

氏 名	かわ 河 原 まさ 真 ひろ 大
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3110 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Identification of HLA class I-restricted tumor-associated antigens in adult T cell leukemia cells by mass spectrometric analysis. (質量分析計を用いた成人 T 細胞白血病における HLA 拘束性腫瘍抗原の同定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 生 田 宏 一 教 授 松 岡 雅 雄 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】近年、癌ペプチド療法をはじめとする腫瘍特異的免疫療法は悪性腫瘍に対する新しい治療法として脚光を浴びつつある。しかし、血液腫瘍領域においては極少数の腫瘍抗原（WT1 など）に対してのみであり、かつ少数の HLA class I に限られている（A0201 もしくは A2402のみである）。一方、成人 T 細胞白血病（ATL）は難治性の血液腫瘍で、ウィルス由来蛋白である Tax に対する腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の誘導が近年報告され、その免疫原性が注目されているが、そもそも大半の ATL 症例で Tax の発現は認められていない。本研究では、質量分析計（LC/MS）を用いて、ATL 細胞上の各 HLA に拘束される抗原を網羅的に解析し、ATL 細胞における新規腫瘍抗原の探索を試みた。

【方法と結果】3 種類の ATL 細胞株（サザンプロット法で患者白血病細胞と同一クローンであることが証明されている株）を大量培養し、lysate を作成した後、W6/32（Anti-HLA class I monoclonal Ab）を用いた免疫沈降で HLA class I 拘束性ペプチドを回収し、nano-capillary LC/MS にて解析を行った。合計188個の HLA 拘束性ペプチドが同定され、次に RT-PCR 法にてそれらの親蛋白の発現プロファイルを正常 CD4+T 細胞と比較し、強発現を認めた10個のペプチドを新規腫瘍抗原候補とした。さらに、特に発現の強かった5個の候補蛋白について症例サンプルにおける発現量の検討を行い、一部の ATL 症例で強い発現を認めた（いずれもこれまで報告のないものばかりであった）。さらに、それらの候補蛋白のうち、癌/精巣抗原として知られる PRAME（preferentially expressed antigen in melanoma）の HLA-B*62 拘束性ペプチド GQHLHLETF を同定していたので、それを用いて免疫原性を確認するため、HLA-B*62 陽性ドナーから CTL の誘導を試みた。その結果、HLA-B*62 陽性 PRAME 陽性の ATL 3 株全てに対して細胞障害活性を認め、HLA-B*62 陰性 PRAME 陽性 ATL 株には細胞障害活性を認めない CTL を誘導することに成功した。さらに、それから樹立した CTL クローンは、PRAME ペプチドを添加した同一ドナー由来 PHA blast に対して強い細胞障害活性を認めその特異性を確認した。

【結論】HLA 拘束性腫瘍抗原の同定は、腫瘍特異的免疫療法を行う上での重要な第一歩である。本研究では、ある特定の蛋白、HLA に捉われることなく ATL 細胞上の HLA class I に提示されるペプチドを網羅的に解析し、そのデータに遺伝子発現解析を補足的に使用するという方法で、新たな腫瘍抗原由来の CTL エピトープ候補として10個のペプチドを同定した。また、その内の1つに関して、合成ペプチドを用いて健常人ドナーより class I 拘束性、抗原特異的な CTL を誘導できることを示した。この方法は、直ちに臨床応用可能なテクノロジーであり、テラーメード型免疫治療を実現する上で非常に有力な方法であると思われる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、難治性造血器腫瘍に対する新しい治療法として腫瘍特異的免疫療法が試みられているが、特定の HLA（A*0201, A*2402）や、特定の標的蛋白（WT1 など）に限られるなど問題も多い。そこで本研究は、難治性白血病の一つである成人

T細胞白血病(ATL)の細胞株をモデルとして、各々のHLAに提示されるペプチド群(ペプチドーム)を網羅的に解析したものである。具体的には、3種類のATL細胞株から抗HLA class-Iモノクローナル抗体を用いてHLA class-I分子を免疫沈降し、弱酸処理にてHLAに拘束されているペプチドを遊離させペプチドームを得た。次に質量分析計により直接的にそれらのシーケンスを同定し、その中でATLに強発現する蛋白に由来するものをATL関連HLA拘束性腫瘍抗原ペプチドとした。更に、その中の一つのHLA-B*62拘束性PRAMEペプチドに関して、健常人ドナーからHLA-B*62拘束性、PRAME特異的な細胞傷害性T細胞のin vitroでの誘導に成功し、実際に白血病細胞を殺傷しうることを証明している。これらの結果は、腫瘍抗原を用いた免疫治療を目指すうえで重要な研究成果である。また本方法を臨床検体に適用できるようになれば、患者個々人の白血病細胞に適したテーラーメイド型免疫治療の実現につながる可能性も示しており、今後の腫瘍特異的免疫療法の発展に寄与するものと思われる。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成19年2月6日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。