

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。

(倫理面への配慮)

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

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(図 1 A)。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(図 1 B)、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ー(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ものはなかった。

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、Serp1n 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 (図 2)。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 (図 3)。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 Cancer 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 (図 4)。

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 (図 5)。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 (図 6)。

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、論文投稿中)。

#### D. 考察

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 $\gamma$ <sup>-/-</sup> 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。

最後に、結果は示さなかったが、我々は、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ている。また、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。

以上のことから、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。

#### E. 結論

骨髓性造血器腫瘍と多発性骨髓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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, et al. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A\*3101 and -A\*3303. *Br J Haematol.* **134**: 406-16, 2006.
- 2) Morishima S, Akatsuka Y, Nawa A, et al. 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) Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Nishida K, Akatsuka Y, et al. Characterization of murine CD160<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Immunol Lett.* **106**: 48-56, 2006.
- 4) Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, et al. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol.* **135**: 413-414, 2006.
- 5) Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, et al. Generation of peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol Methods.* **314**: 54-66, 2006.
- 6) Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, et al. 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**: 315-28, 2007.
- 7) Ito Y, Demachi-Okamura A, Ohta R, Akatsuka Y, et al. Full-length EBNA1 mRNA-transduced dendritic cells stimulate cytotoxic T lymphocytes recognizing a novel HLA-Cw\*0303- and -Cw\*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol.* **88**: 770-80, 2007.
- 8) Torikai H, Akatsuka Y (equal contribution), Miyauchi H, et al. The HLA-A\*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1<sup>H</sup> peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A\*0206. *Bone Marrow Transplant.* (in press)
- 9) 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.
- 10) 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.
2. 学会発表
- 1) 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 HPV-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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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)
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 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 バリエント遺伝子並びに該遺伝子がコードする CD8<sup>+</sup>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.

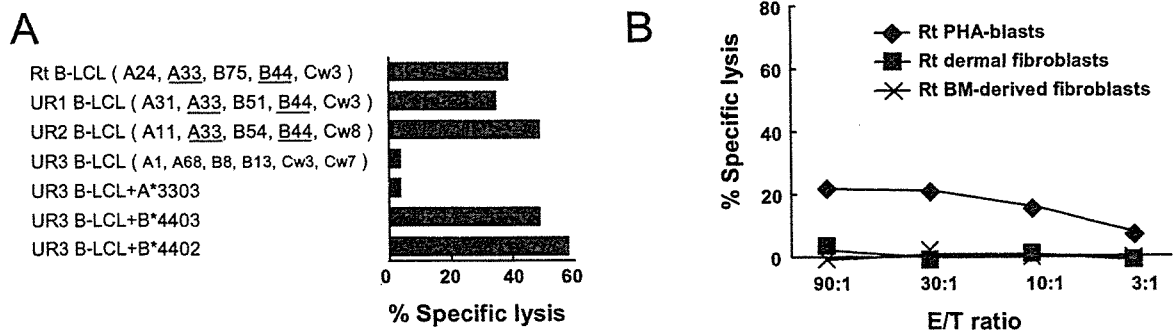


図1 細胞傷害性T細胞クローン (CTL) -2A12 のHLA 拘束性 (A)、および PHA 刺激T細胞芽球・非造血系細胞に対する細胞傷害性 (B)

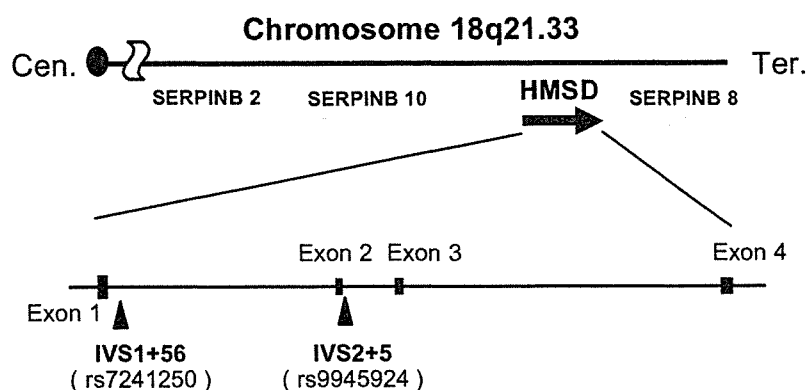


図2 発現クローニングで同定した cDNA クローンをコードする遺伝子 (LOC284293、後に HMSD と命名) と、他の SERPIN 遺伝子群との相互関係 (上段)、および Exon・Intron 構造、検索した SNP 部位の位置 (下段)。

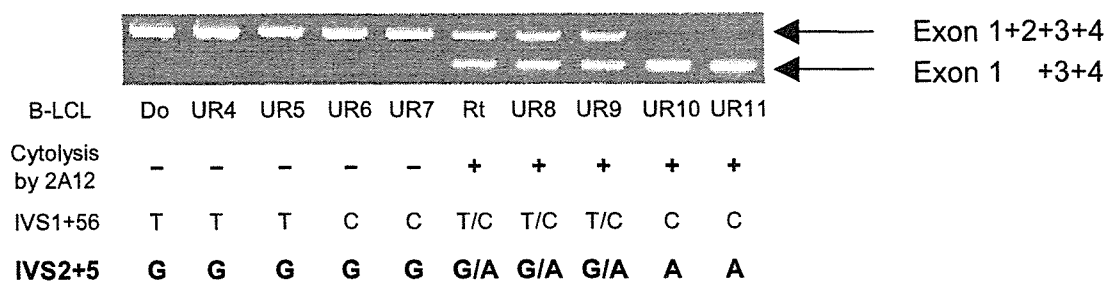


図3 さまざまな LCL の CTL-2A12 による細胞傷害性の有無と、図2で示された2箇所の SNP の塩基型の関係。最上段には Exon 1 と Exon 4 部分にアニールするプライマーで RT-PCR をおこなった際のバンドのパターンを示す。Exon 2 を skipping していると短いバンドを呈する。

### Minigene-1

```

TCTCCGACCCGGTCTCACTTCGCTCCTGGGCAGCTGCGCGGAGAA
      > Exon 3
CTGGG GCACTTTGTTTTAGTAAATCGGAGGTGAAGATGGAGATA
      M E I
TTCATCGAGGTTTTTCAGTCACTTCTTGTGCAATTAACAGAACTG
F I E V F S H F L L Q L T E L
ACACTGAAATATGTCTTAGAACTGCCAACGGCTCTTTGGAGAAA
T L N M C L E L P T G S L E K

      > Exon 4B
AGTCTTATGATTTCCTCACA GGTTTTACAGATTTCCTGGCAAAT
S L M I S S Q V L Q I P V A N
TCTACCAAGCAACGATAAAACAGCTAGACTTTGTGAATGATACAG
S T K Q R * M I Q
AGAAGTCCACAACACGTGTAAACTCCTGGGTGCTGATAAAACTA
R S P Q H V *
AAGGTGAAAATATATTGTTATCTATTTTCGATAATATTTTAAACA
GTTTTATAGTCAGTTCTTTACAAAACGTCAAATATAAAAAGGAG
TCCTTTTTCTCTAAACAACATGCAAAACATTAACCTTTCTTTT
      M Q T L K P F F
GGAAATATTGCCAACTCGTAGACCTTTTCTCTAGCTTTAGCTTTT
G N I A N S *
CCCTTATCAAGTATCTGTGATGTCTCTCTAGATGAAATAATCTCT
TCCAGGTTTTTTGCTTGTAATATTAGGTAGTTTTCTTTTCAC
AAATAGCGTTAAATTTGAATTTAAAAATTTCTAGCTGTCTCCCT
CACTGGTATTGCCATACTGTATGGTTTACAGGCTTGAATGCAAC
      M V Y R L E M Q
TGCTGTGATCAGTGATAAGGGAACACACTGATGATTTAGATTGAA
L L *
CAGGAGAGTTATATTGTTTTCTAGGGCACAGCTAAAAGACATT
CCATCAACCCCTTGCAGCCAGAAAGACCCTGAGCCCTCAGAAC
    
```

図4 同定された cDNA の Exon 1, 3, 4(一部) の塩基配列と、翻訳したアミノ酸配列。Exon 3 部位に同定されたエピトープを下線で示す。

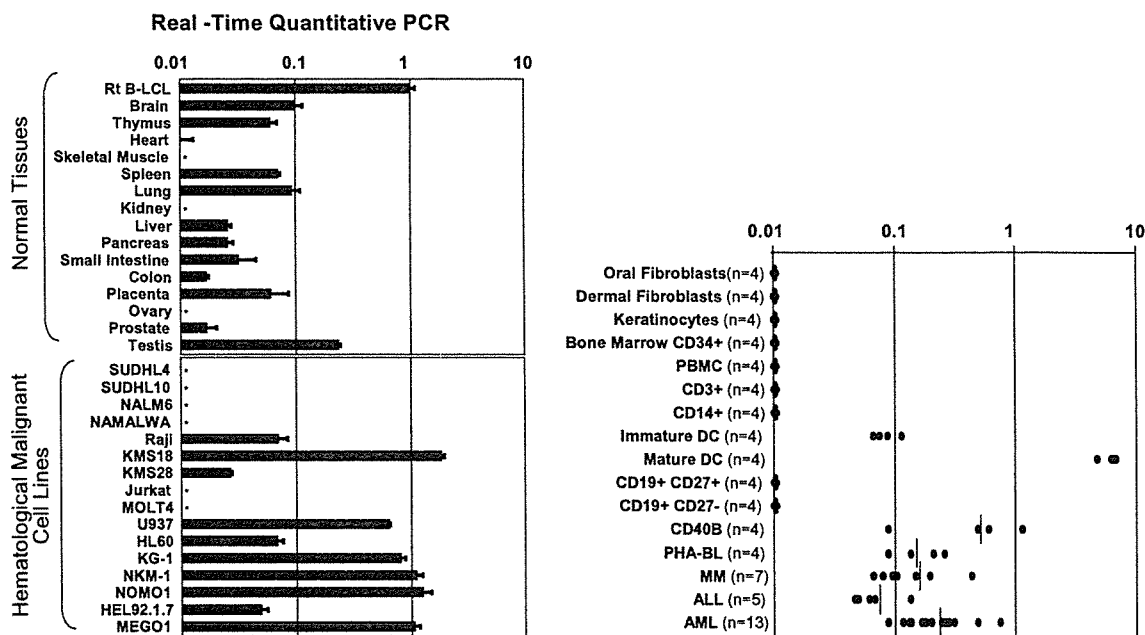


図5 定量 PCR による HMSD 遺伝子の発現量解析。正常組織および造血器腫瘍細胞株（左）、培養正常細胞と患者から得られた造血器腫瘍（右）。 MM、多発性骨髄腫；ALL、急性リンパ性白血病；AML、急性骨髄性白血病。

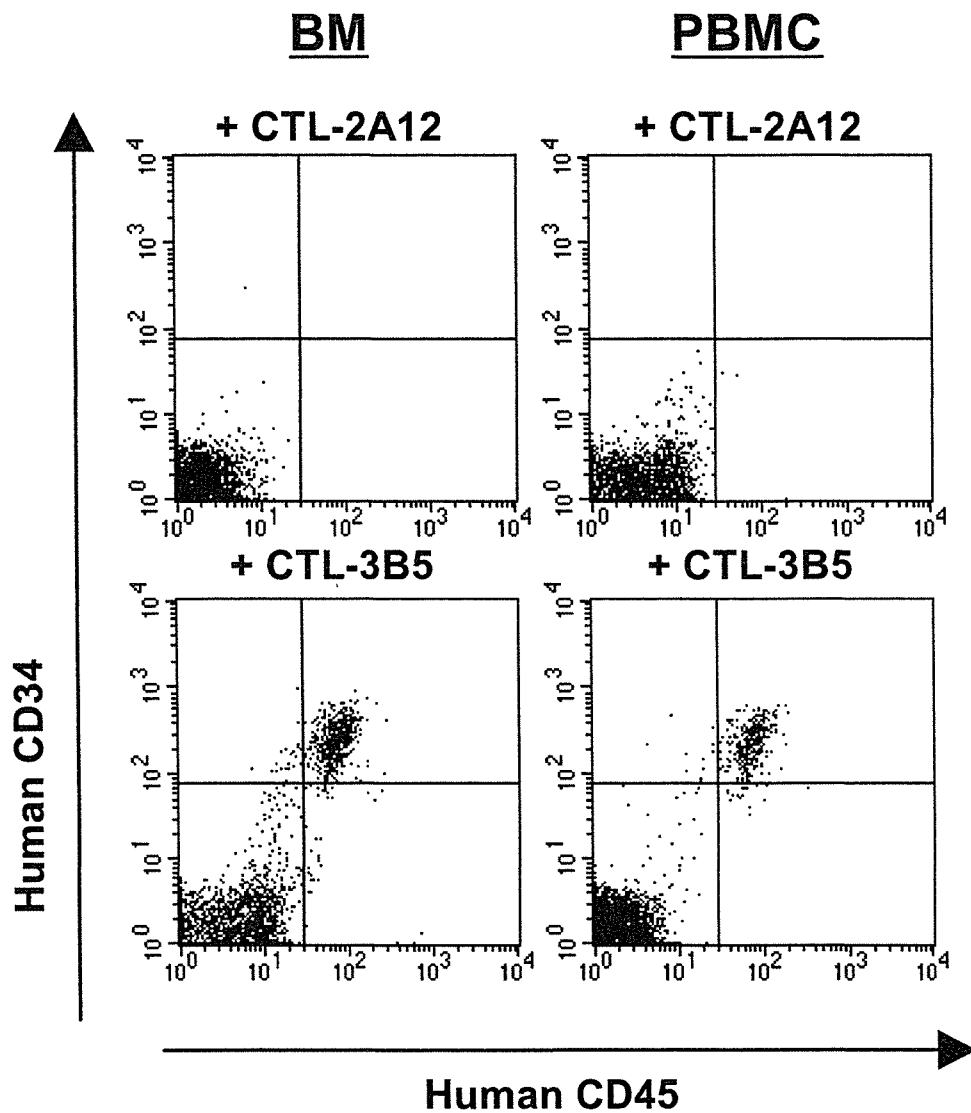


図6 白血病細胞 repopulating assay。HLA-B\*4403 陽性、ACC-6 マイナー抗原陽性、ACC-2 マイナー抗原陰性の急性骨髄性白血病 (M2) 細胞から CD34 分画を純化。これを ACC-6 特異的 CTL-2A12 (上段) または ACC-2 特異的 CTL-3B5 とともに一晩共培養し、NOG マウス (各群 3 匹) の尾静脈に静注した。5 週後、マウス骨髄 (左列) および末梢血 (右列) を採取し、抗ヒト CD45, CD34 抗体にて 2 重染色した。

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

分担研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター中央病院

研究要旨：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の発症に關与する 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。

A. 研究目的

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 に關与する 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

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。

C. 研究結果

(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：

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：

表2に示すように、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)で示した部位は、図1で示すように、9番、99番、116番がいずれも 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

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 KIR2DL 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が生じるといふ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

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. 論文発表

- 1: 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.* 2007 Mar;13(3):315-28.
- 2: 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.* 2007 Mar 5; [Epub ahead of print]
- 3: 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 cytotoxic T lymphocytes recognizing a novel HLA-Cw\*0303- and -Cw\*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells. *J Gen Virol.* 2007 Mar;88(Pt 3):770-80.
- 4: 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.* 2007 Feb;85(2):140-5.
- 5: 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.* 2007 Jan;13(1):90-9.
- 6: 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.* 2007 Feb;59(2):99-108.
- 7: 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.* 2007 Jan;39(1):25-30.
- 8: 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.* 2007 Feb 1;120(3):594-604.

- 9: 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*. 2006 Oct;36(10):655-61.
- 10: 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*. 2006 Nov;135(3):413-4.
- 11: 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*. 2006 Oct 1;24(28):4626-33.
- 12: 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 J J, 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*. 2006 Aug; 12(8):828-36.
- 13: 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*. 2006 Sep;97(9):868-74.
- 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*. 2006 Aug; 134(4):406-16.
- 15: 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*. 2006 Jun; 97(6):499-504.
- 16: 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*. 2006 Apr;97(4): 305-12.
- 17: 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*. 2006 Jun 1; 107(11):4500-7.
2. 学会発表  
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. 48<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology. Dec. 2006. Orland, USA

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 バリエント遺伝子並びに該遺伝子がコードする CD8<sup>+</sup>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.

表 1

position and amino acid substitution  
of HLA molecule in HLA allele mismatch combination

HLA-C mismatch position	beta-Plated Sheet								alfa Helix						TCR contact		
	9	24	85	97	98	113	114	116	66	73	77	80	83	156	163	66	163
*0102-+0103								ND	FY								
*0102-+0303	YF	AS	IL	RW	YC								LP	LT			LT
*0102-+0401	SF	AS		RW	FC				AT	NS	KN						
*0102-+0301	YF	AS		RW	YC							TE	LR				
*0303-+1502						HY	LY		NK		NS	KN		TL		NK	TL
*0304-+0401	SY		LI		FY		ND	FY		AT	NS	KN		RL	TL		TL
*0304-+0702	DY	SA	LI		SY		SY		AT			AE		TL			TL
*0304-+0901			LI				ND	FY				TE		TL			TL
*0304-+1402	SY		LI	WR	FY		SY							RL	TL		TL

Ser116C-Tyr116C

● Substituted position and amino acid in HLA allele mismatch

- HLA-A : 52 combinations in 31 positions
- HLA-B : 65 combinations in 31 positions
- HLA-C : 159 combinations in 55 positions

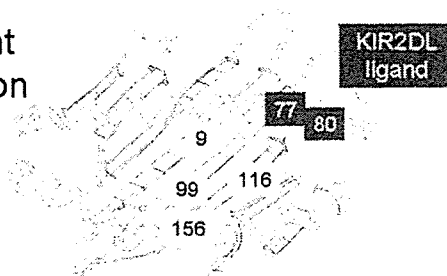
表 2 Significant position and kind of amino acid substitution  
of HLA molecule for severe acute GVHD.

Donor - Patient	HR (95% CI)	P
HLA-A	N	
Tyr9A-Phe9A	163 1.66 (1.19-2.32)	0.003
Asn116A- Asp116A	32 2.25 (1.26-4.01)	0.005*
HLA-C	N	
Tyr9C-Ser9C	146 1.66 (1.23-2.25)	0.001
Asn77C-Ser77C●	205 1.87 (1.46-2.39)	<0.001
Lys80C-Asn80C●	205 1.87 (1.46-2.39)	<0.001
Tyr99C-Phe99C	146 1.64 (1.21-2.22)	0.001
Leu116C-Ser116C	53 3.40 (2.20-5.25)	<0.001
Arg156C-Leu156C	251 1.48 (1.15-1.90)	0.002
HLA-B. -DRB1, -DQB1 -DPB1	No significant substitutions	

●Position of ligand for KIR2DL, and KIR2DL ligand mismatch combination

1

Position of significant amino acid substitution between donor and patient for severe acute GVHD



	beta-plate sheet			alpha helix
Position of HLA class I	9	99	116	156
Peptide-binding pocket	B C	A B D	F	D E
Amino acid substitution				
HLA-A	Tyr-Phe		Asn-Asp*	
HLA-C	Tyr-Ser	Tyr-Phe	Leu-Ser	Arg-Leu

n.s. by bootstrap resampling method

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>J. Gen. Virol.</i>	88(Pt 3)	770-80	2007.
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.	<i>Int J Cancer</i>	120	594-604	2007
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.	<i>Biol Blood Marrow Transplant.</i>	13(3)	315-28	2007
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.	<i>Int J Hematol.</i>	85(2)	140-5	2007
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.	<i>Biol Blood Marrow Transplant.</i>	13(1)	90-9	2007
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.	<i>Immunogenetics</i>	59(2)	99-108	2007
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.	<i>Bone Marrow Transplant.</i>	39(1)	25-30	2007



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.	<i>Eur. J. Immunol.</i>	36(3)	593-602	2006
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.	<i>J Virol</i>	80(2)	883-890	2006
Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, Tsujimura K, Morishima Y, Koderu Y, Kuzushima K, Takahashi T.	Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen.	<i>Br J Haematol</i>	135(3)	413-414	2006
Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, Tsujimura A, Yatabe Y, Kawase T, Nakao Y, Tsujimura K, Motoyoshi K, Morishima Y, Koderu 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.	<i>Br J Haematol</i>	134(4)	406-416	2006
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.	<i>Immunol Lett,</i>	106(1)	48-56	2006
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.	<i>Hepatology</i>	43(6)	1284-1294	2006
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.	<i>Jpn J Clin Oncol.</i>	36(10)	655-61	2006
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.	<i>J Clin Oncol.</i>	24(28)	4626-33	2006
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.	<i>Biol Blood Marrow Transplant.</i>	12(8)	828-36	2006
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.	<i>Cancer Sci.</i>	97(9)	868-74	2006

Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, Kasugai Y, Karnan S, Kameoka J, Sasaki T, <u>Morishima Y</u> , Nakamura S, Seto M.	Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma.	<i>Cancer Sci.</i>	97(6)	499-504	2006
Ogura M, <u>Morishima Y</u> , 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.	<i>Cancer Sci.</i>	97(4)	305-12	2006
Oshiro A, Tagawa H, Ohshima K, Karube K, Uike N, Tashiro Y, Utsunomiya A, Masuda M, Takasu N, Nakamura S, <u>Morishima Y</u> , Seto M.	Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma.	<i>Blood.</i>	107(11)	4500-7.	2006

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## Full-length EBNA1 mRNA-transduced dendritic cells stimulate cytotoxic T lymphocytes recognizing a novel HLA-Cw\*0303- and -Cw\*0304-restricted epitope on EBNA1-expressing cells

Yoshinori Ito,<sup>1</sup> Ayako Demachi-Okamura,<sup>1</sup> Rieko Ohta,<sup>1</sup> Yoshiki Akatsuka,<sup>1</sup> Keiko Nishida,<sup>1</sup> Kunio Tsujimura,<sup>1</sup> Yasuo Morishima,<sup>2</sup> Toshitada Takahashi<sup>1</sup> and Kiyotaka Kuzushima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Immunology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan

<sup>2</sup>Department of Cell Therapy, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan

### Correspondence

Kiyotaka Kuzushima  
kkuzushi@aichi-cc.jp

Epstein–Barr virus (EBV)-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1) is an attractive target for immunotherapy against EBV-associated malignancies because it is expressed in all EBV-positive cells. Although CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitope presentation is largely prevented by its glycine–alanine-repeat domain (GAR), the use of mRNA-transduced dendritic cells (DCs) would offer the advantage of priming EBNA1-specific CTLs. After stimulation with GAR-containing EBNA1-transduced monocyte-derived DCs, two EBNA1-specific CTL clones, B5 and C6, were isolated successfully from a healthy donor. These CTLs recognize peptides in the context of HLA-B\*3501 and HLA-Cw\*0303, respectively. A novel epitope, FVYGGSKTSL, was then identified, presented by both HLA-Cw\*0303 and -Cw\*0304, which are expressed by >35% of Japanese, >20% of Northern Han Chinese and >25% of Caucasians. The mixed lymphocyte–peptide culture method revealed that FVYGGSKTSL-specific CTL-precursor frequencies in HLA-Cw\*0303- or -Cw\*0304-positive donors were between  $1 \times 10^{-5}$  and  $1 \times 10^{-4}$  CD8<sup>+</sup> T cells. Moreover, both CTL clones inhibited growth of HLA-matched EBV-transformed B lymphocytes *in vitro*, and B5 CTLs produced a gamma interferon response to EBNA1-expressing gastric carcinoma cells in the context of HLA-Cw\*0303. These data demonstrate that EBNA1 mRNA-transduced DCs may be useful tools for inducing EBNA1-specific CTLs that might be of clinical interest for CTL therapy of EBV-associated malignancies.

Received 31 August 2006

Accepted 7 November 2006

## INTRODUCTION

Epstein–Barr virus (EBV), a human gammaherpesvirus that establishes lifelong latency in memory B cells (Babcock *et al.*, 2000), is associated with several different lymphoid and epithelial malignancies, including Burkitt's lymphoma (BL), nasopharyngeal carcinoma (NPC), Hodgkin's disease (HD) and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). All EBV-positive malignant cells exhibit one of three latency types, distinguished from each other by the pattern of expressed EBV antigens. In latency type I, only EBV-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1) is expressed, as in BL; latent membrane protein 1 (LMP1) and LMP2, as well as EBNA1, are expressed in latency type II, as in HD and NPC. In latency type III, highly immunogenic EBNA3 genes, EBNA3A, EBNA3B and EBNA3C, are expressed together with other EBV latent antigens, as in PTLD (Rickinson & Kieff, 2001).

EBNA1 is required for the maintenance and replication of the viral episome in EBV-transformed cells (Kieff &

Rickinson, 2001). Because it is expressed in all EBV-associated tumours, EBNA1 is an attractive target for immunotherapy. However, CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses are directed preferentially toward EBNA3s among latent-cycle proteins, and EBNA1 has been believed to be immunologically invisible because of studies indicating that there has been escape from recognition by CTLs (Callan *et al.*, 1998; Khanna *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 1992; Steven *et al.*, 1996). A glycine–alanine-repeat domain (GAR) within EBNA1 was found to prevent antigen processing for CTL recognition (Levitskaya *et al.*, 1995). Presence of this GAR was shown to prevent processing by the proteasome, the main catalytic machinery for generation of major histocompatibility complex (MHC) class I epitopes (Blake *et al.*, 1997; Levitskaya *et al.*, 1997). Moreover, the same domain was established to prevent EBNA1 mRNA translation (Yin *et al.*, 2003).

To explore the possibility of targeting EBNA1, EBV-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses have been examined and