

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

がん特異的細胞傷害性 T 細胞
活性化に基づく免疫治療の構築

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 葛島 清隆

平成17(2005)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- がん特異的細胞傷害性T細胞活性化に基づく免疫治療の構築に関する研究…… 1
主任研究者 葛島清隆

II. 分担研究報告

1. Epstein-Barr virus 陽性癌に対する CTL 応答に関する研究 …………… 9
葛島清隆 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
2. マイナー組織適合抗原に対する CTL 応答に関する研究 …………… 13
赤塚美樹 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
3. 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応に関与する要因の
解析に関する研究 …………… 17
森島泰雄 (愛知県がんセンター病院)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 23

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

がん特異的細胞傷害性T細胞活性化に基づく免疫治療の構築

主任研究者 葛島 清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

研究要旨 本研究では、種々の臨床局面においてがん細胞の増殖に抑制的に働いていると考えられる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の機能解析、効果的な活性化方法および再現性の高いモニタリングの開発に取り組んでいる。本年度の研究成果として、(a) Epstein-Barr virus(EBV)陽性がんに対するCTL応答の研究、(b)マイナー組織適合抗原に対するCTL応答の研究、並びに(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応に関与する要因の解析について以下のように報告する。

(a)EBV陽性がん局所には多数の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が浸潤していることから、宿主の免疫応答ががんの進展抑制に関与している可能性がある。標的抗原と考えられるLMP1およびEBNA1に対するCTLを効率良く誘導するために、*in vitro*で合成したmRNAを導入した抗原提示細胞を用いた。この方法で樹立したLMP1特異的CTLクローンはHLA-A*0206拘束性にEBV陽性NK細胞リンパ腫株を傷害した。EBNA1特異的CTLクローンはHLA-Cw*0303拘束性にEBV陽性リンパ芽球を認識した。それぞれのCTLクローンが認識する新規エピトープのアミノ酸配列を決定した。

(b)マイナー抗原は同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型の違いによって移植片対宿主病(GVHD)や移植片対白血病/リンパ腫(GVL)効果の標的となる抗原である。本年度はHLA-A*3303に拘束されるY染色体上の*TMSB4Y*遺伝子にコードされるマイナー抗原と、HLA-A*3101およびA*3303分子によって提示される *Cathepsin B*遺伝子上にコードされるマイナー抗原、合計3種類のエピトープを同定した。またこれらの遺伝子の各臓器における発現を定量的に検討した。

(c)同種造血幹細胞移植においてはドナーと患者間のHLA抗原の違いが移植成績に大きな影響を与えている。非血縁者間骨髄移植症例を解析することにより移植免疫反応の解明にはGVHD予防法、ドナーと患者とのHLA適合度を考慮に入れる必要性が明らかになり、同種移植において特異的養子免疫療法を臨床応用する際の症例の選択のための基本情報を得ることができた。

分担研究者	所属施設名	職名	A. 研究目的
赤塚美樹	愛知県がんセンター研究所	室長	(a)Epstein-Barr virus(EBV)は、上咽頭
森島泰雄	愛知県がんセンター病院	副院長	がん、パーキットリンパ腫、ホジキンリン

パ腫、T/NKリンパ腫、胃がんの一部などにモノクローナルな感染が示されており、これらのがんの発生と進展に強く関与している。一方EBV陽性がん局所には多数の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が浸潤していることから、宿主の免疫応答ががんの進展抑制に関与している可能性が指摘されている。EBV陽性がんは、ウイルス潜伏感染蛋白の発現パターンから、Latency-I(バーキットリンパ腫)、Latency-II(上咽頭がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、T/NKリンパ腫)、Latency-III(免疫低下時に発症するB細胞リンパ腫)に分類される。Latent membrane protein (LMP)1はLatency-IIのがんに対するCTL応答の標的抗原と考えられるが、末梢血におけるT細胞頻度が少なく、これまでCTL誘導が容易ではなかった。本年度は、LMP1に対するCTLを効果的に誘導する方法としてmRNA導入抗原提示細胞の有用性を検討することを目的とした。また、EBNA1はEBV陽性がんの全てに発現していることから、免疫療法の標的として理想的であるが、内在するグリシン・アラニン反復配列により、従来CTLの標的になりにくいとされていた。LMP1と同様に、EBNA1に対するCTL誘導におけるmRNA導入抗原提示細胞の有用性も検討した。

(b)同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきた。しかし、難治性造血器腫瘍に対する移植成績は移植後の再発のため、必ずしも満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対腫瘍(GVL)効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVL効果の主要な標的はマイナー抗原であるが、これはドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白断片(ペプチド)がHLAに提示されて抗原性を持ったものである。腫瘍細胞

を含む血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされるマイナー抗原は、移植後の再発腫瘍に対する免疫療法に有用である。治療の対象を拡大するために、より多くのマイナー抗原(およびそのエピトープ)を同定することを目的とする。

(c)HLA-A、B、DR血清型適合非血縁移植におけるHLA遺伝子型適合度と移植免疫反応、生存について解析し、移植免疫反応、とくに抗白血病効果を有するgraft versus host effect解明のための基礎資料ならびにマイナー組織適合性抗原を標的とする養子免疫療法のプロトコル作成のための基本情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

(a) EBV陽性がんに対するCTL応答:

1) mRNA導入抗原提示細胞によるCTL誘導

T7プロモーターの下流にEBV-LMP1あるいはEBNA1のcDNAを組込み、大腸菌のポリメラーゼを用いてmRNAを合成した。Cap構造とpolyA-tailをそれぞれ付加したmRNAを電気穿孔法にて樹状細胞等の抗原提示細胞に導入した。末梢血CD8陽性細胞をmRNA導入抗原提示細胞にて数回刺激した後、限界希釈法にてLMP1およびEBNA1特異的CTLクローンを樹立した。

2) CTLの傷害性の検討

慢性活動性EBV感染症、EBV陽性NKリンパ腫の患者から樹立したEBV陽性NK細胞株のLMP1発現はウエスタンブロット法にて確認した。CTLの傷害性はクロミウム放出法にて測定した。

3) CTLエピトープの同定とテトラマーの作成

様々な長さに短縮したプラスミッドおよび合成ペプチドを用いてCTLの認識する最短のペプチドのアミノ酸配列を決定した。エピトープを含有するMHC-tetramerを定法に従って合成した。

4) LMP1エピトープ生成における免疫プロテアソームの関与の検討

免疫プロテアソームを構成する2種の分子、immunoproteasome subunit low molecular protein 2(ip-lmp2)とip-lmp7の発現を抑制するshort hairpin RNAを組み込んだレトロウイルスを作成し、EBV陽性のB-lymphoblastoid cell line (LCL)に感染させた。エピトープの生成はLMP1特異的なCTLクローンをを用いたELISPOT法にて検討した。

(b)マイナー組織適合抗原に対するCTL応答:
1) Y染色体上に存在するマイナー抗原の同定

女性ドナーより慢性骨髄性白血病に対してHLA一致同胞間移植を受けた男性患者より、CTLクローンを樹立した。クローンの特異性はさまざまな細胞からなるパネルを用いて行った。Y染色体上にコードされるマイナー抗原を認識していると判明したため、Y染色体部分欠損株を用いた検討により、遺伝子の局在を決定した。遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

2) 第15番染色体に存在するマイナー抗原の同定

AMLに対してHLA一致同胞間移植を受けた2名の男性患者より、それぞれHLA-A*3101およびA*3303拘束性のCTLクローンを樹立した。クローンが認識する遺伝子の同定は、以前同定した*BCL2A1*遺伝子にコードされるマイナー抗原(ACC-1)を同定した際と同様な連鎖解析法にて行ったが遺伝子同定には至らなかったため、cDNAライブラリーを作成して発現クローニング法を行った。同定したエピトープペプチドによるマイナー抗原特異的CTLの誘導はテトラマー法にて、また*CTSII*遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応に関与する要因の解析:

非血縁者間骨髄移植症例を対象とし、HLA

適合度と急性GVHDならびに生存との関連を解析した。今回はとくにGVHD予防法としてシクロスポリン+メトトレキサート併用療法とシクロスポリン+タクロリムス法とを比較した。症例はHLA-A,-B,-DRB1の遺伝子型が判明している白血病とした。スタンダードリスク白血病は第1寛解期の急性リンパ性白血病と急性非リンパ性白血病と第1慢性期の慢性骨髄性白血病とした。ハイリスク白血病はスタンダードリスクより進行した病期で移植をした白血病とした。

本研究計画はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(厚生労働省)を遵守して作成され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会および組換えDNA研究審査委員会の承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

(a) EBV陽性がんに対するCTL応答:

1) HLA-A*0206拘束性EBV-LMP1特異的CTLの傷害性の検討とエピトープの解析

mRNA導入抗原提示細胞によるCTL誘導法により、5名の健康成人のうち1名からLMP1特異的CTLを誘導することができた。樹立したCTLクローンはHLA-A*0206拘束性にEBV陽性のNK細胞株を傷害した。認識するエピトープはLMP1のN末端側に位置する膜貫通疎水性部位に存在し、ip-lmp7依存性にプロセスされていた。

2) HLA-Cw*0303とCw*0304に提示されるEBNA1特異的CTLの認識するエピトープの同定

前述のグリシンアラニンリピートを含んだEBNA1 mRNAを導入した抗原提示細胞の刺激により、HLA-B*3501およびCw*0303拘束性のCTLクローンを樹立した。HLA-B*3501拘束性のクローンは既知のエピトープを認識していた。Cw*0303拘束性のCTLクローンは新

規の9merないし10merエピトープを認識しており、Cw*0304陽性細胞にも反応性を有していた。エピトープペプチドを含有するテトラマーの染色結果から、CTLクローンのT細胞受容体は、9merにより親和性が高いことが示された。

(b) マイナー組織適合抗原に対するCTL応答:

1) Y染色体上に存在するマイナー抗原の同定

女性ドナーより移植を受けた男性患者より樹立したCTLクローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。B-LCLパネルを用いた検討により、クローンはHLA-A33拘束性であり、男性由来の細胞のみを傷害することが判明した。Y染色体部分欠損B-LCLパネルを用いた検討により、マイナー抗原をコードする遺伝子はYq11.2領域に存在する*TMSB4Y*であることが判明した。また該当cDNAのdeletion mutant、minigeneを用いた実験等により、エピトープは11merのアミノ酸からなるペプチドと判明した。このエピトープは*TMSB4Y*遺伝子のコーディング領域より上流(5'非翻訳領域)に存在しており、機能を有しないcrypticなポリペプチドの分解産物と考えられ、マイナー抗原もこのような一種のDefective Ribosomal Products (DRiPs)に由来することが示唆された。この遺伝子は定量PCRにより、比較的造血系細胞に強く発現するが、ACC-1をコードする*BCL2A1*遺伝子のように造血系細胞に局限した発現パターンは認められなかった。

2) 第15番染色体に存在するマイナー抗原の同定

HLA-A*3101およびA*3303拘束性のCTLクローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度かほとんど認められなかった。CEPH細胞パネルを用いた連鎖解析法により、両クローンともマイナー抗原をコードする遺伝子は15q24-25

領域に存在することが判明した。しかしこの部位には34種類以上の遺伝子が存在し、また造血細胞特異的発現パターンを示すものは以前我々が同定した*BCL2A1*遺伝子以外に報告されておらず、遺伝子の同定に至らなかった。そこでマイナー抗原陽性である患者細胞よりcDNAライブラリーを作成し、発現クローニングを試行したところ、CTLが認識するマイナー抗原の抗原性は*Cathepsin H (CTSH)* 遺伝子上のExon1に存在する遺伝子多型に支配されることが分かった。ミニ遺伝子等を用いた実験により、HLA-A*3101、A*3303拘束性のエピトープはそれぞれ9mer、10merのアミノ酸からなるペプチドと判明した。この遺伝子は定量PCRにより、比較的造血系細胞に強く発現するが、肺胞上皮や脾臓にも発現していることが判明した。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応に関する要因の解析:

HLA不適合症例においてはGVHD予防法としてタクロリムスと短期メトトレキサート併用(FK+MTX)法を用いた症例における重症GVHDの頻度はCSP+MTX法を用いた症例よりも有意に低下していた。一方、HLA-A、B、DRB1適合症例においてはFK+MTX法とCSP+MTX法との間に有意差はなかった。生存について白血病スタンダードリスク、ハイリスク症例ともに、HLA不適合症例ではFK+MTX法がCSP+MTX法に比べ良好な成績を示していたが、HLA適合症例では有意差は認められなかった。

D. 考察

(a) EBV陽性がんに対するCTL応答:

LMP1はLatency-IIのEBV陽性がんに対する免疫療法の標的分子として注目されているが、LMP1特異的CTLがEBV陽性がんを傷害するエビデンスに欠けていた。今回初めてLMP1特異的CTLがEBV陽性NK細胞株を傷害する知見を得た。LMP1を標的とした細胞性免疫療法の論理的基盤が得られたと考えられ

る。グリシンアラニンリピートを含んだ EBNA1 mRNAを導入した抗原提示細胞の刺激によりEBNA1特異的CTLが誘導されたことから、少なくとも一部のEBNA1エピトープはEBV感染細胞において提示されていると考えられる。今後は、EBV陽性胃がんなどの上皮系のがん細胞に対するEBNA1特異的CTLの傷害性を検討し、CTLエピトープペプチドを用いたがんワクチン療法の可能性を検討する予定である。

(b) マイナー組織適合抗原に対するCTL応答

HLA-A*3303によって提示される *TMSB4Y*由来マイナー抗原 (ACC-3) は、組織発現パターンがACC-1ほど血液系細胞に特異的ではないが、比較的血液系細胞に多く発現しており、造血管腫瘍の免疫療法に応用できる可能性が十分ある。他方、HLA-A*3101、A*3303によって提示される *CTSH*由来マイナー抗原 (ACC-4, -5) は、組織発現パターンがユビキタスに近かった。しかし、各組織のmRNAの発現パターンとその翻訳産物を認識するCTLに対する感受性は必ずしも一致しないことが多いので、現在、造血管腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討している。

現在、テトラマーを使って患者末梢血中での動態等の解析を行っている。これ以外にも細胞傷害性試験上、血液系細胞特異的CTL (HLA-A24拘束性が2種類、B44拘束性が1種類) が樹立されているので、今後はこれらが認識するマイナー抗原を同定していく。

なお、ACC-1を標的抗原として用いる養子免疫療法の新GCPに基づいた臨床試験プロトコルは愛知県がんセンターの倫理委員会で既に承認されており、現在症例の登録を行いつつある。また、GMPグレードの治療細胞を作成する細胞プロセッシング室の運営に関わる各種書類等の整備もほぼ終了しつつある。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫

反応に関与する要因の解析：

現在までに得られた移植成績（ここでは示されていない）と今回示した成績を考慮した日本骨髄バンクにおけるドナー選択、治療法選択につき考察すると、

1) スタンダードリスクの移植症例は、HLA-A, -B, -DRB1遺伝子型適合ドナーを選択すべきである。可能であれば、HLA-CのKIRリガンド適合 (GVHD方向) のドナーを選択することが望ましい。

2) HLA-A, B遺伝子型適合HLA-DRB1型不適合のドナーの場合にはHLA-C型が適合しておれば、上記HLA-A, -B, -DR遺伝子型適合ドナーと同様に選択可能である。したがってHLA-C型の検査を実施しHLA-C型が適合していることを確認する必要がある。

3) ハイリスクの移植症例において、HLA-A, B遺伝子型適合ドナーが見出されず移植まで長く待てない場合にHLA-A, B遺伝子型不適合ドナーを選択するかどうかは、移植成績を考慮して決定する。この場合に、HLA不適合血縁者間移植や臍帯血移植の選択枝も考えられるが、これら移植法のevidenceレベルを考慮したうえでの治療法の選択が必要であろう。

4) HLA不適合移植においてはGVHD予防法として、FK+MTX法がCSP+MTX法よりも良好な生存率を示したことから、FK+MTX法が推奨される。

E. 結論

(a) 合成mRNAを導入した抗原提示細胞を用いてHLA-A*0206拘束性EBV-LMP1特異的CTLクローン、HLA-Cw*0303拘束性EBNA1特異的CTLクローンを樹立した。mRNA導入抗原提示細胞は存在頻度の低いT細胞の刺激誘導に効果的な方法と考えられた。LMP1特異的CTLクローンがEBV陽性NK細胞リンパ腫株を傷害したことから、LMP1を標的とした細胞性免疫療法が期待される。

(b) *TMSB4Y*遺伝子の非翻訳領域にコードされるA*3303に拘束性のユニークなマイナー抗原ACC-3、および*CTSH*遺伝子多型部位にコードされるHLA-A*3101、A*3303拘束性のマイナー抗原ACC-4、-5を同定した。これらの遺伝子の発現パターンは血液系細胞特異的ではなかったが、CTLの細胞傷害性パターンは比較的血液細胞特異的であったので、今後の臨床応用について検討する意義があると考えられた。

(c) 本解析により、移植免疫反応の解析にはGVHD予防法、ドナーと患者とのHLA適合度を考慮に入れる必要性が明らかになった。さらに、同種移植において特異的養子免疫療法を臨床応用する際の適用症例の選択のための基本情報を得ることができた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Tajima, K., Ito, Y., Demachi, A., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Hida, T., Morishima, Y., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Interferon- γ differentially regulates susceptibility of lung cancer cells to telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer*. 110(3): 403-412, 2004.
- 2) Tajima, K., Demachi, A., Ito, Y., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K. Identification of an epitope from the epithelial cell adhesion molecule eliciting HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses. *Tissue Antigens*. 64(6): 650-659, 2004.
- 3) Gondo, H., Himeji, D., Kamezaki, K., Numata, A., Tanimoto, T., Takase, K., Aoki, K., Henzan, H., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Ishikawa, F., Shimoda, K., Inaba, S., Tsukamoto, H., Horiuchi, T., Nakashima, H., Otsuka, T., Kato, K., Kuroiwa, M., Higuchi, M., Shibuya, T., Kamimura, T., Kuzushima, K., Tsurumi, T., Kanda, Y., Harada, M.: Reconstitution of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific T-cells following stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 80(5):441-448, 2004.
- 4) Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyazaki, M., Warren, E.H. 3rd, Oba, T., Tsujimura, K., Motoyoshi, K., Morishima, Y., Koderu, Y., Kuzushima, K., Takahashi, T.: A novel HLA-A*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human *TMSB4Y* gene. *J Immunol*. 173(11): 7046-7054, 2004.
- 5) Azuma, T., Otsuki, T., Kuzushima, K., Froelich, C.J., Fujita, S., Yasukawa, M.: Myeloma cells are highly sensitive to the granule exocytosis pathway mediated by WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 10(21):7402-7412, 2004.
- 6) Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., Akinaga, S., Takahashi, T., Utsunomiya, A., Ueda, R.: The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 10(22): 7529-7539, 2004.
- 7) Storek, J., Zhao, Z., Lin, E., Berger, T., McSweeney, PA., Nash, RA., Akatsuka, Y., Metcalf, M.D., Lu, H., Kalina, T., Reindl, M., Storb, R., Hansen, J.A., Sullivan, K.M., Kraft, G.H., Furst, D.E., Maloney, D.G.: Recovery from and consequences of severe

- iatrogenic lymphopenia (induced to treat autoimmune diseases). *Clin Immunol* 113: 285-298, 2004.
- 8) Watanabe, N., Kamachi, Y., Koyama, N., Hama, A., Liang, J., Nakamura, Y., Yamamoto, T., Isomura, M., Kudo, K., Kuzushima, K., Kojima, S.: Expansion of human CMV-specific cytotoxic T lymphocytes to a clinical scale: a simple culture system using tetrameric HLA-peptide complexes. *Cytotherapy*. 6(5):514-522, 2004.
 - 9) Akiyama, Y., Kuzushima, K., Tsurumi, T., Yamaguchi, K.: Analysis of HLA-A24-restricted CMVpp65 peptide-specific CTL with HLA-A*2402-CMVpp65 tetramer. *Immunol Lett*. 95(2):199-205, 2004.
 - 10) Takami, A., Sugimori, C., Feng, X., Yachie, A., Kondo, Y., Nishimura, R., Kuzushima, K., Kotani, T., Asakura, H., Shiobara, S., Nakao, S.: Expansion and activation of minor histocompatibility antigen HY-specific T cells associated with graft-versus-leukemia response. *Bone Marrow Transplant*. 34(8):703-709, 2004.
 - 11) Sugaya, N., Kimura, H., Hara, S., Hoshino, Y., Kojima, S., Morishima, T., Tsurumi, T., Kuzushima, K.: Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T cells in patients with chronic active EBV infection. *J Infect Dis*. 190(5):985-988, 2004.
 - 12) Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., Seya, T. : Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res*. 64(2):757-764, 2004.
 - 13) Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Ozeki, S., Taguchi, O., Nishida, K., Okanami, Y., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Takahashi T.: Immunity against mouse thymus-leukemia antigen (TL) protects against development of lymphomas induced by a chemical carcinogen, N-butyl-N-nitrosourea. *Cancer Sci* 95(11): 914-919, 2004.
 - 14) Nishida, T., Akatsuka, Y., Morishima, Y., Hamajima, N., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Kodera, Y., Takahashi T. : Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br. J Haematol*. 124(5):629-635, 2004.
 - 15) Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Kodera, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y., Takahashi, T.: Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood*, 103(2): 630-638, 2004.
 - 16) Li, S., Morishima, Y.: Association of polymorphic MHC microsatellites with GVHD, survival, and leukemia relapse in unrelated hematopoietic stem cell transplant donor/recipient pairs matched at five HLA loci. *Tissue Antigens*. 63(4):362-8, 2004.
 - 17) Iida, H., Morishima, Y.: Twenty years' experience in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group. *Int J Hematol*. 79(1):79-84, 2004.
 - 18) Izutsu, K., Morishima, Y.: Japan Marrow Donor Program. Unrelated bone marrow

- transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a study from the Japan Marrow Donor Program. *Blood*. 103(5):1955-60, 2004.
- 19) Morishima, Y.: Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate for Patients in the First Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia: Results of a Japanese Phase II Clinical Study. *Int J Hematol* 80:261-266, 2004.
- 20) Ogura, M., Morishima, Y.: Durable Response but Prolonged Cytopenia after Cladribine Treatment in Relapsed Patients with Indolent non-Hodgkin's Lymphomas: Results of a Japanese Phase II Study. *Int J Hematol* 80: 267-277, 2004
- 21) Karnan, S., Morishima, Y.: Analysis of chromosomal imbalances in de novo CD5-positive diffuse large-B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.*, 39:77-81, 2004.
- 22) Tagawa, H., Morishima, Y.: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res.* 64(17):5948-55, 2004.
- 23) Akatsuka, Y., Morishima, Y.: Major and minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cur. Opin. Organ. Transplant.*, 9: 64-71, 2004.
- 24) Kimura, H., Hoshino, Y., Hara, S., Sugaya, N., Kawada, J., Shibata, Y., Kojima, S., Nagasaka, T., Kuzushima, K., Morishima, T.: Differences between T Cell-Type and Natural Killer Cell-Type Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis.* 191(4):531-539, 2005.
- 25) Kondo, E., Akatsuka, Y., Nawa, A., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Tanimoto, M., Kodera, Y., Morishima, Y., Kuzuya, K., Takahashi, T.: Retroviral vector backbone immunogenicity: identification of cytotoxic T-cell epitopes in retroviral vector-packaging sequences. *Gene Ther.* 12(3): 252-258, 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆、森島泰雄「Cathepsin H タンパク質由来のCD8+細胞傷害性Tリンパ球mHAエピトープペプチドおよびその用途」：平成16年11月9日出願（特願2004-325328）
- 2) 葛島清隆「HLA-A2402拘束性Ep-CAM特異的CTLが認識するエピトープ・ペプチド及びその用途」平成17年1月19日出願（番号PCT/JP2005/587）

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

Epstein-Barr virus陽性がんに対するCTL応答の研究

分担研究者 葛島 清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

研究要旨 Epstein-Barr virus(EBV)は、上咽頭がん、種々のリンパ腫、胃がんの一部などにモノクローナルな感染が示されており、これらのがんの発生と進展に強く関与している。一方EBV陽性がん局所には多数の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が浸潤していることから、宿主の免疫応答ががんの進展抑制に関与している可能性がある。CTLのがん細胞増殖抑制機能に関連して、今年度は以下の研究成果を得た。標的抗原と考えられるLMP1およびEBNA1に対するCTLを効率良く誘導するために、in vitroで合成したmRNAを導入した抗原提示細胞を用いた。この方法で樹立したLMP1特異的CTLクローンはHLA-A*0206拘束性にEBV陽性NK細胞リンパ腫株を傷害した。EBNA1特異的CTLクローンはHLA-Cw*0303拘束性にEBV陽性リンパ芽球を認識した。それぞれのCTLクローンが認識する新規エピートープのアミノ酸配列を決定した。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus(EBV)は、上咽頭がん、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、T/NKリンパ腫、胃がんの一部などにモノクローナルな感染が示されており、これらのがんの発生と進展に強く関与している。一方EBV陽性がん局所には多数の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)が浸潤していることから、宿主の免疫応答ががんの進展抑制に関与している可能性が指摘されている。EBV陽性がんは、ウイルス潜伏感染蛋白の発現パターンから、Latency-I（パーキットリンパ腫）、Latency-II（上咽頭がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、T/NKリンパ腫）、Latency-III（免疫低下時に発症するB細胞リンパ腫）に分類される。Latent membrane protein (LMP) IはLatency-IIのがんに対するCTL応答の標的抗原と考えられるが、末梢血におけるT細胞頻度が少なく、これまでCTL誘導が容易ではなかった。本年度は、LMP1に対するCTL

を効果的に誘導する方法としてmRNA導入抗原提示細胞の有用性を検討することを目的とした。また、EBNA1はEBV陽性がんの全てに発現していることから、免疫療法の標的として理想的であるが、内在するグリシン・アラニン反復配列により、従来CTLの標的になりにくいとされていた。LMP1と同様に、EBNA1に対するCTL誘導におけるmRNA導入抗原提示細胞の有用性も検討した。

B. 研究方法

1) mRNA導入抗原提示細胞によるCTL誘導

T7プロモーターの下流にLMP1あるいはEBNA1のcDNAを組込み、大腸菌のポリメラーゼを用いてmRNAを合成した。Cap構造とpolyA-tailをそれぞれ付加したmRNAを電気穿孔法にて樹状細胞等の抗原提示細胞に導入した。末梢血CD8陽性細胞をmRNA導入抗原提示細胞にて数回刺激した後、限界希釈法にてLMP1およびEBNA1特異的CTLクローンを樹立し

た。

2) CTLの傷害性の検討

慢性活動性EBV感染症、EBV陽性NKリンパ腫の患者から樹立したEBV陽性NK細胞株のLMP1発現はウエスタンブロット法にて確認した。CTLの傷害性はクロミウム放出法にて測定した。

3) CTLエピトープの同定とテトラマーの作成

様々な長さ短縮したプラスミッドおよび合成ペプチドを用いてCTLの認識する最短のペプチドのアミノ酸配列を決定した。エピトープを含有するMHC-tetramerを定法に従って合成した。

4) LMP1エピトープ生成における免疫プロテアソームの関与について

免疫プロテアソームを構成する2種の分子、immunoproteasome subunit low molecular protein 2(ip-lmp2)とip-lmp7の発現を抑制するshort hairpin RNAを組み込んだレトロウイルスを作成し、EBV陽性のB-lymphoblastoid cell line (LCL)に感染させた。エピトープの生成はLMP1特異的なCTLクローンをを用いたELISPOT法にて検討した。

本研究計画はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(厚生労働省)を遵守して作成され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会および組換えDNA研究審査委員会の承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

1) HLA-A*0206拘束性LMP1特異的CTLの傷害性の検討とエピトープの解析

mRNA導入抗原提示細胞によるCTL誘導法により、5名の健康成人のうち1名からLMP1特異的CTLを誘導することができた。樹立したCTLクローンはHLA-A*0206拘束性にEBV陽性のNK細胞株を傷害した。認識するエピトープはLMP1のN末端側に位置する膜貫通疎水性部位

に存在し、ip-lmp7依存性にプロセスされていた。

2) HLA-Cw*0303とCw*0304に提示されるEBNA1特異的CTLの認識するエピトープの同定

前述のグリシンアラニンリピートを含んだEBNA1 mRNAを導入した抗原提示細胞の刺激により、HLA-B*3501およびCw*0303拘束性のCTLクローンを樹立した。HLA-B*3501拘束性のクローンは既知のエピトープを認識していた。Cw*0303拘束性のCTLクローンは新規の9merないし10merエピトープを認識しており、Cw*0304陽性細胞にも反応性を有していた。エピトープペプチドを含有するテトラマーの染色結果から、CTLクローンのT細胞受容体は、9merにより親和性が高いことが示された。

D. 考察

LMP1はLatency-IIのEBV陽性がんに対する免疫療法の標的分子として注目されているが、LMP1特異的CTLがEBV陽性がんを傷害するエビデンスに欠けていた。今回初めてLMP1特異的CTLがEBV陽性NK細胞株を傷害する知見を得た。LMP1を標的とした細胞性免疫療法の論理的基盤が得られたと考えられる。グリシンアラニンリピートを含んだEBNA1 mRNAを導入した抗原提示細胞の刺激によりEBNA1特異的CTLが誘導されたことから、少なくとも一部のEBNA1エピトープはEBV感染細胞において提示されていると考えられる。今後は、EBV陽性の上皮系のがん細胞(胃がん)に対するEBNA1特異的CTLの傷害性を検討し、CTLエピトープペプチドを用いたがんワクチン療法の可能性を検討する予定である。

E. 結論

合成mRNAを導入した抗原提示細胞を用いてHLA-A*0206拘束性LMP1特異的CTLクローン、HLA-Cw*0303拘束性EBNA1特異的CTLクローンを樹立した。mRNA導入抗原提示細胞は存在頻度の低いT細胞の刺激誘導に効果的な方法と

考えられた。LMP1特異的CTLクローンがEBV陽性NK細胞リンパ腫株を傷害したことから、LMP1を標的とした細胞性免疫療法が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Tajima, K., Ito, Y., Demachi, A., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Hida, T., Morishima, Y., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Interferon- γ differentially regulates susceptibility of lung cancer cells to telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer*. 110(3): 403-412, 2004.
- 2) Tajima, K., Demachi, A., Ito, Y., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K. Identification of an epitope from the epithelial cell adhesion molecule eliciting HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses. *Tissue Antigens*. 64(6): 650-659, 2004.
- 3) Gondo, H., Himeji, D., Kamezaki, K., Numata, A., Tanimoto, T., Takase, K., Aoki, K., Henzan, H., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Ishikawa, F., Shimoda, K., Inaba, S., Tsukamoto, H., Horiuchi, T., Nakashima, H., Otsuka, T., Kato, K., Kuroiwa, M., Higuchi, M., Shibuya, T., Kamimura, T., Kuzushima, K., Tsurumi, T., Kanda, Y., Harada, M.: Reconstitution of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific T-cells following stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 80(5):441-448, 2004.
- 4) Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyazaki, M., Warren, E.H. 3rd., Oba, T., Tsujimura, K., Motoyoshi, K., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K., Takahashi, T.: A novel HLA-A*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human TMSB4Y gene. *J Immunol*. 173(11): 7046-7054, 2004.
- 5) Azuma, T., Otsuki, T., Kuzushima, K., Froelich, C.J., Fujita, S., Yasukawa, M.: Myeloma cells are highly sensitive to the granule exocytosis pathway mediated by WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 10(21):7402-7412, 2004.
- 6) Watanabe, N., Kamachi, Y., Koyama, N., Hama, A., Liang, J., Nakamura, Y., Yamamoto, T., Isomura, M., Kudo, K., Kuzushima, K., Kojima, S.: Expansion of human CMV-specific cytotoxic T lymphocytes to a clinical scale: a simple culture system using tetrameric HLA-peptide complexes. *Cytotherapy*. 6(5):514-522, 2004.
- 7) Akiyama, Y., Kuzushima, K., Tsurumi, T., Yamaguchi, K.: Analysis of HLA-A24-restricted CMVpp65 peptide-specific CTL with HLA-A*2402-CMVpp65 tetramer. *Immunol Lett*. 95(2):199-205, 2004.
- 8) Takami, A., Sugimori, C., Feng, X., Yachie, A., Kondo, Y., Nishimura, R., Kuzushima, K., Kotani, T., Asakura, H., Shiobara, S., Nakao, S.: Expansion and activation of minor histocompatibility antigen HY-specific T cells associated with graft-versus-leukemia response. *Bone Marrow Transplant*. 34(8):703-709, 2004.
- 9) Sugaya, N., Kimura, H., Hara, S., Hoshino, Y., Kojima, S., Morishima, T., Tsurumi, T., Kuzushima, K.: Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8⁺ T cells in patients with chronic active EBV

- infection. *J Infect Dis.* 190(5):985-988, 2004.
- 10) Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., Seya, T. : Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64(2):757-764, 2004.
- 11) Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Ozeki, S., Taguchi, O., Nishida, K., Okanami, Y., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Takahashi T.: Immunity against mouse thymus-leukemia antigen (TL) protects against development of lymphomas induced by a chemical carcinogen, N-butyl-N-nitrosourea. *Cancer Sci.* 95(11): 914-919, 2004.
- 12) Nishida, T., Akatsuka, Y., Morishima, Y., Hamajima, N., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Koder, Y., Takahashi, T. : Clinical relevance of a newly identified HLA-A24-restricted minor histocompatibility antigen epitope derived from BCL2A1, ACC-1, in patients receiving HLA genotypically matched unrelated bone marrow transplant. *Br. J Haematol.* 124(5):629-635, 2004.
- 13) Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Koder, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y., Takahashi, T.: Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood.* 103(2): 630-638, 2004.
- 13) Kimura, H., Hoshino, Y., Hara, S., Sugaya, N., Kawada, J., Shibata, Y., Kojima, S., Nagasaka, T., Kuzushima, K., Morishima, T.: Differences between T Cell-Type and Natural Killer Cell-Type Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis.* 191(4):531-539, 2005.
- 14) Kondo, E., Akatsuka, Y., Nawa, A., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Tanimoto, M., Koder, Y., Morishima, Y., Kuzuya, K., Takahashi, T.: Retroviral vector backbone immunogenicity: identification of cytotoxic T-cell epitopes in retroviral vector-packaging sequences. *Gene Ther.* 12(3): 252-258, 2005.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆、森島泰雄「Cathepsin H タンパク質由来のCD8+細胞傷害性Tリンパ球mHAエピトープペプチドおよびその用途」：平成16年11月9日出願（特願2004-325328）
- 2) 葛島清隆「HLA-A2402拘束性Ep-CAM特異的CTLが認識するエピトープ・ペプチド及びその用途」平成17年1月19日出願（番号PCT/JP2005/587）

厚生労働科学研究費補助金（第3次がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

マイナー組織適合抗原に対するCTL応答の研究

分担研究者 赤塚 美樹 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 室長

研究要旨 マイナー抗原は同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型の違いによって移植片対宿主病（GVHD）や移植片対白血病／リンパ腫（GVL）効果の標的となる抗原である。我々はこれまでに同定した血液系細胞に特異的に発現する遺伝子 *BCL2A1* にコードされる HLA-A24 および HLA-B44 拘束性のエピトープを用いた養子免疫療法の臨床試験を開始し、現在症例のリクルートを行っている。しかしこれらの対象となる症例は15%前後であるため、対象となる症例をさらに増やすために新規のマイナー抗原の同定を継続している。本年度は HLA-A*3303 に拘束される Y 染色体上の *TMSB4Y* 遺伝子にコードされるマイナー抗原と HLA-A*3101 および A*3303 分子によって提示される *Cathepsin H* 遺伝子上の遺伝子多型部位にコードされる、合計3種類のエピトープを同定し、その臨床的意義について解析を継続している。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきた。しかし、難治性造血器腫瘍に対する移植成績は移植後の再発のため、必ずしも満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対腫瘍（GVL）効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVL効果の主要な標的はマイナー抗原であるが、これはドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白断片（ペプチド）がHLAに提示されて抗原性を持ったものである。腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされるマイナー抗原は、移植後の再発腫瘍に対する免疫療法に有用である。今回我々は、HLA-A*3101 および A*3303 によって提示される *Cathepsin H* (*CTSH*) 遺伝子上の遺伝子多型部分にコードされるマイナー抗原を同定したので報告する。

B. 研究方法

1) Y染色体上に存在するマイナー抗原の同定：

女性ドナーより慢性骨髄性白血病に対してHLA一致同胞間移植を受けた男性患者より、CTLクローンを樹立した。クローンの特異性はさまざまな細胞からなるパネルを用いて行った。Y染色体上にコードされるマイナー抗原を認識していると判明したため、Y染色体部分欠損株を用いた検討により、遺伝子の局在を決定した。遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

2) 第15番染色体に存在するマイナー抗原の同定：

AMLに対してHLA一致同胞間移植を受けた2名の男性患者より、それぞれHLA-A*3101 および A*3303 拘束性のCTLクローンを樹立した。クローンが認識する遺伝子の同定は、以前同定した *BCL2A1* 遺伝子にコードされるマイナー抗原（ACC-1）を同定した際と同様な連鎖解

析法にて行ったが遺伝子同定には至らなかったため、cDNAライブラリーを作成して発現クローニング法を行った。同定したエピトープペプチドによるマイナー抗原特異的CTLの誘導はテトラマー法にて、また *CTSII* 遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

なお本研究は愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認（許可番号：15愛がん第21-4号）を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して実施されたものである。

C. 研究結果

1) Y染色体上に存在するマイナー抗原の同定：

女性ドナーより移植を受けた男性患者より樹立したCTLクローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。B-LCLパネルを用いた検討により、クローンはHLA-A33拘束性であり、男性由来の細胞のみを傷害することが判明した。Y染色体部分欠損B-LCLパネルを用いた検討により、マイナー抗原をコードする遺伝子はYq11.2領域に存在する *TMSB4Y* であることが判明した。また該当cDNAのdeletion mutant、minigeneを用いた実験等により、エピトープは11merのアミノ酸からなるペプチドと判明した。このエピトープは *TMSB4Y* 遺伝子のコーディング領域より上流（5'非翻訳領域）に存在しており、機能を有しない cryptic なポリペプチドの分解産物と考えられ、マイナー抗原もこの様な一種の Defective Ribosomal Products (DRiPs) に由来することが示唆された。この遺伝子は定量PCRにより、比較的造血系細胞に強く発現するが、ACC-1をコードする *BCL2A1* 遺伝子のように造血系細胞に限局した発現パターンは認められなかった。

2) 第15番染色体に存在するマイナー抗原の同定：

HLA-A*3101およびA*3303拘束性のCTLクローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度かほとんど認められなかった。CEPH細胞パネルを用いた連鎖解析法により、両クローンともマイナー抗原をコードする遺伝子は15q24-25領域に存在することが判明した。しかしこの部位には34種類以上の遺伝子が存在し、また造血細胞特異的発現パターンを示すものは以前我々が同定した *BCL2A1* 遺伝子以外に報告されておらず、遺伝子の同定に至らなかった。そこでマイナー抗原陽性である患者細胞よりcDNAライブラリーを作成し、発現クローニングを試行したところ、CTLが認識するマイナー抗原の抗原性は *Cathepsin H (CTSH)* 遺伝子上のExon1に存在する遺伝子多型に支配されることが分かった。ミニ遺伝子等を用いた実験により、HLA-A*3101、A*3303拘束性のエピトープはそれぞれ9mer、10merのアミノ酸からなるペプチドと判明した。この遺伝子は定量PCRにより、比較的造血系細胞に強く発現するが、肺胞上皮や膵臓にも発現していることが判明した。

D. 考察

HLA-A*3303によって提示される *TMSB4Y* 由来マイナー抗原 (ACC-3) は、組織発現パターンがACC-1ほど血液性細胞に特異的ではないが、比較的血液系細胞に多く発現しており、造血器腫瘍の免疫療法に応用できる可能性が十分ある。他方、HLA-A*3101、A*3303によって提示されるCTSH由来マイナー抗原 (ACC-4、-5) は、組織発現パターンがユビキタスに近かった。しかし、各組織のmRNAの発現パターンとその翻訳産物を認識するCTLに対する感受性は必ずしも一致しないことが多いので、現在、造血器腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討している。

現在、テトラマーを使って患者末梢血中での動態等の解析を行っている。これ以外にも細胞傷害性試験上、血液系細胞特異的CTL (HLA-A24拘束性が2種類、B44拘束性が1種類) が樹立されているので、今後はこれらが認識するマイナー抗原を同定していく。

なお、ACC-1を標的抗原として用いる養子免疫療法の新GCPに基づいた臨床試験プロトコルは愛知県がんセンターの倫理委員会で既に承認されており、現在症例の登録を行いつつある。また、GMPグレードの治療細胞を作成する細胞プロセッシング室の運営に関わる各種書類等の整備もほぼ終了しつつある。

E. 結論

TMSB4Y遺伝子の非翻訳領域にコードされるA*3303に拘束性のユニークなマイナー抗原ACC-3、およびCTSH遺伝子多型部位にコードされるHLA-A*3101、A*3303拘束性のマイナー抗原ACC-4、-5を同定した。これらの遺伝子の発現パターンは血液系細胞特異的ではなかったが、CTLの細胞傷害性パターンは比較的血液系細胞特異的であったので、今後の臨床応用について検討する意義があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Torikai, H., Akatsuka, Y., Miyazaki, M., Warren, E.H. 3rd., Oba, T., Tsujimura, K., Motoyoshi, K., Morishima, Y., Kodera, Y., Kuzushima, K., Takahashi, T.: A novel HLA-A*3303-restricted minor histocompatibility antigen encoded by an unconventional open reading frame of human TMSB4Y gene. *J Immunol.* 173: 7046-7054, 2004.
- 2) Kondo, E., Akatsuka, Y., Nawa, A., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Tanimoto, M., Kodera, Y., Morishima, Y., Kuzuya, K.,

Takahashi, T.: Retroviral vector backbone immunogenicity: identification of cytotoxic T-cell epitopes in retroviral vector-packaging sequences. *Gene Ther.* 12: 252-258, 2005.

- 3) Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., Akinaga, S., Takahashi, T., Utsunomiya, A., Ueda, R.: The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/ lymphoma. *Clin Cancer Res.* 10: 7529-7539, 2004.
- 4) Storek, J., Zhao, Z., Lin, E., Berger, T., McSweeney, PA., Nash, RA., Akatsuka, Y., Metcalf, M.D., Lu, H., Kalina, T., Reindl, M., Storb, R., Hansen, J.A., Sullivan, K.M., Kraft, G.H., Furst, D.E., Maloney, D.G.: Recovery from and consequences of severe iatrogenic lymphopenia (induced to treat autoimmune diseases). *Clin Immunol.* 113: 285-298, 2004.
- 5) Tajima, K., Ito, Y., Demachi, A., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Hida, T., Morishima, Y., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Interferon-gamma differentially regulates susceptibility of lung cancer cells to telomerase-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer.* 110: 403-412, 2004.
- 5) Tajima, K., Demachi, A., Ito, Y., Nishida, K., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Kuwano, H., Mitsudomi, T., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Identification of an epitope from the epithelial cell adhesion molecule eliciting HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses. *Tissue Antigens.* 64: 650-659, 2004.
- 6) Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Ozeki, S., Taguchi, O., Nishida, K., Okanami, Y., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Takahashi T.: Immunity against mouse thymus-

leukemia antigen (TL) protects against development of lymphomas induced by a chemical carcinogen, N-butyl-N-nitrosourea. *Cancer Sci.* 95: 914-919, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

「Cathepsin H タンパク質由来のCD8+細胞傷害性Tリンパ球mHAエピトープペプチドおよびその用途」：平成16年11月9日出願（特願2004-325328）