

200720041A

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

特異的細胞性免疫の活性化による
新規がん治療の開発研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 葛島 清隆

平成20（2008）年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 特異的細胞性免疫の活性化による新規がん治療の開発研究…………… 1
主任研究者 葛島清隆

II. 分担研究報告

1. Epstein-Barr virus 陽性がんに対する CTL 応答の研究 …………… 13
葛島清隆 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
2. マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用 …………… 19
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の解明と
その細胞治療への応用 …………… 28
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 …………… 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 35

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

特異的細胞性免疫の活性化による新規がん治療の開発研究

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。EBV核抗原のEBNA1がEBV陽性のリンパ腫細胞株において、オートファジー経路により抗原提示されている研究成果を得た。class II 経路へ抗原誘導を促すと報告されている遺伝子産物の中で、EBNA1蛋白N-末端にheat shock protein gp96のleader sequenceを融合し、EBNA1蛋白C-末端にLAMP-1のtransmembrane domainを融合した構造物が、最も効率よくCD4⁺T細胞エピトープを提示できることを明らかにした。

(b) 現在でもハイリスク造血器腫瘍の予後は、同種移植を行ってもいぜんとして不良である。移植後の同種免疫反応を強化すると、移植片対白血病／リンパ腫（GVL）効果が期待できる反面、致死的な移植片対宿主病（GVHD）をしばしば併発するため、選択的にGVL効果を高める抗原特異的免疫療法の開発が必要である。我々は本年度HLA-A24分子によって提示される、GVL効果誘導に有用な新規マイナー抗原（ACC-1C）をBCL2A1蛋白質の多型部位に同定した。ここは過去に我々が同定したACC-1Yマイナー抗原をコードするBCL2A1と偶然にも同一部位であるが、抗原多型部位のTyrosineがCysteineに置き換わったものであった。今回の遺伝子同定は、全く新規に開発した免疫学的解析と全ゲノムSNP解析を融合した新手法で行った。今回のマイナー抗原の同定により、選択的GVL効果を誘導できるマイナー抗原数は5つとなり、日本人の4割の患者をカバーできるまでになった。さらに本法を改良した、Publicなリソースを用いた簡便で迅速なマイナー抗原同定方法もほぼ開発を終了しつつある。また、マイナー抗原を標的としたペプチドワクチン療法の開発にむけて、臨床試験の適応となりうる症例を9例までリクルートしており、近日中に投与開始の予定である。

(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-C, DPB1座の不適合が白血病の移植後の再発の頻度を低めることが判明している。今年度は、HLA型不適合の組み合わせと再発との関連を4643症例につき多変量解析法を用いて解析し、白血病の移植後のGVLに関与するドナーと患者間の不適合な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、同種移植におけるGVL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

原特異的CD4⁺T細胞を同時に活性化することが可能になる。本年度は、class II 経路へ抗原誘導促すと報告されている遺伝子産物の中でどれが最も効率が良いものかを特定することを目的とした。

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。

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蛋白はオートファジー経路によって代謝されていることが知られているが、class II 抗原提示にもこの経路が関わっているか、RNAi法を用いて検討した。

遺伝子導入した抗原提示細胞は、通常HLA class I 経路によってCTLへ抗原を提示する。導入遺伝子産物をclass I 経路のみならず、HLA class II 経路にも誘導できれば、CTLと抗

(b) 同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対して確立された治療であるが、難治性造血器腫瘍では移植後再発が20~50%と高率であるため、まだその成績は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白血病・リンパ腫（GVL）効果が期待できるが、多かれ少なかれ移植片対宿主病（GVHD）も併発し、移植成績を下げる原因となっている。GVL効果の主要な標的はアロ抗原であるマイナー抗原と、WT1などの腫瘍関連抗原である。特に前者はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白質断片（ペプチド）が患者のHLA分子に提示されて非自己抗原物質となったもので、過剰発現した自己抗原である腫瘍抗原より抗原性が強く免疫寛容にもなりにくいという特長をもつ。これらのマイナー抗原のうち、腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する蛋白質（すなわち分化抗原）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選択的免疫療法の標的抗原として有用である。

マイナー抗原はドナー、患者間の遺伝子多

型の差に由来するため、移植ペア毎に適応となるマイナー抗原が異なる。しかし、遺伝子タイピングにより移植前（あるいは移植後でも）に不適合の有無が分かることから、各症例にふさわしいマイナー抗原を選択するという、テーラーメイド治療が可能となり、移植後再発腫瘍に対し、適切に対応できると期待される。この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、過去にクローニングしたHLA-A24拘束性のCTLが認識する新規マイナー抗原を、免疫学的手法と全ゲノム解析法を組み合わせた新手法を開発することで同定に成功したことを中心に報告する。

(c) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1遺伝子型適合度と臨床成績、とくに白血病再発との関連(GVL効果)を解析することにより、HLA型適合度に基づいたドナー選択の基礎データを作り、移植成績の向上に資することを目的とする。

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) レトロウイルスを用いたRNAi法によるautophagy関連蛋白のノックダウン:

オートファゴゾームの主要な構成蛋白であるatg-5とatg-8について、発現を抑制するshort hairpin RNAを組込んだレトロウイルスを作製

し、EBV陽性のリンパ腫細胞株に感染させた。各細胞の蛋白の発現はウエスタン法にて検討した。

3) EBNA1抗原をclass-IIに効率よくtargetingする構造の特定:

Lysosome-associated membrane protein (LAMP)-1, heat shock protein gp96, HLA class II-associated invariant chainあるいはautophagy-related protein light chain 3と、EBNA1との融合蛋白を発現するplasmidをそれぞれ作製した。各plasmidからin vitro transcription法にてmRNAを作製し、自己のCD40活性化B細胞に電気穿孔法にて導入し抗原提示細胞とし、EBNA1特異的HLA-DQ6拘束性CD4⁺T細胞クローンを反応細胞としたELISPOT法を行った。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析:

1) 新規マイナー抗原の同定:

HLA-A24拘束性の1B9-CTLは急性骨髄性白血病に対しHLA一致同胞から移植を受けた患者末梢血より限界希釈法にてクローニングした。また、健康人末梢血から樹立したEBV不死化細胞株（B-LCL）に必要に応じて拘束性HLA-A24遺伝子を導入し、細胞パネルを作成した。細胞傷害性試験により1B9-CTLによる各B-LCLの傷害の有無を決定した。1B9-CTLにより傷害された、傷害されないB-LCLがそれぞれ40～50検体収集出来たところで、各B-LCLよりゲノムDNAを抽出し定量後、一定量ずつをまとめて行き、抗原陽性群および陰性群の2プールを作成した。このプールDNAを制限酵素で消化した後、Affymetrix社の100Kと500KのSNPアレイでSNPタイピングを行い、2群間でSNPのゲノタイプ分布に有意に偏りがある部分を統計学的に同定した（東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科・小川誠司博士との共同研究）。ついで、候補に挙げられた領域に存在する遺伝子上のSNP付近のアミノ酸配列につき1B9-CTLのエピトープとなる部分を決定し

た。

2) ペプチドワクチンのマウスモデルの検討：

2006年に英国のグループから、HLA-A2トランスジェニックマウスを用いた、HA-1・HA-2マイナー抗原エピトープ発現ベクターによるDNAワクチンモデルが報告されている。本年度はA2トランスジェニックマウスを入手出来たため、我々がワクチンの臨床試験で行う予定であるペプチドのうち、HA-1で実際にCTLが誘導できるかを検討した。マウスにHA-1^HペプチドをMontanide ISA51VGとともに反復皮下投与し、脾細胞を*in vitro*で刺激後、interferon- γ の産生と細胞傷害活性を測定した。

3) ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24拘束性ACC-1^Y、HLA-B44拘束性ACC-2^D、HLA-A*0201/A*0206拘束性HA-1^HのペプチドがGMPグレードで準備済みであるため、これらのHLAを有する患者について、マイナー抗原タイピングをHLA研究所（京都）で行い、ワクチン療法の対象症例をリクルートし、適応例に臨床試験を行う体制を取っている。

(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：

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイピングがされ非血縁者間骨髄移植を実施された白血病4643症例を対象にした。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。

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症例の再発リスク(OR)をHLA型適合な症例と比較した。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0.05以下の組み合わせと有意とし、さらに Bootstrap resampling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：

オートファゴゾームの主要な構成蛋白であるatg-5とatg-8を、レトロウイルスを用いたRNAi法にてノックダウンしたところ、EBNA1特異的CD4⁺T細胞へのエピトープ提示が減少した。EBNA1蛋白N-末端にheat shock protein gp96のleader sequenceを融合し、EBNA1蛋白C-末端にLAMP-1のtransmembrane domainを融合した構造物が、最も効率よくCD4⁺T細胞エピトープを提示できることを明らかにした。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析：

1) HLA-A24拘束性新規マイナー抗原の同定：

HLA-A24拘束性のCTLクローンは造血系細胞（B-LCL、PHA芽球、AML細胞）を強く傷害し、非造血組織である皮膚の線維芽細胞に対する傷害は認められなかった。マイナー抗

原遺伝子の同定を、CEPH家系を用いた連鎖解析法と、cDNA発現クローニング法で試みたが、同定には至らなかったため、「B.方法」に記載したごとく、まずDNAプール（テストプール：陽性57例、陰性38例；確認用プール：陽性75、陰性34）を作成し、全ゲノムSNP解析を実施した。この結果2つのプールとも、染色体15q25.1領域に1つだけ強い相関を示すSNP（rs1879894）が認められ、これはわずか26kbというlinkage disequilibrium（LD）領域に存在していた。このLDに存在する既知の遺伝子は*BCL2A1*のExon 1のみであった。

次いで*BCL2A1*の全長cDNAを患者およびドナーB-LCLから発現プラスミドにクローン化し、HLA-A24導入293T細胞に導入したところ、患者型cDNAのみ1B9-CTLからのIFN- γ の放出を促したため、*BCL2A1*をマイナー抗原遺伝子として確定した。本遺伝子上のアミノ酸のうち、SNPを含み、かつHLA-A24結合性モチーフをもつものは、我々が2003年に同定したACC-1^Yエピトープ部位のみであった。そこで今回の患者型Cysteine（C）を含むペプチドを合成し、Y型のペプチドと共に1B9-CTLを用いた細胞傷害性試験を施行した。その結果、C型のDYLQCVLQIをパルスした細胞のみが傷害を受けた。さらにCysteineが酸化されCystineになっている可能性もあったため、DYLQCVLQIとDYLQCVLQIをタイトレーションしたところ、DYLQCVLQIの方がより強く1B9-CTLにされたため、Cysteineをもつ方のエピトープを1B9-CTLのマイナー抗原エピトープ（ACC-1^Cと命名）と決定した。

さらに1B9-CTLと同じT細胞受容体 β 鎖のCD3配列をもつT細胞の患者末梢血中での動態を、定量PCR法にて検討した。CTLは移植後半年をピーク（末梢血CD3陽性細胞の1%）に上昇し、以後漸減した。この症例は移植後微少残存白血病を認めなかったため、GVL効果との関連

は不明であるが、少なくともこの患者が併発した慢性GVHDの病勢とは相関しなかった。

2) ペプチドワクチンのマウスモデル：

A2-トランスジェニックマウスの腹部の皮下に50 μ gのHA-1^Hペプチドと不完全フロイントアジュバントであるMontanide ISA51VGを2回接種（1週間おき）後、脾細胞を分離し、10 μ MのHA-1^Hペプチドでさらに3回 *in vitro*で刺激した。得られたT細胞株を、cognate HA-1^Hペプチド、反対アリのHA-1^Rペプチド、陽性コントロールとしてPMAとイオノマイシンで刺激してinterferon- γ の放出をintracellular cytokine staining法で検討したところ、HA-1^Rに比較しHA-1^Hペプチドで刺激した場合にinterferon- γ 産生細胞が多く認められた。また、HLA-A2の α 3ドメインをH2-D^bで置換したMHCをB6由来のEL4細胞に導入し、これにHA-1^RペプチドないしはHA-1^Hペプチドを種々の濃度で添加し、T細胞株による細胞傷害性を検討した。抗原特異細胞が5%前後のT細胞株を用いたためか、高いペプチド濃度を要したものの、T細胞株はHA-1^Hペプチドを添加した標的細胞のみを特異的に傷害した。

3) ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24拘束性ACC-1^Y、HLA-B44拘束性ACC-2^D、HLA-A*0201/A*0206拘束性HA-1^HペプチドはGMPグレードで合成された後、当センターの細胞調製施設にて無菌的に溶解・分注後、-30 $^{\circ}$ Cで凍結保存された。

本臨床試験に適応のある患者の検索は、研究協力に同意した施設にてHLA-A2、A24、B44のいずれかをもつ症例が同種移植を受けた際に、マイナー抗原の遺伝子型もタイピングすることで行った。集計の結果、平成20年1月末の段階で48例がタイピング検査を受け、うち36例がそのドナーとペアで結果判定が可能であった。この中で9例（25%）が3種類のマイナー抗原のうち、少なくとも1つについ

てGVL方向の不適合を有していた。3例が移植後再発を経験しており、うち1例は合併症のため適応外、2例は化学療法単独で再寛解に至ったため、ワクチン接種には至っていない。しかし、平成19年10月より、当センターのヒトゲノム・遺伝子倫理審査委員会で移植後30%以上の再発ハイリスク例では再発予防投与実施も認められたため、今後、本人の意思の確認後に予防投与を行うか、慎重に決定する予定である。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応
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) GVL効果が生じるHLA分子上の部位とそのアミノ酸：

HLA-Cにおいて9番、99番、156番のアミノ酸の置換により有意に再発は低下していた。なお、9番と99番のデータはほぼ一致しており、このどちらかが関与していることになる。156番のLeu(ドナー)とArg(患者)の組み合わせは重症GVHDを生じる組み合わせとは異なっていた。HLA-A, B, DRB1, DQB1, DPB1ではHLA-Cに見られたような部位を同定することはできなかった。

D. 考察

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答：

EBNA1は全てのEBV陽性がんに発現しているため、免疫療法の標的抗原とした場合に対象を拡げることができる。内在するグリシン・アラニン反復配列により、従来CTLの標的になりにくいとされてきたが、近年の研究では一部のCTLエピトープは提示されることが

明らかとなった。EBNA1はautophagyといわれる細胞内蛋白処理機構により、CD4⁺T細胞に効率良く提示されることが知られていたが、今回、EBV陽性のリンパ腫細胞株においてもその抗原提示機構が確認された。抗癌剤ラパマイシンはオートファジーを誘導することが知られている。今回の知見はラパマイシンがclass II抗原提示を増強する可能性を示す。今後は免疫療法との併用効果を検討する。さらに、今回特定したclass-II targeting構造を用いて、今後、CTLとCD4⁺T細胞を同時に誘導する系の確立を試みる。また、本構造は他の腫瘍抗原特異的CD4⁺T細胞の誘導、解析にも応用可能であると考えられるため、検討を進める。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析：

今回同定したACC-1^Cマイナー抗原は、日本人の65%が有するHLA-A24拘束性であり、ACC-1^C陰性：陽性者が8：2であることを考慮すると、ACC-1^CのGVL方向不適合は11%の確率で発生することとなる。本ACC-1^C抗原は、以前我々が同定したACC-1^Yマイナー抗原の抗原性を決定づけるSNPの対側アリルにコードされるものであり、HB-1マイナー抗原のように、両方向性に抗原性を持つことが本研究で明らかにされた。ACC-1^Yの対側アリルであるため、ACC-1^Cの臨床における利用可能性も同等となり、結果としてACC-1マイナー抗原は22%の日本人患者において臨床応用が可能と推定される。従って、今回の発見は日本人患者におけるマイナー抗原を標的とした免疫療法の臨床試験遂行に貢献すると考える。また、今回開発したマイナー抗原同定法は免疫領域とゲノム解析領域の最先端技術の融合により完成したもので、異分野の協調の重要性を示唆するものである。

BCL2A1は抗アポトーシス機能を有した蛋白質であり、腫瘍が抗癌剤や放射線、細胞傷害性のサイトカインにさらされた場合に誘導さ

れることが知られている。従って、BCL2A1由来のエピトープは、GVL効果誘導においてきわめて有用な標的抗原である。

今回の全ゲノム解析法は100以上のB-LCLを細胞傷害性試験で選別後、それぞれの細胞よりDNAを抽出・定量し、均等にDNAプールを作ったうえ、そのDNAプールをSNPアレイで解析する操作も必要であった。このDNAのプール化、SNPアレイでのタイピングを行わずに済めば、時間の節約と、SNPアレイ解析といった特殊な技術・機器を必要とせず、マイナー抗原の同定が容易となり、テーラーメイドな免疫療法の開発につながると考えられる。我々は、現在HapMapのデータセットを利用してマイナー抗原が同定出来ないか検討しており、HA-1マイナー抗原遺伝子が同定できることをdouble blindで確認し、またprospectiveな試験でも新規な2マイナー抗原の同定に成功している。今後、さらにアッセイ法を工夫し、迅速な抗原同定法を完成させる予定である。

マイナー抗原ペプチドワクチンによる免疫療法は、移植後白血病の再発や、予防に有用な選択的GVLを引き起こすことができると推測され、我々はその安全性、有用性について臨床試験を開始している。WT1などの腫瘍関連抗原と異なり、非自己抗原に対するアロ免疫を誘導することで強いGVL効果が期待できる反面、移植が必要であることと、ドナー患者間で利用可能なマイナー抗原のGVL方向不適合が必要な点などの制約もある。これが、本試験の遂行を遅らせている理由であるが、これまでの36例の移植ペアの検査では対象の3抗原で9例と、ほぼ統計的に予想される頻度で不適合ペアが見つかった。今後、今回同定したACC-1Cおよび昨年度同定したACC-6などもペプチドを準備する計画であり、これにより患者カバー率は40%を超えることとなる。現時点では、残念ながらまだワクチ

ン接種を実施できていないが、今後さらに症例をリクルートし、早急に本免疫療法の有用性を確立していく予定である。

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

4643ペアという多数例で多変量解析とその結果の検証を行ったことにより確かな結果を得ることができた。HLA-CとHLA-DPB1のドナーと患者のHLA座の違いによりGVL効果を生じることが明確になっているが、本研究では、HLA-Cにおいてアミノ酸の置換部位を同定できたことは、GVL効果のメカニズムを考える上で興味深い。また、HLA-DPB1でアミノ酸置換部位を同定できなかったことは、HLA-DPB1によるGVL効果の作用機序が異なる可能性を示唆している。

E. 結論

(a) 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) 造血器腫瘍に特異的に発現するBCL2A1遺伝子にコードされるHLA-A24拘束性の新規マイナー抗原 (ACC-1^C) を同定した。この結果、ACC-1抗原を利用できる日本人患者集団は両方向のGVL不適合を合わせて2倍となった。また、今回の抗原同定は新たな技術開発により成功したもので、ほとんどのCTLに応用でき、さらにHapMapのデータを利用した方法の開発により、マイナー抗原の同定が加速されると考えられた。以上をもとに、今後免疫療法の対象となる症例の蓄積をはかりたい。

(c) HLA型不適合の組み合わせと再発との関連を解析し、HLA-CにおいてGVL効果と関連のある部位とアミノ酸置換を同定することができた。今後、GVL効果の作用機序解明により特異的同種細胞療法を開発するための基礎的

所見を得ることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer*. in press.
- 2) Shimato S, Natsume A, Tsujimura K, Nakahara N, Wakabayashi T, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J. Identification of an HLA-A24-restricted T-cell epitope derived from a glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor $\alpha 2$ chain. *J Neurosurg*. in press.
- 3) Vigna KL, Fujii N, Mito JK, Koo KKW, Xuereb SM, Sala-Torra O, Gibbs JS, Radich JP, Akatsuka Y, Van den Eynde BJ, Riddell SR, Warren EH. DDX3Y Encodes a Class I MHC-Restricted H-Y Antigen That Is Expressed In Leukemic Stem Cells. *Blood*, 2008, *in press*.
- 4) Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y for the Japan Marrow Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype and anti-thymocyte globulin pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biology Blood Marrow Transplant*, 14(1):75-87,2008.
- 5) Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*, 111(6):3286-94,2008.
- 6) Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Letters* 18;260 (1-2):137-145, 2008.
- 7) Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood* 110:1055-1063, 2007.
- 8) Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci*. 98: 1139-1146, 2007.
- 9) Torikai H, Akatsuka Y, 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-1H peptide can also be presented by another

- HLA-A2 subtype, A*0206. Bone Marrow Transplant. 40: 165-174, 2007.
- 10) 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.
 - 11) Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*, 110:2235-41, 2007.
 - 12) Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.*, 13:5124-32, 2007.
 - 13) Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation Component. Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens*, 69 (Suppl 1):31-5, 2007.
 - 14) Setterholm M, Morishima Y, Pepperall J, Schmidt A. Strategies for typing new volunteer donors. *Tissue Antigens.*, 69 (Suppl 1):6-7, 2007.
 - 15) Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, Maruta A, Cho R, Ohwada C, Sakamaki H, Sao H, Mori S, Okamoto S, Miyamura K, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program. *Br J Haematol.*, 137:142-51, 2007.
 - 16) 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.*, 39:471-6, 2007.
 - 17) 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.*, 85:140-5, 2007.
 - 18) 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., 13:315-28, 2007.
- 19) 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., 59:99-108, 2007.
 - 20) 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., 39:25-30, 2007.
 - 21) 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., 13:90-9, 2007.
 - 22) 岡村文子、葛島清隆。「免疫治療」EBウイルス 第二版。高田賢蔵監修。診断と治療社。印刷中。
 - 23) 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（先端医学社、東京）。6:15-21, 2007.
 - 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(46)」、最新医学社。p144-149, 2007.
2. 学会発表
- 1) 岡村文子、渡邊友紀子、長尾 隆志、森島聡子、赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆。EBウイルス核抗原EBNA1特異的CD4⁺T細胞の誘導と機能解析：第11回基盤的癌免疫研究会総会、東京、2007年7月
 - 2) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら。HMSD 遺伝子に由来する新規マイナー抗原ACC-6の同定と白血病幹細胞におけるACC-6の発現。第11回基盤的がん免疫研究会総会、東京 2007年7月
 - 3) 夏目敦至、辻村邦夫、葛島清隆、近藤豊、関戸好孝、島戸真司、伊藤元一、若林俊彦、吉田純。Epigenetic target for cancer-testis antigen-based tumor immunotherapy: 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
 - 4) 岡村文子、渡邊友紀子、森島聡子、赤塚美樹、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆。EBウイルス核抗原EBNA1特異的CD4⁺T細胞の機能解析：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
 - 5) 鳥飼宏基、赤塚美樹、谷田部恭ら。BCL2A1にコードされる血液細胞特異的マイナー組織適合抗原のメラノーマにおける異所性発現。第66回日本癌学会総会、横浜 2007年10月
 - 6) 川瀬孝和 南谷泰仁 赤塚美樹ら。遺伝子連鎖解析によるHLA-A*2402拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定。第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜 2007年10月
 - 7) 赤塚美樹。GVHDを増強せずにGVL効果を高める治療法の可能性（シンポジウム）。第69回日本血液学会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横浜 2007年10月

- 8) 赤塚美樹. 造血器腫瘍に対する細胞免疫療法
の今後（教育講演）. 第69回日本血液学
会総会・第49回日本臨床血液学会総会、横
浜 2007年10月
- 9) 赤塚美樹. マイナー組織適合抗原を標的と
した免疫療法. 第55回日本輸血学会総会
（教育講演）、名古屋 2007年5月
- 10) Kawase T, Morishima Y. et al. Identification of
HLA Allele Mismatch Combinations and
Amino Acid Substitution Positions Associated
with GVL Effect after Unrelated HSCT. 49th
annual meeting of American Society of

Hematology. Dec. 2007. Atlanta. USA

- 11) 亀井美智、南谷泰仁、赤塚美樹ら. 新規遺
伝子連鎖解析法によるHLA-B*4002拘束性
のマイナー組織適合性抗原の同定. 第30回
日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム.
大阪 2008年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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。オートファゴソームの主要な構成蛋白であるatg-5とatg-8を、レトロウイルスを用いたRNAi法にてノックダウンしたところ、EBNA1特異的CD4⁺T細胞へのエピトープ提示が減少した。class II経路へ抗原誘導を促すと報告されている遺伝子産物の中で、EBNA1蛋白N-末端にheat shock protein gp96のleader sequenceを融合し、EBNA1蛋白C-末端にLAMP-1のtransmembrane domainを融合した構造物が、最も効率よくCD4⁺T細胞エピトープを提示できることを明らかにした。今後、CTLとCD4⁺T細胞を同時に誘導する系の確立を試みる。

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。

EBVの核抗原であるEBNA1はEBV陽性癌に共通して発現している蛋白質である。EBNA1を標的抗原として活用できれば、すべてのEBV陽性癌に対して有効な免疫療法

が構築できる可能性がある。また、効率的な腫瘍免疫応答には、CD8陽性のCTLのみならず抗原特異的なCD4⁺T細胞の動員が重要であることが指摘されている。

EBNA1蛋白はオートファジー経路によって代謝されていることが知られているが、class II抗原提示にもこの経路に関わっているか、RNAi法を用いて検討した。

遺伝子導入した抗原提示細胞は、通常HLA class I 経路によってCTLへ抗原を提示する。導入遺伝子産物をclass I 経路のみならず、HLA class II 経路にも誘導できれば、CTLと抗原特異的CD4⁺T細胞を同時に活性化することが可能になる。本年度は、class II 経路へ抗原誘導促すと報告されている遺伝子産物の中でどれが最も効率が良いものかを特定することを目的とした。

B. 研究方法

1) 合成ペプチドによる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) レトロウイルスを用いたRNAi法によるautophagy関連蛋白のノックダウン：

オートファゴゾームの主要な構成蛋白であるatg-5とatg-8について、発現を抑制するshort hairpin RNAを組み込んだレトロウイルスを作製し、EBV陽性のリンパ腫細胞株に感染させた。各細胞の蛋白の発現はウェスタン法にて検討した。

3) EBNA1抗原をclass-IIに効率よくtargetingする構造の特定：

Lysosome-associated membrane protein (LAMP)-1, heat shock protein gp96, HLA class II-associated invariant chainあるいはautophagy-related protein light chain 3と、EBNA1との融合蛋白を発現するplasmidをそれぞれ作製した。各plasmidからin vitro transcription法にてmRNAを作製し、自己のCD40活性化B細胞に電気穿孔法にて導入し抗原提示細胞とし、EBNA1特異的HLA-DQ6拘束性CD4⁺T細胞クローンを反応細胞としたELISPOT法を行った。

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

オートファゴゾームの主要な構成蛋白であるatg-5とatg-8を、レトロウイルスを用

いたRNAi法にてノックダウンしたところ、EBNA1特異的CD4⁺T細胞へのエピートープ提示が減少した（図1および2）。

EBNA1蛋白N-末端にheat shock protein gp96のleader sequenceを融合し、EBNA1蛋白C-末端にLAMP-1のtransmembrane domainを融合した構造物が、最も効率よくCD4⁺T細胞エピートープを提示できることを明らかにした（図3および4）。

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エピー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たが、今回、EBV陽性のリンパ腫細胞株においてもその抗原提示機構が確認された。抗癌剤ラパマイシンはオートファジーを誘導することが知られている。今回の知見はラパマイシンがclass II抗原提示を増強する可能性を示す。今後は免疫療法との併用効果を検討する。さらに、今回特定したclass-II targeting構造を用いて、今後CTLとCD4⁺T細胞を同時に誘導する系の確立を試みる。また、本構造は他の腫瘍抗原特異的CD4⁺T細胞の誘導、解析にも応用可能であると考えられるため、検討を進める。

E. 結論

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) Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, Kondo Y, Sekido Y, Kawatsura H, Narita Y, Yoshida J. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer*. in press.
- 2) Shimato S, Natsume A, Tsujimura K, Nakahara N, Wakabayashi T, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J. Identification of an HLA-A24-restricted T-cell epitope derived from a glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor α 2 chain. *J Neurosurg*. in press.
- 3) Kawase T, Nanya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. *Blood*, 111(6):3286-94, 2008.
- 4) Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. *Cancer Letters* 18;260 (1-2):137-145, 2008.
- 5) Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood* 110:1055-1063, 2007.
- 6) Torikai H, Akatsuka Y, 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-1H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A*0206. *Bone Marrow Transplant*. 40: 165-174, 2007.
- 7) 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.
- 8) 岡村文子、葛島清隆. 「免疫治療」EBウイルス 第二版. 高田賢蔵監修. 診断と治療社. 印刷中.
- 9) 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 (先端医学社、東京). 6:15-21, 2007.
- 10) 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(46)」, 最新医学社. p144-149, 2007.

2. 学会発表

- 1) 岡村文子、渡邊友紀子、長尾 隆志、森島聡子、赤塚美樹、高橋利忠、葛島清隆. EBウイルス核抗原EBNA1特異的CD4⁺T細胞の誘導と機能解析: 第11回基盤的癌免疫研究会総会、東京、2007年7月

- 2) 夏目敦至、辻村邦夫、葛島清隆、近藤豊、関戸好孝、島戸真司、伊藤元一、若林俊彦、吉田純. Epigenetic target for cancer-testis antigen-based tumor immunotherapy: 第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月
- 3) 岡村文子、渡邊友紀子、森島聡子、赤塚美樹、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆. EBウイルス核抗原EBNA1特異的CD4⁺T細胞の機能解析：第66回日本癌学会学術総会、横浜、2007年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. RNAiによるオートファジー関連分子の発現抑制効果

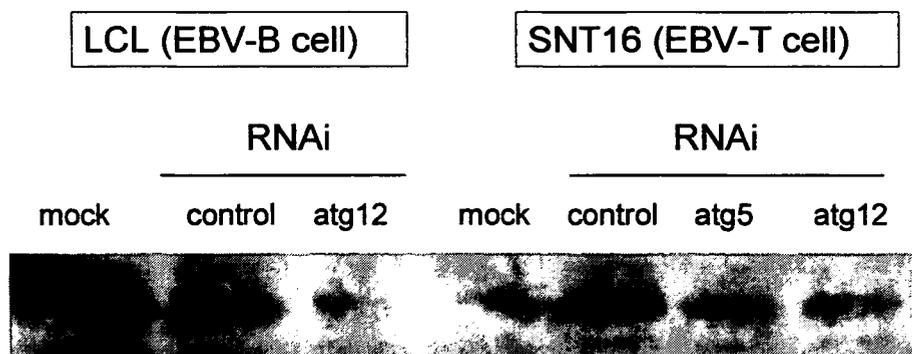


図2. RNAiによるオートファジー抑制細胞を用いたELISPOT assay

