

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2008) 26巻:80～81.

HLA class I抗原／癌抗原ペプチド複合体特異的プローブの開発

片山昭公、坂東伸幸、岸部幹、高原幹、原渕保明

11. HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体特異的プローブの開発

片山昭公, 岸部 幹, 高原 幹, 坂東伸幸, 原渕保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

Development of HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ peptide complex specific probes

Katayama, A., Kishibe, K., Takahara, M., Bandoh, N., Harabuchi, Y.

Dept. of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Asahikawa Medical College

1. はじめに

癌免疫の主役をなしているのは癌細胞を認識し排除する CTL であり, その CTL による癌細胞の認識は, HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体を介して起こる¹⁾。しかしながら癌細胞膜上の HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体の発現については未だに不明な点が多く, 詳細な報告は存在しない。仮に HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体の定量ができるとすれば, (i) HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体発現メカニズムの解明 (ii) 癌ペプチドワクチン療法の施術前の治療効果予想 (iii) HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体発現をターゲットとした新たな癌免疫療法の開発などに応用可能となることが予想され, HLA class I 抗原／癌抗原ペプチド複合体を認識するプローブの開発が望まれている。そこで, 本研究ではファージディスプレイヒト単鎖抗体 (scFv) ライブラリを基に, HLA-A2/MAGE-3 271-279 ペプチド複合体特異的のプローブを開発し²⁾, affinity maturation の結果, 最終的に複数の HLA-A2(+)/MAGE-3(+)³⁾ 頭頸部扁平上皮癌細胞株を特異的に認識することができた。

2. 対象と方法

本研究に用いた単鎖抗体ライブラリは The G riffin.1 library を用いた。単鎖抗体ファージライブラリから抗原特異的なクローンを単離する方法として, HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチド複合体を固相化したマグネティックビーズを用いたパニング法を 3 ラウンド行い, 最終的に ELISA 法を用いて最も親和性の高いクローンを単離した。親和性成熟の標的として, 相補性決定領域 (CDR) セリン配列をターゲットとした。VH CDR2 の 3 つのセリン配列と, 親和性成熟に最も影響する VLCDR3 に存在するセリン配列に対してランダム遺伝子変異を導入したライブラリを構築し, 前述のパニング法を用い最も親和性成熟したクローンを単離した。親和性成熟したクローンの単鎖抗体ファージ遺伝子より可変領域を切り出しヒト IgG Fc 発現ベクターに組み込み, AG8-653 細胞にトランスフェクションし, 培養上清中

の scFv-Fc³⁾ を精製し実験に用いた。最終的にフローサイトメーターを用いて, HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチドパルスした T2 細胞, 頭頸部扁平上皮癌細胞を用いてプローブの特異的親和性をテストした。

3. 結果

単鎖抗体ライブラリ The G riffin.1 library よりパニング法により単離された HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチド複合体特異的な scFv clone 33 を用いフローサイトメトリーを行った結果, 単鎖抗体 (scFv) クローン 33 は陰性コントロールである MART1 ペプチドを負荷した T2 細胞に対しては反応性が認められませんが HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチドパルスした T2 細胞には明らかな反応性が認められたが, 反応性の確認には多量のペプチドが必要であった。抗原に対する親和性が高いとは言えず, 相補性決定領域 (CDR) セリン配列をターゲットとした親和性成熟を行った。VH CDR2 の 3 つのセリン配列と, 親和性成熟に最も影響する VLCDR3 に存在するセリン配列に対してランダム・遺伝子変異導入とパニングによるセレクションの結果, VH CDR2 ポジション 52a のセリン・アルギニン変異と VL CDR3 ポジション 109 のセリン・トリプトファン変異の 2 アミノ酸置換により, 親和性の高い scFv クローン U-16 を単離しました。scFv クローン U-16 では, scFv クローン 33 では反応性が確認できない 50ng/ml の MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチドパルス T2 細胞でも明らかな特異的反応性がフローサイトメトリーで確認された。この scFv クローン U-16 の可変領域と IgG Fc 領域の融合蛋白である scFv-Fc U16 を用いて頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞との反応性をフローサイトメトリーで行ってみたところ HLA-A2(+)/MAGE-3(+)³⁾ HNSCC 細胞に対しては明らかな反応性を示し, HLA-A2(-)/MAGE-3(+), HLA-A2(+)/MAGE-3(-), HLA-A2(-)/MAGE-3(-)³⁾ HNSCC 細胞には反応性は認められず, 結果として HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチド複合体特異的の特異的な反応性を示した。

4. 考察・結語

ヒト単鎖抗体 (scFv) ライブラリより, HLA-A2/MAGE-3 ペプチド複合体特異的な scFv クローン 33 を単離した。scFv クローン 33 の CDR 上の 2 アミノ酸置換の結果, HLA-A2/MAGE-3₂₇₁₋₂₇₉ ペプチドペプチド複合体に対してより親和性の高い scFv クローン U16 が得られた。scFv-Fc U16 は HLA-A2(+)/MAGE-3(+) HNSCC 細胞と特異的な反応性を示した。

参考文献

- 1) LinksKanaoka, S., Yamasaki, S., et al.: Induction of human leukocyte antigen (HLA)-A2-restricted and MAGE-3-gene-derived peptide-specific cytolytic T lymphocytes using cultured dendritic cells from an HLA-A2 esophageal cancer patient. *J. Surg. Oncol.* **71**: 16–21, 1999.
- 2) Wang, X., Campoli, M., et al.: Enhancement of scFv fragment reactivity with target antigens in binding assays following mixing with anti-tag monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.* **294**: 23–35, 2004.
- 3) Geng, S.S., Feng, J., et al.: Binding activity difference of anti-CD20 scFv-Fc fusion protein derived from variable domain exchange. *Cell Mol. Immunol.* **6**: 439–443, 2006.