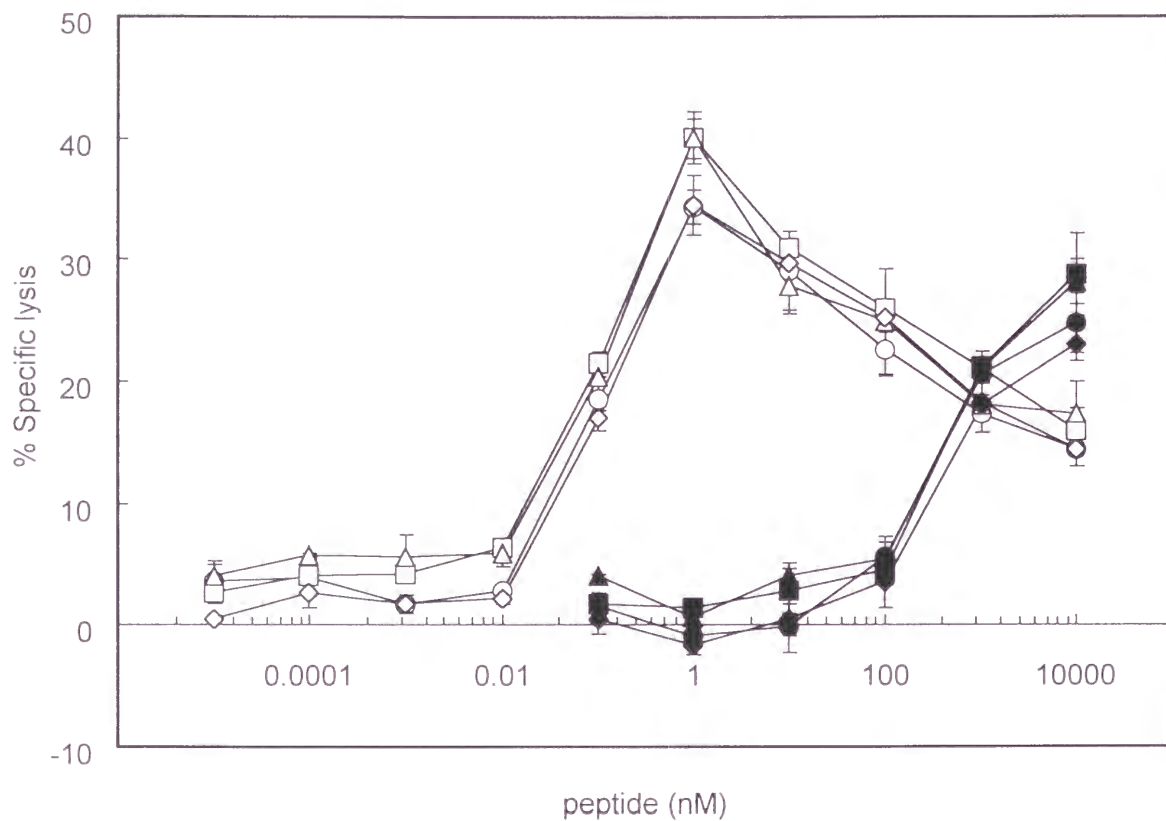


図 2 FBL-3 を接種した B6 マウス脾細胞に由来する MLTC 細胞の細胞傷害能。黒印は p71-79, 白抜きの印は p75-83 を提示させた CV-1.D^b 標的細胞の MLTC 細胞による傷害活性を示す。同形の印は同じマウス由来の MLTC 細胞を示す。E:T 比は 30:1 とした。

- 2つの CTL 標的抗原ペプチドの CTL クローンに対する細胞傷害能誘導

次に、p71-79 及び p75-83 の FBL-3 腫瘍特異的 CTL クローンに対する細胞傷害能の誘導活性を検定した。図 3 は 5 種類の CTL クローンに対する両ペプチドの活性を示している。B615-1, B5-10 及び B413-4 は N9-127 抗イディオタイプ抗体に反応し、T 細胞抗原受容体(TCR)として $V_{\alpha 1}J_{\alpha 112-2}/V_{\beta 10}D_{\beta 2.1}J_{\beta 2.7}$ を共通に持つ(18, 32)。B2-13 は $V_{\alpha 3}J_{\alpha 32-13}/V_{\beta 5.2}D_{\beta 1.1}J_{\beta 1.4}$ であり(18), SB14-24 は $V_{\alpha 11}J_{\alpha 2B4}/V_{\beta 14}D_{\beta 2.1}J_{\beta 2.1}$ である(参考論文 2)。これら各クローンは、図 3 に示すように両ペプチドのどちらを提示させた標的細胞に対しても細胞傷害活性を示した。各クローンは使用する TCR がそれぞれのグループで異なるが、いずれも MLTC 細胞における傾向と同様に、p71-79 に比較して p75-83 を提示させた標的細胞に対する傷害活性がおよそ 10^3 倍程度高い傾向が見られた。このことは、両ペプチドの MLTC 細胞に対する活性の高低が、それぞれのペプチドに反応し得る CTL の population の大きさに依存するのではなく、両ペプチドはいずれも FBL-3 特異的 CTL に対する活性を持つが、その活性に 10^3 程度の開きがあるということを示唆している。

FBL-3 特異的 CTL はすべて H-2D^b 拘束性であることは既に判明している(32)が、p71-79 及び p75-83 が同じ MHC クラス I H-2D^b 分子に拘束されているかどうかを確認するため、H-2D^b 結合性のインフルエンザ nucleoprotein366-374 (ASNENMETM; FluNP₃₆₆₋₃₇₄) (12)と H-2K^b 結合性の p2CK^b ペプチド(SIYRYYGL) (53)による両標的抗原ペプチドに対する競合阻害活性を調べたところ、図 4 に示すように、どちらの標的抗原ペプチドに対しても FluNP₃₆₆₋₃₇₄ のみが競合阻害活性を示した。このことから、どちらのペプチドも H-2D^b 分子上に提示されて CTL に認識されていることが確認された。

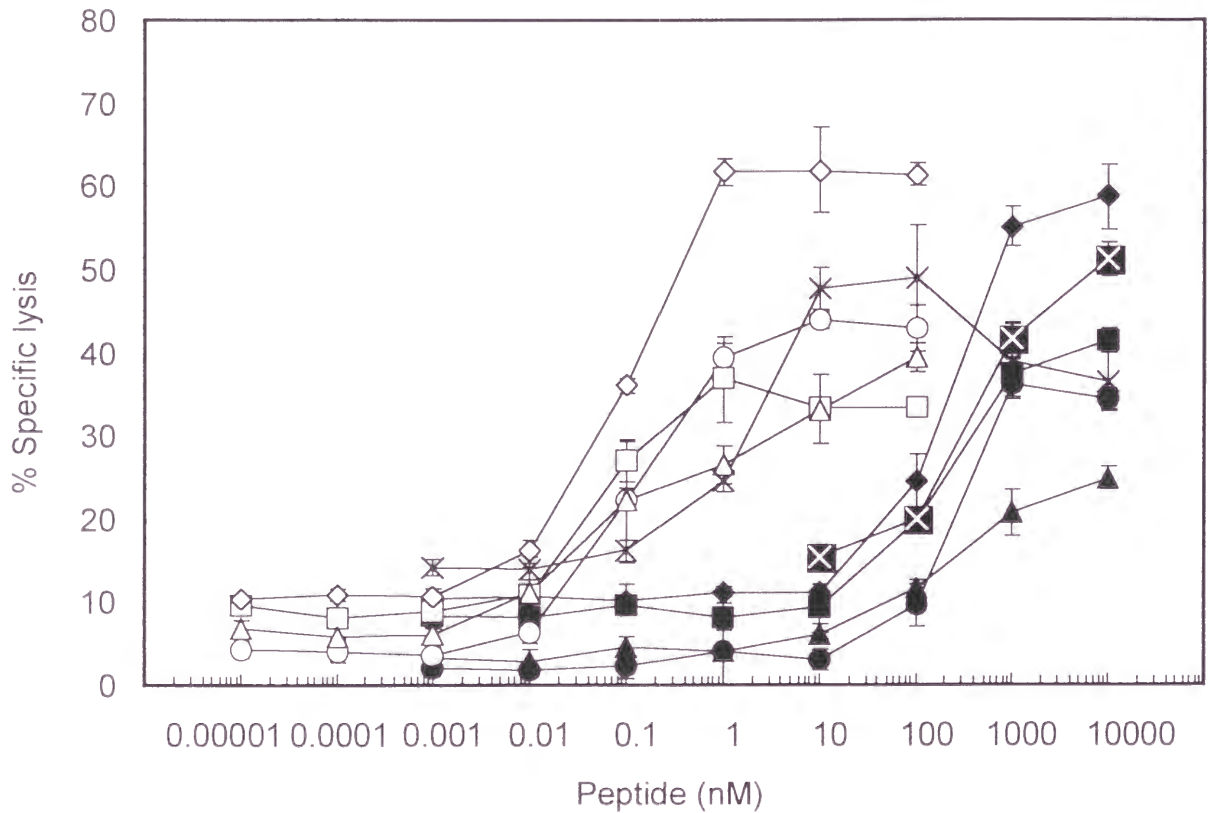


図 3 FBL-3 特異的 CTL クローンに対する両標的抗原ペプチドの活性。
 黒印は p71-79, 白抜きの印は p75-83 を提示させた CV-1.D^b に対する傷害活性を示す。同形の印は同じ CTL クローンを示す。B615-1(○), B5-10(□), B413-4(×) は N9-127 抗イディオタイプ抗体に反応し, T 細胞抗原受容体 (TCR) として $V_{\alpha 1}J_{\alpha 112-2}/V_{\beta 10}D_{\beta 2.1}J_{\beta 2.7}$ を共通に持つ。B2-13(△) は $V_{\alpha 3}J_{\alpha 32-13}/V_{\beta 5.2}D_{\beta 1.1}J_{\beta 1.4}$ で, SB14-24(◇) は $V_{\alpha 11}J_{\alpha 2134}/V_{\beta 1.4}D_{\beta 2.1}J_{\beta 2.1}$ である。E:T 比は 20:1 とした。

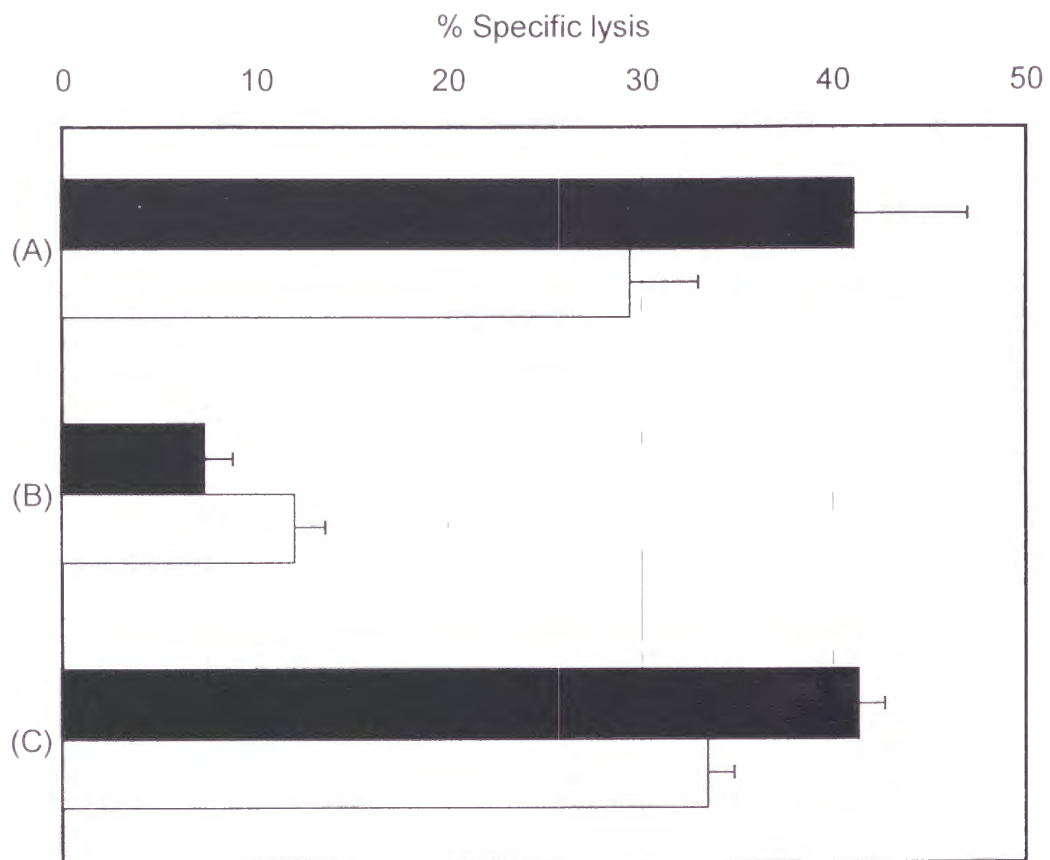


図 4 MHC クラス I 結合性ペプチドによる, FBL-3 特異的標的抗原ペプチドに対する競合阻害活性。

25 μ M の FluNP₃₆₆₋₃₇₄(B)あるいは p2CK^b(C)を CV-1D^b 細胞に加え, その後 p71-79 10 μ M(黒棒)あるいは p75-83 10nM(白棒)を加え, 更に FBL-3 特異的 CTL クローンとして B615-1 を E:T 比が 20:1 となるように加えて細胞傷害活性を測定した。(A)は競合阻害ペプチドを加えなかった対照群である。

- 2つの CTL 標的抗原ペプチドの活性残基同定

H-2D^b 分子に結合するペプチドのモチーフはこれまでによく調べられているが、そのほとんどが親水性のペプチドについてであり、p71-79 あるいは p75-83 のような極めて疎水性が強いペプチドについてはよくわかっていない。そこで、これらペプチドの各残基を1つずつ alanine 置換したものについて、その CTL に対する活性を検定した(図 5)。用いたペプチドを表 1 にまとめて示す。p71-79 については p71-79-I72A, L74A, C75A, 及び C76A が活性をほぼ完全に失った。p75-83 については p75-83-L77A, C78A, 及び T80A が活性を持たなかった。両ペプチドの cysteine 残基をすべて alanine あるいは残基の大きさとして類似の serine にすべて置換したペプチドの活性も測定した(図 5)。p71-79 については cysteine 3 残基の alanine 置換, serine 置換ペプチドの両者ともに活性を持たなかったが、p75-83 については serine に置換したペプチドに対してもとのペプチドと変わらない活性が見られた。p71-79 については MHC クラス I 分子への結合力が非常に弱いので、p75-83 についてのみ各残基の alanine 置換ペプチドの H-2D^b 分子への結合活性を、RMA-S を用いて測定した。図 6 に結果を示す。明確に H-2D^b への結合性を失ったのは p75-83-T80A のみであった。よって p75-83 においては 6 番目の残基である T80 が MHC への結合に重要な残基であると考えられる。

表 1 FBL-3 特異的 CTL の標的抗原ペプチドの活性残基同定に用いた一連の残基置換ペプチド。
 もとのペプチドと同じ残基はハイフンで示す。

Name	Sequence	Name	Sequence
p71-79	SIVLCCLCL	p75-83	CCLCLTVFL
p71-79-L79A	-----A	p75-83-L83A	-----A
p71-79-C78A	-----A-	p75-83-F82A	-----A-
p71-79-L77A	-----A--	p75-83-V81A	-----A--
p71-79-C76A	-----A---	p75-83-T80A	-----A---
p71-79-C75A	----A----	p75-83-L79A	----A----
p71-79-L74A	---A-----	p75-83-C78A	---A-----
p71-79-V73A	--A-----	p75-83-L77A	--A-----
p71-79-I72A	-A-----	p75-83-C76A	-A-----
p71-79-S71A	A-----	p75-83-C75A	A-----
p71-79-3A	----AA-A-	p75-83-3A	AA-A-----
p71-79-3S	----SS-S-	p75-83-3S	SS-S-----

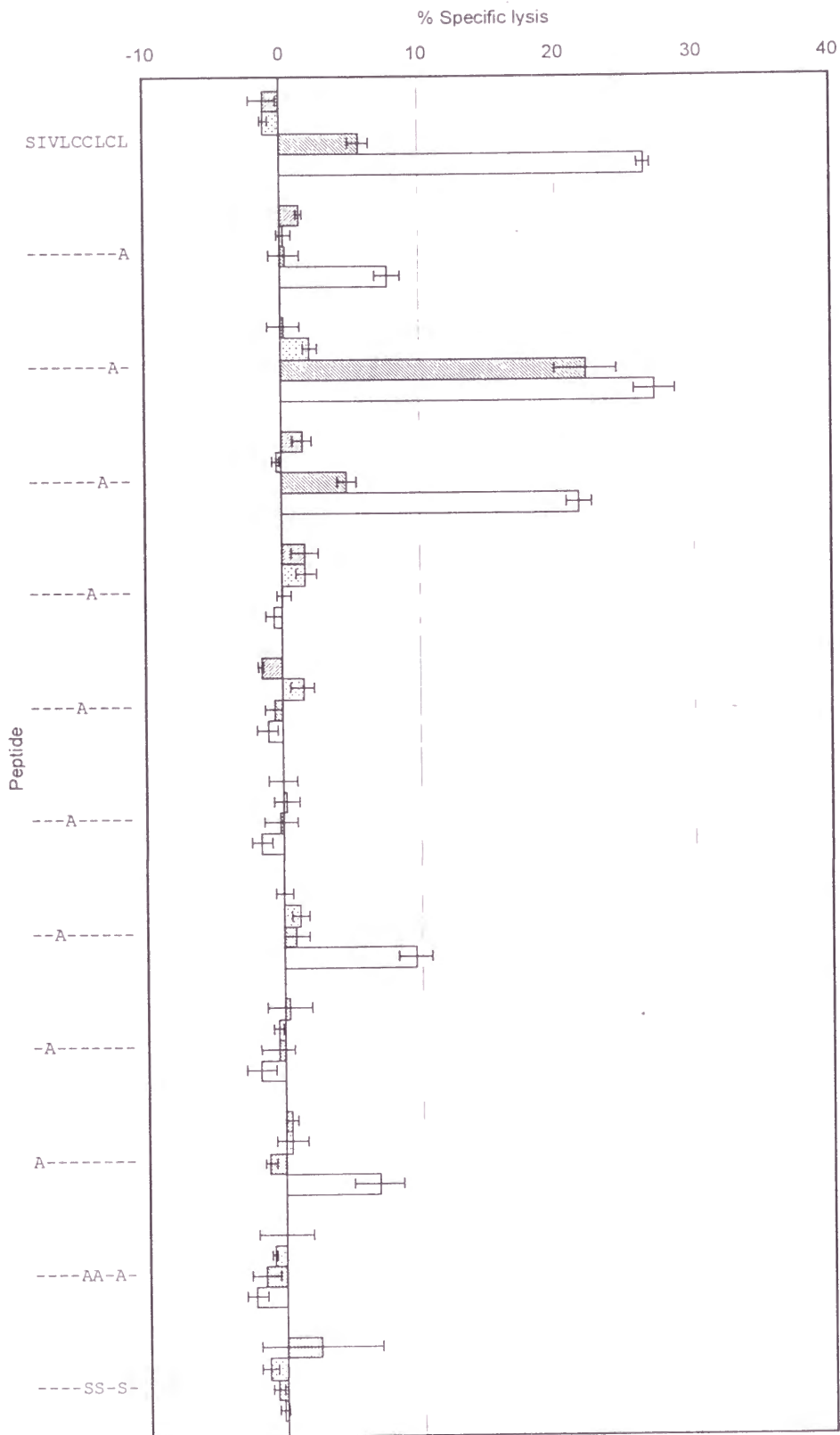


図 5a p71-79 の各残基 alanine 置換ペプチド, 及び cysteine 残基を alanine あるいは serine に置換したペプチドの CTL の細胞傷害活性誘導能。
 用いた CTL クローンは B615-1 (18, 32), E:T 比は 20:1 である。ペプチドの濃度は 10^{-8} M (▨), 10^{-7} M (□), 10^{-6} M (▩) 10^{-5} M () である。

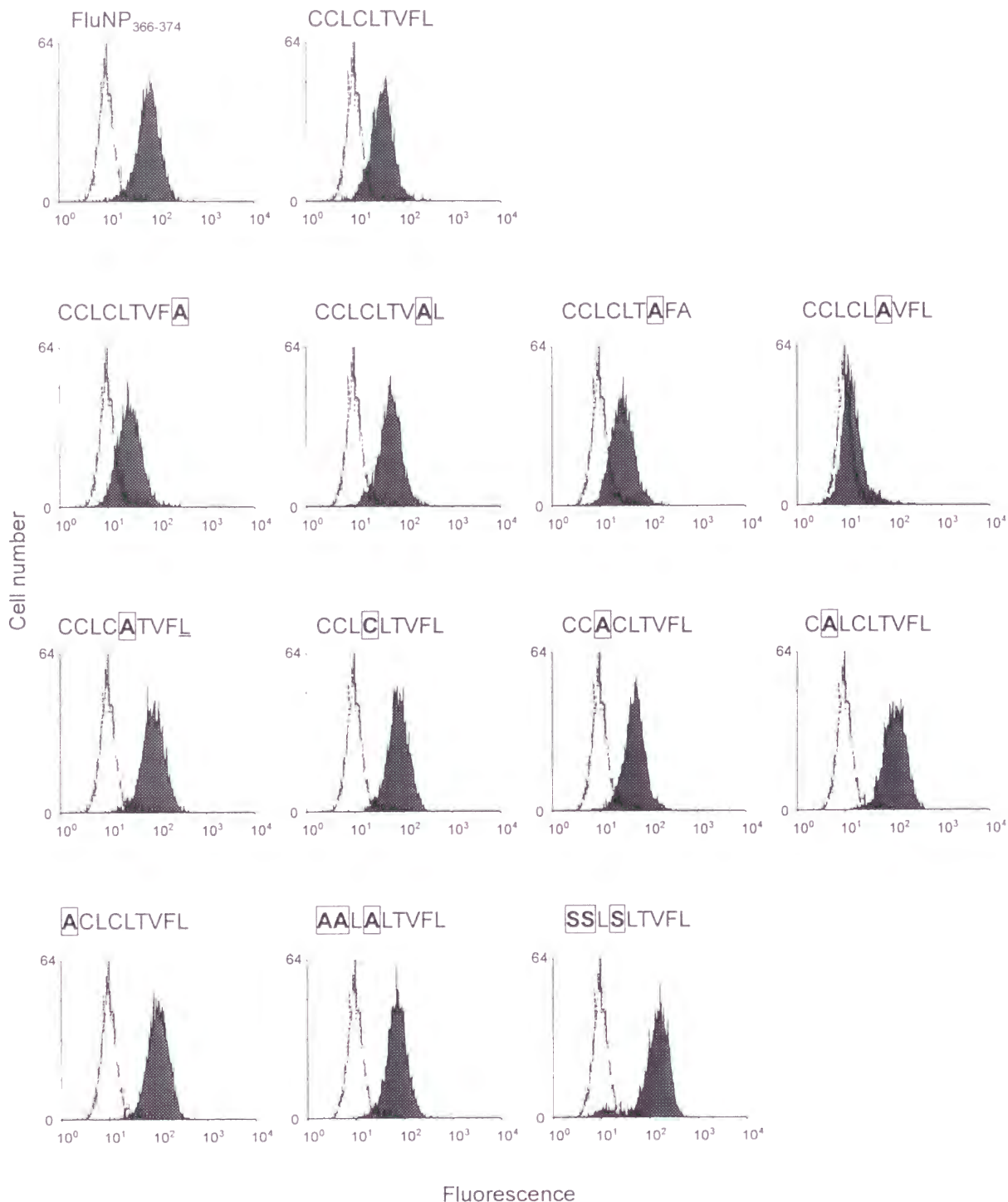


図 6 p75-83 の各残基 alanine 置換ペプチド, 及び cysteine 残基を alanine あるいは serine に置換したペプチドの H-2D^b 分子への結合能の測定。
 ペプチドが結合することによって安定化された H-2D^b 分子の発現量は横軸の
 蛍光強度によって示される。それぞれのグラフの点線は何もペプチドを加え
 ないときの H-2D^b 分子の発現量を示す。

- FBL-3 特異的 Th クロンの標的抗原ペプチドの詳細な位置決定

FBL-3 特異的 Th クロンは現在までに 4 株樹立されている。3 株は B6 由来で、その内 2 株は同じ I-A^b 拘束性のペプチド F-MuLV Env₁₂₂₋₁₄₁ (ペプチド f_{n20}) を認識する (21)。もう 1 株の標的抗原は未確認である。

更に CB6F₁ 由来の Th クロン (F5-5) が得られている。F5-5 の標的抗原ペプチドは F-MuLV Env₄₆₂₋₄₇₉ (HPPSYVYSQFKSYRHKR; ペプチド i) と同定された (21)。ペプチド i の拘束分子は I-Eα^dβ^b である。I-Eα 分子はハプロタイプ間の多様性がほとんど存在せず (19), 以下では I-Eα^dβ^b 分子を I-E^b と呼称する。図 7 に両標的抗原ペプチドの F-MuLV ゲノム上における位置とその配列を示す。

ペプチド i は 18 残基までその範囲を限定されているが、MHC クラス II 分子に提示されて TCR に認識されるペプチドは最短で 13 残基前後とされている (11)。そこで、まず、ペプチド i を短縮した際に F5-5 に対する活性を失わない最小の長さの決定を行った。図 8 に各ペプチドを用いたときにおける増殖試験の結果のグラフを、表 2 に各ペプチドのペプチド i に対する相対活性を示す。N 末から順に残基を短縮した場合、6 残基短縮して 12 残基の Env₄₆₈₋₄₇₉ とした場合有意に活性を失い、7 残基短縮して 11 残基とした Env₄₆₉₋₄₇₉ ではほぼ完全に活性を消失した。C 末から残基を短縮した場合は、1 残基短縮すると (Env₄₆₂₋₄₇₈) F5-5 に対する活性をほぼ完全に失った。残基の長さを 18 残基に固定して F-MuLV Env の S469 から下流に 1 残基ずつずらしたペプチドについて活性をみたところ、Env₄₇₁₋₄₈₈ は十分な活性を保持したが、Env₄₇₂₋₄₈₉ はほぼ完全に活性を消失した。以上の結果から、ペプチド i が F5-5 に対して活性を持つためにコアとして必要な部分は Env₄₇₁₋₄₇₉ の 9 残基であるが、実際に MHC クラス II 分子上に提示されて TCR に認識されるためには 13 残基程度の長さが必要であることが明らかとなった。

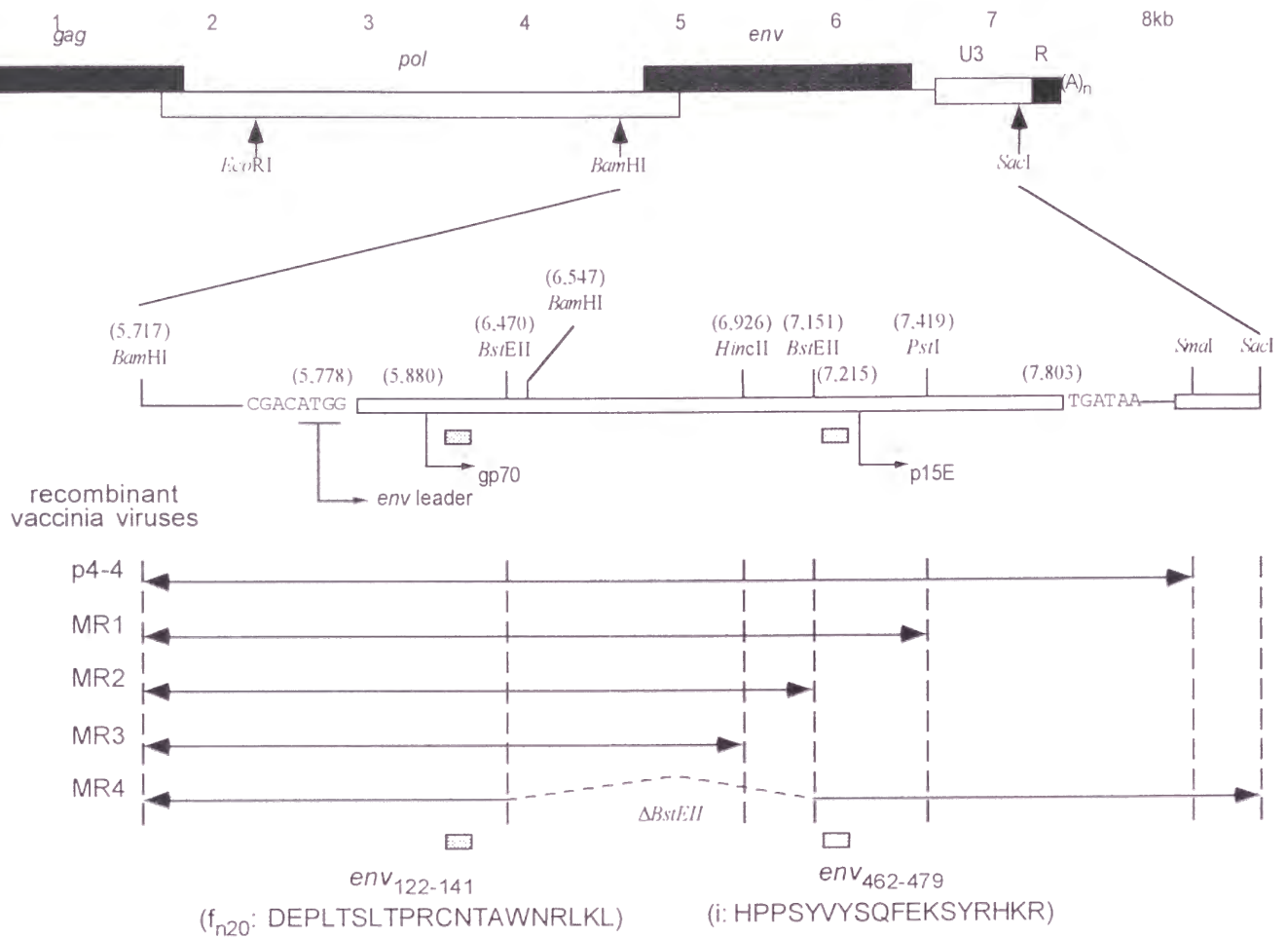


図 7 FBL-3 特異的 Th の標的抗原ペプチドの F-MuLV ゲノム中の位置とその配列。
 標的抗原ペプチドの位置決定を行うために使用した組換えワクシニアウイルスの F-MuLV env 遺伝子を組み込んだ各部位も併せ示す(21)。

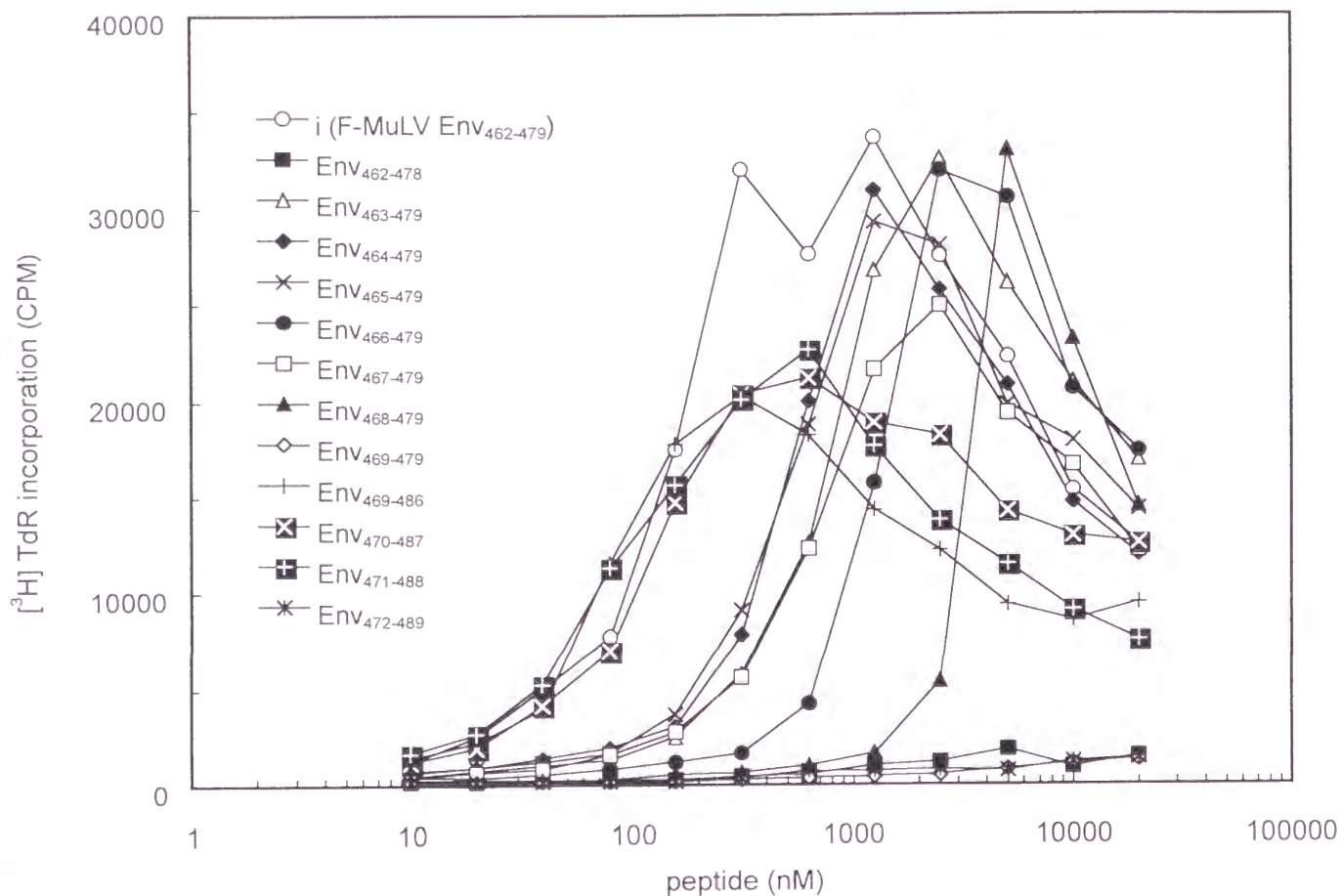


図 8 ペプチド i の両端から残基を短縮したペプチド, 及び位置を C 末側に移動させたペプチドの FBL-3 特異的 Th クローン F5-5 に対する増殖活性の測定。活性の強さは F5-5 への methyl- $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みで示す。

表 2 FBL-3 腫瘍特異的 Th の標的抗原ペプチド i のコア配列検索に用いたペプチドと、そのペプチド i と比較した F5-5 に対する相対的増殖活性。
 F-MuLV Env タンパクのもとの配列と同じ残基はハイフンで示す。
 相対的増殖活性は各ペプチドの Th クローンに対する飽和した場合の半分の増殖能を与えるペプチド量(ED₅₀)を①, ペプチド i の ED₅₀を②としたとき ②/①で表す。

F-MuLV Env sequence (462-489)	Relative Responsiveness
HPPSYVYSQFEKSYRHKREPVSLTLALL	
i	1.0
Env ₄₆₂₋₄₇₈	<0.001
Env ₄₆₃₋₄₇₉	0.24
Env ₄₆₄₋₄₇₉	0.32
Env ₄₆₅₋₄₇₉	0.34
Env ₄₆₆₋₄₇₉	0.13
Env ₄₆₇₋₄₇₉	0.22
Env ₄₆₈₋₄₇₉	0.041
Env ₄₆₉₋₄₇₉	<0.001
Env ₄₆₉₋₄₈₆	1.7
Env ₄₇₀₋₄₈₇	1.2
Env ₄₇₁₋₄₈₈	1.8
Env ₄₇₂₋₄₈₉	<0.001

- ペプチド i の活性残基の同定

次に、ペプチド i の各残基の T 細胞認識における寄与の実体を調べるため、各残基を alanine に置換した一連のペプチド(表 3)を用意し、これの Th クローンに対する増殖活性を測定した。図 9 に F5-5 の各ペプチドに対する増殖活性のグラフを示し、表 4 に各ペプチドのペプチド i に対する相対活性を示す。F5-5 は F471A, Y475A, R476A, H477A 及び K478A に対しての活性を持たず、K473A は若干の活性は残存するもののペプチド i と同等の活性を得るためには 100 倍程度の濃度を必要とした。ペプチド i において R479 は除去すると F5-5 に対する活性を失うが、alanine に置換した場合(R479A)には活性を失わない。このことより、R479 自体は MHC クラス II 分子への結合ないし TCR の認識には寄与しないが、MHC-ペプチド複合体の構造を F5-5 の TCR が認識できるように形成することに寄与していることが想定される。これら活性を失ったペプチドの、ペプチド i 免疫マウス由来の LN 細胞に対する活性を測定したところ(図 10)、F471A, Y475A, 及び R476A は活性を持たなかったが、H477A 及び K478A はペプチド i とほぼ同等の活性を有した。よってこれら F471, Y475, 及び R476 の 3 残基は MHC への結合に重要な残基か、あるいはペプチド i を認識する TCR が必然的に接触する残基であると考えられる。

このようにペプチド i 特異的 Th に対する i の活性残基を同定したが、これらの残基が MHC への結合に関わる残基であるのか、あるいは TCR による認識にのみ関わる残基であるのかを決定するために、ペプチド結合試験を行った。その結果を図 11 に示す。ペプチド i の各残基の alanine 置換体の内、I-E^b 分子に対して十分に結合活性を失ったのは F471A で、その他 R476A も有意な結合活性の減少を示した。これらのことから、F5-5 によるペプチド i の認識に関わる 5 つの残基 F471, Y475, R476, H477 及び K478 の内、MHC への結合に関わると考えられる残基は F471 及び R476 で、その他の 3 つの残基は主として TCR への結合に関わる残基と考えられる。

ペプチド*i*免疫によって多数の Th クローンを得たが、その内 3 つのクローン FP7-11, FP10-10, 及び FP10-13 についても alanine 置換ペプチドに対する活性を測定した。図 12 にそれぞれのクローンの alanine 置換ペプチドに対する増殖活性のグラフを示し、表 4 に各ペプチドのペプチド*i*に対する相対活性を示す。3 つのクローンは F5-5 とも、また相互に活性残基の位置に相違がみられた。FP10-10 においては、F471A, E472A, S474A, Y475A 及び R476A に対してほぼ完全な活性の消失が見られ、Y468A, Q470A 及び K473A に対して有意な活性の低下が見られた。FP10-13 においては、E472A, Y475A 及び R476A に対してほぼ完全な活性の消失が見られ、Y466A, V467A, Y468A 及び F471A に対して有意な活性の低下が見られた。FP7-11 においては Y468A, Q470A, E472A, K473A 及び Y475A に対して活性のほぼ完全な消失が見られ、V467A と R476A に対して有意な活性の低下が見られた。これらのように、Y475A 及び R476A はどの Th クローンに対しても活性を大きく低下させることが示された。その他の残基でも alanine 置換したときに複数の Th クローンで活性が低下する場合もみられたが、alanine 置換したときに調べたすべての Th クローンで活性が有意に低下する残基は存在しなかった。これらのように、同一の標的抗原ペプチドを認識する Th によるペプチド-MHC 複合体の認識の様式は多様であることが明らかとなった。

表 3 ペプチド i の活性残基検索に用いた alanine 置換ペプチド。
 F-MuLV Env タンパクのものとの配列と同じ残基はハイフンで示す。

Name	Sequence
i	HPPSYVYSQFEKSYRHKR
P463A	-A-----
P464A	--A-----
S465A	---A-----
Y466A	----A-----
V467A	-----A-----
Y468A	-----A-----
S469A	-----A-----
Q470A	-----A-----
F471A	-----A-----
E472A	-----A-----
K473A	-----A-----
S474A	-----A-----
Y475A	-----A-----
R476A	-----A-----
H477A	-----A-----
K478A	-----A-----
R479A	-----A-----

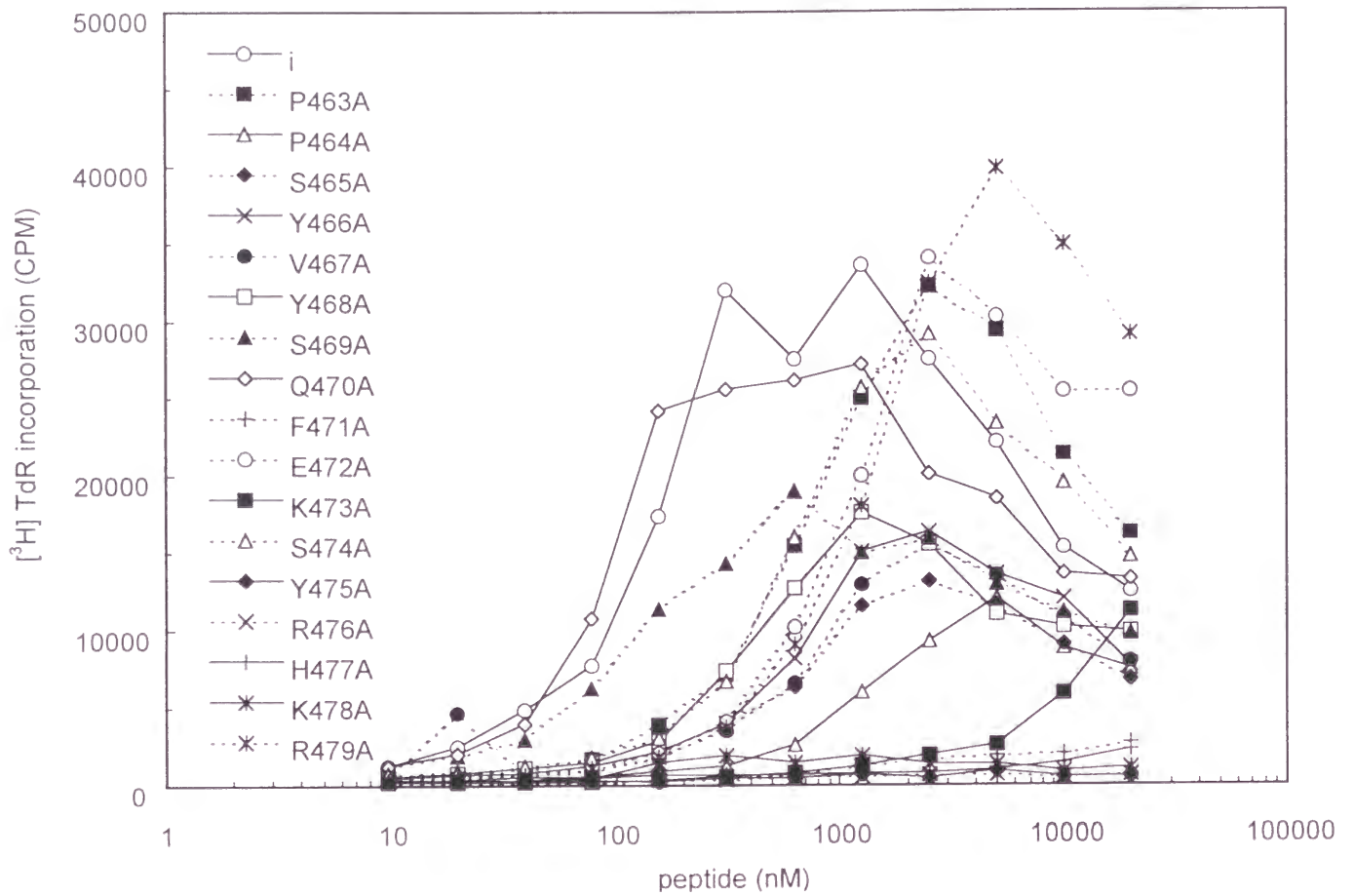


図 9 ペプチド i の各残基 alanine 置換ペプチドの FBL-3 特異的 Th クローン F5-5 に対する増殖活性の測定。
 活性の強さは F5-5 への methyl-[3H]-thymidine の取り込みで示す。

表 4 ペプチド i の各残基 alanine 置換アナログペプチドの, FBL-3 腫瘍特異的 Th クローン F5-5 及びペプチド i 免疫により樹立した Th クローンに対する, ペプチド i と比較した相対的増殖活性。
活性の表示方法は表 2 と同様である。

Peptide	F5-5	FP7-11	FP10-10	FP10-13
i	1.0	1.0	1.0	1.0
P463A	0.29	0.34	0.31	0.19
P464A	0.062	0.51	0.22	0.20
S465A	0.12	0.46	0.81	0.70
Y466A	0.14	0.68	0.45	0.043
V467A	0.12	0.004	0.31	0.013
Y468A	0.26	<0.001	0.0089	0.022
S469A	0.89	0.33	2.8	0.99
Q470A	1.6	<0.001	0.030	0.63
F471A	<0.001	2.3	<0.0001	0.0069
E472A	0.19	<0.001	<0.0001	<0.0001
K473A	0.007	<0.001	0.093	0.40
S474A	0.29	1.9	<0.0001	0.37
Y475A	<0.001	<0.001	<0.0001	<0.0001
R476A	<0.001	0.017	0.0004	0.0008
H477A	<0.001	0.45	0.64	0.55
K478A	<0.001	0.21	0.50	0.25
R479A	0.17	2.1	1.5	2.3

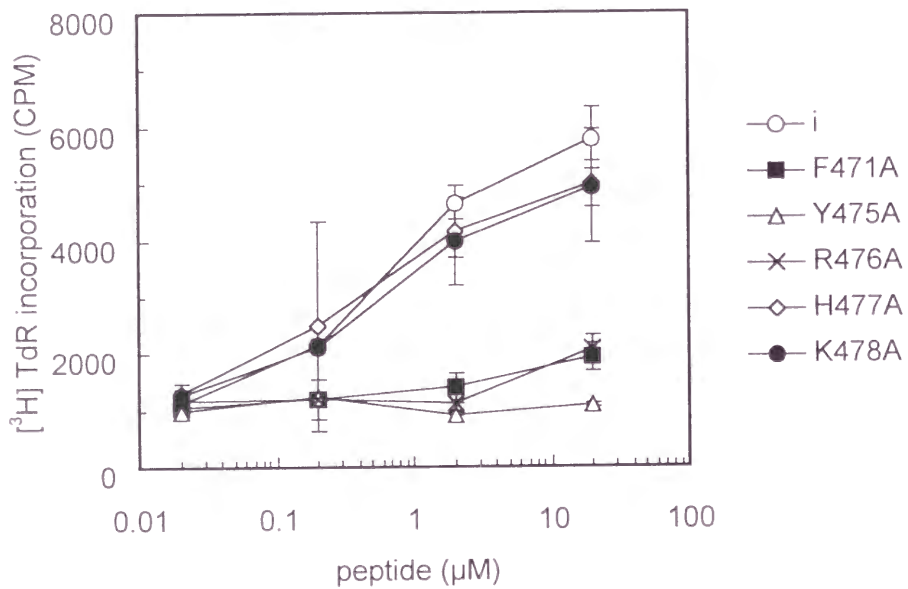


図 10 ペプチド i 免疫マウスの免疫部位所属リンパ節細胞のペプチド i 及びそのアナログペプチドに対する反応。
 各測定点は 2 点ずつとり、その標準偏差を誤差範囲として示す。他に 5 匹のマウスについて同様の実験を行ったが、すべてのマウスにおいてここに示した結果と同様に、F471A、Y475A 及び R476A には反応せず、H477A 及び K478A には反応した。

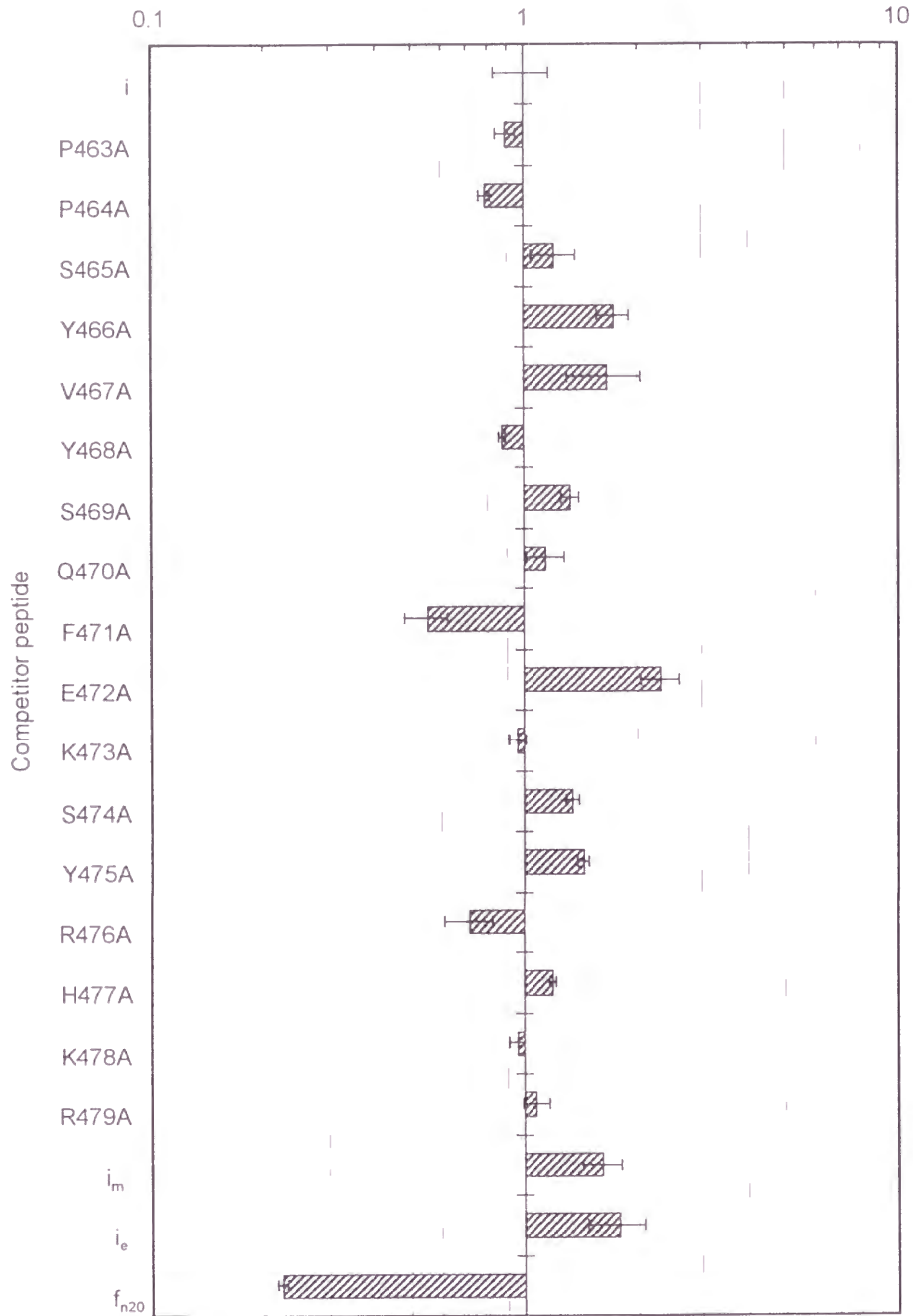


図 11 ビオチン標識ペプチド i に対する各ペプチドの I-E^b 分子への結合競合能力の測定。

各競合阻害ペプチドは 3 点ずつ測定し(ペプチド i については 6 点), それぞれの平均値を標準偏差と共に示す。このグラフにおいて, 1 より数値が大きい場合はペプチド i より MHC 分子への結合能が強く, 1 より小さい場合は結合能が小さいことを示す。

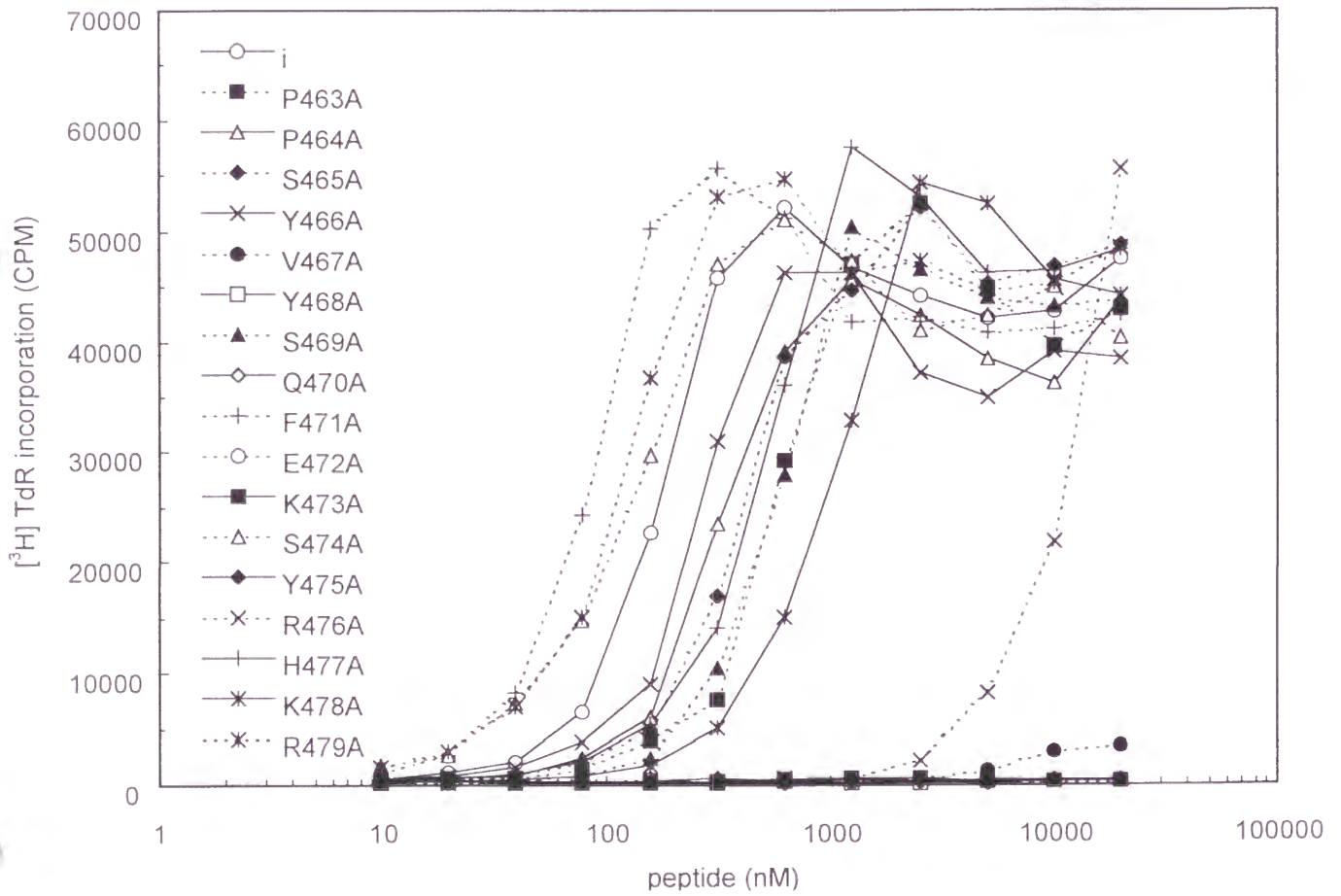


図 12a ペプチド i の各残基 alanine 置換ペプチドの、ペプチド i 免疫によって樹立した Th クローン FP7-11 に対する増殖活性の測定。

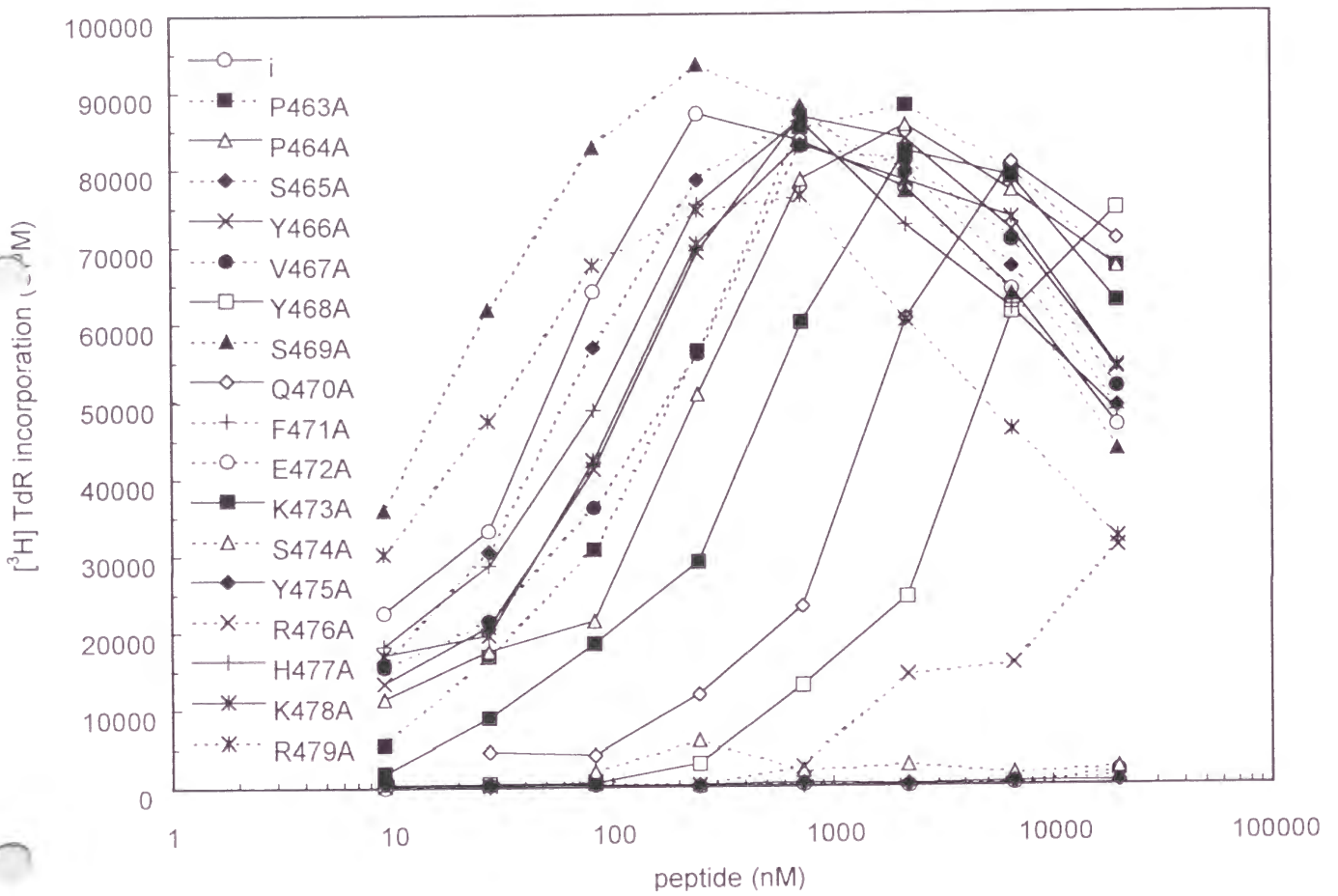


図 12b ペプチド *i* の各残基 alanine 置換ペプチドの、ペプチド *i* 免疫によって樹立した Th クローン FP10-10 に対する増殖活性の測定。

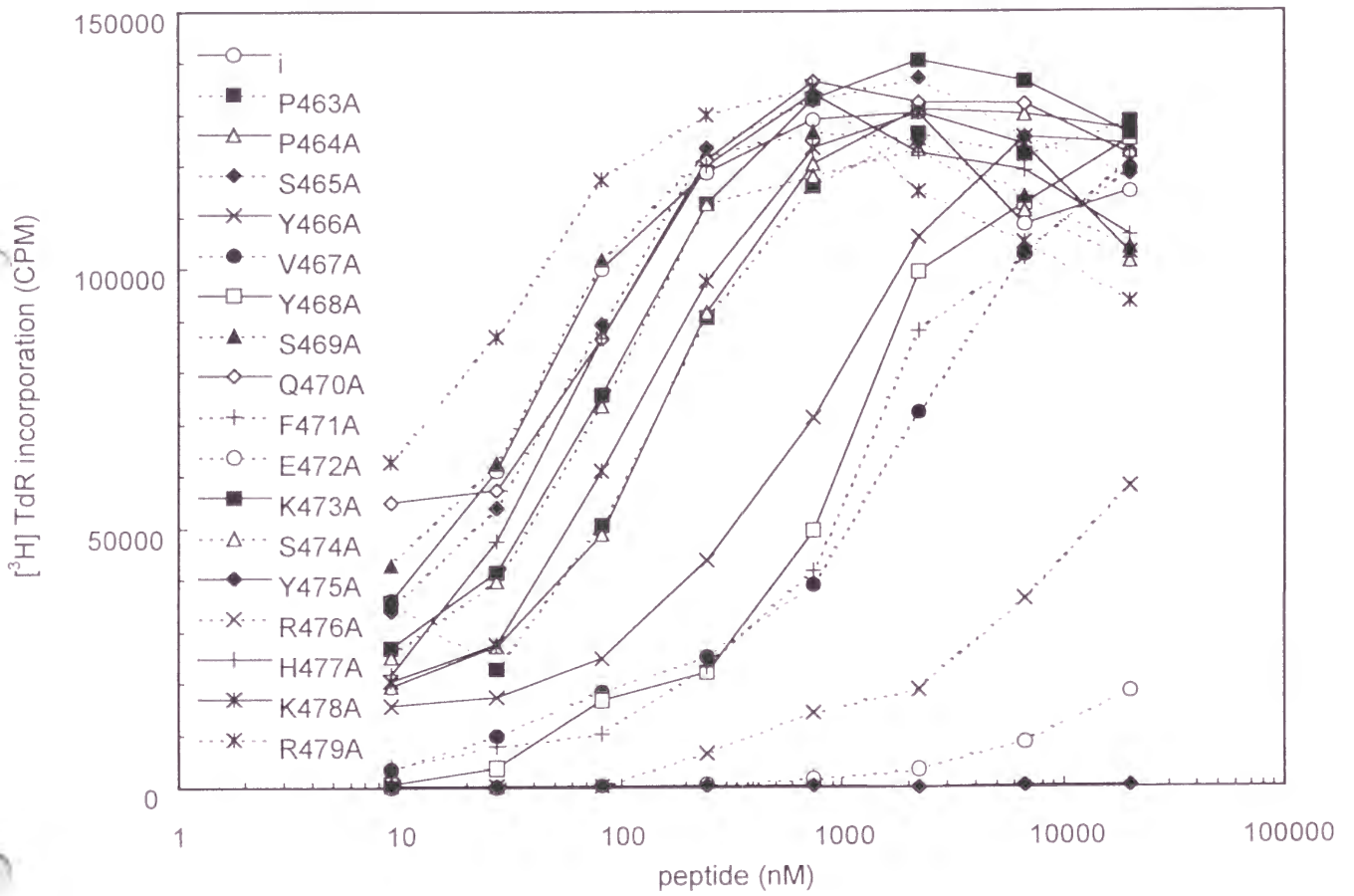


図 12c ペプチド i の各残基 alanine 置換ペプチドの、ペプチド i 免疫によって樹立した Th クローン FP10-13 に対する増殖活性の測定。

- フレンドマウス白血病ウイルスと近縁のモロニーウイルス,

及びマウス内在性ウイルス由来ペプチドとペプチド i の交差反応性の検討

F-MuLV と近縁の M-MuLV あるいは R-MuLV の内, R-MuLV はペプチド i と全く同じ配列を持つ(55)。M-MuLV については, ペプチド i とは 5 残基が異なるものの相同な配列がある(M-MuLV Env₄₅₂₋₄₆₉, 図 13, 以下ペプチド i_m と呼称)。M-MuLV で誘発された腫瘍に胸腺細胞腫である MBL-2(3)があるが, これは FBL-3 とは異なり F5-5 に対する増殖刺激の活性を有しない(21)。ペプチド i_m は I-E^b 分子への結合活性を持ち(図 11), また, ペプチド i_m で CB6F₁ マウスを免疫感作することで i_m に特異的に反応する T 細胞を誘導できるが, これらの T 細胞はペプチド i に対しては反応しない(図 14)。一方, ペプチド i で免疫感作したマウスの LN 細胞は i_m に対して全く反応しない。これらのことから, ペプチド i_m 自体は抗原性を失っているわけではないが, 変異によってペプチド i との交差反応性を失っていると考えられる。また, ペプチド i に対応する内在性ウイルス由来の配列として, I-E^b 分子に結合するものが, C57BL/10(H-2^b)及び BALB/c マウス由来 B 細胞を融合して得られたハイブリドーマ LB27.4(24)の MHC クラス II 分子から抽出されたペプチドの中に知られている(44)。これは内在性ウイルスの 1 つ AKV 中に存在する配列である。AKV のペプチド i に相当する部分の配列(AKV Env₄₅₃₋₄₇₀:HSPSYVYHQFERRAKYKR, 図 13, 以下ペプチド i_c と呼称)についてペプチド i との交差反応性について検討したところ, ペプチド i_c も, F5-5 あるいはペプチド i で誘導した T 細胞に対しての交差反応性を持たず(図 15), またペプチド i_m で誘導した T 細胞に対する交差反応性も有しなかった(図 14)。また, ペプチド i_c で CB6F₁ マウスを免疫感作してもペプチド i_c , i 及び i_m に特異的な T 細胞を誘導することは出来なかった(データ示さず)。そこで, F-MuLV, M-MuLV 及びそれらに対応する内在性ウイルス由来自己抗原の相互の抗原特異性を決定している残基を決定することを試みた。

ペプチド i_m は、図 13 に示すとおり、S453, G459, L460, R463 及び N465 がペプチド i と異なっているが、先の実験(図 9, 表 4)が示すように、それらのペプチド i の相当する残基を alanine 置換した一連のペプチド (P463A, S469A, Q470A, K473A 及び Y475A) の内、F5-5 に対して有意に活性を失ったのは K473A 及び Y475A であった。しかも、K473 は対応するペプチド i_m の残基が R(463) で共に塩基性アミノ酸であるのでこの部位はペプチド i と i_m の特異性決定に関わっている可能性が少ないと考えられた。そこで、残るペプチド i_m の N465 残基をペプチド i の相当する残基である Y に置換したもの (i_m 465Y) を合成し、その F5-5 に対する増殖活性をみたところ、ペプチド i とほぼ同等の活性を示した(図 15, 表 5)。

ペプチド i_c については、S454, H460, R464, R465, A466, K467 及び Y468 がペプチド i と異なっている。ここで先の実験(図 9, 表 4)によれば、これらに相当する位置のペプチド i の残基(それぞれ P463, S469, K473, S474, Y475, R476 及び H477)で alanine 置換して活性が低下するのは K473, Y475, R476 及び H477(ペプチド i_c ではそれぞれ R464, A466, K467 及び Y468 に相当)であった。更にこれらの内でペプチド i とペプチド i_c でアミノ酸として類似のものでない残基はペプチド i_c において A466 及び Y468 である。また、ペプチド i_c の H460 に相当する位置のペプチド i の残基を alanine に置換した S469A は F5-5 に対する活性は失わないものの、ペプチド i_c における H の残基はかなり大きい立体的に TCR による認識を阻害する可能性がある。そこでペプチド i_c における H460, A466 及び Y468 の 3 残基をペプチド i の相当するアミノ酸残基に換えたもの(図 13)を合成してその F5-5 に対する反応性をみたところ、3 残基とも置換した i_c SYH のみが活性を有した(図 15, 表 5)。

これらのペプチド i に類似したペプチド及びその置換アナログペプチドの、ペプチド i 免疫マウス由来の LN 細胞に対する反応性をみたところ、 i_m 465Y に対しては若干反応する T 細胞の population が存在することがみられたがごくわずかであった。また、ペプチド i_c 及びその置換アナログペプチドに対しての反応性はみられなかった(図 16)。このことから、ペプチド i 特異的 T 細胞の population 全体の中では、ペプチド i_c

から3残基の置換を行ってペプチド*i*と構造が極めて類似していると考えられる i_c SYH に対しても反応するものが少ないことが示唆された。

Peptide	Sequence
	462 479
i	HPPSYVYSQFEKSYRHKR
	452 469
i _m	H <u>S</u> PSYVY <u>GL</u> F <u>E</u> R <u>S</u> NRHKR
i _m 465Y	H <u>S</u> PSYVY <u>GL</u> F <u>E</u> R <u>S</u> [.] YRHKR
	453 470
i _e	H <u>S</u> PSYVY <u>H</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>Y</u> KR
i _e 466Y	H <u>S</u> PSYVY <u>H</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>Y</u> KR
i _e SY	H <u>S</u> PSYVY <u>S</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>Y</u> KR
i _e YH	H <u>S</u> PSYVY <u>H</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>H</u> KR
i _e SH	H <u>S</u> PSYVY <u>S</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>H</u> KR
i _e SYH	H <u>S</u> PSYVY <u>S</u> QF <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>H</u> KR

図 13 ペプチド i と相同な M-MuLV 由来のペプチド i_m, 内在性ウイルス由来のペプチド i_e, 及びそれぞれのアナログペプチド。
二重線付きのアミノ酸はペプチド i と異なる残基を示す。傍点を付けたアミノ酸はペプチド i と同じ残基に置換したことを示す。

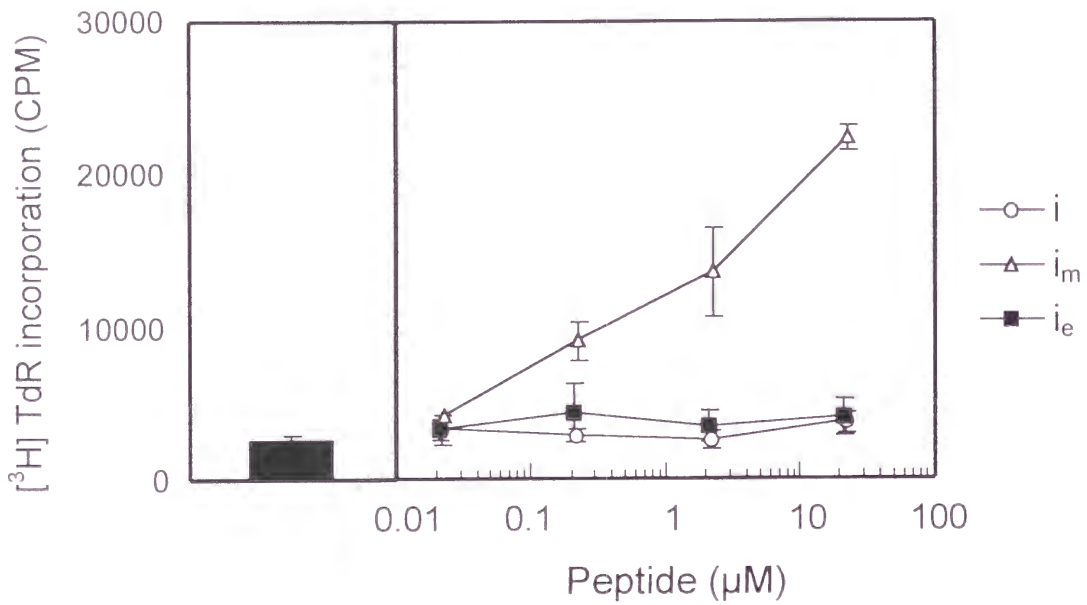


図 14 ペプチド i_m に対する $CB6F_1$ マウスの免疫応答。
 ペプチド i_m でマウスを免疫し, 10 日後に免疫部位所属リンパ節細胞を回収してそのペプチド i_m , i 及び i_e に対する反応性を測定した。左側に付した棒グラフはペプチドを加えないときのリンパ節細胞の methyl- $[^3H]$ -thymidine の取り込みを示す。データは各 3 点ずつ測定しその平均を標準偏差と共に示す。尚, ペプチド i_e は $CB6F_1$ マウスに対する免疫感作の能力を有しなかった(データ示さず)。

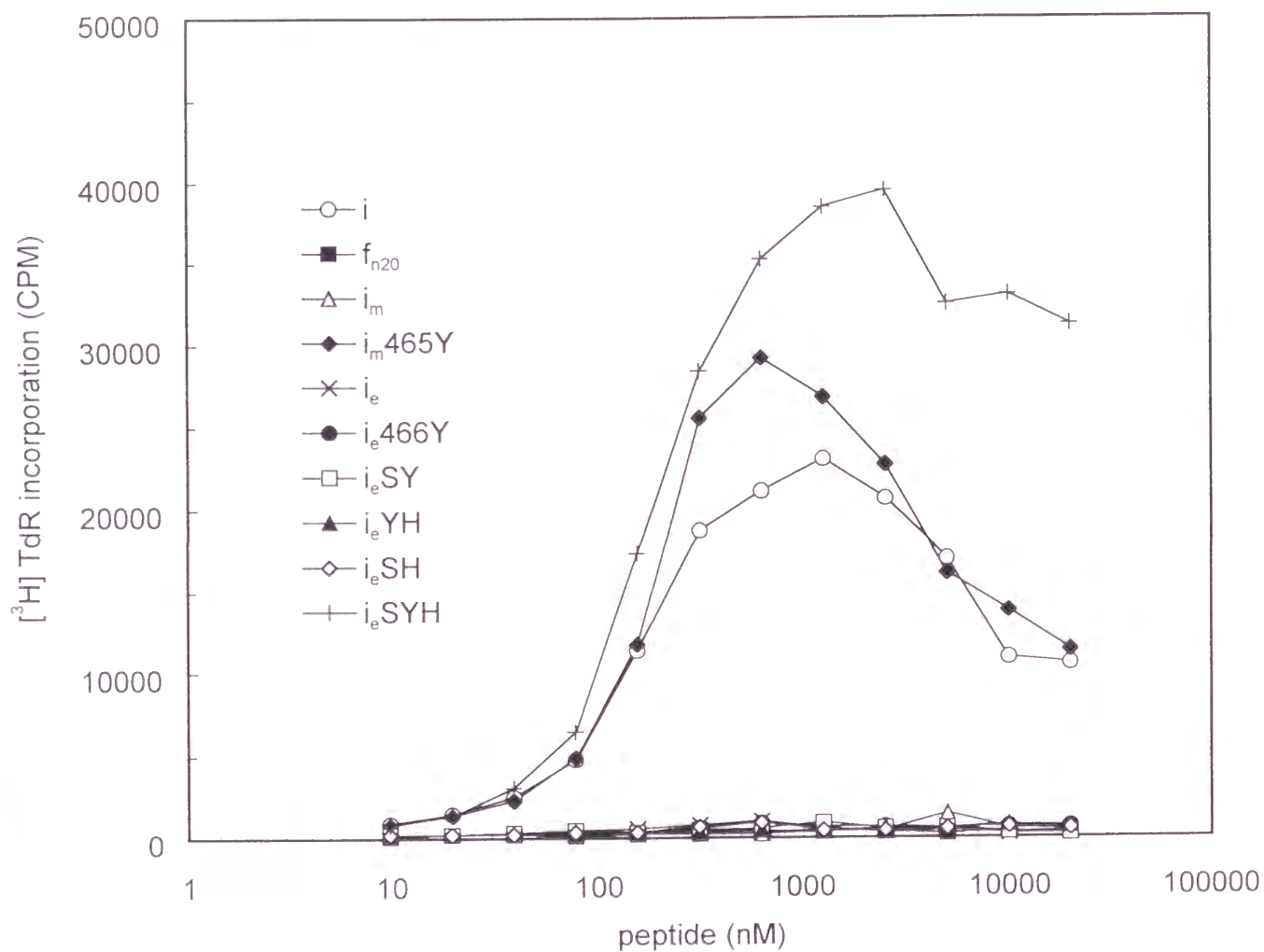


図 15 ペプチド*i*と相同な M-MuLV 由来のペプチド *i_m*, 内在性ウイルス由来のペプチド *i_e*, 及びそれぞれのアナログペプチドの FBL-3 腫瘍特異的 Th クローン F5-5 に対する増殖活性。

表 5 ペプチド i と相同な M-MuLV 由来のペプチド i_m , 内在性ウイルス由来のペプチド i_e , 及びそれぞれのアナログペプチドの FBL-3 特異的 Th クローン F5-5 に対する, ペプチド i と比較した相対的増殖活性。活性の示し方は表 2 と同様である。

Peptide	Relative Responsiveness
i	1.0
i_m	<0.001
i_m465Y	0.89
i_e	<0.001
i_e466Y	<0.001
i_eSY	<0.001
i_eYH	<0.001
i_eSH	<0.001
i_eSYH	1.2

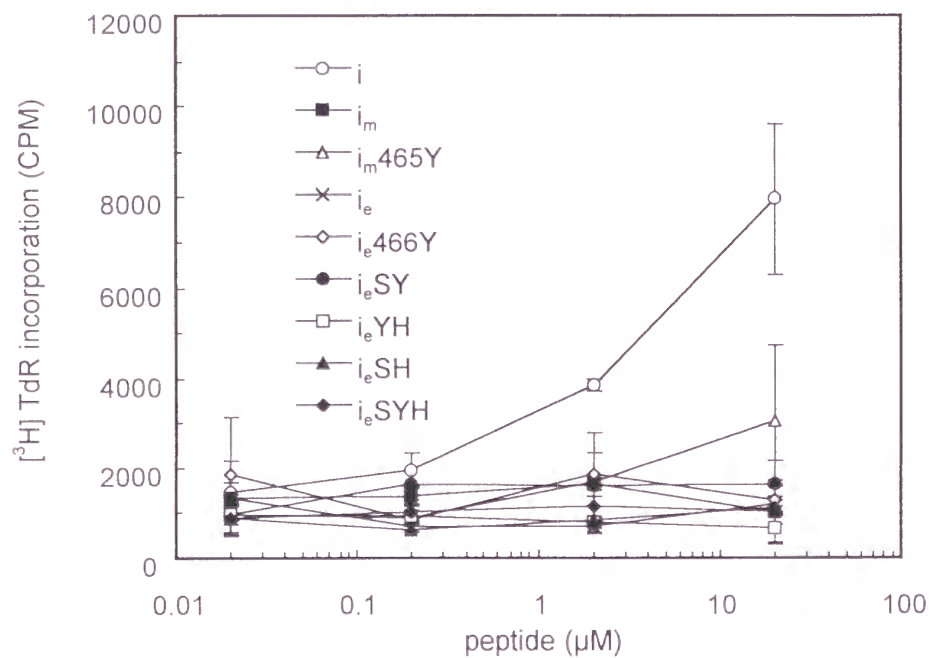


図 16 ペプチド i と相同な M-MuLV 由来のペプチド i_m , 内在性ウイルス由来のペプチド i_e , 及びそれぞれのアナログペプチドのペプチド i 免疫マウスの免疫部位所属リンパ節細胞に対する増殖活性。データは2点ずつ測定し, その平均値を標準偏差と共に示す。

考察

● 疎水性の強い標的抗原ペプチドの CTL による認識

FBL-3 特異的 CTL は F-MuLV *gag* 遺伝子にコードされている非構造タンパク Pr75^{gag} のリーダー配列内にその標的抗原ペプチドが存在していることをこれまでの実験で明らかにした。しかしながら、FBL-3 の接種によって出現する CTL の中に、その他の *gag* 遺伝子にコードされている領域及び *env* 遺伝子等他の部分にコードされたペプチドを標的抗原としているものは、現在までに多数の FBL-3 特異的 CTL を F-MuLV の各部位を組み込んだワクシニアウイルスあるいは合成ペプチドに対する反応性を検証した実験を行っても発見されていない(参考論文 2 及び未公表データ)。ところが、感染系においては、FV 感染によって B6 マウスにおいて F-MuLV *env* 遺伝子にコードされるペプチドが CTL の標的抗原ペプチドになり得ることが Ruan らによって示されている(42)。FBL-3 においては、感染系と異なり、Pr75^{gag} のリーダー配列が優先的に CTL 標的抗原として用いられるということは興味深いが、現在までにはっきりした理由はわかっていない。非構造タンパクである Pr75^{gag} は FV 等の FMR virus の感染成立に重要な役割を果たしていることが知られていて、FV の増殖にとって必須の配列である(8)。p71-79 及び p75-83 は、F-MuLV のみに存在しているわけではなく、他の FMR virus である M-MuLV, R-MuLV にも共通して保持され、発現されている配列である(8, 38)。リーダー配列内のペプチドで MHC クラス I 分子に提示されるものは lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) glycoprotein のリーダーペプチドについての例が知られている(26, 37)。一般的には、MHC クラス I 分子に提示されるペプチドはタンパク質が細胞質中でプロテアソームに分解されて、TAP 分子によって小胞体内に輸送されてから MHC クラス I 分子に提示されるという経路をとる(56)。Pr75^{gag} は合成後リーダー配列自体は小胞体内に取り残されるので、このリーダー配列内に位置する標的抗原ペプチドは、上記の経路を通過せずに細胞表面に提示される可能性もある(25, 29)。FBL-3 腫瘍細胞においては他の H-2D^b 結合性ペプチドよりも先にこれら標的抗

原ペプチドがまだペプチドと結合していない H-2D^b 分子と高い確率で会合し、細胞表面上の有効な H-2D^b 分子の大多数がこれら疎水性ペプチドで占められている可能性がある。

参考論文 2 において明らかにした FBL-3 特異的 CTL の標的抗原ペプチド p71-79 と、Chen ら(6)によって報告された標的抗原ペプチド p75-83 のいずれが実際に FBL-3 特異的 CTL に対する主要な標的抗原として使用されているかは不明である。*in vitro* における H-2D^b への結合は p75-83 の方が強い傾向がみられたが、実際には p71-79 はかなりの低濃度から血清等他のタンパク質と、またはペプチド相互で反応してゲル状となって不溶化する傾向が強く、培養液中での実効濃度はかなり低下しているものと考えられ、FBL-3 細胞表面の H-2D^b 分子への両標的抗原ペプチドの結合においては *in vitro* 程の差はない可能性がある。

本研究で取り上げたような、p71-79 及び p75-83 のように 5 残基重複しているとはいえ特に対応する位置の残基に共通性のない異なる 2 つのペプチドを同一 TCR が認識するという例は、MHC クラス II 拘束性のペプチドについては知られている(35)が、クラス I 拘束性のペプチドについてはこれまでにはない。MHC クラス I 拘束性のペプチドについては、異なる MHC に異なるペプチドが結合して同一の TCR に認識される例はアロ抗原特異的 CTL が知られており(53)、これは MHC-ペプチド複合体の形状の類似性によるものと考えられている。p71-79 あるいは p75-83 と H-2D^b 分子の複合体もこれと同様に、H-2D^b といずれかのペプチドとの複合体が、もう一方のペプチドとの複合体と形状が類似しているために、同一 TCR に認識されるものと考えられる。

p71-79 及び p75-83 の両者は 5 残基の重複を持つものの、それぞれの残基で対応する部分が共通しているのは、C 末の leucine のみで、他には 3 番目の V(p71-79)と L(p75-83)、7 番目の L(p71-79)と V(p75-83)が類似の残基となっている。その他の残基は必ずしも同等の相互に交換可能なアミノ酸とは言い難い。しかも、p75-83 及びその各残基を alanine 置換したアナログペプチドの H-2D^b 分子へのペプチド結合試験によれば、実際に H-2D^b への結合に大きく寄与しているのは p75-83 においては 6 番

目の threonine 残基であり, C 末の leucine 残基は結合への寄与は少ないことが判明した。また CTL に対する活性の点でも C 末の leucine 残基は大きな影響を及ぼしていないことが判明した。また, p71-79 についても, C 末 leucine 残基の alanine への置換は CTL に対する活性に大きな影響を及ぼさなかった。H-2D^b 分子に結合するペプチドは, 一般に (xxxxNxxxM/I/L) というモチーフ配列を持つことが知られている(39)。しかしながら, 本研究における以上の結果を考えると, p71-79 及び p75-83 はともに, 上記のモチーフに当てはまらないそれぞれ独自の様式で H-2D^b 分子に結合していることが考えられる。ペプチドのモチーフ構造の解析においては, 取扱いを容易にするために一般に溶解度が低いペプチド, 又は cysteine を多く含む酸化されやすいペプチドは除外されることが多い(48, 52)。しかしながら, H-2D^b 分子の結晶構造解析から MHC クラス I 分子のペプチドが結合する溝の部分自体の疎水性が強いことが判明している(57)。表 6 に示すとおり, p71-79(SIVLCCLCL) 及び p75-83(CCLCLTVFL) は他のよく解析されている CTL 標的抗原ペプチドと比較しても極端に疎水性が強い。本研究で取り上げた CTL 標的抗原ペプチドのような疎水性の強いペプチドにおいては, ペプチド全体の疎水性を利用して, 親水性のペプチドとは異なったモチーフ構造を用いて MHC 分子に結合している可能性が考えられる。また, Klavinskis らの報告による LCMV glycoprotein のシグナル配列に由来する H-2D^b 拘束性の CTL 標的抗原ペプチド(26)も, AVYNFAT と一般的に知られる H-2D^b のモチーフ構造に合致しない配列を取っており, 疎水性でかつ小胞体膜に挿入されるペプチドの MHC クラス I 分子への提示の様式は, 他の親水性標的抗原ペプチドとは大きく異なる可能性が示唆される。

表 6 これまでに解析されているマウス MHC クラス I 結合性ペプチドの hydrophathy index。

算出方法は Kyte らの方法(27)によった。数値が大きいほど疎水性が強いと考えられる。(*)を付したペプチドは小胞体への輸送シグナル配列内に存在するペプチドである。文献番号を付していないペプチドは文献(39) にまとめられているものである。

H-2D ^b 結合性ペプチド		H-2K ^b 結合性ペプチド	
Sequence	Index	Sequence	Index
SIVLCCLCL*(参考論文 2)	3.0	SIYRYYGL(53)	-0.2
CCLCLTVFL*(6)	2.8	RGYVYQGL	-0.4
AVYNFAT*(26)	0.7	SIINFEKL	0.5
ASNENMETM	-1.1	HIYEFPQL	-0.3
SGPSNTPPEI	-1.0	FAPGNYPAL	0.2
SGVENPGGYCL	-0.1	SIIEFARL	1.1
CKGVNEEYL	-0.6		
QGINNLDNL	-0.6		
FQPQNGQFI	-0.7		
ASNENMDAM	-0.8		

H-2K ^d 結合性ペプチド		H-2K ^k 結合性ペプチド	
Sequence	Index	Sequence	Index
TYQRTRALV	-0.6	FESTGNLI	0.3
SYFPEITHI	0.1	FEANGNLI	0.3
KYQAVTTTL	-0.1	IEGGWTGMI	0.5
GYKDGNEYI	-1.5	SEFLLEKRI	-0.1
RYLENGKETL	-1.4	YENDIEKKI	-1.6
RYLKNGKETL	-1.4	SDYEGRLI	-0.7
SYIPSAEKI	-0.1	DELDYENDI	-1.6
SYVPSAEQI	-0.1		

• MHC クラス II 分子結合ペプチドの結合モチーフの多様性

Rudensky らは、ペプチド i_c 及びその他の MHC クラス II I-E^b 分子より抽出したペプチドの配列の共通性より、xxYLYxxxxRRxxYx を I-E^b 分子結合ペプチドのコンセンサス配列として提唱している(44)。ペプチド i_c は図 13 に示すとおりこのコンセンサス配列に一致している。一方ペプチド i は、S474(コンセンサスでは R)及び H477(同 Y)など完全には一致していない。また、M-MuLV のペプチド i 及び i_c と相同な配列 i_m も i と同様の位置がコンセンサスと一致していない。Rudensky らが挙げているペプチドもすべてコンセンサスに一致しているわけではなく、I-E^b 分子に結合するペプチドのモチーフ構造を明らかにするのは意義深いことである。また、広く実験に供されている本来 H-2^b ハプロタイプである一連の C57BL 系統のマウスが遺伝子の変異により I-E α^b 分子を正常に発現できず、結果として I-E^b 分子を発現できないという理由から、I-E^b 分子に結合するペプチドの詳細な解析は例が少ない。そこで本研究においてはペプチド i が MHC 分子に結合して T 細胞に認識されるために必要な領域を決定し、またその活性残基を検定し、 i の各残基の I-E^b 分子への結合への寄与を測定することで、I-E^b 分子へのペプチドの結合様式を明らかにすることを試みた。

ペプチド i の両端より短縮したペプチドは、C 末から残基を短縮した場合は 1 残基の短縮のみで F5-5 に対する活性を失ったが、N 末からの短縮の場合は 6 残基短縮しなければ有意な活性の低下が見られず、またペプチド全長を 18 残基に固定して C 末側に領域を移動させた場合は 9 残基位置のずれた Env₄₇₁₋₄₈₈ まで十分な活性を保持した。Env₄₇₁₋₄₈₈ は Rudensky らのコンセンサス配列における前半の重要と見られる部分 YLY(ペプチド i においては YVY)を全く欠いており、このペプチド i においてこの部分が I-E^b 分子への結合に重要な要素となっていない可能性が高い。

更にペプチド i の、各残基を alanine に置換したアナログペプチドを用いてその F5-5 に対する活性を測定したところ、F471, K473, Y475, R476, H477 及び K478 が重要

であるという結果を得た。また I-E^b 分子への結合活性を各 alanine 置換ペプチドについて測定したところ、大きく結合能力を低下させたのは F471A 及び R476A であった。

これらの実験結果から、ペプチド i の F5-5 による認識の様式は図 17 のように示される。ペプチド i が MHC に結合し、FBL-3 腫瘍特異的 Th クローン F5-5 に対して活性を持つために重要な残基は、先の実験において決定したコア配列である Env₄₇₁₋₄₇₉ の範囲内に存在している。また、ペプチド i は Rudensky らが提唱するもの(44)と異なる I-E^b 分子結合ペプチドのモチーフ構造とを用いて MHC 分子に結合していることが明らかとなった。

ウシ血清アルブミン 141-157 ペプチド(BSA₁₄₁₋₁₅₇:GKYLVEIARRHPYFYAP)は I-E^b 分子に結合することが知られている(43)。本研究における実験結果から得られた、ペプチド i がその活性を保持するために必要な最短の配列である 13 残基(VYSQFEKSYRHKR)、あるいはペプチド i のコアとなる配列である 9 残基(FEKSYRHKR)と、BSA₁₄₁₋₁₅₇ の中の配列に共通性は見られない。このことから、ペプチド i と BSA₁₄₁₋₁₅₇ は異なるモチーフ構造を用いて I-E^b 分子に結合していることが考えられる。MHC 分子上に提示されているペプチドで、phenylalanine や tyrosine などの大きな側鎖を持つ残基や proline などのペプチド結合のバックボーン回転を妨げるような残基が存在すると、それがペプチド全体の構造を規定している可能性があり、そのような残基の在、不在によってペプチド全体の構造が大きく変化して MHC 分子への結合あるいは TCR による MHC-ペプチド複合体の認識に大きな影響を及ぼす可能性もある。また、図 17 に示すようなペプチド i の予想される結合モチーフは、小笠原らが提唱している I-E^b 結合モチーフ(xxxDxxxxxxxRxxx;15)とも異なっているが、小笠原らの I-E^b 結合性ペプチドは、ペプチド i や i₀、あるいは BSA₁₄₁₋₁₅₇ とも異なる残基を用いて I-E^b 分子に結合しているものと考えられる。

FBL-3 腫瘍抗原として同定されたペプチド f_{n20}, i がそれぞれ結合する MHC クラス II 分子である I-A^b, I-E^b 分子に結合する他のペプチドをまとめると図 18 のようになる。これらはそれぞれのグループにおいて、MHC への結合において使用しているモチーフ

フ構造は別々のものであると考えられる。これらのことから、MHC クラス II 分子に結合するペプチドの MHC 分子への結合の際に使用されるモチーフ構造は多様であることが明らかとなった。

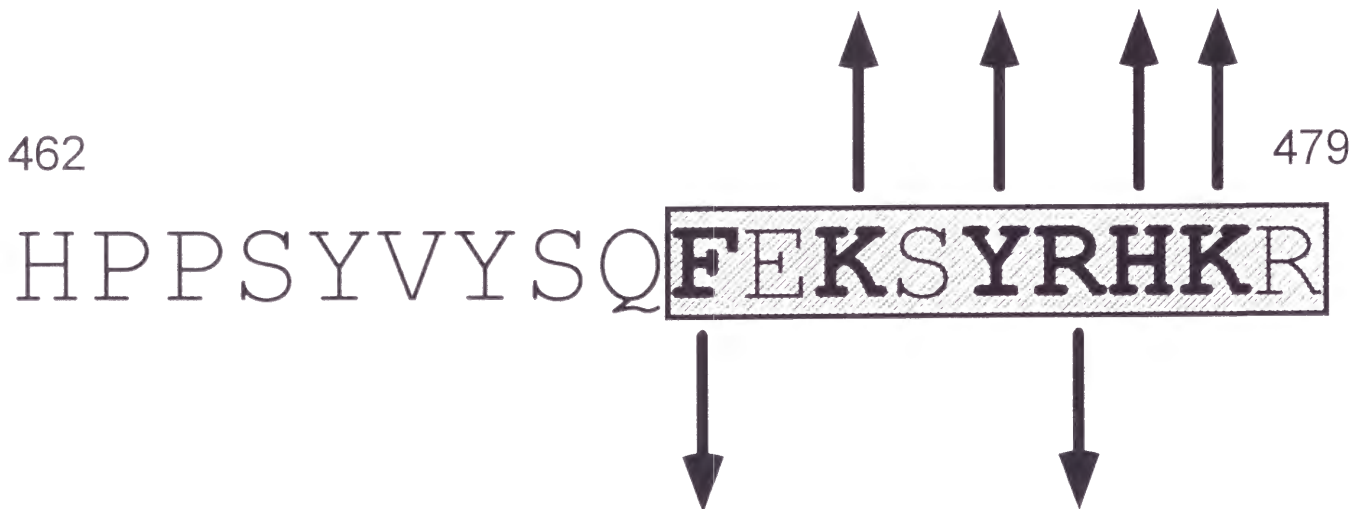


図 17 ペプチド i の FBL-3 特異的 Th クローン F5-5 に対する認識の様式。
 下向きの矢印が MHC への結合に寄与する残基を示し，上向きの矢印が TCR への結合に寄与する残基を示す。矢印の大小は寄与の程度を示す。alanine 置換した際にペプチド i に対する相対活性(ED_{50})が 0.03 以下になる残基を活性残基とした。太字の残基は活性残基を示す。枠で囲った領域はペプチド i が活性を持つためのコアとなる領域を示す。


Peptide i	HPPSYVYSQFEKSYRHKR 
Consensus (Rudensky et al.)	xxYLYxxxxRRxxYx
MuLV env 454-469	SPSYVYHQFERRAKYK
BSA 141-157	GKLYEIIARRHPYFYAP
Undefined	XPQSYLIHEXXXIS
DR consensus	AAAYAAAAAKAAA
PCC43-58 46D50V54R	AEGDSYTVANKRKGIT 

図 18b MHC クラス II I-E^b 分子に結合するペプチド。

ペプチド i は文献(21)及び本研究により, PCC 43-58 46D50V54R は文献(15)による。その他のペプチドは文献(44)によった。下向きの矢印は MHC 結合残基であることが, 上向きの矢印は TCR 結合残基であることが確認されているものを示す。

- MHC クラス II 分子とペプチドの複合体の Th による認識の多様性

ペプチド *i* の, *i* によって誘導された Th クローンにおける活性残基は, 図 19 に示すように F5-5 におけるそれと若干異なっていた。すべてのクローンにおいて全く活性を消失するという残基は Y475 のみであった。このことと, ペプチド結合試験, ペプチド *i* 免疫マウス LN 細胞のアナログペプチドに対する反応の結果等と考え合わせると, Y475 は TCR が認識する主要な残基であると想定される。FBL-3 腫瘍特異的 Th クローン F5-5 と, 比較的反応性が強いペプチド *i* 特異的 Th である FP10-10 及び FP10-13 では, MHC への結合性に関わると思われる F471 及び R476 と, 主要 TCR 残基と考えられる Y475 を alanine に置換したときにどのクローンも活性を失った点が共通している。。しかしながら, FP7-11 は反応性が他の Th クローンと大きく異なり, 他の Th クローンをを用いた解析及びクラス II 結合試験での結果から MHC 結合残基の 1 つと想定される F471 を alanine に置換しても活性はペプチド *i* より低下せずむしろ若干上昇する。FP7-11 がペプチド *i* を認識する際の TCR 結合残基と想定される部位は他の Th クローンよりも多く, ペプチド *i*-MHC 複合体に対する親和性は他の Th クローンより高いことが想定される。このことから, MHC との結合が不安定な F471A のようなペプチドに対しても, 高い活性を示すものと考えられる。

これら各 Th クローンの活性残基の同定結果より, Th によるペプチド-MHC 複合体の認識の様式は多様であることが明らかとなった。MHC クラス II 分子へのペプチド結合モチーフの多様性, 及び Th によるペプチド-MHC 複合体認識の多様性によって, 多種多様な認識様式を示す Th が出現しうる可能性があり, このことから, 腫瘍あるいはウイルスが, 標的抗原の変異によって免疫系の監視をから逃れる可能性を小さくしていることが考えられる。

- Th 標的抗原ペプチドの他のウイルス由来あるいは自己抗原ペプチドとの抗原特異性決定

CTL の標的抗原となる p71-79 及び p75-83 については FMR murine leukemia virus のすべてが共通に保持している(8)。Th の標的抗原については、F-MuLV と R-MuLV はペプチド i に相当する領域は全く同一で(55)、R-MuLV 誘発腫瘍はペプチド i 特異的 Th に対する抗原性については FBL-3 等の FV(F-MuLV)誘発腫瘍と同様と考えられる。f_{n20} に対応する配列は R-MuLV にはない(55)。M-MuLV の Env₁₂₀₋₁₃₈ は F-MuLV の Env₁₂₃₋₁₄₁ と全く同一であり、M-MuLV 誘発腫瘍のペプチド f_{n20} 特異的 Th に対する抗原性は FBL-3 と同様である(21)。M-MuLV の Env タンパク内には図 13 に示すように相同な配列 i_m があるが、これとペプチド i との間には交差反応性はない。

ここで F5-5 に関しては主要 TCR 残基と想定される N465(ペプチド i での Y475)を tyrosine に置換することでペプチド i と同等の活性を持たせることができた。但し、すべてのペプチド i 特異的 Th が N466Y の置換のみで活性を回復するわけではなく(図 16)、両ペプチドの特異性の決定には他の異なる残基の影響も少なからずあるものと考えなければならない。

ペプチド i_m は CB6F₁ マウスへの免疫によって特異的 Th を誘導することが可能であるが、その population はペプチド i で誘導したものとは重ならない。ペプチド i 特異的 Th と i_m 特異的 Th は質的に差異がある可能性があり、これが FBL-3 が容易に拒絶されるのに対して CTL の抗原性では FBL-3 と同様の MBL-2 が同系マウスに接種しても拒絶されないことの原因である可能性が考えられる。

マウスには多数の内在性ウイルス(40)が知られているが、それらの内の 1 つ AKV にコードされるペプチド i_e はペプチド i との相同性が高く、これと同じ配列が CB57BL 系統マウスと BALB/c 系統マウスの B 細胞のハイブリドーマに発現していて、それが MHC クラス II I-E^b 分子に結合することが知られている(44)。ペプチド i_e は何らかの形でペプチド i の positive selection にかかわっている可能性もあるが、ペプチド i 特異

的 Th はペプチド i_c には反応せず、はっきりしたことは不明である。但し、ペプチド i_c は自己抗原であるので、 i_c に強く反応する T 細胞は negative selection を受けて除去されていると考えられる。ペプチド i_c のペプチド i と異なる残基を i と同一の残基に置換したものの i 特異的 Th クローン及びペプチド i 免疫マウス由来 LN 細胞の反応性を調べた結果、 i_c の改変により活性を回復させることは困難であった。このことから考えて、ペプチド i_c そのものに反応する T 細胞のみではなく、更に広い範囲で negative selection が行われており、ペプチド i_c と類似のペプチドに対して反応する T 細胞の population が除去されている可能性が高い。

- まとめ

FBL-3 は免疫原性が強く、またウイルス誘発腫瘍であることから腫瘍抗原の由来がはっきりしており、免疫系による腫瘍拒絶の系を解析するために都合が良い。既に FBL-3 特異的 Th のクローンは 4 つ樹立されており、それらの認識する標的抗原ペプチドも同定を行い(21), 更にそれらの Th による認識機構についての詳細な解析も行った(参考論文 1, 本研究)。本研究で取り上げたペプチド i は、先に参考論文 1 の中で詳細に解析したペプチド f_{n20} と並んで腫瘍抗原として同定されている数少ない Th 標的抗原ペプチドである。Th の腫瘍拒絶における重要性はいくつか指摘されているところであり(16, 49, 50), FBL-3 特異的 Th の標的抗原ペプチドの認識の詳細を解明することは、ペプチド腫瘍ワクチン開発の上で有意義である。

また、この系は免疫系によるウイルス排除の系としてみた場合にも興味深いものがある。ウイルス感染細胞の排除には CTL がその主要な役割を担い、抗原特異的に感染細胞を殺傷する。またウイルス粒子そのものは B 細胞が分泌する中和抗体が無毒化する。ところがそれらの直接ウイルス排除に働く効果細胞を制御しているのは Th である。CTL 標的抗原ペプチドのみの接種では有効に CTL を誘導し得ず、Th 標的抗原ペプチドとの併用によって効率的に CTL が誘導された例がこれまでに知られている(47)。また、本研究における F-MuLV の系のペプチド i はそれ単独で FV に対する強い感染防御の効果を示す。ペプチド i の長さを短縮したペプチドについてはその FV に対する感染防御効果について検討中であり、現在までに 13 残基の F-MuLV $Env_{467-479}$ で十分な感染防御効果があり、12 残基の $Env_{468-479}$ で効果が見られなくなるという結果が得られており(宮澤ら, 私信), *in vitro* における Th に対する増殖効果と良い相関が見られる。ペプチド f_{n20} でも FV に対するある程度の防御効果は存在したが、ペプチド i と脾腫の発症経過等を比較するとその効果は弱かった(参考論文 3)。この効果の差が何に由来するかは不明であるが、免疫した際に誘導される T 細胞のサイト

カインの産生パターンに両ペプチドで違いがある可能性があり、このことと、ペプチド f_{n20} と比較した場合の i のワクチン効果の高さが関連があることも考えられる。ペプチド f_{n20} の修飾によりペプチド i と同等の効果を持たせるようなことが可能であれば、ペプチドワクチンの設計において重要な指針を与えるものと考えられ、今後の検討課題である。

これら FBL-3 腫瘍特異的 T 細胞の抗原解析によって、MHC 分子へのペプチドの結合におけるモチーフの多様性と、ペプチド-MHC 複合体の T 細胞による認識の多様性が明らかとなった。MHC 分子へのペプチドの結合モチーフを用いて T 細胞抗原解析を行う方法(17)は容易ではあるが、本研究における標的抗原ペプチドのように、疎水性が強く、MHC への結合モチーフが他の親水性ペプチドと異なることが想定される MHC クラス I 結合ペプチドや、多様な結合モチーフを持ちうる MHC クラス II 結合ペプチドは探索する事が困難であるという弱点を持つ。これを解決する方法として、腫瘍抗原の場合、細胞表面 MHC 分子に結合しているペプチドを抽出して解析する方法(54)や、腫瘍の cDNA ライブラリーを transient に抗原提示細胞に発現させてスクリーニングする方法(20)等も考えられる。

ペプチドワクチンとして臨床応用する場合、このようにして得られた標的抗原であっても、これまではそれが結合し得る MHC を持つ限られた患者でなければ適用できないと考えられていたが、実際には 1 つのペプチドは、様々なハプロタイプの MHC 分子に結合し得る場合があることが明らかにされている(9)。このことから、同定された T 細胞標的抗原ペプチドが広範囲にペプチドワクチンとして使用し得る可能性があり、その意味でも標的抗原ペプチドの結合様式とその多様性を明らかにする本研究は意義深いものと考えられる。

参考文献

1. **Bartnes, K., F. Leon, J. P. Briand, P. J. Travers, and K. Hannestad.** 1997. A novel first primary anchor extends the MHC class II I-A^d binding motif to encompass nine amino acids. *Int. Immunol.* **9**:1185-1193.
2. **Berenson, J. R., A. B. Einstein, Jr., and A. Fefer.** 1975. Syngeneic adoptive immunotherapy and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia: requirement for T cells. *J. Immunol.* **115**:234-238.
3. **Bernstein, I. D., D. E. Thor, B. Zbar, and H. J. Rapp.** 1971. Tumor immunity: tumor suppression in vivo initiated by soluble products of specifically stimulated lymphocytes. *Science.* **172**:729-731.
4. **Busch, R., and J. B. Rothbard.** 1990. Detection of peptide-MHC class II complexes on the surface of intact cells. *J. Immunol. Methods.* **134**:1-22.
5. **Carson, R. T., K. M. Vignali, D. L. Woodland, and D. A. Vignali.** 1997. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity.* **7**:387-399.
6. **Chen, W., H. Qin, B. Chesebro, and M. A. Cheever.** 1996. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. *J. Virol.* **70**:7773-7782.
7. **Chesebro, B., M. Miyazawa, and W. J. Britt.** 1990. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. *Annu. Rev. Immunol.* **8**:477-499.

8. **Corbin, A., A.-C. Prats, J. L. Darlix, and M. Sitbon.** 1994. A nonstructural gag-encoded glycoprotein precursor is necessary for efficient spreading and pathogenesis of murine leukemia viruses. *J. Virol.* **68**:3857-3867.
9. **Doolan, D. L., S. L. Hoffman, S. Southwood, P. A. Wentworth, J. Sidney, R. W. Chesnut, E. Keogh, E. Appella, T. B. Nutman, A. A. Lal, D. M. Gordon, A. Oloo, and A. Sette.** 1997. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by multiple HLA-A and HLA-B supertype alleles. *Immunity.* **7**:97-112.
10. **Dryland, A., and D. C. Sheppard.** 1986. A system for solid phase synthesis under low pressure continuous flow conditions. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I.* **1986**:125-135.
11. **Engelhard, V. H.** 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:181-207.
12. **Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanović, G. Jung, and H.-G. Rammensee.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* **351**:290-296.
13. **Feltkamp, M. C. W., H. L. Smits, M. P. M. Vierboom, R. P. Minnaar, B. M. de Jongh, J. W. Drijfhout, J. T. Schegget, C. J. M. Melief, and W. M. Kast.** 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur. J. Immunol.* **23**:2242-2249.
14. **Friend, C.** 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J. Exp. Med.* **105**:307-318.

15. **Gotohda, T., K. Ogasawara, P. P. Wambua, and K. Onoe.** 1991. Analysis of functional sites on a peptide antigen, p43-58, in I-A or I-E-restricted T cell responses. *Int. Immunol.* **3**:503-509.
16. **Greenberg, P. D.** 1991. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv. Immunol.* **49**:281-355.
17. **Hill, A. V., J. Elvin, A. C. Willis, M. Aidoo, C. E. Allsopp, F. M. Gotch, X. M. Gao, M. Takiguchi, B. M. Greenwood, A. R. Townsend, and et al.** 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* **360**:434-439.
18. **Hirama, T., S. Takeshita, Y. Matsubayashi, M. Iwashiro, T. Masuda, K. Kuribayashi, Y. Yoshida, and H. Yamagishi.** 1991. Conserved V(D)J junctional sequence of cross-reactive cytotoxic T cell receptor idiotype and the effect of a single amino acid substitution. *Eur. J. Immunol.* **21**:483-488.
19. **Hyldig-Nielsen, J. J., L. Schenning, U. Hammerling, E. Widmark, E. Heldin, P. Lind, B. Servenius, T. Lund, R. Flavell, J. S. Lee, J. Trowsdale, P. H. Schreier, F. Zablitzky, D. Larhammar, P. A. Peterson, and L. Rask.** 1983. The complete nucleotide sequence of the I-E α^d immune response gene. *Nucleic. Acids Res.* **11**:5055-5071.
20. **Ikeda, H., N. Ohta, K. Furukawa, H. Miyazaki, L. Wang, K. Kuribayashi, L. J. Old, and H. Shiku.** 1997. Mutated mitogen-activated protein kinase: a tumor rejection antigen of mouse sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:6375-6379.

21. **Iwashiro, M., T. Kondo, T. Shimizu, H. Yamagishi, K. Takahashi, Y. Matsubayashi, T. Masuda, A. Otaka, N. Fujii, A. Ishimoto, M. Miyazawa, M. N. Robertson, B. Chesebro, and K. Kuribayashi.** 1993. Multiplicity of virus-encoded helper T-cell epitopes expressed on FBL-3 tumor cells. *J. Virol.* **67**:4533-4542.
22. **Jorgensen, J. L., P. A. Reay, E. W. Ehrich, and M. M. Davis.** 1992. Molecular components of T-cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:835-873.
23. **Kaiser, E., R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. I. Cook.** 1970. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**:595-598.
24. **Kappler, J., J. White, D. Wegmann, E. Mustain, and P. Marrack.** 1982. Antigen presentation by Ia⁺ B cell hybridomas to H-2-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**:3604-3607.
25. **Khanna, R., S. R. Burrows, D. J. Moss, and S. L. Silins.** 1996. Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A: implications for cytotoxic T-lymphocyte control of EBV-associated malignancies. *J. Virol.* **70**:5357-5362.
26. **Klavinskis, L. S., J. L. Whitton, E. Joly, and M. B. Oldstone.** 1990. Vaccination and protection from a lethal viral infection: identification, incorporation, and use of a cytotoxic T lymphocyte glycoprotein epitope. *Virology.* **178**:393-400.
27. **Kyte, J., and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.

28. **Li, J. P., A. D. D'Andrea, H. F. Lodish, and D. Baltimore.** 1990. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. *Nature*. **343**:762-764.
29. **Liu, T., X. Zhou, C. Orvell, E. Lederer, H. G. Ljunggren, and M. Jondal.** 1995. Heat-inactivated Sendai virus can enter multiple MHC class I processing pathways and generate cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* **154**:3147-3155.
30. **Ljunggren, H. G., N. J. Stam, C. Öhlen, J. J. Neefjes, P. Höglund, M.-T. Heemels, J. Bastin, T. N. Schumacher, A. Townsend, K. Kärre, and H. Ploegh.** 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature*. **346**:476-480.
31. **Matis, L. A., S. Shu, E. S. Groves, S. Zinn, T. Chou, A. M. Kruisbeek, M. Rosenstein, and S. A. Rosenberg.** 1986. Adoptive immunotherapy of a syngeneic murine leukemia with a tumor-specific cytotoxic T cell clone and recombinant human interleukin 2: correlation with clonal IL 2 receptor expression. *J. Immunol.* **136**:3496-3501.
32. **Matsubayashi, Y., T. Hirama, A. Morioka, M. Iwashiro, T. Masuda, H. Uchino, S. Takeshita, H. Yamagishi, H. Udono, M. Mieno, E. Nakayama, H. Shiku, A. Uenaka, and K. Kuribayashi.** 1990. Participation of a dominant cytotoxic T cell population defined by a monoclonal antibody in syngeneic anti-tumor responses. *Eur. J. Immunol.* **20**:2095-2103.
33. **McCoy, J. L., A. Fefer, and J. P. Glynn.** 1967. Comparative studies on the induction of transplantation resistance in BALB/c and C57BL/6 mice in three murine leukemia systems. *Cancer Res.* **27**:1743-1748.

34. **Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari, and L. Moretta.** 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:619-648.
35. **Nanda, N. K., K. K. Arzoo, H. M. Geysen, A. Sette, and E. E. Sercarz.** 1995. Recognition of multiple peptide cores by a single T cell receptor. *J. Exp. Med.* **182**:531-539.
36. **Ogasawara, K., P. P. Wambua, T. Gotohda, and K. Onoe.** 1990. Modification of the T cell responsiveness to synthetic peptides by substituting amino acids on agretopes. *Int. Immunol.* **2**:219-224.
37. **Pircher, H., D. Moskophidis, U. Rohrer, K. Burki, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel.** 1990. Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature.* **346**:629-633.
38. **Prats, A.-C., G. De-Billy, P. Wang, and J. L. Darlix.** 1989. CUG initiation codon used for the synthesis of a cell surface antigen coded by the murine leukemia virus. *J. Mol. Biol.* **205**:363-372.
39. **Rammensee, H.-G., K. Falk, and O. Rötzschke.** 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:213-244.
40. **Risser, R., J. M. Horowitz, and J. McCubrey.** 1983. Endogenous mouse leukemia viruses. *Annu. Rev. Genet.* **17**:85-121.
41. **Rothbard, J. B., and M. L. Gefter.** 1991. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:527-565.
42. **Ruan, K. S., and F. Lilly.** 1991. Identification of an epitope encoded in the env gene of Friend murine leukemia virus recognized by anti-Friend virus cytotoxic T lymphocytes. *Virology.* **181**:91-100.

43. **Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow, and C. A. Janeway, Jr.** 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. **353**:622-627.
44. **Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, B. K. al-Ramadi, J. Rothbard, and C. A. Janeway, Jr.** 1992. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature*. **359**:429-431.
45. **Russell, J. H., V. Masakowski, T. Rucinsky, and G. Phillips.** 1982. Mechanisms of immune lysis. III. Characterization of the nature and kinetics of the cytotoxic T lymphocyte-induced nuclear lesion in the target. *J. Immunol.* **128**:2087-2094.
46. **Schumacher, T. N. M., M.-T. Heemels, J. J. Neefjes, W. M. Kast, C. J. M. Melief, and H. L. Ploegh.** 1990. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell*. **62**:563-567.
47. **Shirai, M., M. Chen, T. Arichi, T. Masaki, M. Nishioka, M. Newman, T. Nakazawa, S. M. Feinstone, and J. A. Berzofsky.** 1996. Use of intrinsic and extrinsic helper epitopes for in vivo induction of anti-hepatitis C virus cytotoxic T lymphocytes (CTL) with CTL epitope peptide vaccines. *J. Infect. Dis.* **173**:24-31.
48. **Smith, M. H., K. S. Lam, E. M. Hersh, M. Lebl, and W. J. Grimes.** 1994. Peptide sequences binding to MHC class I proteins. *Mol. Immunol.* **31**:1431-1437.
49. **Stuhler, G., and S. F. Schlossman.** 1997. Antigen organization regulates cluster formation and induction of cytotoxic T lymphocytes by helper T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:622-627.
50. **Stuhler, G., and P. Walden.** 1994. Recruitment of helper T cells for induction of tumour rejection by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* **39**:342-345.

51. **Troxler, D. H., S. K. Ruscetti, and E. M. Scolnick.** 1980. The molecular biology of Friend virus. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**:305-324.
52. **Udaka, K.** 1996. Decrypting class I MHC-bound peptides with peptide libraries. *TIBS.* **21**:7-11.
53. **Udaka, K., K.-H. Wiesmüller, S. Kienle, G. Jung, and P. Walden.** 1996. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J. Immunol.* **157**:670-678.
54. **Uenaka, A., T. Ono, T. Akisawa, H. Wada, T. Yasuda, and E. Nakayama.** 1994. Identification of a unique antigen peptide pRL1 on BALB/c RL σ^1 leukemia recognized by cytotoxic T lymphocytes and its relation to the Akt oncogene. *J. Exp. Med.* **180**:1599-1607.
55. **Vogt, M., C. Haggblom, S. Swift, and M. Haas.** 1985. Envelope gene and long terminal repeat determine the different biological properties of Rauscher, Friend, and Moloney mink cell focus-inducing viruses. *J. Virol.* **55**:184-192.
56. **York, I. A., and K. L. Rock.** 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:369-396.
57. **Young, A. C., W. Zhang, J. C. Sacchettini, and S. G. Nathenson.** 1994. The three-dimensional structure of H-2D^b at 2.4 Å resolution: implications for antigen-determinant selection. *Cell.* **76**:39-50.
58. **Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty.** 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* **27**:51-177.

謝辞

本研究を遂行するに当たり、全般に渡り御指導いただいた山岸秀夫博士に感謝の意を表します。細胞免疫学の研究を行うに当たっての設備的な面の御尽力だけでなく、その他私の様々な我が儘を快く許容して下さったことは感謝にたえません。研究室生活の上で良き指導者として相談相手となっていたいただいた井口八郎博士、有益な御助言をいただいた宇高恵子博士にも感謝の意を表します。

研究の進め方で様々な助言をしていただいたのみならず、材料をいつも快く提供していただいた三重大学医学部の栗林景容博士、保富康宏博士はじめ生体防御医学講座の諸氏には大変お世話になりました。また、ペプチド合成・分子量測定については京都大学大学院薬学研究科薬品製造学講座の藤井信孝博士、玉村啓和博士、生化学講座の川寄敏祐博士、中谷貴子氏はじめ多くの方の御協力を得ました。また近畿大学医学部の宮澤正顕博士、東京工業大学生命理工学部の竹下淳博士にも様々な御助言をいただきました。Th の増殖実験等では京都大学放射線同位元素総合センターの方々に大変お世話になりました。京都大学大学院理学研究科生物科学専攻動物学系の稲葉カヨ博士には設備の利用などで様々な便宜を図っていただきました。これらの方々に感謝の意を表します。

実験に当たって多大な協力を受けた当研究室の大学院生・研究生の諸氏にも感謝の意を表します。特に岩波礼将氏には本研究において多大の貢献を為していただいたことを記して謝意を表したいと思います。

その他、円滑に研究を進めるに当たっては、私を励まし勇気づけてくれた友人たちや、陰で支えてくれた家族の存在も大きいものでした。ここに感謝の意を表します。

以上の方々、並びに私の研究を支えてくれたすべての方々に対して深甚なる感謝の意を捧げたいと思います。本当に有り難うございました。