腫瘍免疫の標的分子としての熱ショック蛋白(hsp)

田村保明・佐藤昇志*

Heat shock protein may be an immune target in the host's antitumor resistance

We identified transformation-associated cell surface antigens(TAAs)that are expressed on a W31 H-*ras* oncogene trasformant of WFB rat fibroblast. One of TAAs, defined by mAb067, showed the enhanced expression by physicochemical stressors, and was supposed to be 70 heat shock cognate protein(hsc)itself. It was also shown that this antigen may be a target for CD4⁺ CD8⁺ double negative T cell(DNT), since mAb067 completely blocks the cytotoxicity of DNT against W31.

These data strongly suggest that 70 hsc is a tumor antigen, and is a potential target for the host's tumor immunity. The capability of antigenic peptide presentation of 70 hsc was discussed.

Yasuaki Tamura・Noriyuki Sato*

key words : *heat shock protein, tumor immunity, double negative T cells, tumor antigen*

今日まで、腫瘍抗原に関する実に膨大な研究がなされているが、その物質的本態は依然として不明のままである。BoonらのグループがCTL(cytotoxic T lymphocytes)の標的分子の遺伝子を単離しているが¹⁾、この分子の細胞生物学的機能や、癌化との関連についてはやはり不明のままである。

細胞の癌化に伴って発現増量するもっとも厳密な意味での腫瘍抗原の研究は意外と少ない。宿主が個体内に発生した腫瘍細胞を非自己として認識するのならば、癌化に伴って発現する抗原が重要な役割を演じていることが十分考えられる。このことを明らかにするためにわれわれはラット胎児由来線維芽細胞(WFB)を用いて、種々の活性型癌遺伝子でWFBを形質転換させ、TAAs(transformation associated antigens)を単クローン抗体(mAb)を用いて同定し、TAAsの宿主腫瘍拒絶機

構における役割を解析してきた^{2,3)}。

その結果、70 kDa 熱ショック蛋白(hsp)が実はこのような腫瘍抗原の一つであり、腫瘍免疫を成立させる重要な蛋白であることが示唆された⁴⁾。本研究では presenting molecule としての hsp の役割を含め、hsp の腫瘍免疫での役割の解析を行った。

材料と方法

(1) 細胞, mAb

WFB は WKAH ラット胎児由来線維芽細胞であり、これに H-*ras* 癌遺伝子を移入して形質転換株 W14, W31 を得た²⁾。mAb は W31 を BALB/c マウスに免疫し、NS-1 細胞と hybridoma を作成し、FACS 上で WFB に陰性、W31 に陽性のクローン mAb109(IgG₁), mAb067(IgG₁)を得た⁴⁾。これらはそれぞれ 86 kDa, 67 kDa の単一なポリペプチドを認識した。その他、抗ラット MHC class I mAb R48B1, 抗ラット 70hsc(heat shock cognate)mAb TG5E を使用した⁵⁾。後者は英国王立癌研 Dr. LaThangue より供与された。ラット CD3, CD4, CD8 はそれぞれ mAb 1F4, RTH7, 10B5 を用いた。またラット NK 細胞抗体 3. 2. 3 mAb は Dr. DeLeo より供与された⁶⁾。

(2) ストレス処理と FACS 解析

50~70% confluent な細胞に TNF- α (100 u/ml) 6 時間, AZC (4 mM) 5 時間, sodium arsenite (40 μ M) 2 時間, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで処理し、2 度洗浄後、3 日間さらに培養した。その後、通常の方法により FACS 解析を行った。

(3) 免疫沈降, ウェスタンブロット

mAb 067 を ¹²⁵I ラベル W31, W14 と反応させ、免疫沈降物を作成し、SDS-PAGE 後、分子量を同定した。また同様な免疫沈降物を SDS-PAGE 後、ウェスタンブロットし、抗ラット 70hsc mAb である TG5E による反応性を検討した。バンドの検

* Department of Pathology, Sapporo Medical College
札幌医科大学第一病理学教室

図1 mAb067(a), 109(b)のFACSパターン

出は chemiluminescent system (Amersham, RPN2105)を使用した。

(4) double negative T細胞(DNT)による細胞障害

WKA ラットに 1mg/rat の生 BCG (Japan BCG, Inc.)を腹腔内注射後、7～10日にT細胞を分離し、CD4, CD8, 3.2.3抗体と反応させ、goat 抗 mouse Ig 結合磁気ビーズ(advanced magnetics)を用いて、CD4⁺, CD8⁺, 3.2.3⁺-T細胞(DNT)のポピュレーションを得た。これらのDNTを⁵¹CrラベルW31やWFBを標的細胞とする細胞障害試験にエフェクターとして使用した。なお、用いたBCGにはhsp70 familyが大量に含まれているのを抗 mycobacterial 70 kDa hsp mAb L7(Dr. W. Britton より供与)を用いウエスタンブロットで確認した。NK細胞は、poly IC 1mgをラット腹腔内注射し、24時間後、脾より得た⁷⁾。

(5) 細胞障害試験と brefeldin A (BFA)処理
細胞障害試験では⁵¹Crを使用した。mAbによる阻止試験では⁵¹CrラベルW31細胞をmAb067, 109, R48B1などで4℃、60分処理し、PBS洗浄後、エフェクターを加えた。BFAは⁵¹CrラベルW31細胞を2.5 μg/mlで30分、37℃前処理し、かつ細胞障害試験中もBFAを存在させることによりその効果をみた。BFAはSando Pharma AZより供与された。

結果

(1) mAb067により認識される抗原の種々ストレスによる発現増強

WFBのTAAsを認識するmAb067, 109のFACSプロフィールを図1に示す。すなわち、

図2 067抗原(a)のTNF, AZC(L-azetidine-2-carboxylic acid), ヒ素などのストレスによる発現増強, bは109抗原
.....: 2次抗体のみ, -----: 非ストレス下の抗原発現, —: ストレス処理後の抗原発現

mAb067はW31に反応するが、WFBやW14には反応しない。一方、mAb109はW31に強く、W14には中程度の反応性を示した。つぎにわれわれは、W14やW31をcAMPで4日間処理することにより、形質上WFBにリバーサさせ、TAAsの発現低下を検討した。その結果、109抗原発現低下を示したが、予想に反し、067抗原は逆にいちじるしい発現増強を示した。cholera toxinや血清濃度を1%に低下させることでも同様の結果を得た。

このような実験結果は、067抗原が70 kDa hspであることを示唆したため、つぎに、W31細胞をTNF, AZC, sodium arseniteなどでストレス処理し、mAb067, 109の反応性をFACSで解析した。その結果、図2に示すごとく、067抗原はこれらいずれのストレスでも明らかな発現増量を示した。一方、109抗原はそのような反応性はまったく示さなかった。すなわち、067抗原は強いストレス誘導性を持つことが示された。

(2) 067抗原の抗hsp mAbとの反応性

067抗原の強いストレス誘導性は、この抗原が、ラット70 kDa hspであることを示唆した。しかも、この抗原の細胞内局在をみると、ストレス処

図 3

a : ^{125}I ラベルによる 067 抗原の分子サイズ解析 (矢印は 67 kDa を示す). 1, 3 W31; 2, 4 W14 細胞; 1, 2 mAb067, 3, 4 コントロール抗体
b : (a) 1 の免疫沈降物の TG5E mAb との反応性 (矢印に TG5E との反応を示す). 1, 4 mAb067 沈降物. 2, 5, mAb109 沈降物, 3, 6 コントロール抗体

図 4 BCG プライムラット脾T細胞の WFB, W31 細胞に対する細胞障害試験
縦軸は % cytotoxicity.

理により大量に核への移行が認められた. そこで, ラット 70hsc と反応する mAb TG5E を使用して, W31 可溶化抗原と mAb067 の免疫沈降物をウエスタンブロットし, これを TG5E と反応させた. 図 3 b に示すごとく, mAb067 沈降物(図 3 a)は明らかに TG5E と反応した. すなわち, 067 抗原はラット 70hsc であることが示された.

(3) 067 抗原の宿主エフェクター機構への関与

つぎに 067 抗原(ラット hsc70)が宿主エフェクター機構と相互反応するか否かを検討した. ここ数年, hsp60 を中心に hsp と $\gamma\delta$ T 細胞との反応

図 5 BCG プライムラット脾臓からの DNT の分離とその FACS パターン

図 6 BCG プライムラット脾(SP), 末血(PBL) DNT の WFB, W31 に対する細胞障害性と mAb067, R48B1, 109 による阻止試験(E/T=100)

が報告されている. BCG には hsp60, hsp70 が大量に含まれている. そこで, BCG をラット腹腔に注射し, このラットのT細胞と W31, WFB を標的として細胞障害試験を行った. 図 4 に示すごとく, W31 に dose dependent な反応をみせた.

さらに DNT を分離し(図 5), これをエフェクターとして W31 に対する細胞障害性を検討した. 図 6 に示すごとく, DNT は W31 に障害性を示したが, WFB には示さなかった. つぎに W31 を mAb067, R48B1, 109 で処理すると, mAb067 でのみ完全な細胞障害性の阻止がみられた. すなわち, DNT による W31 の細胞障害性に 067 抗原(70hsc)が, 強く係わっていることが示された. しかもこの細胞障害性には MHC class

図7 BCG プライムラット脾 DNT (a), poly I-C 処理ラット脾 NK (b) の W31 に対する細胞障害性における BFA の効果 (E/T=100)

I 分子は関与していないことが推測された。また、109 抗原はわれわれの最近の研究により、NK 標的分子と考えられるが、DNT による細胞障害性には関与していないことが示唆された。

(4) BFA による細胞障害性の阻止

上の実験事実は、067 抗原、つまり 70hsc が DNT と反応する際に二つの可能性を持つことを意味する。一つは 067 抗原そのものが DNT と反応している場合である。すなわちこの場合、70hsc 単一で DNT のリガンドになりうることを意味している。一方、70hsc は細胞内の多くのペプチドや蛋白分子と分子会合していることが知られている。つまり、70hsc とペプチドの複合体の形で細胞表面に発現し、これが DNT と反応する可能性も考えられる。

この二つの可能性を区別するため、われわれは BFA を使用した。BFA は ER~Golgi 間で、蛋白やペプチドの会合を阻止することが知られている^{8,9)}。図7に示すごとく、2.5 μ g/ml の BFA 存在下で DNT による W31 の細胞障害試験を行ったところ、BFA により細胞障害性は完全に阻止された。一方、NK による細胞障害性はまったく影響を受けなかった。われわれはさらに、BFA 処理 W31 細胞の 067 抗原発現を FACS で解析した。図8に示すごとく、BFA 処理の有無にかかわらず、067 抗原の細胞表面発現はまったく変化は認められなかった。

以上の結果は、BFA による DNT の W31 細胞に対する細胞障害性の阻止効果は、067 抗原 (70hsc) がなんらかの細胞内ペプチドと複合体を形成し、これが DNT に認識されている可能性を

図8 BFA 未処理 (a), 処理 (2.5 μ g/ml) (b) W31 細胞と mAb067 の反応の FACS パターン

示唆したものと見える。

考 察

細胞の増殖、癌化に伴って発現する抗原が実際に腫瘍の免疫的拒絶に関する可否かという、腫瘍免疫における重要な問題は大部分、今日でも不明のままである。われわれはこの点を明らかにするために、WFB や BALB3T3 など、非形質転換細胞としてすぐれた形質を有している細胞に癌遺伝子を移入し、それらの TAAs を同定し、どのような分子が腫瘍拒絶に係わっているかを解析してきた^{2-4,7,10)}。WFB の場合、TAAs は 86 kDa, 62 kDa, 101 kDa, 67 kDa の分子が TAAs として同定され³⁾、前2者は NK 細胞による癌細胞破壊の際の標的分子として働いていることをすでに報告している^{2,7)}。

WFB の TAAs の一つの 67 kDa 分子は、本研究で示したごとく、ラット 70hsc そのものであることが示された。つまり、hsp が腫瘍抗原となりうることをクローナルレベルで示した。しかもわれわれの *in vitro* の結果は、この分子が DNT による標的細胞障害に直接関与することを示している。また MHC class I 非拘束性の反応であることも示された。おそらく、hsc70 を介した DNT 反応は *in vivo* でも働いていると推測される。実際、067 抗原陽性の W31 は、陰性の W14 に比し、同系動物での移植抵抗性が 10^2 オーダー高い¹¹⁾。

DNT と W31 細胞の細胞障害性に関しては、細胞障害性が E/T100 で約 10% と、決して高くはない。これは、*in vivo* の DNT をそのまま使用し、*in vitro* で IL-2 など高濃度のサイトカインで DNT を刺激する操作を行っていないことが一つの原因と考えられる。また、この細胞障害活性に接着因子の関与も考えられる。しかし、BFA で

細胞障害活性が完全に抑制され、かつ、細胞表面の 067 抗原発現は不変のことから、067 抗原そのもの(70hsc)が接着因子として細胞障害活性に係わっている可能性は低い。

われわれの実験データのもう一つの重要な点は、70hsc が細胞の内因性ペプチドと複合体を形成し、それらが、DNT に present されていることを示唆している部分である。BFA による明らかな細胞障害の阻止は、これを強く支持する。NK 活性は BFA によりまったく影響を受けなかった。70hsp family は細胞生物学的に intracellular detergent として変性蛋白やペプチドの分解、再生などに働いている^{12,13)}。また、molecular chaperone として、種々のペプチドや蛋白と分子会合し、分子の高次構造に強く係わっていることが明らかにされつつある。また、昨年、米国と英国の研究グループより、70hsc と MHC class I がアミノ酸 1 次構造は 24% の相同性を示すのみであるが、hydrophilicity は酷似、類似した高次構造をとることが推測された^{14,15)}。つまり、MHC class I が 8~9 個の抗原ペプチドを、domain の溝に結合するのと同様な構造が 70 hsc にもみられることが予想されている。われわれの今回の研究結果は、このような考え方によく符合するものである。

DNT のどのようなポピュレーションが hsc70 をリガンドとした細胞障害に重要なのか、という点についてはまだ不明である。残念ながら現時点では、ラット $\gamma\delta$ T 細胞特異的な抗体が開発されておらず、 $\alpha\beta$ 型 DNT か $\gamma\delta$ 型の DNT かについても決定されていない。マウスでは、 $\alpha\beta$ 型の DNT は多くの場合 MHC class I 拘束性を示す¹⁶⁾。また、いくつかの実験系では hsp 分子と $\gamma\delta$ T 細胞の反応が報告されている^{17,18)}。このようなことから推測すると、70hsc と DNT との反応はラット $\gamma\delta$ T 細胞が担っている可能性が高い。ちなみにわれわれの解析では $\alpha\beta$ 型の CD4⁺、あるいは CD8⁺T 細胞はまったく細胞障害活性を示さなかった。

今回報告した DNT と 70hsc を介する反応は、おそらく細胞の癌化の初期の免疫監視機構において重要な役割を演じているのであろう。今後、hsc+ペプチドの複合体の形で実際に DNT に present されているか否かの、より直接的な証明

と、反応するこれら DNT 細胞のレセプター構造の解析を進めることにより、hsp を介した癌の治療が可能か否かを決定することが重要と思われる。

まとめ

① ラット WFB 細胞に癌遺伝子 H-*ras* を導入し癌化する際、mAb067 により認識される 067 抗原が細胞表面に発現することをみた。

② この 067 抗原はラット hsc70 であることが示唆された。

③ CD4(-)、CD8(-) T細胞(DNT)が 067 抗原を標的とし、MHC class I 非拘束性に癌細胞を破壊することが観察された。

④ この細胞障害性は brefeldin A(BFA)により阻止された。この際 067 抗原には変化はなかった。一方 BFA は NK 細胞による癌細胞破壊を抑制しなかった。

以上の結果は hsc が癌細胞抗原として $\alpha\beta$ T 細胞以外のエフェクター細胞の標的となることを初めて示したものと見える。またその際、hsc は一種の抗原提示分子として働いている可能性が推測された。

文 献

- 1) van den Eynde, B., Lethe, B., Pel, A. V., DePlaen, E., Boon, T.: The gene encoding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/a mice. J. Exp. Med. 173 : 1373-1384, 1991.
- 2) Yagihashi, A., Sato, N., Torigoe, T., Okubo, M., Konno, A., Takahashi, N., Yamashita, T., Fujinaga, K., Kuzumaki, N., Kikuchi, K.: Identification of the transformation-associated cell surface antigen expressed on the rat fetus-derived fibroblast. Cancer Res. 48 : 2798-2804, 1988.
- 3) Sato, N., Cho, J.-M., Takashima, T., Tsuboi, N., Nihei, T., Wada, Y., Kikuchi, K.: Immunogenicity and involvement in the host's effector mechanisms of the oncogene-induced transformation-associated cell surface antigens. In Vivo 5 : 663-670, 1991.
- 4) Konno, A., Sato, N., Yagihashi, A., Torigoe, T., Cho, J.-M., Torimoto, K., Hara, I., Wada, Y., Okubo, M., Takahashi, N., Kikuchi, K.: Heat or stress-inducible transformation-associated cell surface antigen on the activated H-*ras* oncogene-transfected rat fibroblast. Cancer Res. 49 : 6578-6582, 1989.
- 5) LaThangue, N. B.: A major heat shock protein

- defined by monoclonal antibody. *EMBO J.* 3 : 1871-1879, 1984.
- 6) Brink, M. M., Hunt, L. E., Hiserodt, J. C. : *In vivo* treatment with monoclonal antibody 3, 2, 3, selectively eliminates natural killer cells in rats. *J. Exp. Med.* 171 : 197-210, 1990.
 - 7) Cho, J-M., Sato, N., Yagihashi, A., Konno, A., Hara, I., Konn, S., Torigoe, T., Qi, W., Takashima, T., Takahashi, N., Kikuchi, K. : Natural killer target molecules associated with the transformation of the oncogene-transfected fibroblast. *Cancer Res.* 51 : 4250-4256, 1991.
 - 8) Nuchtern, J. G., Bonifacino, J. S., Biddison, W. E., Klausner, R. D. : Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature* 339 : 223-226, 1989.
 - 9) Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schwizer, A., Berger, E. G., Hauri, H. P., Yuan, L. C., Klausner, R. D. : Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 60 : 821-834, 1990.
 - 10) Torigoe, T., Sato, N., Takashima, T., Cho, J-M., Tsuboi, N., Qi, W., Hara, I., Wada, Y., Takahashi, N., Kikuchi, K. : Tumor rejection antigens of BALB3T3 cells transformed by activated oncogenes. *J. Immunol.* 147 : 3251-3258, 1991.
 - 11) Okubo, M., Yagihashi, A., Torigoe, T., Konno, A., Sato, N., Kikuchi, K. : The expression of tumor rejection antigens on rat fetus fibroblasts transformed by the *ras* oncogene. *Jpn. J. Cancer Res.* 79 : 850-856, 1988.
 - 12) Hightower, L. E. : Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66 : 191-197, 1991.
 - 13) Beckmann, R. P., Mizzen, L. A., Welch, W. J. : Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins : implications for protein folding and assembly. *Science* 248 : 850-854, 1990.
 - 14) Rippman, F., Taylor, W. R., Rothbard, J. B., Green, N. M. : A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp 70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J.* 10 : 1053-1059, 1991.
 - 15) Flajnik, M. F., Canel, C., Kramer, J., Kasahara, M. : Which came first, MHC class I or class II ? *Immunogenetics* 33 : 295-300, 1991.
 - 16) Mieno, M., Suto, R., Obata, Y., Uono, H., Takahashi, T., Shiku, H., Nakayama, E. : CD4⁺ CD8⁻ T cells receptor $\alpha\beta$ T cells : generation of an *in vitro* major histocompatibility complex class I specific cytotoxic T lymphocyte response and allogeneic tumor rejection. *J. Exp. Med.* 174 : 193-201, 1991.
 - 17) Raulet, D. H. : Antigens for γ/δ T cells. *Nature* 339 : 342-343, 1989.
 - 18) Fisch, P., Malkovsky, M., Kovatz, S., Sturm, E., Braakman, E., Klein, B. S., Voss, S. D., Morrissey, L. W., DeMars, R., Welch, W. J., Bolhuis, R. L. H., Sondel, P. M. : Recognition by human V γ 9/V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250 : 1269-1273, 1990.