

●ファイザーフェローシップ報告

精巣上皮特異的分泌蛋白である EP2c は腫瘍抗原を抗原提示させ、
腫瘍免疫を成立させる

住友 賢哉

はじめに

Epididymis-specific secretory proteins, epididymis protein 2 type C (EP2c) はアンドロゲン依存性蛋白で精子に結合し、精子形成に関係している。ヒト EP2c 遺伝子は chromosome 8 (8p23) に位置し抗菌ペプチドであるβ-defensin 遺伝子とクラスターを形成している。Defensin は貪食細胞と肥満細胞に遊走作用を持ち、CCL20 (MIP3α) の受容体である CCR6 によって、未分化樹状細胞の活性化は促される。それゆえ、EP2c は chemokine receptors を介して未熟な樹状細胞を活性化させると仮定し実験を行った。

研究目的

粘膜免疫におけるキャリアとして EP2c を利用できるかどうか検討した。すなわち、抗菌作用を持つβ-defensin 様のペプチドである EP2c が未知の受容体を介して免疫細胞を活性化させ、さらに EP2c と融合した抗原が MHC Class I & II を通じて粘膜免疫における抗原提示細胞への標的とする可能性を検証する。

Materials and Methods

1. MHC Class II presentation

Wild-type BALB/c splenocytes were incubated with 0.01–1 μg/ml murine or human EP2c peptide fused with VL315 (VL from MOPC315 plasmacytoma cells, Igλ chain) O/N. Splenocytes were washed, irradiated, and mixed with BALB/c CD4⁺ T cell clone 7A10B2, which recognizes processed epitope λ91–101. IFN-γ secretion was measured after 24 h of incubation. Control splenocytes were incubated with VL315 fused with VH fragment (sFv315), with (mDF1β), or with murine macro-

phage inflammatory protein IIIα (mMIP3α).

2. MHC Class I presentation

Wild-type C57BL/6 of tibia were purified from bone marrow dendritic cells, and incubated with EP2c fusion protein and/or inhibitors. From TCR, transgenic pmel-1 mouse splenocytes were concurrently purified and co-culture with dendritic cells and splenocytes, and the IFN-γ was measured by ELISA.

3. Procedure of receptor binding assay

B6/129: mouse macrophage, RAW264.7: virus transformed BALB/c mouse macrophage, HEK293/mCCR6: human adenovirus E1 transformed embryonal kidney, THP-1: human acute monocytic leukemia, CCRF-CEM: human T acute lymphoblastic leukemia, MOLT-4: human T acute lymphoblastic leukemia, A20: mouse B cell lymphoma, and C57BL/6: mice bone marrow dendritic cell lines were purchased from ATCC (American Type Culture Collection). Harvest cells 0.5×10^6 /tube. Incubate 50 μl of 50 μg/ml of fusion protein or control protein on ice. Incubate 10% goat serum/PBS/0.1% azide on ice. Add 1:300 Anti c-myc Ab on ice. Add 1:50 Anti mouse FITC-IgG Ab on ice. Analyze by FACS.

4. Chemokine fusion vaccination elicits antitumor responses in BALB/c mice

Eight or 10 mice per group were electroporate immunized three times over a two-week interval with mEP2cOFApCMVE or PBS. Four days before the last immunization, the mice were challenged subcutaneously with A20 (TIB-208; BALB/cAnN B cell lymphoma) cells.

Tumor growth was subsequently assessed, and mice with tumors greater than 400 mm² were euthanized.

結 果

1. EP2c は細胞表面にある受容体に結合し、腫瘍抗原を MHC Class II へ提示する

Epididymis-specific secretory proteins, epididymis

連絡先：住友 賢哉
〒783-8509 高知県南国市明見字中野 526-1
JA 高知病院内科
(E-mail: kenyasum@gmail.com)

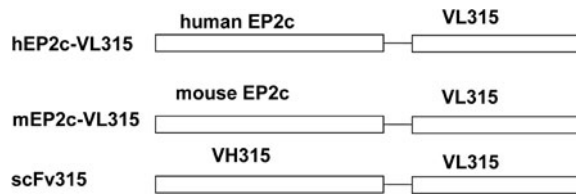


Fig. 1 Schema of constructs to study MHC Class II presentation. Human or mouse EP2c was linked in frame with VL315, a plasmacytoma MOPC315 immunoglobulin-delivered variable light (VL)-chain fragment, which contained CD4⁺ T cell epitope λ 91-101. Control construct is single chain antibody (scFv), which is contained in frame fusions of both VH and VL fragments of Ig from MOPC315.

protein 2 (EP2) はアンドロゲン依存性蛋白ファミリーで精子と結合し精子の成熟に関係していると考えられている。ヒト EP2 遺伝子は染色体 8 番 (8p23) に位置し抗菌ペプチドである β -defensin 遺伝子と一群を形成している。EP2 遺伝子は副睾丸に強く発現し、spliced form である EP2c は β -defensin 様の特徴と関連があると考えられている。しかし EP2c の免疫細胞での役割は不明である。最近我々は、 β -defensin が chemokine receptor である CCR6¹⁾ を介して免疫細胞の誘導を行い、未熟な樹状細胞が TLR-4²⁾ を介して成熟することを見いだした。さらに免疫原性のない自己の腫瘍抗原が β -defensin や chemokine との融合蛋白により免疫原性が回復することを示し¹⁾、マウス同系腫瘍モデルに対する予防的治療的効果を示した¹⁾³⁾。chemokine の融合蛋白は、chemokine receptor を介して抗原を効率的に細胞内へ取り込み、MHC Class I & II を通じて抗原提示を行い、CD4⁺ CD8⁺ T 細胞を反応させる¹⁾⁴⁾⁵⁾。これらの方法は chemoattractant の種類に依存して免疫反応の調整を可能とする。たとえば成熟樹状細胞を chemoattract する恒常性 chemokine である SLC, SDF1 ではなく、未熟樹状細胞を標的とする β -defensin 2 や炎症性 chemokine の融合組換え体は中等度の humoral responses を引き起こすが、強い予防的治療的抗腫瘍効果を発揮する。対照的に、いわゆる Th2 chemokine は細胞傷害性 T cell 反応を誘導することはできないが、抗体の産生には優れている¹⁾。そのため EP2c ペプチドは、粘膜の抗原提示細胞に抗原を提示する能力があると仮定した。すなわち β -defensin に類似する EP2c は chemokine receptor を介して抗原提示細胞に結合し MHC Class I & II を通じて抗原処理を効率的に行うことができると考えた。加えて腫瘍抗原である VL315 や plasmacytoma MOPC315 由来 variable light (VL)-chain fragment (Fig. 1) と融合した EP2c (ヒト、マウスともに) は、特異的に VL315 を MHC Class

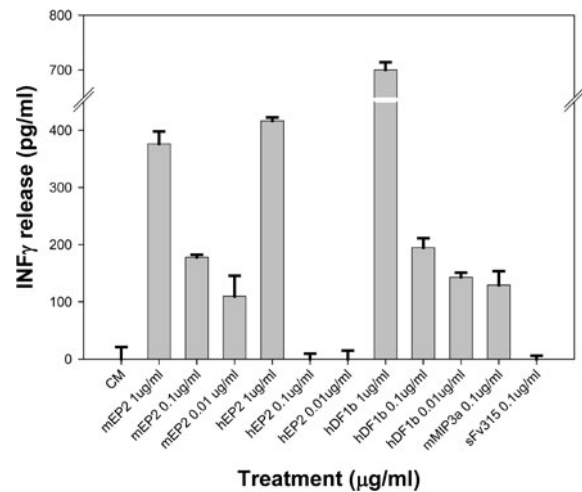


Fig. 2 Both human and murine EP2c can deliver antigens to MHC Class II processing pathway. Murine splenocytes from BALB/c mice were incubated with 1-0.01 μ g/ml murine or human EP2c fused with VL315 (mEP2 and hEP2, respectively) overnight. The splenocytes were then washed and irradiated and mixed with CD4⁺ T cells, which recognized that processed epitope λ 91-101. IFN- γ secretion was measured after 48 h of incubation. Control splenocytes were incubated with VL315 fused with VH fragment (sFv315), with mDF1 β , or with mMIP3 α .

II 経路へ運び CD4⁺ T 細胞を刺激することを示した (Fig. 2)。それゆえ、これらの結果から EP2c は細胞表面の受容体に結合することができ、抗原提示細胞に抗原を発現し抗原提示を促進すると考えられた。

2. EP2c は腫瘍抗原の MHC Class I processing を促進する (cross-presentation)

殺傷性 CD8⁺ T 細胞反応の誘導は、腫瘍や慢性炎症疾患の治療の鍵である。CD8⁺ T 細胞反応は抗原を処理し MHC Class I に提示する。外因性の抗原は MHC Class I 処理経路にはほとんど到達しない、これを cross-presentation と呼んでいる。我々の最近の結果にもかかわらず、抗原が融合体として β -defensin や β -defensin に類似する EP2c を輸送するとしたならば、cross-presentation 経路が効率的に利用されるだろう。Cross-presentation を研究するため gp100 と融合した EP2c を作製した (Fig. 3)。gp100 は melanoma/melanocyte 分化自己抗原である。我々は共同研究者である National Cancer Institute の Dr. Nicolaus Restifo から、V α 1V β 13 T cell receptor を発現している transgenic mice pmel-1 を提供していただいた。この T cell receptor は mouse and human gp100 epitope を MHC Class I: H-2D^b 特異的に拘束する。我々の予備実験の結果から、EP2gp100 で処理した抗原提示細胞は pmel-1 mice 由来の CD8⁺ T 細胞を刺

激することがわかっており、これは、EP2はgp100をMHC Class I処理経路に輸送することを示している (Fig. 4)。一方gp100だけではCD8⁺ T細胞を刺激するのに失敗した。さらに反応は非常に効率的でごく少量の蛋白が必要なだけであった。それゆえこれらより、EP2は抗原提示細胞の未知の受容体に特異的に結合し抗原をMHC Class I & II処理経路に輸送することが示された。EP2は粘膜で産生される。それゆえEP2は粘膜の抗原提示細胞を標的とし、ワクチンキャリアとして使用できることが示唆された。

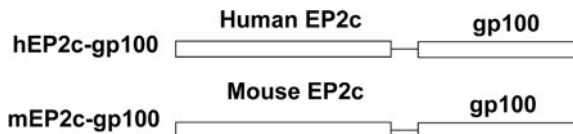


Fig. 3 Schema of constructs to study MHC Class I presentation. Human or mouse EP2c was linked in frame with gp100, a melanoma specific antigen that contained H-2D^b-restricted mouse gp100 epitope. Control protein consisted of unlinked gp100 alone.

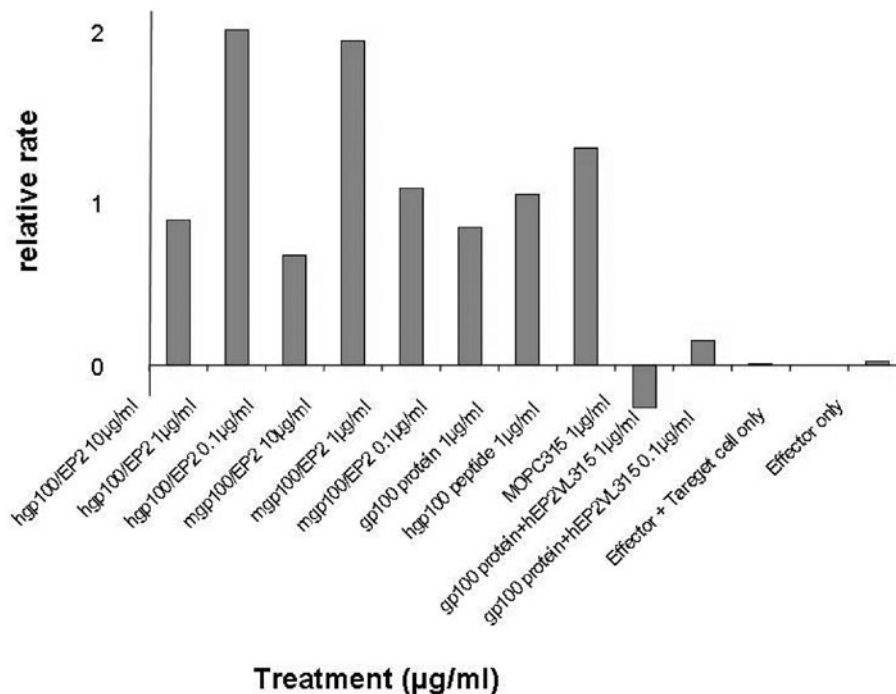


Fig. 4 Human and murine EP2c/gp100 peptide can both deliver antigens to MHC Class I processing pathway. Murine immature DCs from C57BL/6 mice were incubated with 1–0.01 µg/ml murine or human EP2c fused with gp100 (mEP2gp100 and hEP2gp100, respectively) overnight, and then DCs were washed and irradiated and mixed with CD8⁺ T cells from pmel-1 mice, which recognized processed H-2D^b-restricted epitope. IFN-γ secretion was measured after 48 h of incubation. Control DCs were incubated with unlinked gp100 alone or DCs pulsed with irrelevant peptide (MOPC315 peptide).

3. EP2c 融合蛋白の結合する受容体の検索

MHC Class I & II 処理経路における EP2c 融合蛋白による抗原輸送の経路を検討した。取り込みと抗原提示を特異的に阻害する阻害剤 [pertussis toxin (PTX), sucrose, lactocystin] を使用し、ELISA を用いて IFN-γ を測定することにより抗原提示能を検討した。EP2c は chemokine receptor に結合すると考え、受容体は G 蛋白質共役型かどうか検討した (Fig. 5)。その結果 PTX や sucrose で抗原提示が阻害されることが示され、その受容体は G 蛋白質共役型であることが示唆された。また、当初から EP2c は β-defensin と同様、chemokine receptor である CCR6 に結合することにより抗原提示を行うことが示唆されていた。そのため FACS を用いて結合能を検討したが、結合は確認できなかった。そのほか CCR4 に結合する受容体である TARC も検討したが同じく結合は確認されなかった。さらに未知の受容体があると考え、いくつかの細胞において結合の有無を検討したが確認できなかった (Fig. 6–8)。

4. *in vivo* での EP2c の DNA ワクチンとしての働き

マウスのモデルを用い、EP2c 融合蛋白もしくは DNA を皮下もしくは筋肉注射で投与し全身性 T cell 反

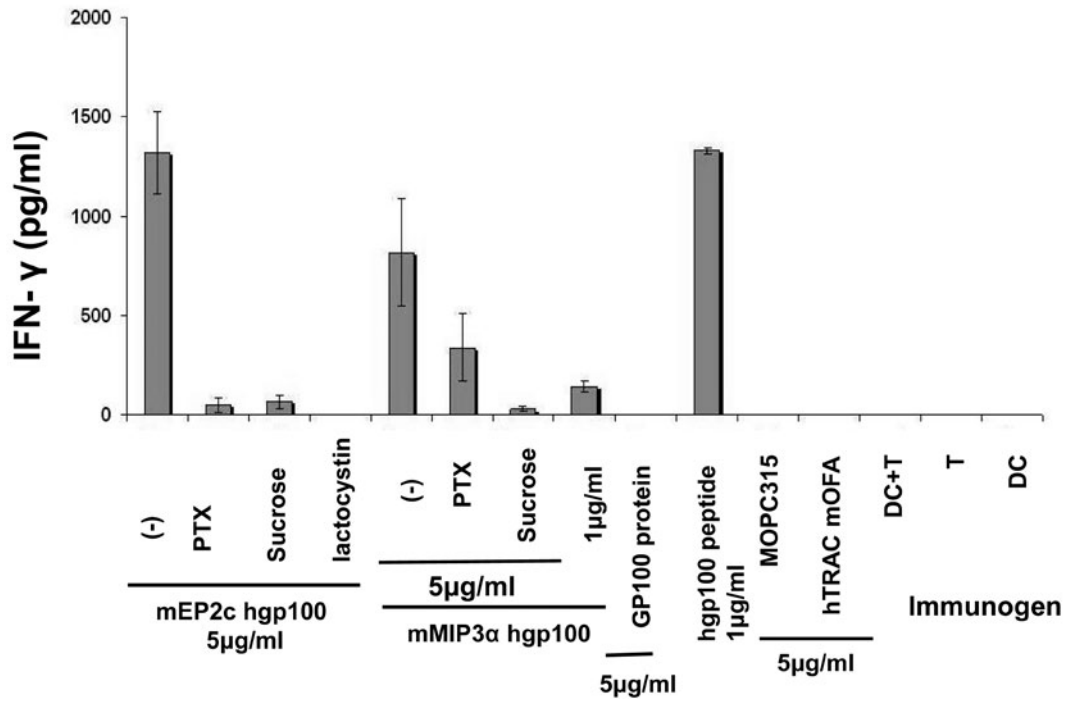


Fig. 5 MHC Class I presentation by EP2c is mediated by G-coupled receptor endocytosis.

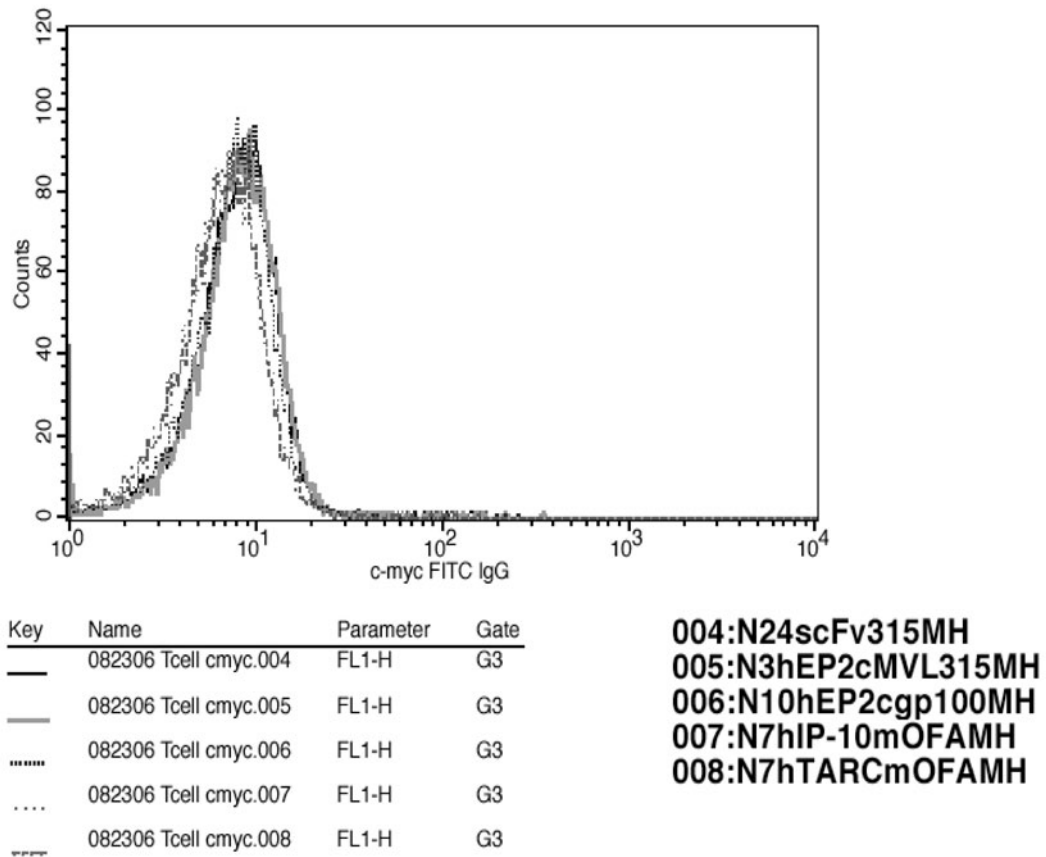
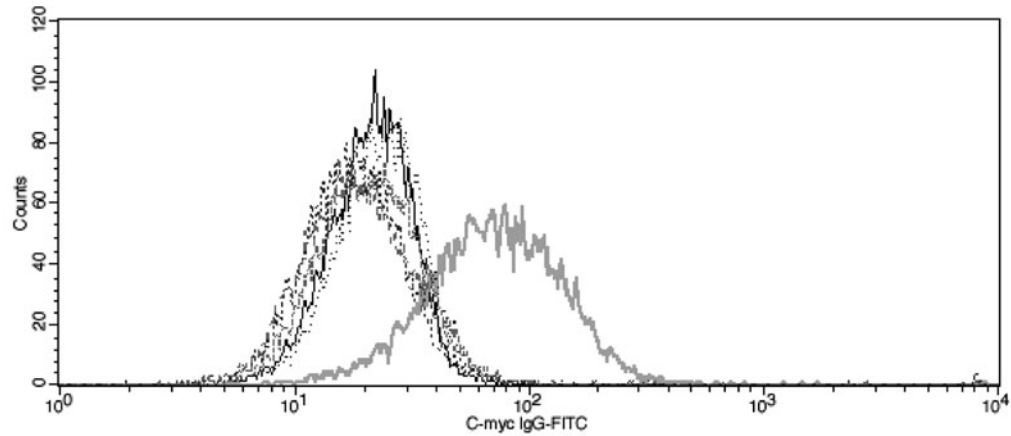


Fig. 6 Receptor-binding assay. Human T cells do not bind murine and human EP2c.

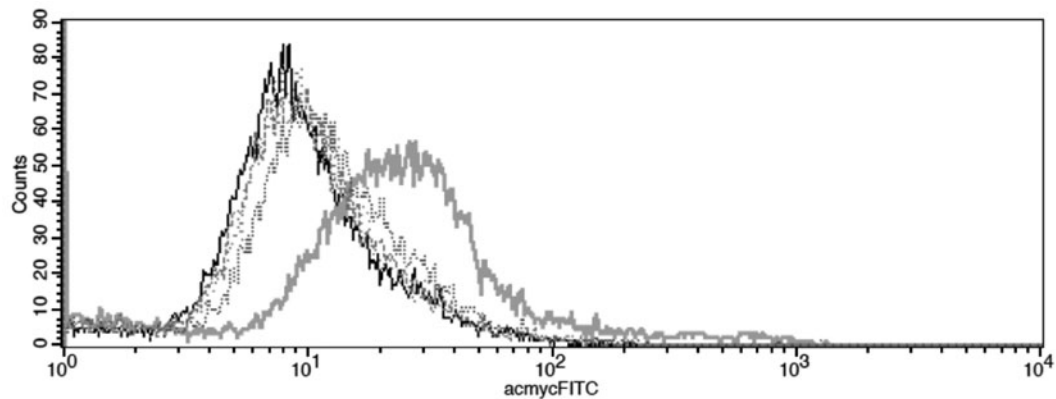


Key	Name	Parameter	Gate
—	071806 MOLT4.004	FL1-H	G2
—	071806 MOLT4.005	FL1-H	G2
⋯⋯	071806 MOLT4.006	FL1-H	G2
---	071806 MOLT4.007	FL1-H	G2
⋯⋯	071806 MOLT4.008	FL1-H	G2
---	071806 MOLT4.009	FL1-H	G2

004;scFv315MH
 005;hTARC OFAMHM
 006;hEP2cMVL315MH
 007;hEP2cgp100MH
 008;mEP2cMVL315MH
 009;mEP2cgp100MH

scFv315MH is negative control.
TARC that can bind hCCR4 is positive control.

Fig. 7 Receptor-binding assay. CCRF-CEM (human peripheral leukemia acute lymphoblastic) cells bind hTARC, but do not bind murine and human EP2c.



Key	Name	Parameter	Gate
—	B6-129-cMyc.002	FL1-H	G2
—	B6-129-cMyc.003	FL1-H	G2
⋯⋯	B6-129-cMyc.004	FL1-H	G2
⋯⋯	B6-129-cMyc.005	FL1-H	G2
---	B6-129-cMyc.006	FL1-H	G2

002:PBS
 003:N7hIP-10mOFAMH
 004:N8mMIP3ascFv78MH
 005:N24scFv315MH
 006:N3hEP2cMVL315MH

Fig. 8 Receptor-binding assay. Mouse MIP3 α and murine EP2c show little difference compared to single-chain Fv315. Single chain is negative control.

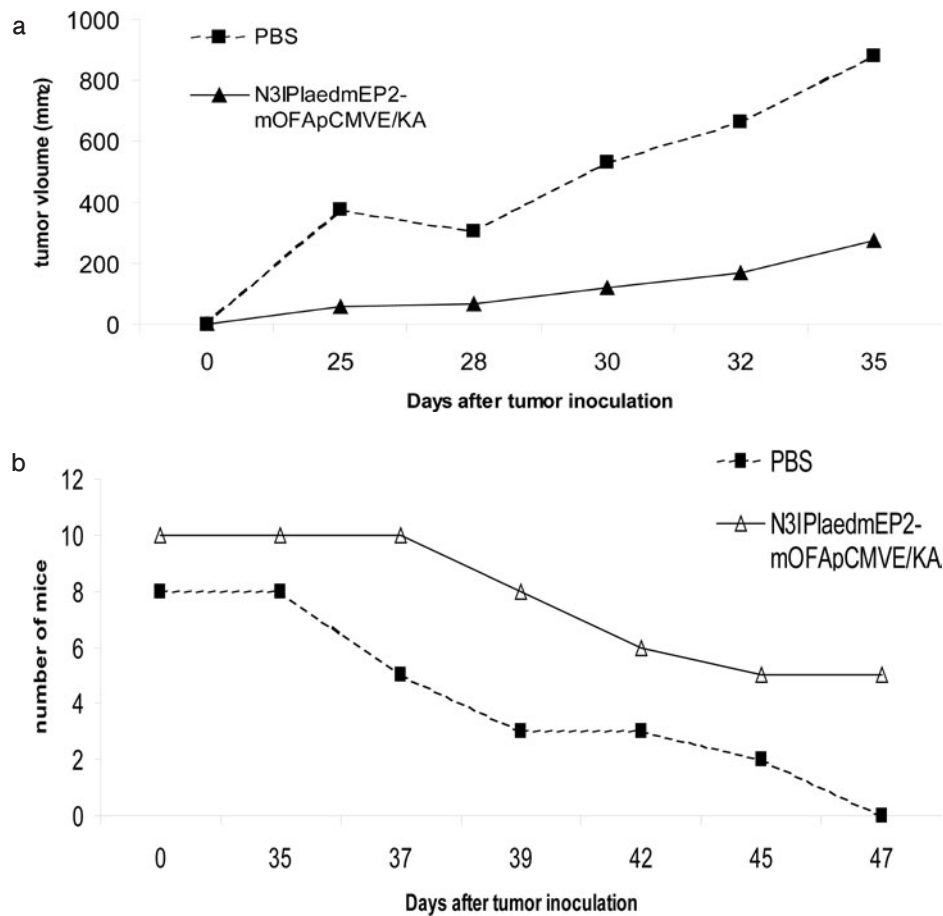


Fig. 9 (a) Vaccination with EP2-cmOFA suppresses tumor growth. (b) DNA vaccination with EP2-cmOFA improves survival.

応の有無を調べた。同時に腫瘍を皮下投与し、予防的抗腫瘍免疫能を検討した。

腫瘍径や生存曲線を検討した。その結果、治療群は有意に生存曲線、腫瘍径の改善を認め、抗腫瘍効果を期待できる結果となった (Fig. 9)。

結 語

我々の究極の目標は、理想的なワクチンキャリアの作製と粘膜免疫の誘導にある。EP2cの生物学や免疫学、すなわちEP2cの抗菌ペプチド作用、粘膜免疫細胞の活性化に注目することとなる。EP2cを介したMHC Class I & II抗原提示のメカニズムの解明は、臨床応用に重要な意味を持つであろう。腫瘍や性行為感染症 (HPV, HBV, HCV, HIV)、呼吸器感染症、腸管感染症の治療的予防的ワクチンの開発にも重要である。

引用文献

1) Biragyn A, et al. Mediators of innate immunity that

target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001; 167: 6644-53.

2) Biragyn A, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298: 1025-9.

3) Biragyn A, et al. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 253-8.

4) Schiavo R, et al. Chemokine receptor targeting efficiently directs antigens to MHC class I pathways and elicits antigen-specific CD8+ T-cell responses. *Blood* 2006; 107: 4597-605.

5) Biragyn A, et al. Chemokine receptor-mediated delivery directs self-tumor antigen efficiently into the class II processing pathway in vitro and induces protective immunity in vivo. *Blood* 2004; 104: 1961-9.