

CTL 유도 실험용 항원 펩타이드 시리즈 전립선암 항원 PSMA 유래 항원 펩타이드

PSMA. 178 (9) TaKaRa Code SP208 0.5 mg/vial
PSMA. 227 (9) TaKaRa Code SP209 0.5 mg/vial

CTL 유도 실험용 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드 시리즈에 이어 새롭게 2종류의 (PSMA 178 (9), PSMA 227 (9)) 항원 펩타이드를 추가하였다. 이번 upgrade로 CTL 유도 실험용 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드 시리즈는 기존의 7종류를 포함하여 총 9종으로 lineup되었다. 이번에 발매되는 항원 펩타이드는 전립선 특이적막항원 (PSMA) 유래의 HLA-A24 결합성 펩타이드로 작년 12월에 과학지에 보고 되었다. 제품은 종전과 같이 품질 관리 (순도, endotoxin 시험)를 철저히 하여 CTL 유도 및 해석 실험에 효과적이다.

서론

최근 자기의 수상 세포 (Dendritic Cell)나 임파구를 이용한 면역 요법이 암의 치료법으로서 확립 되고 있다. 암의 면역 요법은 항원 제시세포나 종양을 직접 공격하는 CTL (killer T 세포) 및 암 세포상의 MHC와 결합함으로써 T세포에 인식되는 항원 펩타이드가 중요하다. 일본인의 약 60%에서 HLA-A24가 발현되고 있기 때문에 특히 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드의 동정은 일본인의 면역 요법의 확립에 중요한 역할을 차지하고 있다고 생각된다.

지금까지 많은 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드가 동정되어 있으며 당사에서도 CTL 유도 실험용 HLA-A24 결합 펩타이드를 line up 해왔다 (관련 제품 참조). 또한 MAGE3, CEA 등에 대해서는 이미 항원 펩타이드를 이용한 임상 응용도 보고 되었다^{1,2)}. 그러나 지금까지 보고 되지 않은 암 종류도 많으므로 새로운 항원 펩타이드의 동정이 필요하다. 전립선암도 이 중 하나로 미국인 남성에서 사망 원인 중 상위를 차지하고 있으며, 일본인에서도 생활 습관 등의 변화로 인해 발병 비율이 해마다 상승해 오고 있다. 전립선 특이적 막항원 (PSMA)은 전립선암 (전이암, 호르몬 저항성 암 등) 외에 중앙 관련 신생 혈관에도 발현하는 것으로 알려져 있다. HLA-A2에 결합하는 PSMA 유래 항원 펩타이드에 대해서는 지금까지 모두 3종류가 보고되어 있다³⁾. 이 중 2종류의 항원 펩타이드는 임상 투여 결과, 환자의 종양 marker (PSMA)가 저하되었다는 보고가 있어 그 효과가 기대된다⁴⁾. 한편 일본인에게 많이 발현하고 있는 HLA-A24에 결합하는 항원 펩타이드에 대해서는 아직 보고된 바 없었다. 이번에 출시되는 2종류의 항원 펩타이드 PSMA. 178 (9), PSMA. 227 (9)은 HLA-A24 결합성의 PSMA 유래 항원 펩타이드이다. PSMA 유래의 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드에 관한 보고는 이번에 소개하는 Horiguchi 등의 보고⁵⁾가 처음이다.

항원 펩타이드 (PSMA. 178 (9), PSMA. 227 (9))*을 이용한 CTL 유도⁵⁾

Horiguchi 등은 PSMA의 아미노산 서열로부터 HLA-A24의 결합 motif를 가지는 9종류의 후보 펩타이드를 선별하여 이들에 대한 항원 펩타이드에 특이적인 CTL 유도를 HLA-A24⁺ 정상인 PBMC (말초혈단핵구)를 이용해 시험하였다.

*PSMA. 178(9), PSMA. 227(9)은 과학잡지에 보고되어 있는 PSMA24-5, PSMA24-3 과 각각 동일한 아미노산 서열이다.

● CTL의 유도 방법

· 항원 제시 세포의 제조

PBMC 중의 plate 접착 세포를 GM-CSF (1,000 U/ml), IL-4 (1,000 U/ml)의 존재 하에서 7일간 배양하여 DC (수상세포)를 유도하였다.



각 후보 펩타이드 (40 µg/ml)를 pulse한 후 X선을 조사 (55 Gy)하여 항원 제시세포로 사용하였다.

· CTL 유도과 CTL 활성의 측정

PBMC에서 magnetic beads로 분리한 CD8⁺세포 (5×10⁵)와 항원 제시 세포 (2.5×10⁴)를 48 well plate를 이용하여 IL-7 존재하에서 배양하였다.



다음날 IL-10 (10 ng/ml)을 첨가하였다.



7일 및 14일 후 펩타이드를 pulse한 plate 접착세포에 재 자극한 후 2~3 일마다 IL-2 (30 U/ml)를 첨가하여 배양하였다.



21일째 펩타이드 pulse한 HLA-A24⁺ 세포 (TIS)를 표적 세포로 하여 세포 상해 활성을 측정하였다 (그림 1).



세포 상해 활성이 확인된 CTL은 한층 더 대량 증식시킨 후 HLA-A24⁺/PSMA⁺ 암 세포주에 대한 세포 반응성을 측정하였다 (그림 2).

그림 2의 실험에서 이용한 표적 세포는 adenovirus vector에 의해 PSMA 유전자를 각종 암 세포주에 도입해 제작하였다 (adenovirus vector 제작 kit에 대해서는 관련제품을 참조). DC를 사용한 CTL 유도 방법은 Life Science & Biotechnology 8호를 참고한다.

●결과

9 종류의 펩타이드에 따른 CTL 유도를 실시하여 각 펩타이드를 pulse한 표적 세포 (TISI)에 대하여 특이적 상해 활성을 조사하였다. 그 결과 2종의 펩타이드 PSMA24-3, PSMA24-5 에서 특이적 세포 상해성이 인정되었다 (그림 1).

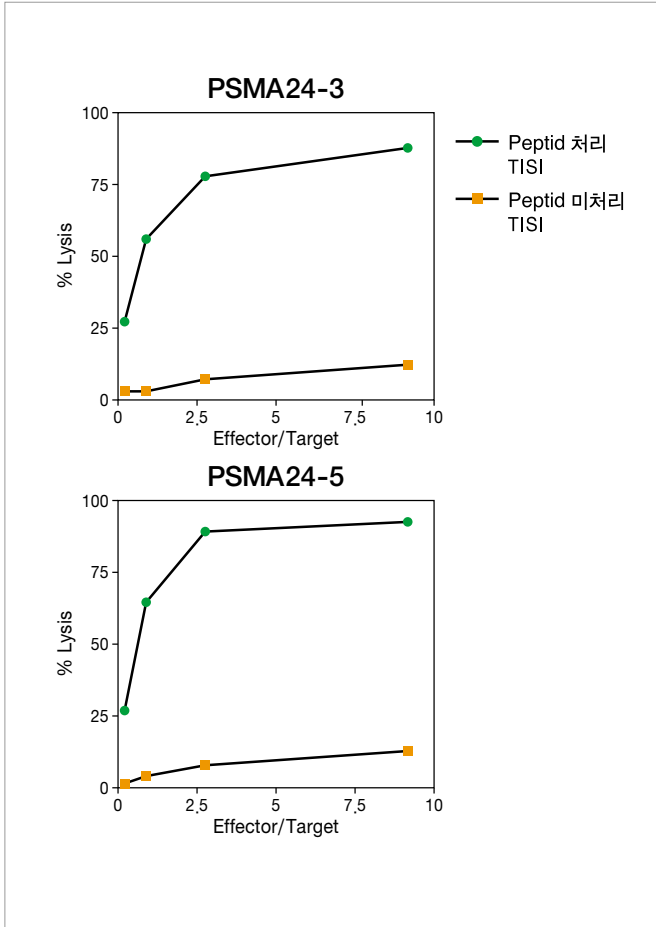


그림 1 펩타이드 특이적 세포 상해활성

다음으로 PSMA를 발현하는 HLA-A24 양성 또는 음성의 여러 가지 암 세포주에 대한 반응성을 조사한 결과 HLA-A24 및 PSMA를 함께 발현하는 세포주와 혼합할 경우에만 특이적으로 IFN- γ 를 생산하였고 HLA-A24를 발현하지 않는 PSMA⁺ 세포에서는 반응하지 않았다 (그림 2).

이 결과로부터 이들 CTL이 PSMA24-3, PSMA24-5에 특이적이며 내재성으로 PSMA를 발현하는 HLA-A24⁺ 종양세포주도 특이적으로 인식하는 CTL인 것이 확인되었다. 이들 CTL의 구속성을 확인하기 위하여 항체에 의한 저해실험을 수행 한 결과 항 CD8 항체, 항 MHC class I 항체에서 CTL에 의한 IFN- γ 생산이 특이적으로 저해되었다 (그림 3).

이 결과로부터 PSMA24-3, PSMA24-5 특이적 CTL은 아니지만 MHC class I 구속성의 CD8⁺ T 세포라는 것이 확인되었다.

이로써 PSMA24-3, PSMA24-5는 HLA-A24에 결합하여 암 세포상에 제시되어 CTL에 의해 인식되는 항원 펩타이드임이 밝혀졌다.

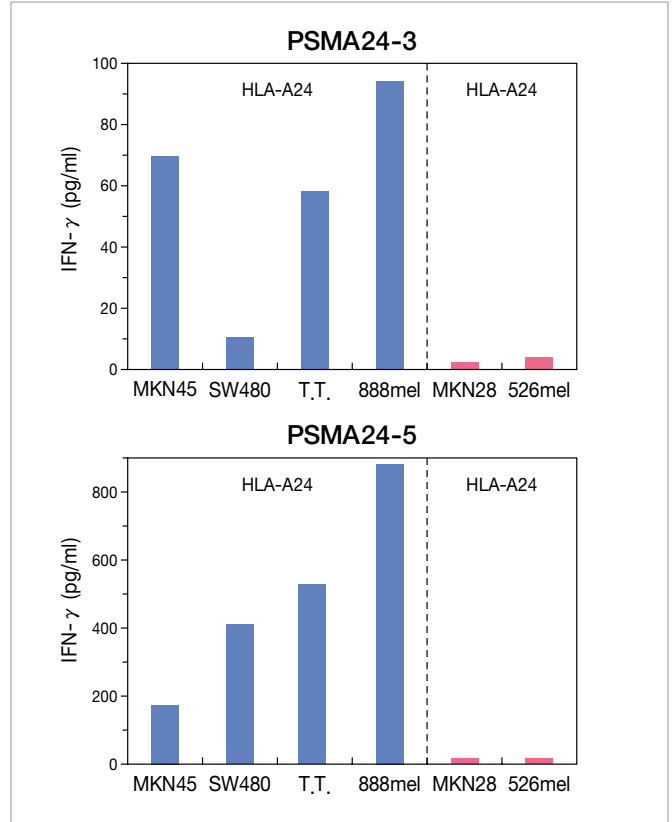


그림 2 PSMA 특이적 CTL의 각종 암세포 주에 대한 반응성

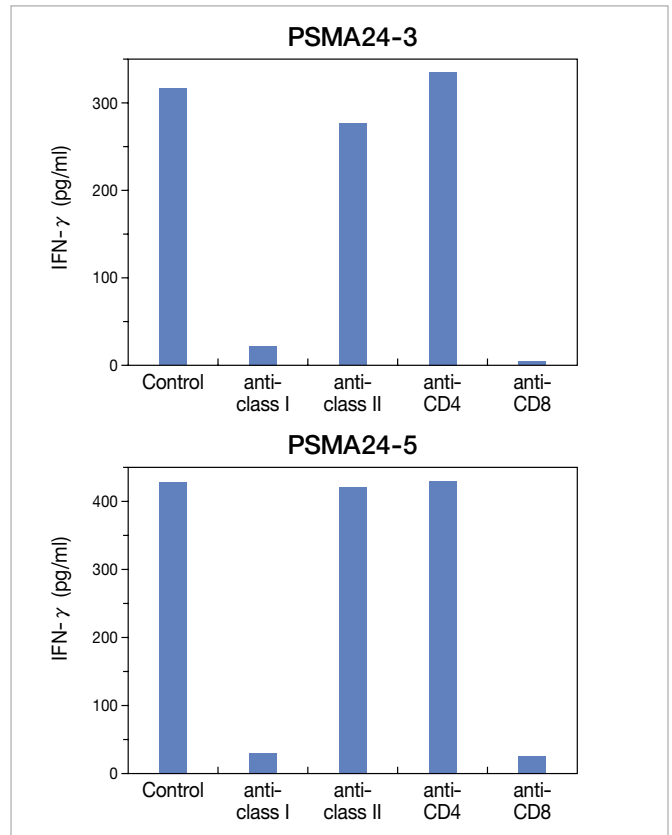


그림 3 항체에 의한 PSMA 반응성 CTL의 항원 특이적 인식의 저해 표적세포로서 PSMA 유전자를 도입한 888 mel 암세포주 (HLA-A24⁺, PSMA⁺)를 사용하고 있다.

맺음말

당사에서는 이번에 출시하는 PSMA, 178 (9), PSMA, 227 (9) 외에 MAGE1, MAGE2, MAGE3, CEA, HER2/neu, Flu 유래의 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드 및 HLA-A24 결합성 항원 펩타이드 동정용 “CTL epitope 동정용 펩타이드 set” 도 판매하고 있다. 또한 adenovirus vector 제작용으로 “Adenovirus Expression Vector Kit” 를 판매하고 있으며, 이 kit은 COS-TPC 법에 기초를 둔 것으로 기존 방법에 비해 수십배의 효율로 재조합 adenovirus를 제작할 수 있다.

앞서 언급한 이외의 합성 및 재조합 adenovirus 제작에 대해서는 당사에서 별도로 수탁서비스를 제공하고 있다. 자세한 문의는 당사 연구지원사업부(02-575-7409)로 문의하기 바란다.

참고 문헌

- 1) Nishiyama, T. *et al.* (2001) *Clin. Cancer Res.* **7**, 23.
- 2) Itoh, T. *et al.* (2002) *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 99.
- 3) Lu, J., Celis, E. (2002) *Cancer Res.* **62**, 5807.
- 4) Lodge, P. A. *et al.* (2000) *Cancer Res.* **60**, 829.
- 5) Horiguchi, Y. *et al.* (2002) *Clin. Cancer Res.* **8**, 3885.

[문의처]

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구지원사업부
Tel: 02-575-7409

관련 제품

제품명	TaKaRa Code	포장
CTL 유도 실험용 종양 관련 항원 펩타이드		
MAGE1, 135 (9) (HLA-A24)	SP201	0.5 mg
MAGE2, 156 (9) (HLA-A24)	SP206	0.5 mg
MAGE3, 195 (9) (HLA-A24)	SP202	0.5 mg
CEA, 652 (9) (HLA-A24)	SP203	0.5 mg
HER2, 8 (9) (HLA-A24)	SP204	0.5 mg
HER2, 63 (9) (HLA-A24)	SP205	0.5 mg
FluNP, 38 (10) (HLA-A24)	SP207	1.0 mg
CTL epitope 동정용 펩타이드 set*		
종양 항원 MAGE3 (HLA-A24)	SP101	9종 (각 1 mg)
종양 항원 CEA (HLA-A24)	SP102	10종 (각 1 mg)
종양 항원 HER2/neu (HLA-A24)	SP103	10종 (각 1 mg)
* 각 set에는 influenza virus nucleoprotein (Flu NP) 유래 펩타이드가 첨부되어 있다.		
Adenovirus Expression Vector Kit	6150	1 Kit (5 회용)

다카라 유전자 해석센터



〉Genome Project, Speed가 생명

〉초저가, 초스피드 실현!!

〉어떤 시료도 완벽하게 분석해 드립니다.

Sequencing Targets

