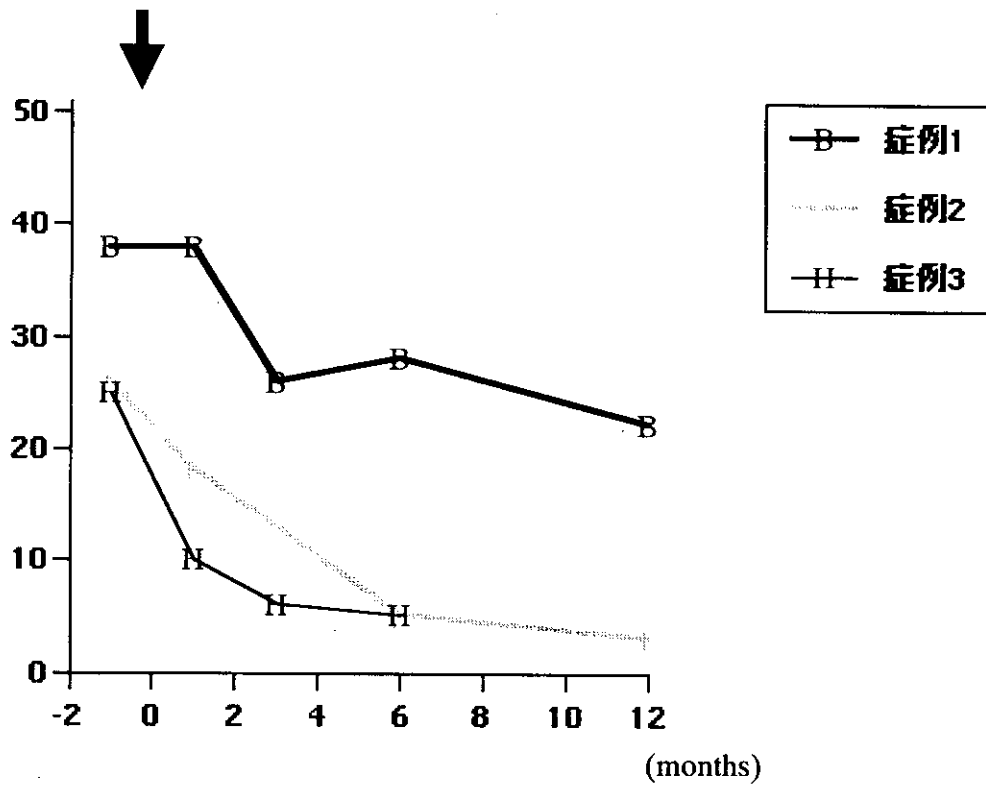
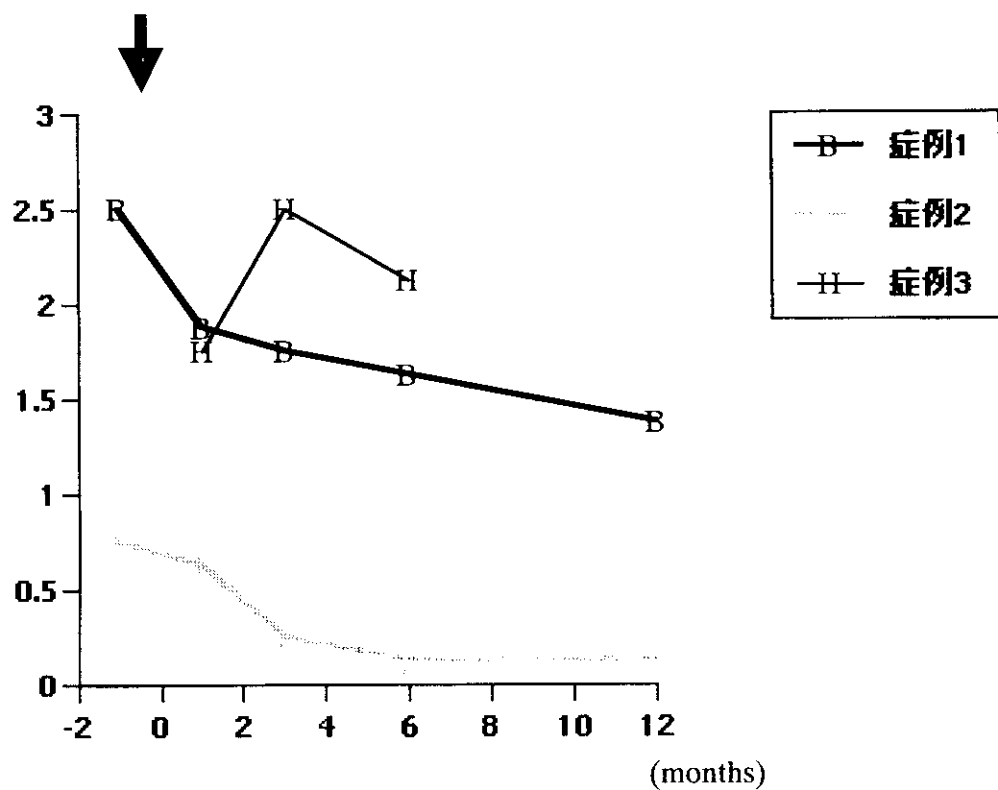


自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



<図 1> mRodnan TSS の推移

自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植



<図 2> mHAQ の推移

	症例 1	症例 2	症例 3
性別／年齢	男性／57 歳	女性／19 歳	女性／53 歳
診断	SSc	SSc	SSc
臓器合併症	腎障害、高血圧 (腎クリーゼの既往あり)	皮膚潰瘍 逆流性食道炎	間質性肺炎
罹病期間	1.5 年	3 年	1 年
治療歴	PGE1、ACEI	PSL、D-P、PGE1	PSL、D-P、PGE1
mRodnan TSS	38／51	26／51	25／51

PG : prostaglangin、ACEI : angiotensin converting enzyme inhibitor、

D-P : D-penicillamine

<表 1> 治療適応時の概略

	症例 1	症例 2	症例 3
造血幹細胞動員	G	CPA+G	CPA+G
移植前処置	CPA	CPA	CPA
CD34 陽性細胞純度	95%	96%	90%
移植 CD34 陽性細胞数*	2.96	5.21	2.75
白血球数 500/ $\mu$ l 以上	11 日	9 日	11 日
血小板数 $5 \times 10^4$ / $\mu$ l 以上	15 日	21 日	16 日
抗核抗体(IF)**	1:160→1:320	1:1280→1:1280	1:1280→1:160
抗 Scl-70 抗体**	7.9→6.9	92.3→196.5	151.2→40.3

G : G-CSF、\* :  $\times 10^6$ /kg、\*\* : 移植前→移植後 3 ヶ月

<表 2> 造血能の回復と血清学的変化

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
小池 隆夫 (他 2 名)	Genetics of antiphospholipid syndrome	Rheumatic Disease Clinics of North America	27 : 3	565-572	2001
小池 隆夫 (他 9 名)	Plasma tumor necrosis factor a levels and the -238* a promoter polymorphism in patients with antiphospholipid syndrome.	Thromb. Heamost.	85	198-203	2001
小池 隆夫 (他 9 名)	Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of human erythoid precursor cells with Scr-family kinase dependency	Exp.Hematol	29	19-29	2001
小池 隆夫 (他 11 名)	A specific ligand for $\beta$ 2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages	J Lipid Research			2001
小池 隆夫 (他 4 名)	Innvolvement of pRB-related p107 protein in inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress.	JbiolChem	276:20.	17559-17567	2001

## V. 研究会議発表者報告文書

第一回研究会議：平成 13 年 6 月 9 日

第二回研究会議：平成 14 年 2 月 15 日（一日目）

平成 14 年 2 月 16 日（二日目）

(再掲)

## V. 研究班会議発表者報告文書

### 1. 平成 13 年度第一回研究班会議

平成 13 年 6 月 9 日 (土) 正午 12 時～午後 5 時

会 場 名古屋第一赤十字病院 古川講堂

#### I. 主任研究者挨拶並びに報告 ..... 111

小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター

#### II. 分担研究報告

##### テーマ I. 造血細胞移植から細胞治療へ

##### 1) DL I と細胞治療

##### ① Ex vivo 培養による CD4 陽性細胞を用いた細胞治療の基盤整備と実施 ..... 114

伊藤仁也 中畑龍俊 京都大学大学院医学研究科 発達成長医学

山本興太郎<sup>1)</sup> 関根暉彬<sup>2)</sup> 1) 東京医科歯科大学 2) 株式会社リンフォテック、感染症細胞治療研究会

##### 2) 抗原特異的 ex vivo 培養 T 細胞による細胞治療の基盤整備と実施

##### ① 同種幹細胞移植後再発白血病に対するドナー由来 CTL 誘導及びその臨床応用について ..... 116

土屋貴秀 加藤俊一 堀田知光 東海大学医学部 血液・リウマチ内科/小児科

##### ② 血液系細胞に特異的なマイナー抗原を認識する CTL の樹立 ..... 118

##### ③ マイナー抗原の適合性と臨床への影響を検索するための DNA バンクの設立についての提案 ..... 119

②③赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部

##### ④ H-Y 抗原を標的とした難治性白血病細胞に対する CTL の樹立: in vivo における

##### GVL 効果担当細胞の可能性 ..... 120

高見昭良 塩原信太郎 金沢大学大学院 細胞移植学/金沢大学医学部附属病院 輸血部

##### ⑤ WT1 を標的とした造血器悪性疾患に対する抗腫瘍免疫療法 ..... 122

坪井昭博 小川啓恭 大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科

##### ⑥ 樹状細胞を用いた腫瘍特異的 CTL の誘導とその臨床応用 ..... 124

古川達雄 新潟大学医学部附属病院 高密度無菌治療部

##### ⑦ Mantle cell lymphoma における腫瘍抗原の同定 ..... 126

加藤光次 原田実根 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科

##### ⑧ 造血幹細胞移植におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球の検討 ..... 128

高橋義行 木村 宏 小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科 成長発達医学/小児科学

##### 3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備

##### ① 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植のための基盤整備 ..... 129

北折健次郎<sup>1)</sup> 原田実根<sup>2)</sup> 小寺良尚<sup>3)</sup> 1) 名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター

2) 九州大学医学大学院医学研究院 病態修復内科

##### 4) 自家造血幹細胞移植の確立と海外ドナーからの移植の推進

##### ① 自家造血幹細胞移植後の長期造血能・造血障害 (sMDS/AML) ..... 131

岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 血液内科

##### ② 小児急性白血病に対する自家骨髄移植の治療成績 ..... 133

加藤剛二 松山孝治 名古屋第一赤十字病院 小児医療センター血液腫瘍科

##### 5) HLA 不適合移植の基盤整備 —— 成分移植と母児間移植 ——

##### ① 免疫寛容の指標としての母児間マイクロ・キメリズム ..... 134

佐治博夫 丸屋悦子 特定非営利活動法人 HLA 研究所

② FK506 をGVHD予防に用いた母子間・非遺伝母HLA抗原 (NIMA) 相補的同胞間造血幹細胞移植に関する臨床第Ⅱ相試験の提案	136
一戸辰夫 <sup>1)</sup> 玉木茂久 <sup>2)</sup> 丸屋悦子 <sup>3)</sup> 佐治博夫 <sup>3)</sup>	
1) 京都大学大学院医学研究科 血液病態学	
2) 山田赤十字病院 内科 3) 特定非営利活動法人HLA研究所	
③ HLA 2 座不一致母親から骨髄移植を施行した骨髄異形成症候群の一例	138
西田徹也 <sup>1)</sup> 北折健次郎 <sup>1)</sup> 小寺良尚 <sup>1)</sup> 丸屋悦子 <sup>2)</sup> 佐治博夫 <sup>2)</sup>	
1) 名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター 2) 特定非営利活動法人HLA研究所	
④ HLA不適合母子間移植の3例	139
濱口元洋 国立名古屋病院 血液内科	
⑤ CD34 陽性細胞純化による同種 haploidentical 移植の検討とプロトコール提案	141
峯石 真 国立がんセンター中央病院 内科	
⑥ 非血縁者間骨髄移植後8か月に再発し骨髄非破壊的前処置を用いて父親より末梢血CD34陽性細胞移植を施行したT-NHLの1例	143
安井昌博 河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター 小児血液科	
⑦ HLA遺伝的一致同胞以外からの血縁者間造血細胞移植の成績	145
井関 徹 浅野茂隆 東京大学医科学研究所 造血細胞移植チーム	
6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅	
① 異種骨髄ストローマ細胞株を利用したヒト骨髄ならびに末梢血幹細胞の ex vivo 増幅	147
川田浩志 堀田知光 東海大学医学部 血液・リウマチ内科	

## テーマ II. ヒト組織適合抗原の解析と応用

7) HLA-C, E抗原の役割	
① 非血縁者間骨髄移植における HLA-C抗原の役割	149
② Non-myeloablative hematopoietic transplantation 全国調査の経過報告	報告文書なし
② 田地浩史 ① 森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部	
8) HLA-DNAタイピングの意義の確立	
① HLA-DNAタイピングの意義の確立	報告文書なし
笹月健彦 九州大学生体防御医学研究所 遺伝子学部門	
9) マイナー抗原の解析	
① マイナー抗原および免疫関連遺伝子の解析	151
② BMT における NK 受容体の関与	151
① 石川善英 ② 屋部登志雄 十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター 研究部	
10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索	
① マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイドな組織適合性遺伝子の探索	153
猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学部門	

## テーマ III. 造血細胞移植対象疾患の拡張

11) 膠原病に対する造血細胞移植	
① 全身性皮膚硬化症に対する純化CD34陽性細胞選択移植	155
澤田賢一 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 分子病態制御学	
② 臨床用細胞プロセッシング室の設置と自己骨髄細胞筋注による血管再生療法	157
室井一男 小澤敬也 自治医科大学 輸血・細胞移植部	
③ 強皮症に対する末梢血幹細胞移植の適応	159
深谷修作 江崎幸治 藤田保健衛生大学 感染症・リウマチ内科/血液内科	



厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の  
開発と普及に関する研究

平成13年度第一回研究班会議

主任研究者  
小寺良尚

平成13年6月9日  
名古屋

平成13年度造血細胞移植関連研究班(厚生労働省系)

1. 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の  
開発と普及に関する研究」
2. 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「ミニトランスプラントに関する研究」
3. 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「臍帯血移植に関する基礎的、臨床的研究」
4. 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「臍帯血の培養、増殖に関する研究」
5. 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業  
「造血幹細胞の体内増殖/体外増殖のための飜食分化制御システムの  
開発と応用に関する研究」
6. 厚生省がん研究助成金「非血縁者間の同種血液幹細胞移植法による  
悪性腫瘍の治療率向上に関する研究—同種末梢血幹細胞移植の  
確率—に関する研究」

研究全体の目的

血液、骨髄系はもともと自己修復、再生能力を有し、その特質を利用した同種ならびに自己造血細胞移植療法(同種骨髄、末梢血、臍帯血、自己骨髄、末梢血幹細胞移植ならびに同種リンパ球系細胞輸注;DLI)は、それまで不治の病とされてきた各種疾患、病態を有する患者に高い確率で治癒と良好なQOLをもたらしてきた。本研究はこれら多様な同種、自己造血細胞移植を一体的に捉え、そのさらなる成績向上、適用範囲の拡大、ならびにドナーの負担の軽減を、同種又は自己由来の血液、骨髄系細胞の、自己修復、再生能力を最大限に引き出すことにより実践することを目的とする。

平成13年度研究テーマ

- テーマ 1. 造血細胞移植(DLI)から細胞治療へ
- 1) Ex vivo培養CD4陽性細胞を用いた細胞治療の基盤整備と実施
  - 2) 抗原特異的ex vivo培養T細胞による細胞治療の基盤整備と実施
  - 3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植のための基盤整備
  - 4) 自家造血幹細胞移植の確立と海外ドナーからの移植の推進
  - 5) HLA不適合移植の基盤整備—成分移植(Clini-MACX)と母児間移植—
  - 6) 骨髄、末梢血系幹細胞のex vivo増殖
- テーマ 2. ヒト組織適合抗原の解析と応用
- 7) HLA-C座抗原の役割
  - 8) HLA-DNAタイピングの意義の確立
  - 9) マイナー抗原の解析
  - 10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の件察
- テーマ 3. 造血細胞移植対象疾患の拡張
- 11) 膠原病に対する造血細胞移植

造血細胞移植の問題点と研究班のテーマとの関係

問題点	テーマ(当班)	テーマ(他班)
供給率:	自家移植、母児間移植、成分移植(CliniMACX)、臍帯血	Ex vivo増殖幹細胞
対象年齢:	Mini-transplant + 活性化CD4	
対象疾患:	膠原病、その他の癌など	
拒絶とGVHD:	組織適合性抗原(MHC, mHa)	
再発:	DLI、活性化CD4、HLA-C、mHa、特異的T細胞	
TRM:	同種末梢血幹細胞移植、Mini-transplant、成分移植 + 活性化CD4 又は 特異的T細胞	

平成13年度に予定される共同研究(案)

1. FK506をGVHD予防に用いた非遺伝母HLA抗原(NIMA)相補的血縁者間造血幹細胞移植に関する臨床試験
2. 末梢血CD34陽性細胞を用いたHLA 2~3抗原不一致血縁者間同種造血幹細胞移植
3. 活性化CD4陽性細胞を用いたDLI
4. HLA一致同種間造血幹細胞移植におけるマイナー組織適合抗原不適合と臨床経過との相関の検討とこれを目的とした細胞及びDNAバンクの設立

## Ex vivo 培養による CD4 陽性細胞を用いた細胞治療の基盤整備と実施

先端医療センター再生医療部 伊藤 仁也、京都大学発達小児科学 中畑 龍俊  
株式会社リンフォテック 関根 暉彬、感染症細胞治療研究会

### 1. 細胞療法の基盤整備について

細胞治療は行政面においてもここ半年間、大きな転帰を迎えた。2000 年 12 月に厚生省より「ヒト由来細胞組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」が出され 2001 年 1 月にはこれまでの GMP を細胞治療の特徴に合わせた FDA からの Current Good Tissue Practice for manufacturers of human cellular and tissue-based product; Inspection and enforcement; proposed rule によって GTP のガイドラインが示された。これを受け、「細胞組織医薬品及び細胞組織医療用具に関する取り扱いについて」という厚生労働省令が薬事法の一部改正という形で 2001 年 4 月 1 日より施行された。これにより、我が国でも細胞療法用に加工した細胞が薬事法のしほりをうけることになった。

活性化 CD4 陽性細胞輸注療法の臨床試験を進める上で GTP に沿った細胞加工の基盤を整備する必要がある。具体的には CPC(Cell processing center)の整備、投与用活性化 CD4 陽性細胞調整工程のバリデーション、SOP の作成、倫理委員会、ドナー追跡調査などのソフト面の整備も行う必要がある。

### 2. 細胞免疫療法における臨床試験の問題点

細胞免疫療法の臨床試験は化学療法とは異なり cytotoxic な効果よりも cytostatic な効果が認められることが多く、腫瘍縮小率などの効果判定基準が使いにくい、また副作用の発現がアレルギー反応や GVHD の出やすさなど製剤そのものも副作用ではない反応が出現することなど必ずしも dose dependant ではないことから phase I study の信頼性も得にくいといった問題がある。さらには投与細胞数などの dose の設定や、効果判定を MRD の消失を end-point に設定するにしても個々の白血病や HLA の一致度などの factor が大きく、order-made 治療的な面があり、Phase II study においてはさらに標準的手法がとりにくいと思われる。しかし、DLI においてはすでに塩原らのわが国における全国調査の成績が存在すること、primary end-point を寛解導入率や手技的に煩雑ではあるが、MRD の消失、副作用の代表として GVHD の出現に規定することにより他の免疫細胞療法と比較して臨床試験を組みやすいと考えられる。我々は旭川医大で行った preliminary な pre-pilot study を行い、その結果より感染症細胞治療研究会参加施設で、臨床試験を開始したので報告する。

### 3. 活性化 CD4 陽性細胞輸注療法の preliminary pilot study の成績

我々は現在の DLI の最大の問題点である GVHD を軽減するという目的のもと活性化 CD4 陽性細胞輸注の study を開始した。さらには Phase Ib 的な要素も加味し、surrogate marker として個々の白血病細胞 cell line を樹立し、MRD の検索と自己白血病に対する Cr release 法による cytotoxic assay、リンパ球サブセットやリンパ球幼弱試験、IL-2 反応能などの T cell 機能検査を行った。造血細胞移植に伴う合併症治療として白血病の再発、CMV 感染症、生着不全・拒絶に対してそれぞれ study を組んだが、症例数が少ないため、今回は異なる対象をまとめて、副作用の出現に主眼を置き、報告した。

Case	Donor HLA	purpus of DLT	先行 GVHD	DLI後 GVHD	Effect	Outcome
1 8y M ALL(L1)	sib 6/6	Relapse	III	I	CR	† 10M VHAS
2 1y F ALL(L1)	mother 3/6 CD34. BMT	Relapse	II	0	CR	† 8M relapse
3 16y M ALL(L1)	sib 6/6	Relapse	II	0	CR	alive
4 19y M CML(ACP)	sib 6/6	Relapse	0	0	CR	alive
5 10y M AML(M O)	mother 3/6 CD34. BMT	Relapse	III	-	-	† MOF
6 11y M Aplastic Anemia	sib 6/6	CMV	III	0	CMV negative	alive
7 8y F Aplastic Anemia	sib 6/6	Rejection	II	0	Engraft	alive

対象は左表に示すように 7 例で、活性化 CD4 陽性細胞輸注を行った。症例 4 を除き、輸注前あるいは骨髄移植後に II 度以上の GVHD が出現しており、また 2 例は HLA haploidentical な移植であり、通常の DLI による重症 GVHD 出現の high risk 症例と考えられた。副作用は DLI 後の急性 GVHD が 1 例に認められた。症例 5 は早期死亡例であることとステロイド使用のため、脱落例であり評価不能であった。症例 6 は輸注後 3 カ月後、

Advers effect n=7	
Acute GVHD	1
Chronic GVHD	1
Pancytopenia	0
Vascular leak syndrome	0
Fever	1
Headache	1

眉毛の白髪化が認められ、limited chronic GVHD と考えられたが無治療で軽快した。その他の副作用として輸注後の発熱と頭痛が1例に認められたが、LAK療法で認められる vascular leak 症候群のような重篤なものはない。

効果としては、白血病再発の4例でMRDの消失と輸注後患者末梢リンパ球の自己白血病細胞に対する cytotoxic activity が有意に上昇した。また体内で CD3/DR 陽性細胞の上昇が認められ、これはほぼ cytotoxic activity の上昇と相関したため、有用なマーカーになる可能性が示唆された。

再発白血病での効果発現までの期間は約3週間を要し(臨床症状、MRDの消失)通常のDLIと比較して効果発現までの短縮効果は認められなかった。しかし、対象症例が3例は転座を有するALLで1例は加速期であるCMLであることを考えると寛解導入率は通常のDLIと比較して優れていることが示唆された。

#### 4.活性化CD4陽性細胞輸注療法の多施設共同臨床試験

我々は preliminary pilot study の結果を踏まえ、感染症細胞治療研究会参加施設において多施設共同で臨床試験をスタートさせた。塩原らのDLI全国調査で寛解導入率の低かった急性白血病を対象として活性化CD4陽性細胞輸注療法の効果と安全性を検討することを目的とした。対象は急性白血病で輸注直前のII度以下のGVHDは除外項目とはしなかった。投与プロトコールとしては白血病の再発を確認後、活性化CD4陽性細胞を $1 \times 10^7/\text{kg}$ 投与し、4週間の観察期間を設けた。4週後も白血病細胞が残存する場合には2週毎に $3 \times 10^7/\text{kg}$ 、 $1 \times 10^8/\text{kg}$ とdose escalationすることとし、全8週間の観察期間で効果が認められないときはstudy offとした。観察期間中の化学療法や免疫抑制剤の投与例は脱落例とした。Primary end-pointはcomplete remission(検索可能であればMRDの消失)とGVHDとし、surrogate markerとして、輸注後経時的な骨髄キメリズム、リンパ球サブセット、T cell機能を検討した。目標症例数は塩原らのDLI全国調査における急性白血病の寛解率を20%とし、60%の寛解を得ることを目標としてMukuch RWらの方法から算出して21例、安全率をかけ、25例に設定した。製剤の品質管理としては血液寒天培地、サブロー寒天培地での細菌培養での細菌コロニー陰性、トキシカラールでのエンドトキシン $0.12 \text{ EU/ml}$ 以下とし、また $\text{CD}8 < 1\%$ 、 $\text{CD}16 < 1\%$ 、 $\text{CD}3/\text{HLA DR} > 60\%$ とし、トリパンプルー生細胞試験で95%を合格として患者に投与することにした。

また、移植後致命的合併症の一つである移植後難治性ウイルス感染症に対する臨床試験も開始した。対象は、化学療法抵抗性の難治性ウイルス感染症(CMV,EBV,HSV-1,Adeno virus,RSV),原虫感染症(cryptosporidium,Pneumocystis carinii)真菌感染症である。投与プロトコールは初回に活性化ドナーCD4陽性細胞 $5 \times 10^6/\text{kg}$ を投与し、2週間の観察期間をおき、効果が不十分であれば、2週後に $2.5 \times 10^7/\text{kg}$ の追加輸注をするものである。Primary endo-pointは投与1カ月時における感染症の有無であり、臨床症状とPCRなどによる病原体の消失または減少とした。対象症例が多種の感染症におよぶため、病原微生物ごとの症例の蓄積は難しいと考えられるが、移植後感染症においてはGVHD合併例が多く、また移植後免疫不全状態が基礎にあるので、GVHDが少なく、T cell機能を全般的に改善させることが期待される活性化ドナーCD4輸注療法は移植後難治性感染症の治療においてはreasonableな治療と考えられる。現在スタディー中であるのでまだ解析は行っていないが、免疫細胞療法の臨床試験の1例として紹介した。

#### 5.活性化CD4陽性細胞輸注療法の普及のための基盤整理

DLIにかわる活性化CD4陽性細胞輸注療法の普及のためには、GTP基準に基づく細胞加工を行い、新薬事法が定める、細胞組織医薬品の基準を満たさなければならない。国際標準の製剤をつくるため、CPCの完備、SOP、バリデーションの作成、DLI後の患者およびドナーのfollow up体制のシステムをつくる必要がある。また細胞免疫療法およびオーダーメイド療法の臨床試験をいかにデザインしていくか検討しなければならない。また、活性化CD4陽性細胞の加工には約2週間を要するため、再発や感染症のhigh risk例では、あらかじめ、細胞を培養して、凍結しておき、必要時に輸注することも必要になるかもしれない。その場合は、個人の細胞やDNAの保存に関する新たな問題などが生じることが予想され、ガイドラインづくりが必要になるかもしれない。それとともに、DLIについても作用機序は完全に解明されていないが、抗原の解析や実際のeffector cellの同定を行い、マイナー抗原や白血病キメラ蛋白に対するCTLクローンの解析など作用機序の解明に努めなければならない。現在のところ、特異免疫療法がDLIと比べて臨床効果があがらない原因として移植後の免疫の再構築の遅延による免疫不全状態下では特異的CTLを有するT cellがin vivoで維持されないことが考えられる。輸注される細胞の体内動態を解析し、非特異免疫療法+特異免疫療法の併用などよりよい治療の開発にむけ、造血細胞移植後の免疫系をあらゆる方面から解析していくことが必要であると思われる。

## 同種幹細胞移植後再発白血病に対するドナー由来 CTL 誘導及びその臨床応用について

東海大学医学部血液リウマチ内科、\*小児科、同付属病院細胞移植医療センター

土屋 貴秀、萩原 政夫、岸 賢治、\*加藤 俊一、堀田 知光

〈はじめに〉白血病同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対する治療として DLI が試みられているが、その有効性が証明されているものは慢性骨髄性白血病に限られる。又 GVHD の high grade 症例には適応しにくい、ドナーから大量の血液採取するなどの弱点も指摘されている。

今回これらをカバーする新たな試みとして、

(1) 白血病細胞そのものを抗原提示細胞とする（サイトカインによる誘導又は遺伝子導入）又は

(2) 白血病特異的遺伝子産物由来ペプチドを用いた方法による

抗白血病キラー T リンパ球 (CTL) 誘導に関する基礎的及び一部臨床応用を行った。

〈方法/結果〉

1) CD14 陽性 AML(M4,M5)6 例、CD34 陽性 AML18 例、同(全例 Ph1 陽性)ALL4 例の初診又は再発時骨髄あるいは末梢血細胞を用い、GM-CSF(100ng/ml), IL-4 (10ng/ml),TNF $\alpha$  (10ng/ml), Flt-3 (50ng/ml; CD34+白血病のみ), SCF(100ng/ml; CD34+のみ)存在下に 7-14 日間培養した (FCS+RPMI-1640)。経日的に DC marker (CD1a/83/80/86)を FACS で解析した (図 1)。

⇒CD14+AML 6/6 例において、又 CD34+AML7/ 18, ALL3/4( total 10/22)例において mature DC が誘導された。

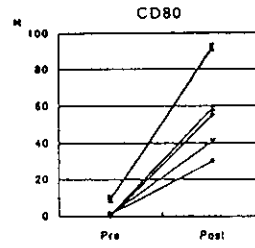
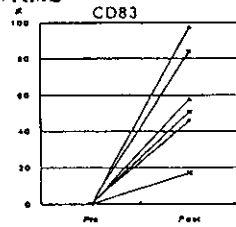
2) CD34+AML(M4) 症例において非寛解期に非血縁者間（骨髄バンクドナー）移植を行った。術後 1 ヶ月を過ぎた当たりから末梢血に blasts 出現し再発と判断された。同細胞を in vitro において GM-CSF(100ng/ml)/IFN $\gamma$  (1000U/ml)添加にて 1-2 週間培養したところ、CD54/80/86 の強力な発現誘導を認めた（再発前 blasts ではそのような結果得られなかった）。さらに末梢血単核球（内正常リンパ球 10%以下）を固相化 OKT3+IL-2(1000U/ml)にて刺激培養開始後、1 週間目より上記分化成熟白血病細胞を加えた。同白血病細胞による刺激を計 4 回繰り返したところ auto-leukemic specific CTL である事が確認された (図 2) 為、患者に静脈投与した。

◎Ph-1 ALL に対する CTL 療法の可能性について以下のごとく検討した。

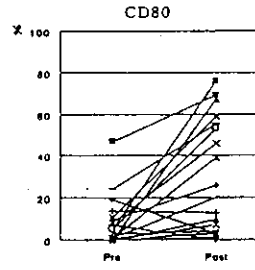
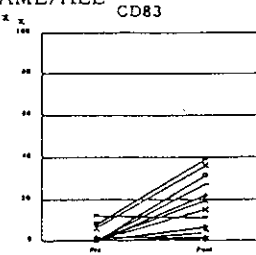
3) サイトカインによって DC 化し得ない白血病細胞 line (Ph1-ALL)に対してレンチウイルスベクターを用いて CD80 抗原遺伝子を導入した。同細胞は original 細胞に比し有意に高いアロ抗原提示能を示した(図 3)。

4) HLA-A24 への binding motif を有する minor-bcr abl peptide を合成した。A24 陽性健康人 7 名から末梢単球由来 DC を誘導し、同 peptide パルス DC を用いて健康人末梢血から CTL 誘導を試みた。2/7 例において peptide 特異的 CTL が誘導され、しかも HLA-A24+ALL lines に対する高い傷害活性を認めた (図 4)。

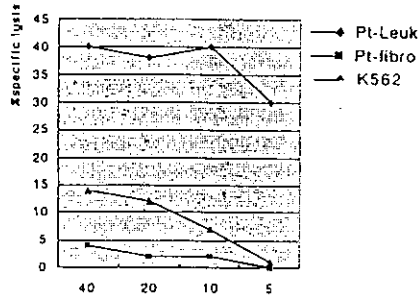
CD14+AML



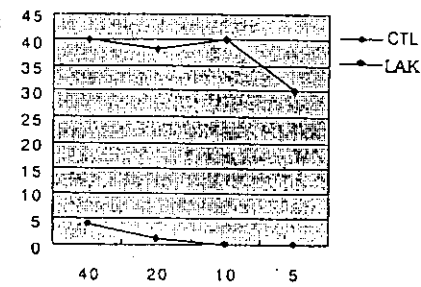
CD34+AML/ALL



Specificity of CTL

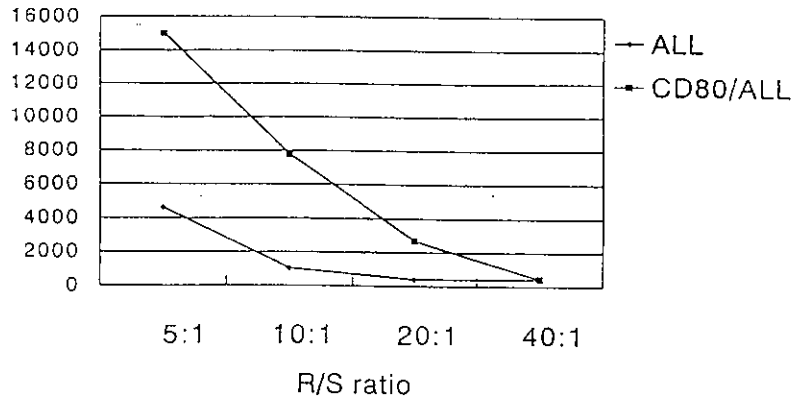


Comparison between CTL and LAK

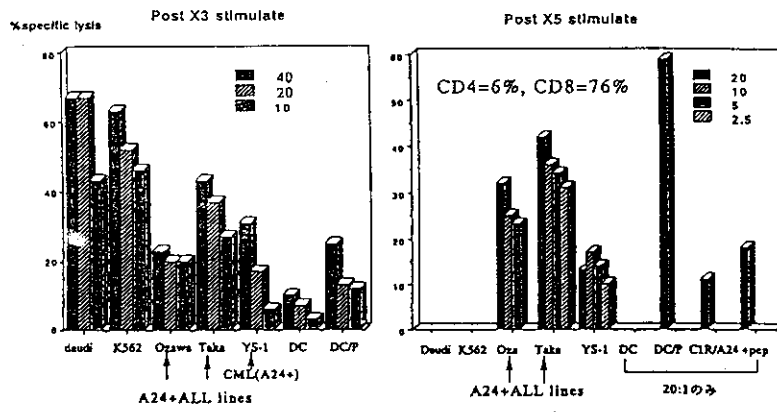


E/T ratio

cpm count Allo T lymphocytes stimulation



Anti minor bcr-abl (Ph1)-peptide CTLs



MoAb blocking (Takahashi=target);  
anti-DR=0%, anti-class I=31%

厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「造血細胞の自己修復能力，再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班  
 平成13年6月9日 平成13年度第一回研究会議 愛知県がんセンター 赤塚美樹

### 血液系細胞に特異的なマイナー抗原を認識するCTLの樹立

背景

- ① 造血器腫瘍に対する免疫療法を確立するにあたり，GVHD発症のリスクを最小限にするため，血液系の細胞にのみ発現されているマイナー抗原を認識するCTLが重要。
- ② マイナー抗原はなるべく頻度の高いHLAアレルに拘束されている方が，将来より多数の造血器腫瘍患者に免疫療法を行う可能性を提供する。

### 方法

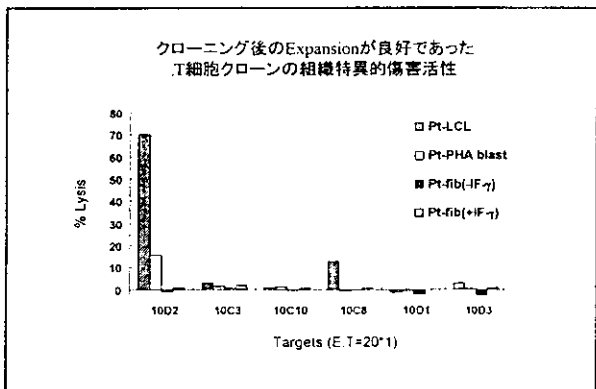
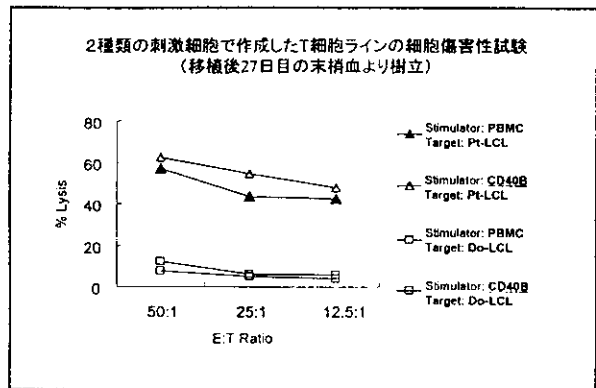
- ① 細胞傷害性T細胞ラインの樹立：  
抗原提示細胞として移植前に採取した末梢血単核球に加え，B-LCLや活性化B細胞等も使用。
- ② 細胞傷害性試験の標的細胞  
PHA芽球，B-LCL，皮膚線維芽細胞の他，口腔粘膜上皮等も可能な限り利用。
- ③ T細胞クローニング  
移植前に採取した末梢血単核球が十分あればそれを主に利用するが，ない場合は活性化B細胞を刺激細胞とする他，OKT3による刺激を行う。
- ④ 得られたクローンの特異性のスクリーニング  
種々の標的細胞を用い血液系細胞に特異的なCTLを選別  
HLA cDNAトランスフェクタントを用いて，HLA拘束性のスクリーニング

### 症例

UPN003 54歳 女性  
 CML (accelerated phase)  
 HLA一致の兄弟(男性)より骨髓移植

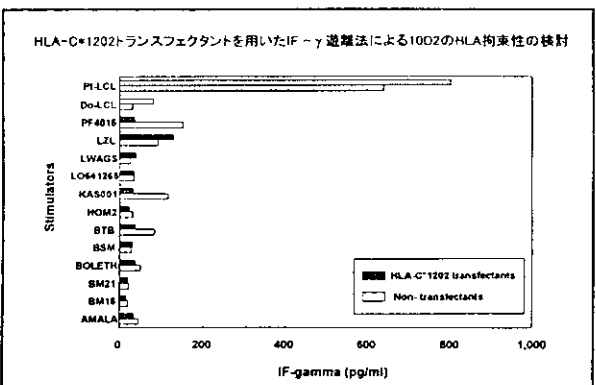
HLA type  
 A\*2402, 3303 B\*5201, 4403 Cw\*1202, 1403  
 DR6, 15

急性GVHD なし  
 慢性GVHD 口腔内および皮膚  
 移植後8ヶ月の段階で，再発の兆候なし



### パネルLCLをもちいたクローン1002のHLA拘束性の検討

	HLA-A		HLA-B		HLA-C		% Lysis
	2402	3303	4403	5201	1202	1403	
UPN003 LCL	-	-	-	-	-	-	58.0
NGY	2402	-	48	58	0901	0303	5.1
KY	2402	-	5204	39	0702	1202	3.3
DT	2402	3101	55	3707	0102	-	1.4
NSG	2402	0208	5401	39	0102	0702	3.7
TDR	2402	-	4002	4001	0304	1502	1.3
IMI	2402	1101	1501	07	0102	0702	-2.1
Mori	2401	31	35	52	w3	-	0.0
JSW	0301	29	0702	44	w07	w16	-5.6
DCW	0301	29	0702	44	w07	w16	-8.5
SDK	1	0201	4501	4901	0403	1202	28.4
KAS118	2402	-	5101	-	1203	-	-3.5
KOSE	0201	-	3503	-	1203	-	-5.7
YAR	2601	-	3801	-	1203	-	-4.5



### その他の1002についての知見

- ① HLA-C\*1202以外の全ての class I アレルについてトランスフェクタントを作成したが，いずれについても1002が認識するものはなかった。
- ② 1002が唯一認識した SDK LCLを用いて，1002をクローニングするのに用いたT細胞株で intracellular IF-gamma アッセイをしたところ，患者LCLに反応するT細胞の約50%がSDK LCLと反応し，1002はT細胞株の中で主要な集団であったことが分かった。

今後の方向性

HLAや不適合マイナー抗原の組み合わせにより，患者細胞に反応してくるT細胞は様々と考えられるので，逆に細胞株の段階で増殖しているT細胞のHLA拘束性を調べて，もし意圖のあるHLA(A\*2402など)に拘束されているT細胞が存在していればクローニングに進むようにする。

マイナー抗原の適合性と臨床への影響を検索するためのDNAバンクの設立についての提案

背景

- ① 血液系細胞特異的と報告されているHA-Iは現在免疫療法への応用が期待されているが、もともと重症急性GVHDの危険因子として発見された。
- ② ほとんどの体組織で発現しているHA-Iは550例の解析の結果、GVHD発症への寄与は少ないにもかかわらず、一部の症例で生存率を低下させた。
- ③ 以上より、マイナー抗原の不適合と臨床経過を統計学的に検討することが各マイナー抗原の真の臨床的意義を知る上で重要と思われる。

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」にもとづくDNAバンク設立の意義

U-3-(1)「生命現象の解明、診断、治療、予防方法の改善、健康の増進」を目的とし、

本研究は骨髄移植後の致死合併症である移植片対宿主病の原因と考えられているマイナー抗原の不一致と臨床との相関を調べ、多数あるマイナー抗原のうちどれが重要かを決定するものである。主因となるマイナー抗原が特定できれば、今後移植前の検査により危険性が予期でき、よりよい骨髄ドナーを選定できる。

一部のマイナー抗原は白血病細胞のみに発現しており、これを標的とした新たな免疫療法が開発できる可能性がある。しかし、本当にそうしたマイナー抗原が白血病を駆逐する効果以外に、臨床に悪影響を及ぼさないかは臨床研究で検討するしかない。

試料収集上の問題点として、マイナー抗原ごとに関連しているHLA型が違っているので、全ての患者データおよびその試料が使えただけではない。また、マイナー抗原の研究が出来るのは同種間でHLA一致移植を行った症例に限られ、その成人患者数は日本全国で年間わずか320例程度である。一方、統計処理に耐える必要最低症例数は300~500例程度で、希なHLA型を対象とすると、母集団は2000例を超える。これだけの数の試料を収集するには、新たなマイナー抗原についての検索を始める前に、事前にバンクを設立しておく必要がある。

愛知県がんセンター遺伝子解析研究申請書 (抜粋)

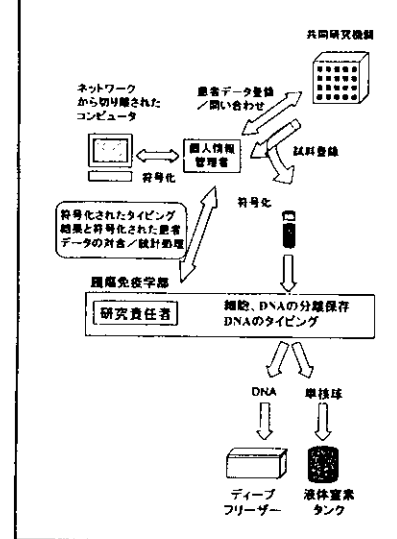
1 課題名	HLA-I類抗原間造血幹細胞移植におけるマイナー組織適合抗原不適合と臨床経過との相関性の検討とこれを目的とした細胞およびDNAバンクの設立		
2 研究者名	所属 血液化学療法部 腫瘍免疫学部	職氏名 部長 主任研究員	倉島 泰雄 赤塚 美樹
3 共同研究者	所属 疫学・予防部 腫瘍免疫学部	職氏名 部長 部長/所長	濱嶋 信之 高橋 利忠
4 共同研究機関の名称等	(下の共同研究機関と協定できない場合はその理由及び参加が予定される共同研究機関の名称) 厚生科学研究所ヒトゲノム・再生医療等研究事業「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班(小寺班)あるいは日本造血幹細胞移植学会参加施設に共同研究を呼びかけ、現在後述で進行中であるデータバンク(事務局長:愛知県がんセンター疫学・予防部)に患者登録の際、本研究の説明と同意を得た上で試料の採取を行う。 ③原則として平成19年4月1日より小寺班の継続期間である平成19年3月31日まで新規登録を行い、平成18年3月31日まで採取した試料は保存し、mHLAの解析を進行する。 ④本研究はブロスベクティブ研究であり、造血幹細胞移植後の合併症や予後との相関のあるマイナー組織適合抗原を究め、最終的には患者とドナー間の組織適合性の事前診断や、マイナー組織適合抗原を標的とした免疫療法に活用することにある。従って現時点では、試料提供者に対し直接的に有益な情報をもたらすことはない。 ⑤試料提供者からは末梢血の採取を行うが、少量(20ml以内)であり危険性はないと考えられる。 ⑥個人識別情報の厳重な管理のため、個人情報管理者(愛知県がんセンター疫学・予防部 田島和雄)を置き、試料提供者の符号化(匿名化)を行った上で登録される。個人情報管理者はネットワークから切り離されたコンピュータを用いて管理を行う。分離された単核球細胞やDNA試料も個人情報管理者により符号化された上で保存される。このように2重の符号化がなされるため、試料提供者の臨床情報と本研究で得られたマイナー抗原等の解析結果との対応は個人情報管理者を介してのみ可能であり、個々の試料に関する個人情報は解析を行う研究者の目に触れることなく、極めて厳重に保管される。		
6 研究の目的、方法、期間、予測される成果、予測される試料等提供者に対する危険や不利益及び個人識別情報を含む情報の保護の方法	①患者とドナー間のmHLAの不適合が造血幹細胞移植後の臨床経過に及ぼす影響の調査を行うにあたり、臨床試料を採取し、細胞およびDNAバンクを作成する。得られたDNAを用いて既知のHLA-I、HLA-II抗原について検討するが今後新たにmHLAが見いだされた場合はそれらについても検討する。 ②厚生科学研究所ヒトゲノム・再生医療等研究事業「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班(小寺班)あるいは日本造血幹細胞移植学会参加施設に共同研究を呼びかけ、現在後述で進行中であるデータバンク(事務局長:愛知県がんセンター疫学・予防部)に患者登録の際、本研究の説明と同意を得た上で試料の採取を行う。 ③原則として平成19年4月1日より小寺班の継続期間である平成19年3月31日まで新規登録を行い、平成18年3月31日まで採取した試料は保存し、mHLAの解析を進行する。 ④本研究はブロスベクティブ研究であり、造血幹細胞移植後の合併症や予後との相関のあるマイナー組織適合抗原を究め、最終的には患者とドナー間の組織適合性の事前診断や、マイナー組織適合抗原を標的とした免疫療法に活用することにある。従って現時点では、試料提供者に対し直接的に有益な情報をもたらすことはない。 ⑤試料提供者からは末梢血の採取を行うが、少量(20ml以内)であり危険性はないと考えられる。 ⑥個人識別情報の厳重な管理のため、個人情報管理者(愛知県がんセンター疫学・予防部 田島和雄)を置き、試料提供者の符号化(匿名化)を行った上で登録される。個人情報管理者はネットワークから切り離されたコンピュータを用いて管理を行う。分離された単核球細胞やDNA試料も個人情報管理者により符号化された上で保存される。このように2重の符号化がなされるため、試料提供者の臨床情報と本研究で得られたマイナー抗原等の解析結果との対応は個人情報管理者を介してのみ可能であり、個々の試料に関する個人情報は解析を行う研究者の目に触れることなく、極めて厳重に保管される。		
7 提供を受けようとする試料等の種類とそれぞれの量	患者と造血幹細胞提供者より末梢血を30ml採取し、細胞および抽出したDNAを保存する。		
12 試料等またはそこから得られた遺伝子情報を国内外の公的研究機関、営利を目的としない団体の研究機関または大学に対して提供する可能性とその方法	提供を受けた試料または解析結果は厚生科学研究所ヒトゲノム・再生医療等研究事業「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班(小寺班)あるいは日本造血幹細胞移植学会を通じてそれらに所属する国内の公的研究機関、営利を目的としない団体の研究機関または大学に提供される可能性がある。上述のごとく匿名化を行うので、個々の試料に関する個人情報は解析を行う研究者の目に触れることはない。		

収集する臨床および試料データについて

個人情報管理者にすべての臨床データは送られ、逐次調査も個人情報管理者より各共同研究機関の担当者へ照会を行う。患者およびドナーの血液試料は個人情報管理者あてに送られ、そこで符号を割り当てられた後分離保存処理を行う。最終的に個人情報管理者を通じて以下のデータの対合を符号で行い、統計学的解析をおこなう。

患者データ項目	ドナーデータ項目
①年齢/性別	①年齢/性別
②診断名/病期	
③HLA型	
④造血幹細胞移植年月日	
⑤移植前処置と免疫予防法	
⑥移植造血幹細胞の種類	試料に対する検査項目
⑦急性および慢性拒絶反応の有無とその時期、程度	①必要に応じてDNAレベルでのHLA型
⑧拒絶反応に対する治療とその効果	②研究対象のマイナー組織適合抗原の型
⑨再発の有無と再発後の経過	
⑩生存の有無	

登録と採取した試料のながれ



連絡先: 赤塚 美樹  
 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部  
 TEL 052-762-6111 (内線 7044) FAX 052-764-2991  
 e-mail: yakatsuk@aichi-cc.pref.aichi.jp  
 〒464-8681 愛知県名古屋市千種区鹿子殿1-1

H-Y 抗原を標的とした難治性白血病細胞に対する CTL の樹立  
—in vivo における GVL 効果担当細胞の可能性—

班員：金沢大学・輸血 塩原信太郎

研究協力員：金沢大学・院・細胞移植 ○高見昭良，中条達也，近藤恭夫，中尾眞二

【目的】Y染色体に遺伝子座を有する男性特異的なマイナー組織適合抗原 (mHA) H-Y を標的とした白血病特異的な免疫療法の可能性を検討した。

【方法と結果】同種骨髄移植後に CML リンパ性急性転化再発をきたした男性患者 (HLA-A2 陽性) に対し，HLA 一致同胞ドナーである姉の血液から樹状細胞 (DC) を誘導した。HLA-A2 への結合モチーフを有する H-Y ペプチド FIDSYICQV でパルスした DC を抗原提示細胞に用いて，ドナー由来の CD8 陽性 CTL を樹立した。H-Y ペプチドパルス後のドナー DC を標的とした場合，ペプチド濃度依存性の細胞傷害活性が認められた。さらにこの CTL は，患者白血病細胞・線維芽細胞，男性由来 LCL に対し HLA-A2 拘束性の細胞傷害活性を示した (図1)。再移植後，分子遺伝学的寛解の時期に CD8 陽性細胞を採取し，H-Y ペプチドで5時間刺激したところ，6.8%が IFN- $\gamma$  陽性となった。この CD8 陽性 IFN- $\gamma$  陽性細胞に対し，T細胞レセプター $\beta$ 鎖の CDR3 領域を PCR により増幅したところ，4種類の BV ファミリーに増幅産物が検出された。CDR3 サイズ・スペクトライピングを用いて検討したところ，BV22 において ex vivo で誘導された CTL と同じサイズのピークが認められた (図2)。

【考察と結語】今回の結果から，再移植後の患者流血中にも H-Y ペプチド FIDSYICQV 特異的 CTL と同じクロナタイプの T細胞が存在し，抗原特異的な反応を示していることが示唆された。このような CTL は，強力な GVL 効果誘導と同時に GVHD を惹起する恐れもあることから，H-Y 抗原を用いた CTL 療法については安全性の確保と適用の判断が今後の課題と言える。



図1 H-Y ペプチド特異的 CTL による細胞傷害活性

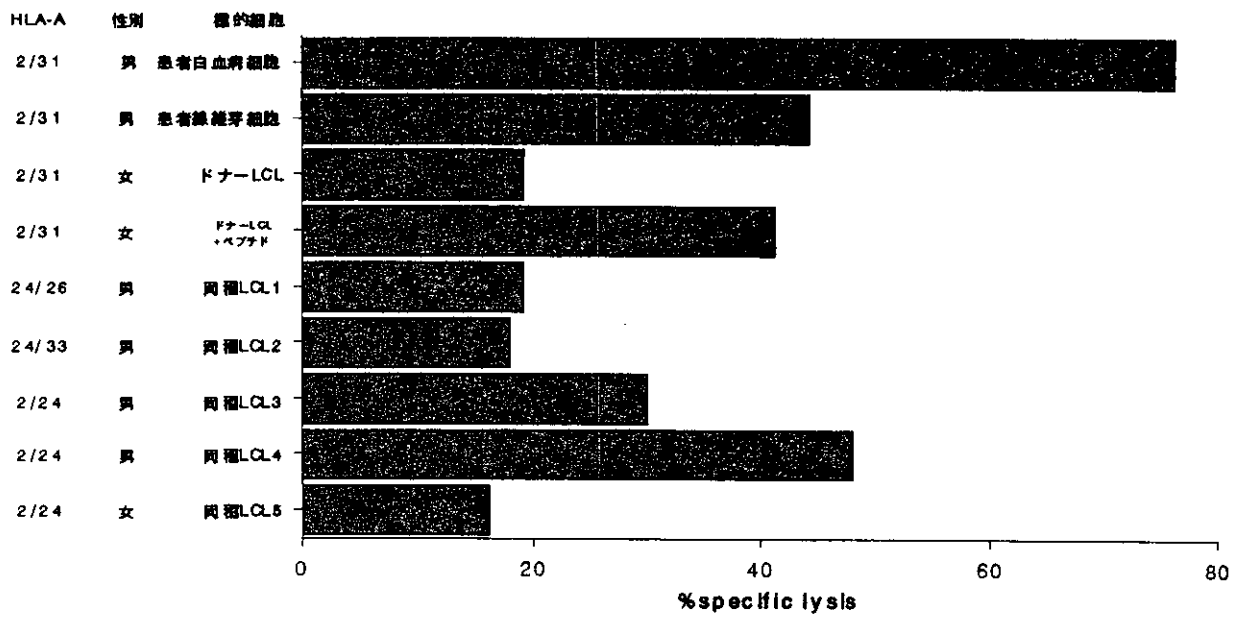
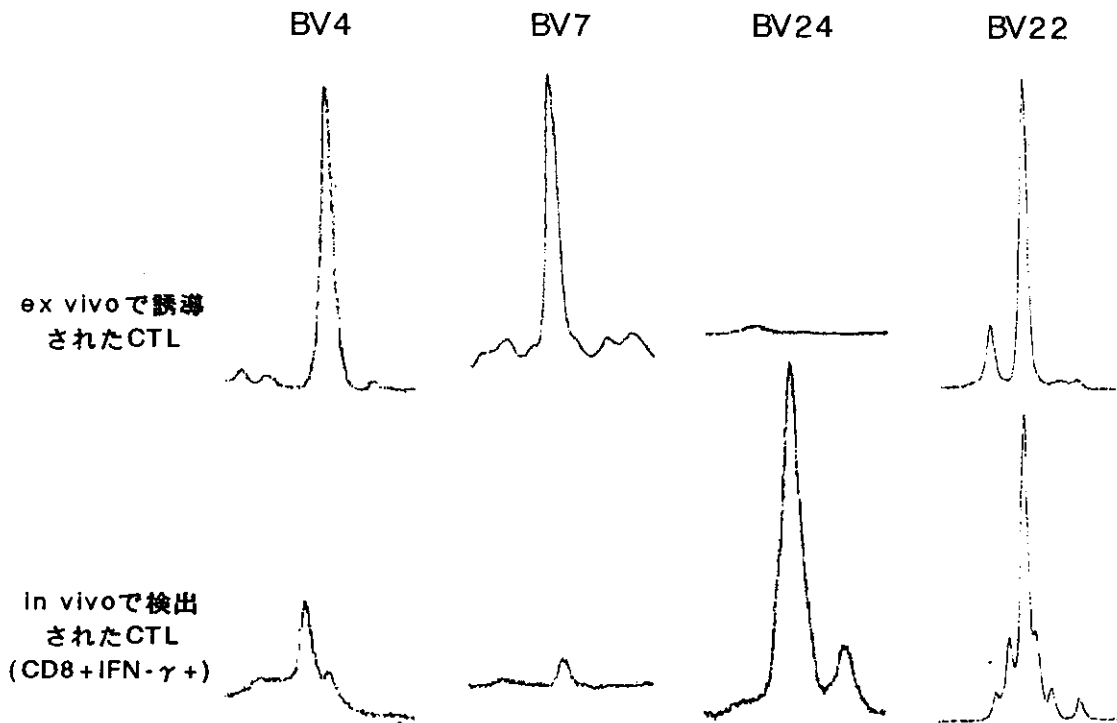


図2 T細胞レセプターβ鎖のレパトア解析 (CDR3 サイズ・スペクトラタイピングを用いた検討)



# WT1を標的とした造血器悪性疾患に対する抗腫瘍免疫療法

大阪大学分子病態内科学 坪井昭博、岡芳弘、Olga Elisseva、小川啓恭、杉山治夫

はじめに

Wilms' tumor遺伝子 (WT1)は白血病や種々固形癌で高発現しており、WT1アンチセンスオリゴマーにより、これらの細胞の増殖が抑制されることから、oncogenic様の機能をはたしている。これらのことから、WT1蛋白は、白血病や固形癌の免疫療法の有望な targetと考えられる。

マウスモデル

マウス (C57BL/6, MHC class I : H-2D<sup>b</sup>)を用いて、WT1免疫療法のモデル実験を行った。449個のアミノ酸からなるWT1蛋白の配列のなかに、H-2D<sup>b</sup>分子への結合に必要なアンカーモチーフをもった9個のアミノ酸からなる配列が、3ヶ所存在したので、この3ヶ所の9-mer WT1ペプチド (Db126, Db235, Db221)を合成し、H-2D<sup>b</sup>分子への結合能を測定したところ、表1に示すように、3種類の9-merペプチドは、H-2D<sup>b</sup>分子への結合能を示したので、これらを用いてWT1特異的CTLの誘導を試みた。マウス脾細胞のLPS blastに、これらのWT1ペプチドをパルスし、免疫したところ、3種類のペプチドのうち、Db126の免疫でのみ、WT1特異的CTLが誘導された。このWT1特異的CTLは、WT1を発現している腫瘍細胞(FBL3, C1498-muWT1, EL4-muWT1)を特異的に障害した (図1)。また、このWT1特異的CTL活性は、抗H-2D<sup>b</sup>抗体の存在下で有意に抑制され、このCTLはMHC class I拘束性に働くことが確認された。次に、腫瘍の拒絶実験を行った (図2)。Db126 WT1ペプチドでマウスを免疫した後、WT1発現白血病細胞FBL3を腹腔に移植したところ、最初の3-4日目から腹水が貯留し、しだいに増加するが、その後しだいに腹水が減少、消失し、全匹生存した。他方、Db126で免疫しなかったコントロールマウスでは、腹水が増加し続け、腫瘍死した。また、正常細胞の一部にもWT1が発現しているため、これら正常細胞がWT1特異的CTLで自己免疫的に障害される可能性があるため、FBL3白血病細胞を拒絶したマウスのWT1発現臓器を病理組織学的に解析したが、異常がみられず、正常臓器の障害なく白血病細胞のみ拒絶できることが明らかとなった。

表1 H-2D<sup>b</sup>分子へのWT1ペプチドの結合能

Peptide name	Amino acid sequence	Kd (M)
WT1 peptides		
Db 126	a.a. 126-134 RMFPNAPYL	$5.7 \times 10^{-7}$
Db 235	a.a. 235-243 CMTWNQMNL	$1.3 \times 10^{-6}$
Db 221	a.a. 221-229 YSSDNLQYM	$2.6 \times 10^{-6}$
Known epitope peptides		
SV40 T antigen	a.a. 223-231 CKGVNKEYL	$1.9 \times 10^{-7}$
Influenza A34 NP	a.a. 366-374 ASNENMETM	$1.9 \times 10^{-7}$

太字はアンカーモチーフを示す

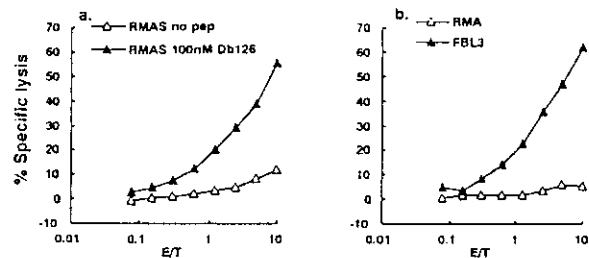


図1 WT1 (Db126) 特異的CTLsによるWT1発現腫瘍細胞の傷害

- Db126 WT1ペプチドをパルスしたRMAS細胞と、パルスしていないRMAS細胞に対するkilling assay
- WT1を発現していないRMA細胞と、WT1を発現しているFBL3白血病細胞に対するkilling assay
- WT1を発現していないC1498細胞と、WT1遺伝子を導入してWT1を発現させたC1498-muWT1細胞に対するkilling assay
- WT1を発現していないEL4細胞と、WT1遺伝子を導入してWT1を発現させたEL4-muWT1細胞に対するkilling assay。EL4では、H-2D<sup>b</sup>分子の発現が弱いので、killingも弱い。

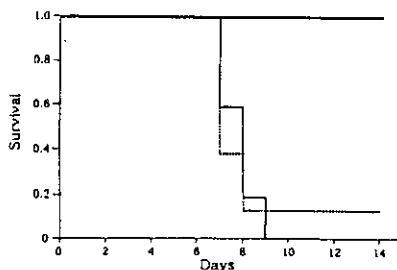


図2 WT1ペプチド (Db126) の免疫による腫瘍細胞の拒絶

Db126でパルスされた脾細胞のLPS blast (実線)、あるいは、Db126でパルスされていない脾細胞のLPS blast (影線)、あるいは、PBSのみ (破線) でマウスを免疫した後、WT1発現白血病細胞FBL3を腹腔に移植した。

## ヒトの系

白人の約60%、日本人の約20%が有するHLA-A0201で、WT1特異的CTLの誘導を試みた。449個のアミノ酸からなるヒトのWT1蛋白の配列から、HLA-A0201分子への結合に必要なアンカーモチーフをもつ9merのアミノ酸配列が4ヶ所見いだされたので、この4ヶ所の9mer WT1ペプチド (Db126、WH187、Db235、WH242)を合成し、HLA-A0201分子への結合能を測定したところ、表2に示すように、Db126とWH187の2種類の9mer WT1ペプチドが比較的強い結合能を示したので、この2種類のペプチドを用いて、WT1特異的CTLの誘導を試みた。HLA-A0201の健康人の末梢血から単核球を分離し、この単核球を9mer WT1ペプチドをパルスしたT2細胞 (TAP欠損のため細胞内在性の抗原をHLA上に提示できないミュータント細胞。この細胞のHLA分子はemptyであるので、パルスした抗原が効率よくHLAに結合するため、刺激細胞としてや、killing assayの標的細胞として有用である) で刺激するため、両者を共培養したところ、WT1ペプチドでパルスされたT2細胞を障害するWT1特異的なCTLが誘導された。このWT1特異的なCTLはWT1発現 (+)、HLA-A0201(+ )の腫瘍細胞は障害したが、WT1発現 (+)、HLA-A0201(-)やWT1発現 (-)、HLA-A0201(+ )の腫瘍細胞は障害しなかった。よって、誘導されたCTLは、WT1特異的、HLA拘束性であることが確認された。また、日本人の約60%が有するHLA-A2402でも、末梢血単核球から、HLA-A2402分子に対するアンカーモチーフをもった9merのWT1ペプチドでのin vitro刺激で、WT1特異的なCTLが誘導された。

表2 HLA-A2.1分子へのWT1ペプチドの結合能

Peptide name	Amino acid sequence	Kd (M)
WT1 peptides		
Db126	a.a. 126-134 RMFPNAPYL	$1.89 \times 10^{-6}$
WH187	a.a. 187-195 SLGEQQYSV	$7.61 \times 10^{-6}$
Db235	a.a. 235-243 CMTWNQMNL	$10^{-4} <$
WH242	a.a. 242-250 NLGATLKGV	$4.33 \times 10^{-5}$
Known epitope peptides		
HIV-1 RT	a.a. 476-484 ILKEPVHGV	$3.99 \times 10^{-7}$

太字はアンカーモチーフを示す

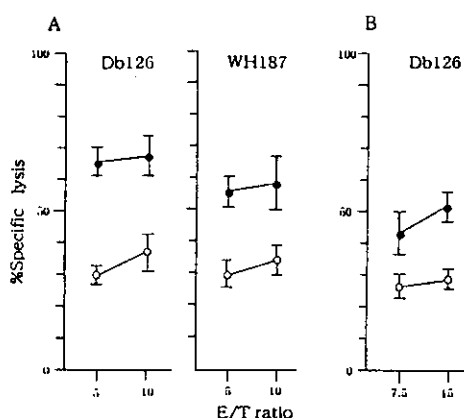


図5 ヒトでのWT1特異的CTLsの誘導

HLA-A2.1の末梢血単核細胞を、WT1 Db126あるいは、WT1 WH187ペプチドでパルスしたT2細胞との共培養でin vitro刺激し、WT1ペプチド特異的CTLsを誘導し、WT1ペプチドをパルスした(黒丸印)あるいはパルスしていない(白丸印)T2細胞(A)、あるいは、JY細胞(B)をターゲットにして、殺細胞活性を測定した。

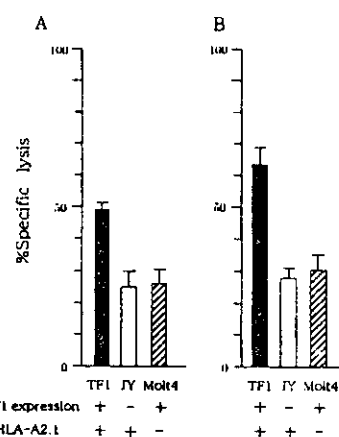


図6 WT1特異的、HLA拘束性のCTLsの誘導  
Db126ペプチドで誘導されたCTLsは、E/T ratio 7.5:1 (A)および15:1 (B)で、TF1腫瘍細胞 (WT1<sup>+</sup>, HLA-A2.1<sup>+</sup>) を殺すが、JY腫瘍細胞 (WT1<sup>-</sup>, HLA-A2.1<sup>+</sup>) やMolt4細胞 (WT1<sup>+</sup>, HLA-A2.1<sup>-</sup>) は殺さなかった。

WT1は白血病で腫瘍抗原となり、腫瘍特異的免疫療法の有望なtargetになりうるということが明らかとなった。今後臨床治験を行い実際のヒトでの有用性を明らかにしていきたい。

平成 13 年度第 1 回研究会議

樹状細胞を用いた腫瘍特異的 CTL の誘導とその臨床応用

新潟大学 第一内科、無菌治療部  
古川達雄、成田美和子、高橋益廣

#### 【目的】

樹状細胞(DC)は最も強力な抗原提示細胞であり、DC を用いることにより、腫瘍特異的 T 細胞が誘導可能であることが報告されている。今回我々は、種々の方法で誘導した DC を用いて、腫瘍特異的 CTL 誘導を試みてきたので、その結果を報告し、最後に最近施行した DC 療法の臨床応用についても、結果を報告する。

#### 【方法と結果】

1. 正常人末梢血細胞に GM-CSF、IL-4 添加で培養した後、腫瘍特異的ペプチドをパルス後に TNF- $\alpha$  を添加して成熟 DC を誘導、自己リンパ球と共培養すると(Fig 1)、ペプチド特異的な細胞障害活性を認め、その細胞集団には、TCR レパトア解析での偏りが認められ、CDR3 領域の配列解析の結果からはオリゴクローナルが推定された。
2. 腫瘍特異的ペプチドが不明な場合には、腫瘍細胞の Lysate pulse によって、腫瘍特異的 CTL が検出できた。
3. 腫瘍特異的 CTL は allo の系においても、誘導可能であった。すなわち CML 症例における BMT Donor から誘導した DC にペプチドまたは lysate パルスをした系において、CTL line が誘導可能であった。この CTL line は recipient の CML クローンに対する増殖抑制能を有することを確認した(Fig 2)。
4. 急性白血病では、白血病細胞自身を Cytokine を用いて、DC like 細胞に誘導することが可能であり(Fig 3)、このような Leukemic DC は多くの AML 症例において誘導可能であった(Fig 4)。
5. DC における特異的抗原提示能は、細胞自身のみならず、細胞が分泌するエクソソームにおいても検出された。
6. 高度進行・再発食道癌に対する SART-1 ペプチドパルス樹状細胞療法は、比較的副作用が少なく安全に施行できた。樹状細胞療法を受けた症例において、パルスした抗原に反応する T 細胞の出現(in vivo, Fig 6)、およびパルスした DC の刺激により、癌抗原に反応する CTL の誘導(in vitro, Fig 5)が確認された。

#### 【考案とまとめ】

樹状細胞を用いて腫瘍特異的 CTL を誘導するには、種々の方法が検討されてきている。今回我々は単球由来樹状細胞を用いて、腫瘍特異的ペプチドや、腫瘍細胞抽出液でパルスすることで in vitro における腫瘍特異的 CTL を誘導することを確認した。ほかに腫瘍抗原の cDNA や腫瘍細胞 RNA の導入などによって、特異的 CTL 誘導が報告されてきている。

またこのように強力な抗原提示能を有する DC を用いた特異的癌免疫療法についても、比較的 safely 施行することができたことは、今後の臨床応用の可能性が確認されたと考えている。まだ症例が非常に少ないが、一部の症例において、パルスした抗原に反応する T 細胞が検出されたことは、今後の臨床応用の可能性を示唆するものと考え報告した。