

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16－18年度 総合研究報告書

主任研究者 葛島 清隆

平成19（2007）年4月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	22
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 .....	28
------------------------	----

# I. 総合研究報告書

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）  
総合研究報告書

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。平成16年度から18年度に得られた研究成果として、(a) Epstein-Barr virus(EBV)陽性がんに対するT細胞応答の研究、(b) Human papillomavirus (HPV)陽性がんに対するCTL応答の研究、(c) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、ならびに(d) 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<sup>+</sup>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。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。また、本研究者らが同定したHLA-A24拘束性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PA28α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。さらに、CTLの活性を増強するCD4<sup>+</sup>T細胞に関連して、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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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) 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。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-γ)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-γ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) 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。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*遺伝子上にコードされるマイナー抗原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。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。

(d) 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。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、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、とくに慢性骨髄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。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。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。

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)。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。

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。EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>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) 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) 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。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。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した。

(d) 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および重症GVHDとの関連を解析することにより、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、および重症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した。

## B. 研究方法

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答:

### 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を組み込み、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) 合成ペプチドによるCTLおよびCD4<sup>+</sup>T細胞の誘導

EBV既感染成人末梢血CD8<sup>+</sup>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細胞クローンを樹立した。

### 3) CD4<sup>+</sup>T細胞が認識するエピトープの同定

EBNA1特異的CD4<sup>+</sup>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。

### 4) 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<sup>+</sup>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。

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

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T/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。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。

#### 6) CTLエピトープの同定とテトラマーの作製

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-テトラマーを定法に従って合成した。

#### 7) 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クローンを用いたELISPOT法にて検討した。

#### 8) 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LCL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クローンを反応細胞とする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細胞にて3回刺激しCTLを誘導後、限界希釈法にてクローンを樹立した。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) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析:

##### 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*CTSH*遺伝子の各種組織での発現はTaqMan PCR法を用いて行った。

##### 3) 第18番染色体に存在するマイナー抗原の同定

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。

(d) 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：

平成16年度の研究では、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+メトトレキセ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。

平成17年度の研究では、日本骨髄バンクで実施された白血病症例でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイピング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、KIR2DL2/3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。

平成18年度の研究では、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。

### 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。

##### 3) HLA-A\*2402拘束性LMP2A特異的CTLが認識するエピトープ(IYVLVMLVL)の生成と提示に関与する分子の同定

遺伝子導入実験において、免疫型プロテアソームのβサブユニットであるip-LMP7と活性

化補助分子PA28α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。

#### 4) 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細胞クローンを複数樹立した。

限界希釈法にて5個の異なるエピトープを認識するCD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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) 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-γ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った。

### 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<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。

#### (c) 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様なDefective Ribosomal Products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、肺胞上皮や脾臓にも発現していることが判明した。

### 3) 第18番染色体に存在するマイナー抗原の同定

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、その産物のアリルイメージをGeneScanにて比較した。この結果、SERPIN遺伝子グループに属する3遺伝子が候補に挙がったが、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、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 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。

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。

(d) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応に關与する要因の解析：

平成16年度の研究結果；

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セート併用（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。

平成17年度の研究結果；

- 1) HLA-C不適合症例では白血病再発率が低下した。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) 慢性骨髄性白血病（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。

平成18年度の研究結果；

- 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)で示した部位は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

### (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。本研究で初めて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。また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。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。

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知られている。本研究で特定した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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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) 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のが、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する予定である。

(c) 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、今後、造血管腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討する。

HLA-B\*4403拘束性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、抗原陽性アレ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。

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。さらに、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。

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。

(d) 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。

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ったことは、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、AMLではHLAやKIRの影響がほとんど認められなかったことは、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ることが推測される。

平成18年度の研究で、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KIR 2 DL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。

平成18年度の研究に用いた手法を応用することにより、今後は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) 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。

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。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。

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<sup>+</sup>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<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) *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。

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推進する。

(d) 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。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た。さらに平成18年度は、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GVTの機序解明への道を開くものである。本研究で得られた成果は同種移植におけ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) 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<sup>H</sup> 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, 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.
- 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.* [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<sup>+</sup>T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4<sup>+</sup>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<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>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) 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.
  - 25) 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.
  - 26) 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.
  - 27) 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.
  - 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Kimura, H., Hoshino, Y., Hara, S., Sugaya, N., Kawada, J., Shibata, Y., Kojima, S., Nagasaka, T., Kuzushima, K., Morishita, 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.