癌拒絶, 抗原提示機構と HSP

佐藤昇志・鳥越俊彦・菊地浩吉*

Role of heat shock proteins in the tumor rejection and antigen presentation

The tumor antigenic peptides of human melanomas have been determined, and applied in the clinical trials. It is also important to investigate the biochemical process for producing these antigenic peptides in the cells. In this report, we suggested that 70 kDa heat shock protein(hsp 70) makes physical complex with TAP molecules. Furthermore, hsp 70 could play an important role to feed HLA-A2-restricted melanoma tyrosinase antigenic peptides into ER via TAP molecules.

Rec. 11/25/1996, Acc. 12/19/1996, pp 269~273

Noriyuki Sato・Toshihiko Torigoe・Kokichi Kikuchi*

key words : hsp 70, antigen presentation, TAP, MHC class I, antigenic peptides

CD8⁺ CTL の標的となる MHC class I 結合性の抗原ペプチドが, ウイルス特異的 CTL, 腫瘍特異的 CTL でつぎつぎと同定されてきている¹⁾. 一方で, これらの抗原ペプチドの処理, 提示機構の解析も大きく進展している. すなわち, 抗原ペプチドの母蛋白が構造上の変異あるいは, 突然変異などによる異常蛋白として発現されたとき, まずユビキチンの多量化を受け, その結果 20S と 26S よりなる proteasome とよばれるプロテアーゼ複合体に渡される. そこで母蛋白は蛋白の限定分解を受け, MHC class I 結合性の抗原ペプチドとして機能しえる 8~12 個のアミノ酸に断片化される, と考えられている.

さらに, これらのペプチドは ER 膜上に局在する TAP(transporter associated with the antigen processing)1.2 とよばれる蛋白により ATP 依存性に ER 内に移入される. ここで MHC class I 重鎖, 軽鎖と会合し Golgi 装置を通り, 最終的に膜表面に発現し, 宿主免疫系のサーベイを受けるのである^{2~4)}.

ここで, 問題となるのは, proteasome により断

片化されたペプチドがどのようにして TAP 1.2 分子に至るかということである. CTL エピトープとして働く抗原ペプチドは通常 9 個前後のアミノ酸よりなり, そこには疎水性のアミノ酸を多く含むことが知られている^{4,5)}.

したがって, このような疎水性のペプチド断片が細胞内でフリーの形で存在することは考えずらく, proteasome から TAP に至る間でなんらかの分子シャペロンの介在が必須と考えられる. ここで筆者らは hsc 70 をその候補と考えた. hsc 70 は細胞質内, 核内に存在する分子シャペロンであり, C 末の基質結合ドメインにはさまざまなペプチドや蛋白分子を結合することが知られている.

本稿では, まず TAP 分子と hsc 70 の分子会合の有無, つぎにメラノーマ癌抗原ペプチドとして最近同定された HLA-A2 結合性のチロシナーゼペプチド Tyr-Met-Asn-Gly-Thr-Met-Ser-Gln-Val⁶⁾ の hsc 70 による ER への移入増強作用の有無を報告する.

方法と結果

(1) hsc 70 と TAP 分子の会合

hsc 70 がさまざまな内在性抗原ペプチドと胞体内で結合していることは, 他の研究者によりすでに報告されている. したがって, これらのペプチドのあるものは MHC class I と ER 内で結合

* Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine 札幌医科大学医学部第一病理学教室
Offprint requests to : Noriyuki Sato, Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1, West-17, Chuo-ku, Sapporo 060, Japan

図1 免疫沈降法による hsc 70 と TAP の分子会合の解析
 A. 抗 TAP 1 抗体と TAP(+) の T1 細胞, TAP(-) の T2 細胞との免疫沈降物. lane 1 に TAP 1 分子のバンドをみることができる.
 B. A の免疫沈降物と抗 hsp 70 抗体のウェスタンブロット法による解析. lane 4 に hsp 70 のバンドをみることができる.

図2 MeDSGによる hsc 70 と TAP の分子会合の選択的阻害
 A. 抗 TAP 1 抗体による TAP 1 分子のバンド. spermidine あるいは MeDSG 存在下で影響はされない.
 B. TAP 1-hsc 73 の分子会合は MeDSG 存在下でほぼ完全に阻害されている.

し, CD8⁺ CTL により認識される可能性が強く示唆される. しかし, シグナルペプチドをもたないペプチドが ER に入るには TAP 分子が必要であり, したがって TAP 分子と hsc 70 との会合の有無が, 抗原ペプチドのプロセッシングにひとつの重要なステップとなることが考えられる. そこで筆者らはこの両者の蛋白分子の *in vivo* での会合の有無を検討した.

T1 細胞を可溶化し, 抗 TAP 抗体(Dr. Crosswell より供与)で免疫沈降物を作製, SDS-PAGE 後ウェスタンブロットし, 抗 hsc 70 抗体(3a3 抗体)で会合の有無を決定した. その結果, 図1に示すごとく, 抗 TAP 抗体免疫沈降物の分子量 70 kDa 付近に 3a3 で検出されるバンドが明らかに認められた. つまり, TAP 分子は hsc 70 と複合体を形成していることが判明した. しかもこの会合

図3 メラノーマチロシナーゼ抗原ペプチドの配列

① で ^{125}I ラベル, ② はグリコシレーションモチーフを示す.

図4 hsc 70 によるメラノーマチロシナーゼ抗原ペプチドの ER への移入増強

図3のメラノーマチロシナーゼペプチドをミクロソーム分画とともに hsc 73 あるいは BSA を加え, ConA affinity column で glycosylated peptide を分離後 cpm をカウントした.

は ATP により解離されることも判明した.

さらに, この会合は図3に示すように hsc 70 と選択的に反応する薬剤として知られている methyl deoxyspergualin (meDSG)⁷⁾により完全に阻害された. meDSG は spermidine の誘導体であるが, spermidine は hsc 70 と結合することは知られていない. 実際, spermidine は hsc 70 と TAP 分子との会合にはなんらかの影響を与えなかった(図2). したがって, hsc 70 と TAP 分子の結合は, meDSG が hsc 70 に結合する部分を介しての会合と推測することができる.

(2) hsc 70 による抗原ペプチドの ER への移入増強

hsc 70 が TAP 分子と会合している事実は, hsc 70 の基質として結合している抗原ペプチドが TAP 分子を介して ER に移入されている可能性

を示唆する. すなわち, ここでは hsc 70 が抗原ペプチドの ER への移入増強の働きを司っている可能性を意味する. このことを実証するために, 筆者らはヒトメラノーマの CTL エピトープであることが明らかにされている tyrosinase の抗原ペプチド⁶⁾(図3)を用いて, つぎのような実験を行った.

tyrosinase 抗原ペプチド Tyr-Met-Asn-Gly-Thr-Met-Ser-Gln-Val は Tyr で ^{125}I ラベルを行った. このペプチドが ER に移入されたことの指標は, Asn-Gly-Thr のモチーフが ER 内で glycosylation されることを利用し, ConA の affinity column を利用し glycosylated peptide として精製し, ^{125}I -Tyr の放射活性で定量化した. ER のソースとしてはラビットの reticulocyte microsome fraction を使用した. また, hsc 70 のコントロールとして同濃度の BSA を利用した. その結果, 図4に示すように, hsc 70 添加により tyrosinase 抗原ペプチドの ER への移入が BSA に比し, 2 倍近く明らかに増強した. このことは hsc 70 が自身の基質結合部に結合する抗原ペプチドを TAP 分子を介し, ER に効率的に移入する機能をもつことを示している.

考 察

プロテアソームで処理された抗原ペプチドはプロテアソームから TAP まで, どのように輸送されるのであろうか.

プロテアソームと TAP とが会合しているという証拠はこれまで得られていなかった. 抗原ペプチドは, 細胞質内である種の分子シャペロンと会合し, TAP に輸送されていると推察される. シャペロンとは, 社交界にデビューする貴婦人をエスコートする紳士を意味するところから, 機能分子と会合してその蛋白質高次構造の形成や輸送に携わるエスコート分子を分子シャペロンとよんでいる. 分子シャペロンとの会合が推察される根拠としては, ① MHC class I 分子と会合していることが証明されている抗原ペプチドには, 疎水性アミノ酸残基に富んだペプチドと多く知られており, これらは遊離した状態では水に不溶性である

図 5 抗原提示機構における hsc 70(hsc 73)の役割

ため, detergent 様作用をもつ分子と会合しているはずである。② 細胞質内遊離したペプチドの一部はペプチダーゼによってアミノ酸に分解されるが, 抗原ペプチド断片はこのような分解から保護されている。③ 受動的な分子拡散よりも ATP を利用したエネルギー依存性の能動的輸送が行われている可能性が高いこと, などがあげられる。

私たちは癌抗原を同定する研究の過程で, 癌抗原のあるものは 70 kD 熱ショック蛋白質 (hsc 70) であることを見出した⁸⁾。しかも, 癌抗原としての抗原性を付与しているのは hsc 70 そのものではなく, hsc 70 と結合している抗原ペプチドであることが示唆された⁹⁾。

hsc 70 は細胞質と核内に分布する分子シャペロンで, ATPase ドメインとペプチド結合ドメインをもつ。hsc 70 のペプチド結合部位の親水性アミノ酸残基の配列は MHC class I 分子のペプチド結合部位と同一性が高く, 疎水性残基に富んだペプチドと親和性をもつこと, また立体構造の解析から, hsc 70 は MHC class I 分子よりも長いペプチドと会合できる capacity があることが知ら

れている^{10,11)}。そこで, 細胞質の抗原ペプチドの分子シャペロンの 1 つは hsc 70 であろうと推測した。

小胞体内腔で TAP から MHC class I 分子にペプチドが受け渡される際には, TAP と MHC class I 分子とが会合することが報告されている²⁾。同様な論理で, hsc 70 と TAP1 との間に分子会合があるかどうかを検討したところ, TAP1 の免疫沈降物中に hsc 70 が同定され, この会合は ATP 依存性に解離することが判明した。さらに, 細胞内で hsc 70 と特異的に結合する免疫抑制剤 meDSG が, hsc 70 と TAP1 との会合を阻害し, 細胞表面の MHC class I 分子の発現低下をひき起こすことから, hsc 70 と TAP との会合は抗原ペプチドの輸送に重要であることが推測された¹²⁾。実際, 筆者らは今回 hsc 70 と TAP の会合の意義を抗原ペプチドの ER への移入増強という形で証明した。

すなわち, メラノーマチロシナーゼ抗原ペプチドの ER 移入が hsc 70 により明らかに増強された。Udono らは, 細胞内で hsc 70 と結合している

ペプチドのアミノ酸配列を解析し、そのうちのいくつかは、すでに MHC class I 分子に提示されることが知られている抗原ペプチドのアミノ酸配列を含む長いペプチドであったことを確認している¹³⁾。この結果、細胞質内で hsc 70 と会合しているペプチドが、小胞体内で MHC class I 分子と会合する抗原ペプチドの前駆ペプチドである可能性を強く示唆している。hsc 70 は ATPase 活性をもち、ATP 依存下でペプチドと解離する。TAP への抗原ペプチドの feeding も ATP 依存性に行われていると考えられる(図 5)。

抗原ペプチドの転送機構に熱ショック蛋白質が関与していることは、生体防御機構を考えるうえで興味深い。ウイルス感染細胞や形質転換した細胞では、しばしば hsp の発現が高まっていることが観察される。また感染症や悪性腫瘍の患者が発熱することによっても hsp の発現が誘導される。その結果、抗原処理提示機構が活発となり、免疫監視能力も高まると想像される⁵⁾。生体を受けるさまざまなストレスによって生じる細胞内部の変化を免疫系に伝達するメカニズムである抗原処理提示機構が、ストレスによって誘導される蛋白質に支えられていることは実に理にかなった仕組みであるといえる。

近年、メラノーマを中心として MHC class I 分子に提示されている多くの腫瘍抗原ペプチドの構造が明らかにされ、すでにそれらの一部はペプチドワクチン療法として臨床治験も行われている。抗原ペプチド転送機構の解明は、grp 94 や hsc 70 のような分子シャペロンをペプチドアジュバントとして用いる新たなペプチドワクチン療法に発展していくことも期待される。

文 献

- 1) 佐藤昇志：腫瘍抗原同定への戦略。臨床免疫（印刷中）。
- 2) Granda III AG, Androlewicz MJ, Athwal RS, Geraghty DE, Spies T : Dependence of peptide binding by MHC class I molecules on their interaction with TAP. *Science* 270 : 105-108, 1995.
- 3) Suh WK, Cohen-Doyle MF, Fruh K, Wang K, Peterson PA, Williams DB : Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 264 : 1322-1326, 1994.
- 4) 鳥越俊彦, 藤原理太郎, 佐藤昇志：抗原ペプチドの輸送に関わる分子群。臨床免疫（印刷中）。
- 5) 佐藤昇志, 井上篤志, 菊地浩吉：腫瘍抗原としての熱ショック蛋白—細胞内 quality control system における熱ショック蛋白(HSP)と腫瘍免疫との関わり。炎症と免疫 1 : 319-325, 1993.
- 6) Wolfel T, Pel AV, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Karl-Hermann Meyer B, Boon T : Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24 : 759-764, 1994.
- 7) Nadler SG, Tepper MA, Schacter B, Mazzucco CE : Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the hsp 70 family of heat shock proteins. *Science* 258 : 484-486, 1992.
- 8) Tamura Y, Tsuboi N, Sato N, Kikuchi K : 70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and possible target for the host's anti-tumor immunity. *J. Immunol.* 151 : 5516-5524, 1993.
- 9) Takashima S, Sato N, Kishi A, Tamura Y, Hirai I, Torigoe T, Yagihashi A, Takahashi S, Sagae S, Kudo R, Kikuchi K : Involvement of peptide antigens in the cytotoxicity between 70 kDa heat shock cognate protein-like molecule and CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺ killer T cells. *J. Immunol.* 157 : 3391-3395, 1996.
- 10) Palleros DR, Welch WJ, Fink AL : Interaction of hsp 70 with unfolded proteins : Effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 5719-5723, 1991.
- 11) Palleros DR, Reid KL, Shi L, Welch WJ, Fink AL : ATP-induced protein-hsp 70 complex dissociation requires K but not ATP hydrolysis. *Nature* 365 : 664-669, 1993.
- 12) Kamiguchi K, Torigoe T, Sato N, Kikuchi K : Involvement of 70 kDa heat shock protein in the cytosolic transportation of antigenic peptides. *J. Immunol.* (submitted).
- 13) Udon H, Shinbara N, Srirastara PK, Tanaka K, Nakayama E : A role of heat shock proteins in class I antigen presentation. 日本免疫学会総会抄録集 p 75, 1995.