

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 葛島 清隆

平成19（2007）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…………… 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 …………… 12
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 …………… 16
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 …………… 24
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 …………… 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 34

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T細胞応答の研究、(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、並びに(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応の解明とその細胞治療への応用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CTLとCD4⁺T細胞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。がん特異的CTLの活性を増強するCD4⁺T細胞に関連して、今年度は以下の研究成果を得た。日本人の多くが保有するHLA-DR,DQ,DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立した。これらのT細胞が認識する新規のエピトープを同定した。EBNA1特異的CD4⁺T細胞がEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害したことから、EBNA1特異的CD4⁺T細胞はヘルパーのみならずエフェクターとして免疫療法に利用できる可能性が示された。

(b) 難治性造血器腫瘍に対する根治療法として実施される同種造血幹細胞移植後には、移植片対白血病/リンパ腫(GVL)/腫瘍(GVT)効果が見られるが、その主要な標的抗原としてマイナー抗原が有望視されている。この多くは、ドナーと患者間に存在する遺伝子多型(SNP)によってアミノ酸置換が起こり、その部分がアロ抗原となってHLAに提示され、免疫反応を惹起するものである。今回我々はHLA-B44拘束性の新規マイナー抗原(ACC-6)をコードする遺伝子、*HMSD*を発現クローニング法にて同定した。このマイナー抗原は、遺伝子のExon 2直後のsplice donor siteに存在するSNPによりexon 2 skippingが起こり、結果としてreading frameの異なったpolypeptideが産生され、抗原性を持つようになったことが分かった。また以前報告したマイナー抗原(ACC-1, 2)をコードする*BCL2A1*遺伝子内に新たなHLA-A24拘束性マイナー抗原エピトープが存在することを示唆するデータを得た。この他、HLA-A*0201拘束性のHA-1がHLA-A*0206でも提示されることを見いだした。

(c) 非血縁者間骨髄移植においてドナーと患者間のHLA抗原の違いが移植成績に大きな影響を与えていることが明らかになり、HLA-A, B, C, DPB1の遺伝子型の不適合、およびNK細胞受容体であるKIR2DLのリガンド不適合(GVHD方向)が急性GVHDの頻度を高めること判明している。今年度は、HLA型不適合の組み合わせと急性GVHDとの関連を5210症例につき多変量解析法

を用いて解析し、重症急性GVHDの発症に関与するHLA分子上の部位と置換アミノ酸を同定することができた。この知見は、急性GVHD発症の機序だけでなく、同種移植における移植片対腫瘍効果（GVT）の機序解明への道を開くものであり、これら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。

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CTLとCD4⁺T細胞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。

EBNA1蛋白は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。これまでに、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陽性のヘルパーT細胞を同時に活性化することが重要である。本年度は、EBNA1特異的CD4⁺T細胞が認識する新規のエピトープを同定し、これらの細胞の機能を明らかにすることを目的とした。

(b) 同種造血幹細胞移植は、アロ免疫反応を利

用した強力な抗腫瘍免疫療法と考えられている。このアロ反応の標的となっているのは、ドナー・患者間の遺伝子多型（多くは一塩基多型であるSNP）に由来するマイナー（組織適合）抗原と呼ばれるエピトープペプチドである。すでに欧米ではHLA-A*0201拘束性のHA-1など、有望なマイナー抗原が報告され、臨床応用が進みつつある。しかし、A*0201の陽性頻度は、欧米人では50%以上であるのに対し、日本人では20%未満と低く、HA-1の応用性は高くない。そこで我々は日本人患者に対する臨床応用に向けて、日本人に多いHLA-A24（60%）やHLA-B44など欧米人・日本人ともに比較的多く（20%前後）にみられるHLAなどに提示されるマイナー抗原エピトープの検索を行い、これまでに計5種類のマイナー抗原を同定した。しかし、マイナー抗原が免疫原性を発揮するには、ドナー・患者間において抗原が不適合となる組み合わせであることが必須であるため、テーラーメイド方式で多くの患者をカバーするには、今後さらに複数のマイナー抗原を同定する必要がある。

本年度は、以前同定したACC-2と同じHLA-B44拘束性ではあるが、異なる遺伝子にコードされる新規マイナー抗原（ACC-6）を同定したので、その詳細につき報告する。

(c) 非血縁者間骨髄移植におけるHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1遺伝子型の不適合組み合わせと重症GVHDとの関連を解析することにより、重症GVHDに関与するHLA分子上の部位

と置換アミノ酸を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答:

1) 合成ペプチドによるEBNA1特異的CD4⁺T細胞の誘導:

グリシン・アラニン反復部位を除くEBNA1蛋白のほぼ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⁺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⁺T細胞クローンを樹立した。

2) CD4⁺T細胞が認識するエピトープの同定:

EBNA1特異的CD4⁺T細胞の応答性はELISPOT法を用いて検討した。エピトープと推定される配列を含む、11ないし13アミノ酸から成るペプチドを合成し、コアとなる認識領域を決定した。

3) エピトープを提示するHLAの同定:

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⁺T細胞の認識するclass-II分子を特定した。HLA-DRについては、血液ドナーの保有する個々のDRB1遺伝子をHLA-DRA*0101遺伝子と共に導入したHEK293T細胞に対する反応性から拘束分子を同定した。DQおよびDPについては、既知のHLAを保有するEBV陽性Bリンパ芽球株（LCL）のパネルに対する反応性から拘束分子を決定した。

4) CD4⁺T細胞クローンの傷害活性の検討: EBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を標的としたクロミウム遊離試験にてCD4⁺T細胞クローンの傷害活性を判定した。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析:

移植後患者の末梢血から限界希釈法で得られたCTLクローンのHLA拘束性決定は、HLA

型タイプ済みのLCLパネルを用いて行った。CTLが認識するマイナー遺伝子の同定は、初めに連鎖解析法およびDNAプールを用いたマイクロサテライト解析法にて検討した。以上により染色体上の遺伝子座は決定できたが、遺伝子の同定には至らなかったため、マイナー抗原陽性の患者LCLからcDNAライブラリーを作成し、発現クローニング法にて遺伝子の同定を行った。次いで種々のLCLについて、候補に挙げられた遺伝子内に存在するSNP型と、CTLへの感受性の結果を比較し、マイナー抗原の原因となっているSNPを決定、引き続きエピトープ配列も決定した。さらに、定量PCR法にてマイナー抗原遺伝子の正常組織や造血器腫瘍での発現パターンを検討した。また非臨床試験として超免疫不全マウスを用い、本マイナー抗原特異的CTLが白血病幹細胞も傷害できるか否かを検討した。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応の解明とその細胞治療への応用:

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイピングをドナーと患者の検体を用いてレトロスペクティブに実施した非血縁者間骨髄移植5210症例を対象にした。GVHD予防としてT細胞除去法を用いた症例と海外ドナーからの移植症例は除外した。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座におけるHLA型不適合な組み合わせのHLA分子の部位と置換アミノ酸の組み合わせにつき、重症GVHDの発症リスク(HR)をHLA型適合な症例と比較した。例として、HLA-C座における部位と置換アミノ酸につき表1に示した。他のHLA座の不適合度、患者・ドナーの年齢、性、性適合、疾患、移植病期、TBIの有無、GVHD予防法などによりadjustした。Pが0.005以下の組み合わせと有意とし、さらにBootstrap法により検証した。

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針（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、等）に準拠しており、研究計画書や説明・同意文書はすでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得たものである。試料の採取は、患者やドナーに説明と理解を得た後、書面にて同意を得られた場合のみに実施された。さらに、マイナー抗原を標的とした移植後再発造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法、養子免疫療法は、同様に政府の定める各種倫理指針に準拠し、愛知県がんセンターの倫理委員会で承認済みの研究実施書と同意文書に基づいて、書面による同意の得られた場合のみに実施されたものである。

また、マウスを用いた実験動物については、愛知県がんセンターの動物委員会にて了承されたプロトコルに基づき、動物愛護の配慮を行いつつ実施した。

C. 研究結果

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答:

限界希釈法にて5個の異なるエピトープを認識するCD4⁺T細胞クローンを樹立した。そのうちの1個はHLA-DR*0401によって提示される新規エピトープであった。その他は、それぞれDR51、DP2、DP5、DQ6であった。この4個は既報告のエピトープ部位の近傍に位置していたが、拘束HLA分子は、報告されているものとは異なっていた。HLA-DR51拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞はEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害した。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析:

今回、マイナー抗原同定の対象としたCTLクローン (2A12) は、非寛解期の急性骨髄性白血病に対してHLA一致同胞より移植を受けた患者の末梢血から樹立された。パネルLCL

を用いた検討から、CTL-2A12クローンのHLA拘束性はHLA-B*4403と判明したが、欧米人に多いHLA-B*4402も抗原を提示しうることが分かった。CTL-2A12クローンは患者のLCLは強く傷害したが、ドナーのLCLや患者の皮膚線維芽細胞は全く傷害しなかったため、造血系細胞特異的に発現する多型遺伝子を認識しているものと考えられた。

以上の結果から、CTL-2A12クローンが認識するマイナー抗原は造血系腫瘍の免疫療法の標的となる可能性があると考えられ、遺伝子の同定を進めることにした。ACC-1、-2マイナー抗原の同定に用いた従来の連鎖解析法では、遺伝子座を18q21まで絞り込むことが出来たが、抗原遺伝子の同定に至らなかった。そこで新たな連鎖解析法として、LCLを細胞傷害性試験の結果に基づいて抗原陽性群・陰性群に分け、各々の細胞より抽出したDNAをプールとして、18q21部位に設定されたマイクロサテライトマーカ（約100 kbおき）に特異的なプライマーにて増幅し、その産物のアレルイメージをGeneScanにて比較した。この結果、*SERPIN*遺伝子グループに属する3遺伝子が候補に挙げられたが、これらの遺伝子上のSNPの塩基型とCTL-2A12の感受性が完全に対応するのはなかった。

連鎖解析法で遺伝子の同定に至らなかったため、cDNAライブラリーを用いて発現クローニングを実施した。この結果、*Serpin*ドメインを持つEST (LOC284293) にホモロジーの高いcDNAを同定した。このESTは連鎖解析法で絞り込んだ3遺伝子間にpseudogeneとして登録されていた。しかし、発現クローニングで得られたcDNAはexon 2に相当する部分を欠損していた。この遺伝子のexon にはSNPが存在しなかったため、exon周辺のintronにあるSNP型と、そのSNP型を持つ細胞のCTL-2A12クローンによる傷害性を検討したところ、exon 2のsplice

donor siteに存在する (IVS2+5、rs9945924) が抗原性の有無に完全に相関した。更なる検討の結果、マイナー抗原が陽性になる場合のSNPの塩基型 (A) がmRNAの投げ縄構造の生成を阻害し、exon 2 skippingをもたらしていた。なお、この新規マイナー抗原Aichi Caner Center (ACC)-6はexon 3部分のframe shiftの起きた開始コドンより翻訳される53アミノ酸のポリペプチド上にコードされていた。

以上の結果をもとに、本遺伝子がマイナー抗原をコードしうる機能があることから、HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) より Histocompatibility (Minor) Serpin Domain containing, *HMSD*と命名された。

定量PCRを用いた*HMSD*の発現パターンの検討では、急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫で強い発現を認めた。また正常細胞では一部の活性化した造血系細胞にのみ発現を認めた。ACC-6に特異的なCTLクローンが抗原陽性の白血病幹細胞も傷害できるかを、免疫不全マウスを用いた白血病 repopulating assay にて検討した。まずACC-6抗原陽性・HLA-B44陽性の白血病細胞を、①ACC-6特異的CTL-2A12、②HLA-B44拘束性であるが特異性の異なるCTL-3B5と共培養し、翌日、免疫不全マウスの尾静脈から接種した。5週間後、抗ヒトCD45、CD34抗体でマウスの末梢血および骨髄を染色したところ、①のACC-6特異的CTL-2A12で共培養された白血病細胞は生着出来なかったのに対して、②では明かな生着を認めた。

最後に、定量PCR法で、移植後患者末梢血におけるACC-6特異的CTLクローン (CTL-2A12のCDR3配列特異的定量PCRによる) の推移を見たところ、移植後180日前後でCD3細胞中の0.8%まで上昇し、1年半でも0.2%ほど存在していた (川瀬孝和他、論文投稿中)。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反

応の解明とその細胞治療への応用:

1) HLA不適合な組み合わせにおけるHLA分子上のアミノ酸が異なる部位とその置換アミノ酸の組み合わせは以下のとおりである。HLA-A分子では31部位で52の組み合わせが見出された。HLA-B分子では31部位で65のアミノ酸の組み合わせが見出された。HLA-Cでは55部位で159の組み合わせが見出された。

2) 重症急性GVHDと有意な相関を示すHLA分子上の部位とアミノ酸の置換は以下のとおりである。HLA-Aでは9番のTyr-Pheの置換、あるいは116番のAsn-Aspの置換を有する症例においてが有意に重症急性GVHDの頻度が高かった。HLA-Cでは、9番のTyr-Serの置換、77番のAsn-Serの置換、80番のLys-Asnの置換、99番のTyr-Pheの置換、116番のLeu-Serの置換、156番のArg-Leuの置換を有する症例において有意に重症急性GVHDの頻度が高かった。HLA-B、HLA-DRB1、HLA-DQB1、HLA-DPB1では有意な部位とアミノ酸の置換は認められなかった。

3) HLA分子上の位置づけ

上記2)で示した9番、99番、116番はHLA分子上のbeta plate sheetに位置し、156番はalpha helixに位置していた。さらに、77番と80番はNK細胞受容体であるKIR2DLのリガンドであるHLA-Cの77番と80番に位置していた。

D. 考察

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答:

EBNA1は全てのEBV陽性がんが発現しているため、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⁺T細胞に効率良く提示されることが知られている。本

年度に特定したEBNA1エピトープを提示するHLAの日本人における保有率は、DR*0401が10%、DR51が20%、DP2が30%、DP5が60%、DQ6が20%であり、EBV陽性がんに対する免疫応答解析と治療応用に有用なものであると考えられる。EBNA1特異的CD4⁺T細胞がEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害したことから、EBNA1特異的CD4⁺T細胞はヘルパーのみならずエフェクターとして免疫療法に利用できる可能性が示された。今後、EBNA1特異的CD4⁺T細胞によるCTL補助活性化機構の検討をする予定である。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析：

HLA-B*4403（および-B*4402）よって提示される新規マイナー抗原ACC-6は、組織発現パターンが骨髄性白血病と多発性骨髄腫細胞、および一部の正常活性化造血細胞においてのみ高く、非造血系細胞における発現は低いことから、移植後の再発造血器腫瘍に対する免疫療法の標的として有望であると考えられる。また今回はHLA-B*4403拘束性のエピトープを同定したが、exon 2 skippingの結果として産生される、抗原陽性アリル特異的ポリペプチドは53アミノ酸長あり、この中に他のHLAで提示されうるエピトープを含んでいる可能性が高いため、現在新たなエピトープを検索中である。

なお今回、白血病repopulating assayとしてIL-2R γ ^{-/-} NOD/SCIDマウスを用いた。まだ予備的実験の段階ではあるが、通常のNOD/SCIDマウスのような移植前照射を行わなくても白血病細胞の生着を得られたことから、in vivoアッセイ系として今後有用と考えられる。

また、Goulmyらが報告したHA-1マイナー抗原エピトープと同じ配列をもつペプチドが日本人の約15%が有するHLA-A*0206によっても提示されうることも見出した。HLA-A24拘束性のCTLが認識するマイナー抗原（日本人の

約3割が抗原陽性）エピトープの同定も進みつつある。以上から、30%以上の日本人患者に対して、マイナー抗原を標的とした免疫療法を実施することが可能になってきた。テーラーメイドで各患者にふさわしいマイナー抗原を選択するには、さらに数種類の新規抗原の同定が必須であるが、現在、多数のCTLクローンの樹立も進行しつつあるので、今後比較的速やかに標的抗原数を増やしていくことが可能と思われる。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応の解明とその細胞治療への応用：

本研究で、多数例のほぼ均一なGVHD予防法を用いた症例を多変量解析したことにより、急性GVHDに関与するHLA分子上の部位とアミノ酸置換を同定することができた。これらの部位はT細胞受容体による抗原認識に重要なbeta plate sheetあるいはalpha helixに存在しており、T細胞によるこれらのアミノ酸置換の認識が急性GVHDの発症に密接な関連を有すると考えられた。一方、HLA-Cの77番と80番は、正にKIR 2 DLのHLA-C上のリガンドであり、前年度の本研究で報告したKIR2DLリガンド不適合症例に高率に急性GVHDが生じるという所見を裏付けるものである。また、本研究手法により急性GVHD発症に関与するアミノ酸置換とその部位の同定が可能であることを証明した点でも意義深い。

HLAクラスII抗原であるHLA-DRB1、-DQB1、-DPB1の解析で有意な部位が認められなかったことは、HLAクラスIIの不適合が関連した急性GVHDの機序がHLAクラスIの不適合を介したものと異なっている可能性が示唆された。

昨年度までの研究でHLA-C座の不適合で急性リンパ性白血病において移植後の再発のリスクが低いこと、HLA-DPB1座の不適合で慢性骨髄性白血病において移植後の再発リスクが

低いこと、KIR2DLリガンド不適合で急性リンパ性白血病において再発リスクが高いことを示したが、今年度研究に用いた手法を応用することにより、今後移植片対白血病効果（GVL）に関与するHLAの不適合部位とアミノ酸の置換を見出すべく症例数を増して検討したい。さらに、これらGVLやGVHDに関与する標的部位を見出すことにより、その増強効果あるいは抑制効果を発揮する免疫療法の開発につながるものと考えられた。

E. 結論

(a) 日本人の多くが保有するHLA-DR,DQ,DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立し、そのエピトープを特定した。EBNA1を標的抗原とする免疫療法の構築に向けて、CD8⁺T細胞とCD4⁺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) 骨髄性造血器腫瘍と多発性骨髄腫細胞を特異的に傷害するHLA-B*4403拘束性のCTLが認識する新規マイナー抗原（ACC-6）を同定し、その臨床への応用可能性が明らかとなった。また新規拘束性アリル（HLA-A*0206）の同定で、HA-1マイナー抗原不適合を利用できる日本人患者集団も従来のほぼ2倍となった。以上をもとに、今後、免疫療法の対象となる症例の蓄積と臨床試験の実施をはかりたい。

(c) HLA型不適合の組み合わせと急性GVHDとの関連を非血縁者間骨髄移植5210症例につき多変量解析法を用いて解析し、重症急性GVHDの発症に関与するHLA分子上の部位と置換アミノ酸を同定することができた。この知見は、GVHD発症の機序だけでなく、同種移植における移植片対腫瘍効果（GVT）の機序解明への道を開くものであり、これら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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Torikai H, Akatsuka Y (equal contribution), Miyauchi H, Terakura S, Onizuka M, Tsujimura K, Miyamura K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. The HLA-A*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1^H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A*0206. *Bone Marrow Transplant.* in press.
- 2) Ito Y, Demachi-Okamura, A, Ohta R, Akatsuka Y, Nishida K, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Full-length EBNA1-mRNA-transduced dendritic cells stimulate CTLs recognizing a novel HLA-Cw*0303 and Cw*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 3):770-80, 2007.
- 3) Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer.* 120:594-604, 2007.
- 4) Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Effects of HLA Allele and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Ligand Matching on Clinical

- Outcome in Leukemia Patients Undergoing Transplantation With T-cell-Replete Marrow From an Unrelated Donor. *Biol Blood Marrow Transplant*. 13(3):315-28, 2007.
- 5) Yamada K, Takahashi M, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kamiya Y, Sugiura H, Morishima Y. High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transfusion for adult and adolescent patients with small round cell sarcomas. *Bone Marrow Transplant*. Mar 5; [Epub ahead of print] 2007
 - 6) Mizuta S, Kohno A, Morishita Y, Atsuta Y, Sao H, Miyamura K, Sakamaki H, Ueda R, Morishima Y. Long-term Follow-up of 14 Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia following Autologous Bone Marrow Transplantation in First Complete Remission. *Int J Hematol*. 85(2):140-5, 2007.
 - 7) Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, Morishima Y, Kodera Y, Harada M; Japan Marrow Donor Program. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia virus-I-negative donors for adult T-cell leukemia/lymphoma: retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant*. 13(1):90-9, 2007.
 - 8) Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H. Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics*. 59(2):99-108, 2007.
 - 9) Inamoto Y, Nishida T, Suzuki R, Miyamura K, Sao H, Iida H, Naoe T, Maruyama F, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Iseki T, Kami M, Yano K, Takeyama H, Morishita Y, Morishima Y, Kodera Y. Significance of additional high-dose cytarabine in combination with cyclophosphamide plus total body irradiation regimen for allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 39(1):25-30, 2007.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, Tsujimura K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol*, 135(3): 413-414, 2006.
 - 13) Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H. Generation of peptide-specific CD8⁺T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4⁺T cells. *J Immunol Methods*, 314(1-2): 54-66, 2006.

- 14) Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Tsujimura A, Yatabe Y, Kawase T, Nakao Y, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A*3101 and -A*3303. *Br J Haematol*, 134(4): 406-416, 2006.
- 15) Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Nishida K, Akatsuka Y, Ito Y, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Takahashi T. Characterization of murine CD160⁺CD8⁺T lymphocytes. *Immunol Lett*, 106(1): 48-56, 2006.
- 16) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 43(6): 1284-1294, 2006.
- 17) Morishima Y, Ogura M, Yoneda S, Sakai H, Tobinai K, Nishiwaki Y, Minami H, Hotta T, Ezaki K, Ohe Y, Yokoyama A, Tsuboi M, Mori K, Watanabe K, Ohashi Y, Hirashima K, Saijo N; Japan Erythropoietin Study Group. Once-weekly epoetin-beta improves hemoglobin levels in cancer patients with chemotherapy-induced anemia: A randomized, double-blind, dose-finding study. *Jpn J Clin Oncol*. 36(10):655-61, 2006.
- 18) Asano N, Oshiro A, Matsuo K, Kagami Y, Ishida F, Suzuki R, Kinoshita T, Shimoyama Y, Tamaru J, Yoshino T, Kitamura K, Fukutani H, Morishima Y, Nakamura S. Prognostic significance of T-cell or cytotoxic molecules phenotype in classical Hodgkin's lymphoma: a clinicopathologic study. *J Clin Oncol*. 24(28):4626-33, 2006.
- 19) Hsu KC, Gooley T, Malkki M, Pinto-Agnello C, Dupont B, Bignon JD, Bornhauser M, Christiansen F, Gratwohl A, Morishima Y, Oudshoorn M, Ringden O, van Rood JJ, Petersdorf E; International Histocompatibility Working Group. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 12(8):828-36, 2006.
- 20) Suguro M, Tagawa H, Kagami Y, Okamoto M, Ohshima K, Shiku H, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Expression profiling analysis of the CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of a CD5 signature. *Cancer Sci*. 97(9):868-74, 2006.
- 21) Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, Kasugai Y, Karnan S, Kameoka J, Sasaki T, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 97(6):499-504, 2006.
- 22) Ogura M, Morishima Y, Kagami Y, Watanabe T, Itoh K, Igarashi T, Hotta T, Kinoshita T, Ohashi Y, Mori S, Terauchi T, Tobinai K. Randomized phase II study of concurrent and sequential rituximab and CHOP chemotherapy in untreated indolent B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 97(4):305-12, 2006.
- 23) 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*. 107(11): 4500-7, 2006.
- 24) 葛島清隆. 「EBV特異的CTLの臨床応用」最新医学別冊「新しい診断と治療の

- ABC」、印刷中、最新医学社
- 25) 葛島清隆. 「がんワクチンの免疫モニタリング」特集・がんワクチン、分子細胞治療 6巻2号 p15-21,2007、先端医学
 - 26) 鳥飼宏基、赤塚美樹. マイナー抗原を標的とした同種免疫反応とその臨床応用. *血液フロンティア* 17: 319-328, 2007.
 - 27) 赤塚美樹. 造血細胞移植におけるマイナー組織適合抗原の役割. *臨床血液* 47: 1353-1363, 2006.
 - 28) 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
 - 29) 葛島清隆. 「テトラマーアッセイ」分子細胞治療 5巻2号 p51-56,2006、先端医学社
2. 学会発表
- 1) 赤塚美樹. GVLの標的としての造血細胞特異的マイナー適合抗原：第29回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム. 福岡 2007年2月
 - 2) 赤塚美樹. Minor組織適合抗原を標的とした免疫療法：日本輸血学会東海支部会学術集会特別講演、名古屋 2007年1月
 - 3) Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, et al. Alternative Splicing due to an Intronic SNP defines a Novel HLA-B44-Restricted-Hematopoiesis-Restricted Minor Histocompatibility Antigen：第48回米国血液学会総会、Orland、フロリダ 2006年12月
 - 4) Morishima Y. et al. Identification of non-permissive HLA allele mismatch combinations and amino acid substitution responsible for acute graft-versus-host disease in unrelated allogeneic bone marrow transplantation. 48th annual meeting of American Society of Hematology. Dec. 2006. Orland. USA
 - 5) Akatsuka Y, Torikai H, Kawase T, et al. Immunotherapy of hematological malignancies targeting hematopoietic cell-specific minor histocompatibility antigens：第11回アジアパシフィック血液骨髄移植学会、名古屋 2006年11月（ワークショップ、招請）
 - 6) 岡村文子、伊藤嘉規、葛島清隆. EBNA1特異的CD4⁺T細胞の誘導とその機能解析：ワークショップ「ウイルス宿主防御の攻防」第54回日本ウイルス学会学術集会、名古屋 2006年11月
 - 7) 鳥飼宏基、赤塚美樹、鬼塚真仁ら. HA-1マイナー組織適合性抗原はHLA-A*0206によっても提示される：第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会、福岡 2006年10月
 - 8) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら. HLA-B*4403拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定と抗原性発現のメカニズム：第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会、福岡 2006年10月
 - 9) 赤塚美樹. マイナー抗原を標的とした移植後再発白血病に対する免疫療法の可能性：第68回日本血液学会総会・第48回日本臨床血液学会総会、シンポジウム. 福岡 2006年10月
 - 10) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら. HLA-B*4403拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定と抗原性発現の機序：第65回日本癌学会総会、横浜 2006年9月
 - 11) 渡辺一絵、鈴木進、田路真悟、葛島清隆、高橋利忠、赤塚美樹. 抗原特異的CTLの新たな単離方法：第65回日本癌学会総会、横浜 2006年9月
 - 12) 岡村文子、伊藤嘉規、葛島清隆. EBV陽性癌に対するT細胞免疫療法の基盤的研究、第3回EBウイルス研究会 名古屋 2006年6月
 - 13) 森島聡子、赤塚美樹、中西透ら. 子宮頸

癌患者の末梢血におけるHLA-A24拘束性H
PV-16 E6₄₉₋₅₇特異的CTLの誘導：第10回基
盤的癌免疫研究会総会、札幌 2006年7月

- 14) 葛島清隆、ウイルス特異的細胞傷害性T細胞を用いた免疫療法の基盤的研究、分野別シンポジウム2「小児血液・腫瘍難病に対する遺伝子治療・再生治療」：第109回日本小児科学会学術集会、金沢 2006年4月

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.
「LOC284293バリエーション遺伝子並びに該遺

伝子がコードするCD8⁺細胞傷害性Tリンパ
球mHAエピトープペプチド及びその用途」
番号；特願2006-152098.

- 2) 葛島清隆、岡村文子、伊藤嘉規、赤塚美樹、森島泰雄. 「エプスタイン-バー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18年10月27日、番号；
PCT/JP2006/321479.

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T細胞応答の研究

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)陽性がん局所には多数の細胞傷害性Tリンパ球(CTL)とCD4⁺T細胞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。がん特異的CTLの活性を増強するCD4⁺T細胞に関連して、今年度は以下の研究成果を得た。日本人の多くが保有するHLA-DR,DQ,DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立した。これらのT細胞が認識する新規のエピトープを同定した。EBNA1特異的CD4⁺T細胞がEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害したことから、EBNA1特異的CD4⁺T細胞はヘルパーのみならずエフェクターとして免疫療法に利用できる可能性が示された。

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)とCD4⁺T細胞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。

EBNA1蛋白は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。これまでに、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陽性のヘルパーT細胞を同時に活性化することが重要である。本年度は、EBNA1特異的CD4⁺T細胞が認識する新規のエピトープを同定し、これらの細胞の機能を明らかに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EBNA1特異的CD4⁺T細胞の誘導：

グリシン・アラニン反復部位を除くEBNA1蛋白のほぼ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⁺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⁺T細胞クローンを樹立した。

2) CD4⁺T細胞が認識するエピトープの同定：

EBNA1特異的CD4⁺T細胞の応答性はELISPOT法を用いて検討した。エピトープと推定される配列を含む、11ないし13アミノ酸から成るペプチドを合成し、コアとなる認識

領域を決定した。

3) エピトープを提示するHLAの同定：

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⁺T細胞の認識するclass-II分子を特定した。HLA-DRについては、血液ドナーの保有する個々のDRB1遺伝子をHLA-DRA*0101遺伝子と共に導入したHEK293T細胞に対する反応性から拘束分子を同定した。DQおよびDPについては、既知のHLAを保有するEBV陽性Bリンパ芽球株のパネルに対する反応性から拘束分子を決定した。

4) CD4⁺T細胞クローンの傷害活性の検討：EBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を標的としたクロミウム遊離試験にてCD4⁺T細胞クローンの傷害活性を判定した。

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

限界希釈法にて5個の異なるエピトープを認識するCD4⁺T細胞クローンを樹立した。そのうちの1個はHLA-DR*0401によって提示される新規エピトープであった。その他は、それぞれDR51、DP2、DP5、DQ6であった。この4個は既報告のエピトープ部位の近傍に位置していたが、拘束HLA分子は、報告されているものとは異なっていた。HLA-DR51拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞はEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害した。

D. 考察

EBNA1は全てのEBV陽性がんが発現しているため、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⁺T細胞に効率良く提示されることが知られている。本年度に特定したEBNA1エピトープを提示するHLAの日本人における保有率は、DR*0401が10%、DR51が20%、DP2が30%、DP5が60%、DQ6が20%であり、EBV陽性がんに対する免疫応答解析と治療応用に有用なものであると考えられる。EBNA1特異的CD4⁺T細胞がEBV陽性のNK/Tリンパ腫患者由来細胞株を直接傷害したことから、EBNA1特異的CD4⁺T細胞はヘルパーのみならずエフェクターとして免疫療法に利用できる可能性が示された。今後、EBNA1特異的CD4⁺T細胞によるCTL補助活性化機構の検討をする予定である。

E. 結論

日本人の多くが保有するHLA-DR,DQ,DPそれぞれに拘束性のEBNA1特異的CD4⁺T細胞クローンを樹立し、そのエピトープを特定した。EBNA1を標的抗原とする免疫療法の構築に向けて、CD8⁺T細胞とCD4⁺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. 論文発表

- 1) Ito Y, Demachi-Okamura, A, Ohta R, Akatsuka Y, Nishida K, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Full-length EBNA1-mRNA-transduced dendritic cells stimulate CTLs recognizing a

- novel HLA-Cw*0303 and Cw*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 3):770-80, 2007.
- 2) Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, Kondo E, Kiyono T, Torikai H, Nakanishi T, Ito Y, Tsujimura K, Iwata K, Ito K, Kodera Y, Morishima Y, Kuzushima K, Takahashi T. Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on the presentation of a cryptic epitope. *Int J Cancer.* 120:594-604, 2007.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, Tsujimura K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol*, 135(3): 413-414, 2006.
 - 6) Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H. Generation of peptide-specific CD8⁺T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4⁺T cells. *J Immunol Methods*, 314(1-2): 54-66, 2006.
 - 7) Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Tsujimura A, Yatabe Y, Kawase T, Nakao Y, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A*3101 and -A*3303. *Br J Haematol*, 134(4): 406-416, 2006.
 - 8) Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Nishida K, Akatsuka Y, Ito Y, Demachi-Okamura A, Kuzushima K, Takahashi T. Characterization of murine CD160⁺CD8⁺T lymphocytes. *Immunol Lett*, 106(1): 48-56, 2006.
 - 9) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 43(6): 1284-1294, 2006.
 - 10) 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 5巻2号 p51-56,2006、先端医学社
 - 8) 葛島清隆. 「がんワクチンの免疫モニタリング」特集・がんワクチン、分子細胞治療 6巻2号 p15-21,2007、先端医学社
 - 9) 葛島清隆. 「EBV特異的CTLの臨床応用」最新医学別冊「新しい診断と治療のABC」、印刷中、最新医学社
2. 学会発表
 - 1) 葛島清隆. ウイルス特異的細胞傷害性T細胞を用いた免疫療法の基盤的研究、分野

- 別シンポジウム2「小児血液・腫瘍難病
に対する遺伝子治療・再生治療」：第109
回日本小児科学会学術集会、金沢2006年
4月22日
- 2) 岡村文子、伊藤嘉規、葛島清隆、EBV陽
性癌に対するT細胞免疫療法の基盤的研
究、第3回EBウイルス研究会 名古屋
2006年6月
 - 3) 岡村文子、伊藤嘉規、葛島清隆、EBNA1
特異的CD4⁺T細胞の誘導とその機能解析
：ワークショップ「ウイルス宿主防御の
攻防」 第54回日本ウイルス学会学術集
会、名古屋 2006年11月
- 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。「LOC284293バリエーション遺伝子並び
に該遺伝子がコードするCD8⁺細胞傷害性
Tリンパ球mHAエピトープペプチド及び
その用途」番号；特願2006-152098.
 - 2) 葛島清隆、岡村文子、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18年10月27日、番
号；PCT/JP2006/321479.

マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用

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

難治性造血器腫瘍に対する根治療法として実施される同種造血幹細胞移植後には、移植片対白血病／リンパ腫（GVL）／腫瘍（GVT）効果が見られるが、その主要な標的抗原としてマイナー抗原が有望視されている。この多くは、ドナーと患者間に存在する遺伝子多型（SNP）によってアミノ酸置換が起こり、その部分がアロ抗原となって HLA に提示され、免疫反応を惹起するものである。今回我々は HLA-B44 拘束性の新規マイナー抗原（ACC-6）をコードする遺伝子、*HMSD* を発現クローニング法にて同定した。このマイナー抗原は、遺伝子の Exon 2 直後の splice donor site に存在する SNP により exon 2 skipping が起こり、結果として reading frame の異なった polypeptide が産生され、抗原性を持つようになったことが分かった。また以前報告したマイナー抗原（ACC-1, 2）をコードする *BCL2A1* 遺伝子内に新たな HLA-A24 拘束性マイナー抗原エペトープが存在することを示唆するデータを得た。この他、HLA-A*0201 拘束性の HA-1 が HLA-A*0206 でも提示されることを見いだした。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、アロ免疫反応を利用した強力な抗腫瘍免疫療法と考えられている。このアロ反応の標的となっているのは、ドナー・患者間の遺伝子多型（多くは一塩基多型である SNP）に由来するマイナー（組織適合）抗原と呼ばれるエペトープペプチドである。すでに欧米では HLA-A*0201 拘束性の HA-1 など、有望なマイナー抗原が報告され、臨床応用が進みつつある。しかし、A*0201 の陽性頻度は、欧米人では 50% 以上であるのに対し、日本人では 20% 未満と低く、HA-1 の応用性は高くない。そこで我々は日本人患者に対する臨床応用に向けて、日本人に多い HLA-A24（60%）や HLA-B44 など欧米人・日本人ともに比較的多く（20% 前後）にみられる HLA など提示されるマイナー抗原エペトープの検索を行い、これまでに計 5 種類のマイ

ナー抗原を同定した。しかし、マイナー抗原が免疫原性を発揮するには、ドナー・患者間において抗原が不適合となる組み合わせであることが必須であるため、テラーメード方式で多くの患者をカバーするには、今後さらに複数のマイナー抗原を同定する必要がある。

本年度は、以前同定した ACC-2 と同じ HLA-B44 拘束性ではあるが、異なる遺伝子にコードされる新規マイナー抗原（ACC-6）を同定したので、その詳細につき報告する。

B. 研究方法

移植後患者の末梢血から限界希釈法で得られた細胞傷害性 T 細胞（CTL）クローンの HLA 拘束性決定は、HLA 型タイプ済みのパネル B リンパ球細胞株（LCL）を用いて行った。CTL が認識するマイナー遺伝子の同定は、初めに連鎖解析法および DNA プールを用いたマ