

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 葛島清隆

平成18（2006）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 陽性がんに対する CTL 応答の研究 ..... 9  
葛島清隆 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
2. ヒトパピローマウイルス E6 蛋白上の HLA-A24 拘束性  
CTL エピトープの同定 ..... 12  
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 ..... 23

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 25

## I. 總 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く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) Human papillomavirus (HPV)陽性がんに対する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) 本研究者らが同定したHLA-A24拘束性EBV-LMP2A特異的CTLエピトープの提示に必須の分子を特定した。免疫型プロテアソームの $\beta$ サブユニットであるimmuno-proteasome low molecular protein(ip-LMP)7と活性化補助分子PA28 $\alpha$ の共発現がエピトープ生成に必須であり、ip-LMP2分子の発現がエピトープ生成を促進した。RNA干渉実験でも確認した。また、EBV-EBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞が認識する新規のエピトープを複数同定した。

(b) 約50%の子宮頸がんではHPV16型がその発症に関与している。これらのがん細胞はE6及びE7がん蛋白を発現しており、免疫療法の標的候補となる。本年度は日本人に多いHLA-A24が提示するHPV-16型E6の新規CTLエピトープ(E6<sub>49-57</sub>)を同定した。本エピトープに特異的なCTLは未処理のSiHa細胞に対しては傷害活性を示さなかったが、プロテアソーム阻害剤であるbortezomibとインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )で処理したところ、高い傷害活性を示すようになった。また、他の子宮頸がん細胞株においてもbortezomibとIFN- $\gamma$ の併用処理によりエピトープの提示能が改善することを明らかにした。

(c) 同種造血幹細胞移植は自家移植や同系移植に比べ移植後の白血病の再発が少ないことが臨床的に示され、この白血病抑制効果を移植片対白血病効果(graft-versus-leukemia:GVL)効果と呼んでいる。ドナーと患者の組織適合性抗原の違いが如何にGVL効果に影響を及ぼしているかを解明することを目的とし、非血縁者間骨髄移植を受けた白血病症例を対象にHLA抗原の違いと白血病再発との関連をCox regression modelを用いた多変量解析法で解析した。この結果、1) HLA-C不適合症例では白血病再発率が低下し、2) とくに急性リンパ性白血病で低下が著しかった。3) HLA-C型から推測できるNK細胞受容体KIR2DL ligand不適合症例では反対に白血病再発が高率であることが明らかになった。さらに、4) HLA-DPB1不適合症例で有意に再発率が低く、とくに慢性骨髓性白血病で低下が著しかった。5) HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1の違いでは白血病再発率に有意の差はなかった。上記知見は、関与する標的細胞上のHLA抗

原の種類と白血病病型が重要であることを示しており、同種移植においてドナー由来のエフェクター細胞が白血病細胞を攻撃するGVLの機序を解明するための基本的な情報を得ることができた。

分担研究者	所属施設名	職名
赤塚美樹	愛知県がんセンター研究所	室長
森島泰雄	愛知県がんセンター中央病院	副院長

#### A. 研究目的

(a) EBVは、上咽頭がん、バーキットリンパ腫、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。

EBV潜伏感染抗原であるLMP2Aは上咽頭がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、T/NKリンパ腫等のEBV陽性腫瘍に発現しており、免疫療法の有力な標的候補である。本研究者らはHLA-A24拘束性EBV-LMP2A特異的CTLエピトープを新規に同定しているが、このエピトープの提示にはIFN- $\gamma$ によって誘導される抗原提示機構の関与が必要である(Kuzushima et al. *Blood* 2003)。本年度はこの提示に関わる分子およびその役割を明らかにすることを目的とした。

EBNA1はEBV陽性がんの全てに発現していることから、免疫療法の標的抗原として理想的である。昨年度はEBNA1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明らかにした。CTLを体内で効果的に活性化するためには、CD4 $^+$ Tヘルパー細胞を同時に活性化することが重要である。本年度

は、EBV-EBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞が認識する新規のエピトープを同定することを目的とした。

(b) 子宮頸がんは世界で年間25万人において新規に発生し近年増加傾向にある。HPV16型は子宮頸がんの約半数の症例で検出される。このHPVゲノムにコードされる蛋白質のうち、細胞の不死化に必須の役割を果たしている初期遺伝子産物E6及びE7蛋白は、免疫療法の有望な標的候補と考えられている。白人に多いHLA-A\*0201に提示されるE7由来エピトープは既に報告があり免疫療法の研究が進んでいるが、日本人に多いHLA-A24によって提示されるHPV16型のE6、E7に由来するCTLエピトープの報告はこれまでになかったため、我々は日本人において免疫療法や免疫モニタリングに有望な新規エピトープを同定することを目的とした。

(c) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1遺伝子型適合度と臨床成績、とくに白血病の再発との関連を解析することにより、移植片対白血病効果(GVL効果)の機序の解明と特異的細胞免疫療法の開発の基礎データを得ることを目的とした。

#### B. 研究方法

(a) EBV陽性がんに対するCTL応答：

1) 合成ペプチドによるCTLおよびCD4 $^+$ T細胞の誘導：

EBV既感染成人末梢血CD8 $^+$ T細胞をLMP2A由来HLA-A24拘束性ペプチド(IYVLVMLVL)をパルスした抗原提示細胞にて数回刺激した後、限界希釈法にて特異的CTLクローンを樹立した。また、グリシン・アラニン反復部位を除くEBNA1蛋白の全長をカバーするオーバーラッピング・ペプチド（アミノ酸20個のペプチド群で、隣接する13個のアミノ酸が重なる）を合成し

た。EBV既感染成人の末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞をこれらのペプチドで数回刺激した後、限界希釈法にて特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローニングを樹立した。

#### 2) CTLおよびCD4<sup>+</sup>T細胞の応答性の検討：

特異的T細胞の応答性はELISPOT法およびクロミウム-51放出法による傷害性試験を用いて検討した。HLA-DR, DQおよびDPに特異的なモノクローナル抗体を用いて、EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の認識するclass-II分子を特定した。

#### 3) 遺伝子導入系を用いたLMP2Aエピトープ生成に関わる分子の同定：

HLA-A\*2402、LMP2Aの遺伝子を導入した293T細胞に、免疫型プロテアソームを構成する各サブユニットの遺伝子を様々な組み合わせで導入した。エピトープの生成と提示は本エピトープに特異的なCTLクローニングを用いたELISPOT法にて検討した。

#### 4) RNA干渉法を用いた免疫プロテアソーム分子の役割検討：

免疫プロテアソームを構成する2種の分子 immuno-proteasome low molecular protein (ip-LMP)7と ip-LMP2および活性化補助分子 PA28 $\alpha$ について、発現を抑制するshort hairpin RNAを組込んだレトロウイルスを作製し、EBV陽性のBリンパ芽球株に感染させた。各分子の発現はウエスタンブロット法にて確認した。エピトープの生成は特異的CTLクローニングを反応細胞とするELISPOT法にて検討した。

#### (b) HPV陽性がんに対するCTL応答：

HLA-A24結合モチーフに基づいてHPV16型E6、E7上で候補ペプチドを推定した。子宮頸部上皮内腫瘍患者の末梢血CD8陽性細胞を、候補ペプチドでパルスした自己のCD40活性化B(CD40-B)細胞にて3回刺激しCTLを誘導後、限界希釈法にてクローニングを樹立した。CTLの傷害性と反応性を<sup>51</sup>Cr遊離試験、IFN- $\gamma$  ELISA法にて検討した。HLA-class Iの発現は、FACSにて解析した。HLA-A24を有しない腫瘍細胞株にはレトロウイルスベクターを用いてcDNAを導入した。E6 mRNAの発現は半定量RT-PCRにて

検討した。また同定したエピトープの免疫原性を検討するために、当センター中央病院婦人科で子宮頸部病変に対し治療を受けた患者より、説明と同意を取得後、末梢血を採取し特異的CTLの誘導を試みた。CTL誘導の評価にはHLA-A24分子にエピトープペプチドを組み込んだテトラマーを用いた。

#### (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：

日本骨髓バンクで実施された白血病症例でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイプと臨床データが得られた1790症例を対象とした。T細胞除去法を用いた症例と海外ドナー症例は除外した。さらに、NK細胞受容体であるKIR (killer cell Ig-like receptor : KIR) 2DLのligand不適合 (GVHD方向) (KIRG) をHLA-C型から推測した。KIR2DL1は標的細胞のHLA-CのC1エピトープ (Cw2, 4, 5, 6に共通) を認識し、このligand結合によりNK細胞の活性が抑制されることが判明している。同じく、KIR 2DL2/3はC2エピトープ (Cw1, 3, 7, 8に共通) と結合する。非血縁者間移植では、ドナーと患者のHLA-C型が異なる場合に、このligand結合が外れる症例がある。GVHD方向 (ドナーのエフェクター細胞は活性化される組み合わせ) のみの不適合は4.6%の症例、拒絶方向のみの不適合は5.8%の症例、両方向の不適合は0.5%の症例に認められた。

統計解析はCox regression modelsによる多変量解析法を使用し、変数として各HLA型の適合度とKIR ligand適合度、さらに患者・ドナーの年齢、性、性適合度、疾患、移植病期、TBIの有無、GVHD予防法などを用いた。

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\*2402拘束性LMP2A特異的CTLが認識するエピトープ(IYVLVMLVL)の生成と提示に関する分子の同定：

遺伝子導入実験において、免疫型プロテアソームの $\beta$ サブユニットであるip-LMP7と活性化補助分子PA28 $\alpha$ の共発現がエピトープ生成に必須であり、ip-LMP2分子の発現がエピトープ生成を促進した。RNA干渉実験において、これらの3分子の発現をそれぞれ特異的に抑制するshort hairpin RNAを導入したEBV陽性のBリンパ芽球株では、いずれも本CTLエピトープの提示能が低下していた。

- 2) EBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞の認識するエピトープの同定：

HLA-DR, DQ, DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞クローニングを複数樹立した。

### (b) HPV陽性がんに対するCTL応答：

#### 1) CTLの誘導

E6上に3種類のHLA-A24結合性ペプチドが推測され、うち1種類のペプチド(E6<sub>49-57</sub>)に対しIFN- $\gamma$ を放出するT細胞株が樹立された。限界希釈法によりCTLクローニング(2B2)が樹立された。この2B2 CTLはE6とHLA-A24を導入した293T細胞を傷害したため、E6<sub>49-57</sub>エピトープは細胞内で産生されHLA-A24分子により提示されることが分かった。

- 2) 子宮頸がん細胞株内におけるE6<sub>49-57</sub>提示能を改善する試み

2B2 CTLはHLA-A24を発現させたHPV-16陽性子宮頸癌細胞株を傷害できなかった。ところがSiHaにE6-E7遺伝子を強制発現させると2B2 CTLは細胞傷害活性を示すようになったため、SiHa細胞はE6<sub>49-57</sub>エピトープの発現量が不十分であると考えられた。そこで臨床応用を念頭に医薬品による処理で子宮頸がん細胞株がエピトープを提示するようにならないか検討した。SiHa細胞をプロテアソーム阻害剤であるbortezomibとIFN- $\gamma$ で併用処理したところ、高

い傷害活性を示すようになった。HLA-A24を導入した他の4種類の子宮頸癌細胞株(SKGIIIa, SKGIIIb, BOKU, CaSki)をbortezomibとIFN- $\gamma$ で同時処理したところ、CaSkiを除く3種類の癌細胞株がCTLからのIFN- $\gamma$ の放出を誘導するようになった。細胞株上のHLA-class Iの発現はbortezomib単独処理では低下したが、IFN- $\gamma$ と併用することにより増強がみられた。他方、E6 mRNAの発現量はbortezomib処理により低下し、IFN- $\gamma$ を併用しても増強しなかつた。

- 3) 子宮頸部病変を有する患者からのE6<sub>49-57</sub>特異的CTLの誘導

当センター婦人科を受診した患者28例より、子宮頸部スメアと末梢血を得た。このうちHLA-A24陽性であった20例よりE6<sub>49-57</sub>をパルスした自己CD40-B細胞を抗原提示細胞としてCTLの誘導を試みた。またスメア、もしくは摘出腫瘍におけるHPV-16の存在の有無をPCR法にて確認した。

7例がHPV-16陽性、6例がHPV-18陽性、残り7例についてはHPV-16, 18, 33型以外のHPVの存在が確認された。HPV-16陽性と判定された7例中5例においてHLA-A24/E6<sub>49-57</sub>テトラマーによって明らかに染色されるCD8 $^+$ T細胞集団が誘導できることが示された。また、HPV-16陰性の13例中5例においてもテトラマー陽性T細胞が誘導できた。

### (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：

- 1) HLA-C不適合症例では白血病再発率が低下了。Hazard ratio (HR) 0.71 p=0.025
- 2) 急性リンパ性白血病(ALL)においてHLA-C不適合症例では低下が著しかった。HR 0.47 p=0.003
- 3) HLA-C型から推測できるNK細胞受容体KIR2DL ligand不適合症例では白血病再発が高率であった。HR 2.55 p=0.017
- 4) HLA-DPB1不適合症例で有意に再発率が低かった。HR 0.68 p=0.001

- 5) 慢性骨髓性白血病（CML）においてHLA-DPB1不適合症例では低下が著しかった。
- 6) HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1の違いでは白血病再発率に有意の差はなかった。

#### D. 考察

##### (a) EBV陽性がんに対するCTL応答：

CTLエピトープ提示機構の分子レベルでの解析は、免疫療法の基盤研究と位置付けることができる。LMP2A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、同定されたエピトープがEBV感染細胞において効率良く提示されることが重要と考えられる。今後は、EBV陽性の上皮系のがん細胞（胃がん等）における本エピトープ提示能を検討し、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。

EBNA1は全てのEBV陽性がんに発現しているため、免疫療法の標的抗原とした場合に対象を拡げることができる。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きたが、近年の研究では一部のCTLエピトープは提示されることが明らかとなった。EBNA1はautophagyといわれる細胞内蛋白処理機構により、CD4<sup>+</sup>T細胞に効率良く提示されることが本年度報告された。今後、樹立したEBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローニングのEBV陽性がん細胞株に対する直接的な傷害性の検討をする予定である。また、EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞によるCTL活性化補助機構の検討をする予定である。

##### (b) HPV陽性がんに対するCTL応答

これまで報告されたHPVのCTLエピトープはE7由来がほとんどであった。つい最近HLA-A24によって提示されるE6由来のエピトープの報告が久留米大学のグループによってなされたが我々の同定したものとは異なっていた。なお、報告されているエピトープ特異的なCTLはE6導入細胞に対する傷害性を示しているが、

未処理子宮頸癌細胞株に対する傷害性は証明されていない。E6がE7と比較してCTLの標的抗原となりにくく理由の一つとして、E6は蛋白の発現量が少なく、HLA上にエピトープが提示されにくいためと考えられている。今回同定したエピトープも癌細胞株では提示されにくいが、bortezomibとIFN- $\gamma$ の同時処理によってその提示が改善されることが明らかとなつた。これまでlactacystin、epoxomicinなど他のプロテアソーム阻害剤で抗原提示が増強されるエピトープがいくつか報告されている。Bortezomibにも同様な効果があると考えられ、さらにIFN- $\gamma$ を併用することによりHLA-class Iの発現増強などで相乗効果が得られるものと推測できる。Bortezomibはプロテアソーム阻害剤の中で初めて臨床試験が行われ、特に多発性骨髄腫での有効性が報告されている。またIFN- $\gamma$ も血管肉腫等に有用な医薬品である。今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の可能性を検討する予定である。

##### (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：

従来から不適合でGVL効果が生じることは判明していたが、責任あるHLA座は明らかでなかった。本研究で、多数例の均一なGVHD予防法を用いた症例を多変量解析したことにより、HLA-CとHLA-DPB1がGVL効果に関与する遺伝子座であることが明らかになった。さらに、NK細胞の受容体であるKIR2DLのリガンド適合度も同時に加えた多変量解析を行うことにより、HLAとKIRの影響を同時に解析することができ、HLA-C不適合の一部症例に生じるKIR2DL不適合（NKG）は逆に白血病再発を高めることが判明した。T細胞を介した抗腫瘍効果の機序に加えて、NK細胞受容体を介したNK細胞あるいはT細胞の機序が存在し臨床的に不利に働いていることが判明した。

さらに従来推測されていたHLA-A, BのGVL効果が認められなかつたことは、同種移植反応としてのGVL効果を解明する上で重要な知見と

考えられた。

GVL効果が白血病の病型により異なることも新たな知見である。各型のHLA抗原の表出の違い、とくにHLA-CとHLA-DPB1 の表出の有無の検索が必要であろう。また、急性骨髓性白血病(AML)ではHLAやKIRの影響がほとんど認められなかつたことは、AML細胞が移植免疫反応に直接なんらかの影響を与えていいることが推測される。

本研究で得られた知見により、GVLの機序を解明するための基本的な情報を得ることができた。さらに、これら抗原を標的とする特異的細胞免疫療法開発の基礎データとして重要であると考えられた。

## E. 結論

(a) 遺伝子導入実験およびRNA干渉法を用いてEBV-LMP2Aエピトープ生成に関わる分子を同定しその役割を証明した。LMP2Aを標的とする免疫療法構築のための分子基盤を明らかにすることができた。また、HLA-DR, DQ, DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンを複数樹立した。EBNA1を標的抗原とする免疫療法の構築に向けて、CD8<sup>+</sup>T細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞両者の活性化を包括する、新たな研究の方向性に繋がる成果を得た。

(b) 日本人に多いHLA-A24が提示するHPV-16型E6の新規CTLエピトープE6<sub>49-57</sub>の同定に成功した。E6<sub>49-57</sub>特異的CTLは未処理の子宮頸がん細胞株は有意な傷害活性を示さなかったが、プロテアソーム阻害剤であるbortezomib及びIFN- $\gamma$ 処理により大部分の子宮頸がん細胞株がCTL感受性となり、crypticなエピトープの提示能が改善されることが明らかとなった。今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の開発を検討する予定である。

(c) ドナーと患者のHLA遺伝子型を本研究班においてレトロスペクティブに同定・解析することにより、同種移植免疫、特にGVL効果に関する新しい知見：HLA-CとHLA-DPB1、KIRとGVL

効果を集積することができ、これら抗原を標的とする特異的細胞免疫療法開発の基礎データ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) Demachi-Okamura, A., Ito, Y., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Morishima, Y., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1-specific cytotoxic T lymphocytes targeting natural killer cell malignancies carrying EBV. *Eur. J. Immunol.* 36(3):593-602, 2006.
- 2) Ito, Y., Kondo, E., Demachi-Okamura, A., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Tanimoto, M., Morishima, Y., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Three Immunoproteasome-Associated Subunits Cooperatively Generate a CTL Epitope of the EBV LMP2A by Overcoming Specific Structures Resistant to Epitope Liberation. *J Virol.* 80(2):883-890, 2006.
- 3) Terakura, S., Murata, M., Nishida, T., Emi, N., Akatsuka, Y., Morishima, Y., Kodera, Y., Naoe, T.: Increased risk for treatment-related mortality after bone marrow transplantation in GSTM1-positive recipients. *Bone Marrow Transplant.* 37(4): 381-386, 2006.
- 4) Ogawa, Y., Hotta, T., Tobinai, K., Watanabe, T., Sasaki, Y., Minami, H., Morishima, Y., Ogura, M., Seriu, T.: Phase I and pharmacokinetic study of oral fludarabine phosphate in relapsed indolent B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 17(2):330-333, 2006.
- 5) Imamura, M., Asano, S., Harada, M., Ikeda, Y., Kato, K., Kato, S., Kawa, K., Kojima, S., Morishima, Y., Morishita, Y., Nakahata, T.,

- Okamura, J., Okamoto, S., Shiobara, S., Tanimoto, M., Tsuchida, M., Atsuta, Y., Yamamoto, K., Tanaka, J., Hamajima, N., Kodera, Y.: Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan. *Int J Hematol.* 83(2):164-178, 2006.
- 6) Oshiro, A., Tagawa, H., Ohshima, K., Karube, K., Uike, N., Tashiro, Y., Utsunomiya, A., Masuda, M., Takasu, N., Nakamura, S., Morishima, Y., Seto, M.: Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* Feb 16; [Epub ahead of print] 2006.
- 7) Tobinai, K., Watanabe, T., Ogura, M., Morishima, Y., Ogawa, Y., Ishizawa, K., Minami, H., Utsunomiya, A., Taniwaki, M., Terauchi, T., Nawano, S., Matsusako, M., Matsuno, Y., Nakamura, S., Mori, S., Ohashi, Y., Hayashi, M., Seriu, T., Hotta, T.: Phase II study of oral fludarabine phosphate in relapsed indolent B-Cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 24(1):174-180, 2006.
- 8) Atsuta, Y., Suzuki, R., Yamamoto, K., Terakura, S., Iida, H., Kohno, A., Naoe, T., Yano, K., Wakita, A., Taji, H., Hamaguchi, M., Kodera, Y., Sao, H., Morishima, Y., Hamajima, N., Morishita, Y.: Risk and prognostic factors for Japanese patients with chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 37(3):289-296, 2006.
- 9) Suzuki, T., Matsuo, K., Ito, H., Hirose, K., Wakai, K., Saito, T., Sato, S., Morishima, Y., Nakamura, S., Ueda, R., Tajima, K.: A past history of gastric ulcers and Helicobacter pylori infection increase the risk of gastric malignant lymphoma. *Carcinogenesis.* Jan 7; [Epub ahead of print] 2006.
- 10) Terakura, S., Murata, M., Nishida, T., Emi, N., Akatsuka, Y., Riddell, S.R., Morishima, Y., Kodera, Y., Naoe, T.: A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 129(2): 221-228, 2005.
- 11) Kasugai, Y., Tagawa, H., Kameoka, Y., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Identification of CCND3 and BYSL as candidate targets for the 6p21 amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 11(23):8265-8272, 2005.
- 12) Kanda, Y., Sakamaki, H., Sao, H., Okamoto, S., Kodera, Y., Tanosaki, R., Kasai, M., Hiraoka, A., Takahashi, S., Miyawaki, S., Kawase, T., Morishima, Y., Kato, S.: Japan Marrow Donor Program. Effect of conditioning regimen on the outcome of bone marrow transplantation from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(11):881-889, 2005.
- 13) Shimada, K., Yokozawa, T., Atsuta, Y., Kohno, A., Maruyama, F., Yano, K., Taji, H., Kitaori, K., Goto, S., Iida, H., Morishima, Y., Kodera, Y., Naoe, T., Morishita, Y.: Solid tumors after hematopoietic stem cell transplantation in Japan: incidence, risk factors and prognosis. *Bone Marrow Transplant.* 36(2):115-121, 2005.
- 14) Tagawa, H., Suguro, M., Tsuzuki, S., Matsuo, K., Karnan, S., Ohshima, K., Okamoto, M., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 106(5):1770-1777, 2005.
- 15) Imai, Y., Chou, T., Tobinai, K., Tanosaki, R., Morishima, Y., Ogura, M., Shimazaki, C., Taniwaki, M., Hiraoka, A., Tanimoto, M.,

- Koike, T., Kogawa, K., Hirai, H., Yoshida, T., Tamura, K., Kishi, K., Hotta, T.: CliniMACS Study Group. Isolation and transplantation of highly purified autologous peripheral CD34+ progenitor cells: purging efficacy, hematopoietic reconstitution in non-Hodgkin's lymphoma (NHL): results of Japanese phase II study. *Bone Marrow Transplant.* 35(5):479-487, 2005.
- 16) Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., Seto, M.: Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene.* 24(8):1348-1358, 2005.
- 17) Tsuji, T., Yasukawa, M., Matsuzaki, J., Ohkuri, T., Chamoto, K., Wakita, D., Azuma, T., Niiya, H., Miyoshi, H., Kuzushima, K., Oka, Y., Sugiyama, H., Ikeda, H., Nishimura, T.: Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood.* 106(2):470-476, 2005.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 葛島清隆. 「EBV感染症に対する細胞療法」日本臨床64巻 増刊号3、ヘルペスウイルス学、p678-681.2006、日本臨床社
- 21) 葛島清隆. 「テトラマーアッセイ」分子細胞治療（先端医学社、東京）印刷中。
- ## 2. 学会発表
- 鳥飼宏基, 赤塚美樹, 宮崎幹則, 辻村朱音, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 元吉和夫, 森島泰雄, 小寺良尚, 葛島清隆, 高橋利忠HLA-A\*3101 及び-A\*3303拘束性のCTSH遺伝子上の同一多型部位にコードされる2つの新規マイナーネオアントigenの同定：基盤的癌免疫研究会第9回総会 東京 2005年6月
  - 森島聰子, 赤塚美樹, 那波明弘, 清野透, 鳥飼宏基, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 葛島清隆, 高橋利忠 : HPV16型E6上のHLA-A24拘束性CTLエピトープの同定とbortezomib, INF-γの併用効果：基盤的癌免疫研究会第9回総会 東京 2005年6月
  - Morishima Y.: Clinical significance of HLA alleles and KIR matching in patients transplanted non-T cell depleted marrow from unrelated donor. :Japan Marrow Donor Program. 14<sup>th</sup> International HLA and Immunogenetics Workshop. Melbourne Australia, Nov. 2005.
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 葛島清隆、出町文子、伊藤嘉規、赤塚美樹、森島泰雄. 「エピスタイン-バールウイルス感染細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその用途」：出願日；平成17年10月28日、出願番号；特願2005-315306.

## 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。本研究者らが同定したHLA-A24拘束性EBV-LMP2A特異的CTLエピトープの提示に必須の分子を特定した。免疫型プロテアソームのβサブユニットであるimmuno-proteasome low molecular protein(ip-LMP)7と活性化補助分子PA28 $\alpha$ の共発現がエピトープ生成に必須であり、ip-LMP2分子の発現がエピトープ生成を促進した。RNA干渉実験でも確認した。また、EBV-EBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞が認識する新規のエピトープを複数同定した。

A. 研究目的

Epstein-Barr virus(EBV)は、上咽頭がん、バーキットリンパ腫、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。

EBV潜伏感染抗原であるLMP2Aは上咽頭がん、胃がん、ホジキンリンパ腫、T/NKリンパ腫等のEBV陽性腫瘍に発現しており、免疫療法の有力な標的候補である。本研究者らはHLA-

A24拘束性EBV-LMP2A特異的CTLエピトープを新規に同定しているが、このエピトープの提示にはインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )によって誘導される抗原提示機構の関与が必要である(Kuzushima et al. Blood 2003)。本年度はこの提示に関わる分子およびその役割を明らかにすることを目的とした。

EBNA1はEBV陽性がんの全てに発現していることから、免疫療法の標的抗原として理想的である。昨年度はEBNA1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明らかにした。CTLを体内で効果的に活性化するためには、CD4 $^+$ Tヘルパー細胞を同時に活性化することが重要である。本年度は、EBV-EBNA1特異的CD4 $^+$ T細胞が認識する新規のエピトープを同定することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 合成ペプチドによるCTLおよびCD4 $^+$ T細胞

の誘導：

EBV既感染成人末梢血CD8<sup>+</sup>T細胞をLMP2A由來HLA-A24拘束性ペプチド(IYVLVMLVL)をパルスした抗原提示細胞にて数回刺激した後、限界希釈法にて特異的CTLクローニングを樹立した。また、グリシン・アラニン反復部位を除くEBNA1蛋白の全長をカバーするオーバーラッピング・ペプチド(アミノ酸20個のペプチド群で、隣接する13個のアミノ酸が重なる)を合成した。EBV既感染成人の末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞をこれらのペプチドで数回刺激した後、限界希釈法にて特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローニングを樹立した。

2) CTLおよびCD4<sup>+</sup>T細胞の応答性の検討：

特異的T細胞の応答性はELISPOT法およびクロミウム-51放出法による傷害性試験を用いて検討した。HLA-DR, DQおよびDPに特異的なモノクローナル抗体を用いて、EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の認識するclass-II分子を特定した。

3) 遺伝子導入系を用いたLMP2Aエピトープ生成に関わる分子の同定：

HLA-A\*2402、LMP2Aの遺伝子を導入した293T細胞に、免疫型プロテアソームを構成する各サブユニットの遺伝子を様々な組み合わせで導入した。エピトープの生成と提示は本エピトープに特異的なCTLクローニングを用いたELISPOT法にて検討した。

4) RNA干渉法を用いた免疫プロテアソーム分子の役割検討：

免疫プロテアソームを構成する2種の分子immuno-proteasome low molecular protein(ip-LMP)7とip-LMP2および活性化補助分子PA28 $\alpha$ について、発現を抑制するshort hairpin RNAを組んだレトロウイルスを作製し、EBV陽性のBリンパ芽球株に感染させた。各分子の発現はウエスタンプロット法にて確認した。エピトープの生成は特異的CTLクローニングを反応細胞とする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\*2402拘束性LMP2A特異的CTLが認識するエピトープ(IYVLVMLVL)の生成と提示に関する分子の同定：

遺伝子導入実験において、免疫型プロテアソームの $\beta$ サブユニットであるip-LMP7と活性化補助分子PA28 $\alpha$ の共発現がエピトープ生成に必須であり、ip-LMP2分子の発現がエピトープ生成を促進した。RNA干渉実験において、これらの3分子の発現をそれぞれ特異的に抑制するshort hairpin RNAを導入したEBV陽性のBリンパ芽球株では、いずれも本CTLエピトープの提示能が低下していた。

2) EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の認識するエピトープの同定：

HLA-DR, DQ, DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローニングを複数樹立した。

### D. 考察

CTLエピトープ提示機構の分子レベルでの解析は、免疫療法の基盤研究と位置付けることができる。LMP2A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、同定されたエピトープがEBV感染細胞において効率良く提示されることが重要と考えられる。今後は、EBV陽性の上皮系のがん細胞(胃がん等)における本エピトープ提示能を検討し、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。

EBNA1は全てのEBV陽性がんに発現しているため、免疫療法の標的抗原とした場合に対象を広げることができる。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

なりにくくいとされてきたが、近年の研究では一部のCTLエピトープは提示されることが明らかとなった。EBNA1はautophagyといわれる細胞内蛋白処理機構により、CD4<sup>+</sup>T細胞に効率良く提示されることが本年度報告された。今後、樹立したEBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンのEBV陽性がん細胞株に対する直接的な傷害性の検討をする予定である。また、EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞によるCTL活性化補助機構の検討をする予定である。

#### E. 結論

遺伝子導入実験およびRNA干渉法を用いてLMP2Aエピトープ生成に関わる分子を同定しその役割を証明した。LMPAを標的とする免疫療法構築のための分子基盤を明らかにすることができた。また、HLA-DR, DQ, DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4<sup>+</sup>T細胞クローンを複数樹立した。EBNA1を標的抗原とする免疫療法の構築に向けて、CD8<sup>+</sup>T細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞両者の活性化を包括する、新たな研究の方向性に繋がる成果を得た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

- 1) Demachi-Okamura, A., Ito, Y., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Morishima, Y., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1-specific cytotoxic T lymphocytes targeting natural killer cell malignancies carrying EBV. *Eur. J. Immunol.* 36(3):593-602, 2006.
- 2) Ito, Y., Kondo, E., Demachi-Okamura, A., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Tanimoto, M., Morishima, Y., Takahashi, T., Kuzushima, K.: Three Immunoproteasome-Associated Subunits Cooperatively Generate a CTL Epitope of the EBV LMP2A by Overcoming

Specific Structures Resistant to Epitope Liberation. *J Virol.* 80(2):883-890, 2006.

- 3) Tsuji, T., Yasukawa, M., Matsuzaki, J., Ohkuri, T., Chamoto, K., Wakita, D., Azuma, T., Niiya, H., Miyoshi, H., Kuzushima, K., Oka, Y., Sugiyama, H., Ikeda, H., Nishimura, T.: Generation of tumor-specific, HLA class I-restricted human Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T-cell receptor genes. *Blood.* 106(2):470-476, 2005.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 葛島清隆. 「EBV感染症に対する細胞療法」日本臨床64巻 増刊号3、ヘルペスウイルス学、p678-681.2006、日本臨床社
- 7) 葛島清隆. 「テトラマーアッセイ」分子細胞治療（先端医学社、東京）印刷中.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 葛島清隆、出町文子、伊藤嘉規、赤塚美樹、森島泰雄. 「エプスタイン-バールウイルス感染細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその用途」：出願日；平成17年10月28日、出願番号；特願2005-315306.

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

ヒトパピローマウイルス E6 蛋白上の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定

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** 約 50% の子宮頸がんでは Human papillomavirus (HPV) 16 型がその発症に関与している。これらのがん細胞は E6 及び E7 がん蛋白を発現しており、免疫療法の標的候補となる。我々は、日本人に多い HLA-A24 が提示する HPV-16 型 E6 の新規 CTL エピトープ同定を試みた。HLA-A24 結合モチーフより推定した 3 種類のペプチドを用いて子宮頸部上皮内腫瘍患者の末梢血より CTL 株を誘導しクローニングした。CTL の反応性は IFN- $\gamma$  ELISA 法等にて検討した。1 種類のペプチドで CTL が誘導され、E6 と HLA-A24 導入 293T 細胞を傷害した。未処理の子宮頸がん細胞株は有意な傷害活性を示さなかつたが、プロテアソーム阻害剤である bortezomib 及び IFN- $\gamma$  処理により 5 種類中 4 種類のがん細胞株が CTL からの IFN- $\gamma$  の放出を誘導するようになり、cryptic なエピトープの提示能が改善されることが明らかとなった。今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の開発を検討する予定である。

**A. 研究目的**

子宮頸がんは世界で年間 25 万人において新規に発生し近年増加傾向にある。Human papillomavirus (HPV) 16 型は子宮頸がんの約半数の症例で検出される。この HPV ゲノムにコードされる蛋白質のうち、細胞の不死化に必須の役割を果たしている初期遺伝子産物 E6 及び E7 蛋白は、免疫療法の有望な標的候補と考えられている。白人に多い HLA-A\*0201 に提示される E7 由来エピトープは既に報告があり免疫療法の研究が進んでいるが、日本人に多い HLA-A24 によって提示される HPV16 型の E6、E7 に由来する CTL エピトープの報告はこれまでになかったため、我々は日本人において免疫療法や免疫モニタリングに有望な新規エピトープの同定を試みた。

**B. 研究方法**

HLA-A24 結合モチーフに基づいて HPV16 型 E6、

E7 上で候補ペプチドを推定した。子宮頸部上皮内腫瘍患者の末梢血 CD8 陽性細胞を、候補ペプチドでパルスした自己の CD40 活性化 B (CD40-B) 細胞にて 3 回刺激し CTL を誘導後、限界希釈法にてクローニングを樹立した。CTL の傷害性と反応性を  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験、IFN- $\gamma$  ELISA 法にて検討した。HLA-class I の発現は、FACS にて解析した。HLA-A24 を有しない腫瘍細胞株にはレトロウイルスベクターを用いて cDNA を導入した。E6 mRNA の発現は半定量 RT-PCR にて検討した。また同定したエピトープの免疫原性を検討するために、当センター中央病院婦人科で子宮頸部病変に対し治療を受けた患者より、説明と同意を得て後、末梢血を採取し特異的 CTL の誘導を試みた。CTL 誘導の評価には HLA-A24 分子にエピトープペプチドを組み込んだテトラマーを用いた。

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：愛がん第 19-3 号および第 21-11 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 日文部科学省・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) CTL の誘導：

E6 上に 3 種類の HLA-A24 結合性ペプチドが推測され、うち 1 種類のペプチド(E6<sub>49-57</sub>)に対し IFN- $\gamma$ を放出する T 細胞株が樹立された(図 1A)。限界希釈法により CTL クローン(2B2)が樹立された。この 2B2 CTL は E6 と HLA-A24 を導入した 293T 細胞を傷害したため、E6<sub>49-57</sub> エピトープは細胞内で產生され HLA-A24 分子により提示されることが分かった(図 1B)。

2) 子宮頸がん細胞株内における E6<sub>49-57</sub> 提示能を改善する試み：

ペプチドタイトレーションにより 2B2 CTL は良好な avidity を有する(図 1C)にも拘わらず、HLA-A24 を発現させた HPV-16 陽性子宮頸癌細胞株を傷害できなかった。ところが SiHa に E6-E7 遺伝子を強制発現させると 2B2 CTL は細胞傷害活性を示すようになったため(図 2)、SiHa 細胞は E6<sub>49-57</sub> エピトープの発現量が不十分であると考えられた。そこで臨床応用を念頭に医薬品による処理で子宮頸がん細胞株がエピトープを提示するようにならなければ検討した。SiHa 細胞をプロテアソーム阻害剤である bortezomib(10  $\mu$ M、5 時間)と IFN- $\gamma$ (100U/ml、48 時間)で併用処理(共に患者に投与した際に達成可能な濃度)したところ、高い傷害活性を示すようになった(図 3)。HLA-A24 を導入した他の 4 種類の子宮頸癌細胞株(SKGIIIa、SKGIIIb、BOKU、CaSki)を bortezomib と IFN- $\gamma$ で同時処理したところ、CaSki を除く 3 種類の癌細胞株が CTL からの IFN- $\gamma$ の放出を誘導するようになった(図 4)。細胞株上の HLA-class I の発現は bortezomib

単独処理では低下したが、IFN- $\gamma$ と併用することにより増強がみられた(図 5A)。他方、E6 mRNA の発現量は bortezomib 処理により低下し、IFN- $\gamma$ を併用しても増強しなかった(図 5B)。

#### 3) 子宮頸部病変を有する患者からの E6<sub>49-57</sub> 特異的 CTL の誘導：

当センター婦人科を受診した患者 28 例より、子宮頸部スメアと末梢血を得た。このうち HLA-A24 陽性であった 20 例より E6<sub>49-57</sub> をパルスした自己 CD40-B 細胞を抗原提示細胞として CTL の誘導を試みた。またスメア、もしくは摘出腫瘍における HPV-16 の存在の有無を PCR 法にて確認した。

7 例が HPV-16 陽性、6 例が HPV-18 陽性、残り 7 例については HPV-16、18、33 型以外の HPV の存在が確認された。HPV-16 陽性と判定された 7 例中 5 例において HLA-A24/E6<sub>49-57</sub> テトラマーによって明らかに染色される CD8<sup>+</sup>T 細胞集団が誘導できることが示された。また、HPV-16 陰性の 13 例中 5 例においてもテトラマー陽性 T 細胞が誘導できた(表 1)。

### D. 考察

これまで報告された HPV の CTL エピトープは E7 由来がほとんどであった。つい最近 HLA-A24 によって提示される E6 由来のエピトープの報告が久留米大学のグループによってなされたが我々の同定したものとは異なっていた。なお、報告されているエピトープ特異的な CTL は E6 導入細胞に対する傷害性を示しているが、未処理子宮頸癌細胞株に対する傷害性は証明されていない。E6 が E7 と比較して CTL の標的抗原となりにくい理由の一つとして、E6 は蛋白の発現量が少なく、HLA 上にエピトープが提示されにくいためと考えられている。今回同定したエピトープも癌細胞株では提示されにくいか、bortezomib と IFN- $\gamma$ の同時処理によってその提示が改善されることが明らかとなった。これまで lactacystin、epoxomicin

など他のプロテアソーム阻害剤で抗原提示が増強されるエピトープがいくつか報告されている。Bortezomib にも同様な効果があると考えられ、さらに IFN- $\gamma$ を併用することにより HLA-class I の発現増強などで相乗効果が得られるものと推測できる。Bortezomib はプロテアソーム阻害剤の中で初めて臨床試験が行われ、特に多発性骨髄腫での有効性が報告されている。また IFN- $\gamma$ も血管肉腫等に有用な医薬品である。今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の可能性を検討したい。

#### E. 結論

日本人に多い HLA-A24 が提示する HPV-16 型 E6 の新規 CTL エピトープ E6<sub>49-57</sub> の同定に成功した。E6<sub>49-57</sub> 特異的 CTL は未処理の子宮頸がん細胞株は有意な傷害活性を示さなかつたが、プロテアソーム阻害剤である bortezomib 及び IFN- $\gamma$  处理により大部分の子宮頸がん細胞株が CTL 感受性となり、cryptic なエピトープの提示能が改善されることが明らかとなつた。今後、同薬剤効果の機序の解明および併用免疫療法の開発を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, et al. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1-specific cytotoxic T lymphocytes targeting EBV-carrying natural killer cell malignancies. *Eur J Immunol.* 36: 593-602, 2006.
- 2) Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Morishima Y, Kodera Y, Naoe T. Increased risk for treatment-related mortality after bone marrow transplantation in GSTM1-

positive recipients. *Bone Marrow Transplant.* 37: 381-386, 2006.

- 3) Ito Y, Kondo E, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, et al. Three immunoproteasome-associated subunits cooperatively generate a cytotoxic T-lymphocyte epitope of Epstein-Barr virus LMP2A by overcoming specific structures resistant to epitope liberation. *J Virol.* 80: 883-890, 2006.
- 4) Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Riddell SR, Morishima Y, Kodera Y, Naoe T. A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 129: 221-228, 2005.

##### 2. 学会発表

- 1) 鳥飼宏基, 赤塚美樹, 宮崎幹則, 辻村朱音, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 元吉和夫, 森島泰雄, 小寺良尚, 葛島清隆, 高橋利忠 HLA-A\*3101 及び-A\*3303 拘束性の CTSH 遺伝子上の同一多型部位にコードされる 2 つの新規マイナーグループ適合抗原の同定：基盤的癌免疫研究会第 9 回総会 東京 2005 年 6 月
- 2) 森島聰子, 赤塚美樹, 那波明弘, 清野透, 鳥飼宏基, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 葛島清隆, 高橋利忠 : HPV16 型 E6 上の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定と bortezomib, INF- $\gamma$  の併用効果 : 基盤的癌免疫研究会第 9 回総会 東京 2005 年 6 月

##### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 葛島清隆、出町文子、伊藤嘉規、赤塚美樹、森島泰雄、「エピスタイン-バーレウイルス感染細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチド及びその用途」：出願日；平成 17 年 10 月 28 日、出願番号；特願 2005-315306.

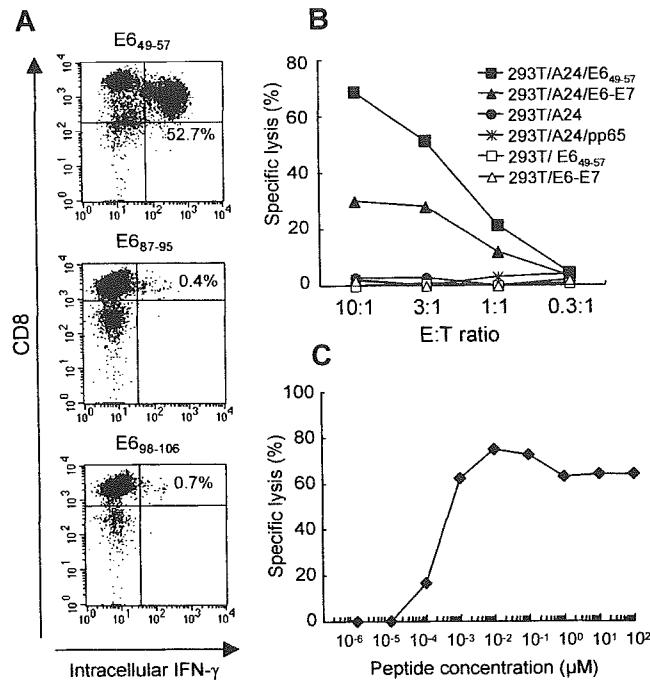


図1 (A) 3種類の候補ペプチドによるCTL株の誘導。(B) E6<sub>49-57</sub>特異的CTLクローニング2B2は内在性に発現するエピトープを認識する。(C) E6<sub>49-57</sub>ペプチドによる2B2 CTLのエピトープ再構成試験。

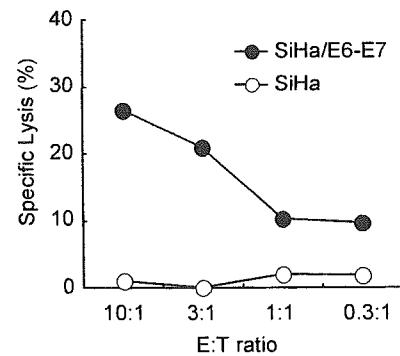


図2 2B2 CTLはHPV-16 E6-E7を強制発現したSiHa細胞を認識する。

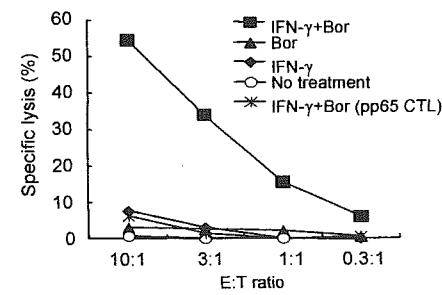


図3 bortezomibとIFN- $\gamma$ 処理により2B2 CTLはSiHaを傷害する。

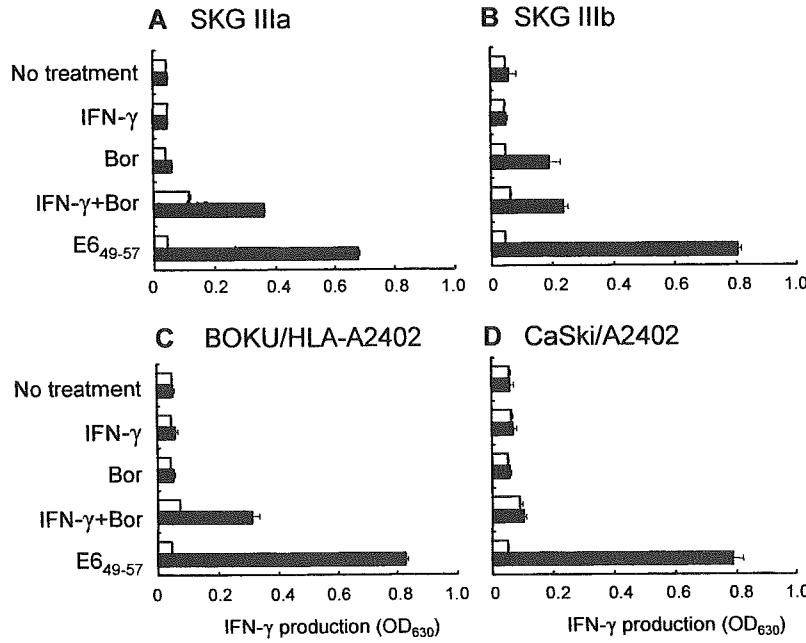


図4 2B2 CTLはbortezomibとIFN- $\gamma$ 処理を施した子宮頸がん細胞株4種類のうち3種類に反応し、IFN- $\gamma$ を放出した。

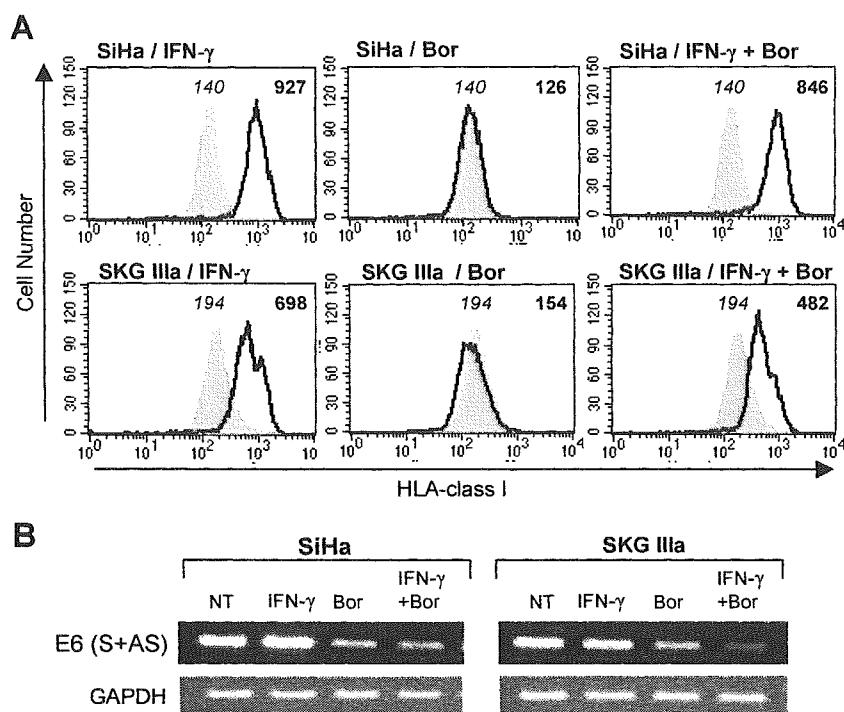


図5 (A) SiHa および SKGIIIa 細胞の bortesomib と IFN- $\gamma$  処理後の細胞表面 HLA クラス I 分子量の変化。(B) 同処理後の HPV-16 E6 mRNA 量の変化。

表1 子宮頸部病変 20 例における HPV-16 E6<sub>49-57</sub> 特異的 CTL 誘導結果

Patient group	Case	年齢	組織分類	テトラマー陽性 ウェルの割合	テトラマー陽性細胞ウェル 中の陽性細胞率(%)
<b>HPV16+ patients</b>					
	AC-04	24	CIN3	1/1	0.3
	AC-07	55	CxCa	0/3	-
	AC-10	58	CxCa	0/2	-
	AC-11	50	CIN3	1/4	0.63
	AC-14	40	CxCa	2/4	0.43, 0.38
	AC-18	27	CxCa	1/5	1.25
	AC-26	42	CxCa	1/2	0.12
<b>HPV16- patients</b>					
	AC-01	58	CIN3	0/1	-
	AC-15	34	CIN3	1/3	0.61
	AC-19	48	CIN2	0/2	-
	AC-23	43	CxCa	0/5	-
	AC-25	40	CxCa	0/4	-
	AC-27	36	CIN3	1/5	1.06
	AC-28	55	CIN3	0/2	-
	AC-03	55	CxCa	1/1	8.26
	AC-08	28	CIN3	0/2	-
	AC-09	36	CIN3	4/4	68.1, 38.9, 0.2, 0.06
	AC-16	51	CxCa	2/3	0.12, 0.08
	AC-20	52	CxCa	0/6	-
	AC-24	53	CxCa	0/4	-

CIN: cervical intraepithelial neoplasia, CxCa; cervical cancer