

200823040A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 葛島 清隆

平成21（2009）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
研究代表者 葛島清隆

II. 分担研究報告

1. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定 …………… 11
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 …………… 15
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 …………… 24
森島泰雄 (愛知県がんセンター病院)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 33

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

研究代表者 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) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定、(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) 免疫療法に有用な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)標的抗原を新規に同定するために、アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞 (aAPC) システムの構築を開始した。今年度は、HLAを表面に発現していないK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞）にHLA-A*2402、CD86および4-1BBLを導入しaAPCを作製した。HLA-A24陽性成人のCD8+T細胞をaAPCで刺激して、HLA-A24拘束性にK562細胞を認識しHLA-A24陽性の正常細胞を認識しないCTLクローンを樹立した。K562細胞のmRNAから構築したcDNAライブラリーを用いた発現スクリーニングにより、4個のCTLクローンがそれぞれ認識する4種類の抗原を同定した。同定した遺伝子は、①赤芽球系の転写因子、②慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、③胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、④ユビキタスな発現をする遺伝子（のスプライスパリアント）であった。同定された抗原のうち3個は白血病細胞に特徴的な遺伝子であった。これは、本aAPCシステムが、使用したがん細胞株に発現する新規腫瘍抗原を同定するのに有効なツールとなり得ることを示している。今後は、肺がんおよび膵がん細胞株を用いた同様のaAPCを作製し、これらのがんに対する免疫療法に有用なCTL標的抗原を同定していく。

(b) 最近の抗体療法、分子標的療法の進歩により造血器腫瘍の予後は大きく改善した。他方、そうした新薬が適応でないか、再発ハイリスクの症例では依然として同種移植が最後の治療法である。そうしたハイリスク症例が増えた結果として、移植を行ったにもかかわらず再発する割合は減っていない。移植後再発の1つの原因として移植片対腫瘍（GVL）効果が不十分であることが挙げられる。移植後の免疫を全般に高めればGVH病が増え致命的合併症を起こすため、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。その標的として、我々は新規マイナー抗原の同定を進めるとともに臨床応用を目指している。本年度は、これまで時間のかかったマイナー

抗原遺伝子の同定を、公共のリソースであるHapMap計画で収集された細胞株とSNPデータを用いることで短時間のうちに可能にする方法を開発した。これにより新規の抗原を2種類同定した。臨床試験においては、これまで同定した造血系腫瘍特異的マイナー抗原を標的としたペプチドワクチンを開始し、臨床試験の適応となりうる症例を11例までリクルートしており、実際に2例に投与した。有害事象は認められておらず、今後臨床試験プロトコルに沿って投与量の増量をはかりつつ、免疫モニタリングにてデータの集積をはかる予定である。

(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おり、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（移植片対白血病効果：GVL効果）、HLA-A, B, DRB1, DQB1座の違いは移植後の再発に影響しないことが判明した。白血病の病型別の解析では、急性骨髄性白血病（AML）と慢性骨髄性白血病（CML）においてHLA-DPB1抗原の違いがGVL効果に関与していた。これらの知見は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。

研究分担者	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

K562細胞および膀胱癌細胞株を認識するCTLを樹立し、抗原を同定したので報告する。

(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、移植の適応となる難治性造血器腫瘍では移植後も再発が20～50%と高率であるため、成績の改善の余地がある。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、多かれ少なかれ患者の主要臓器を傷害する移植片対宿主病（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、もとは自己抗原である多くの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

A. 研究目的

(a) 担がん患者のリンパ球を自己のがん細胞株で刺激することで得られる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、CTL標的抗原の同定に必須である。このため、細胞株を樹立しにくい膀胱癌などではCTL標的抗原の同定が遅れている。他の患者から樹立されたがん細胞株を抗原提示細胞として使用すると、一致していないHLAに対する強いアロ反応がCTLの誘導を阻害する。

アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞（aAPC）システムの構築を試みている。今年度は、HLAを表面に発現していないK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞）にHLA-A*2402、CD86および4-1BBLを導入しaAPCを作製した。このaAPCを使用してCTL誘導能の検討を行った。加えてHLA-A*2402拘束性に

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。実際、再発時にドナーリンパ球輸注を行って再寛解に到達する際に複数のマイナー抗原に反応する細胞傷害性T細胞（CTL）が血中に1%程度まで増加しているという複数の報告がある。

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が、これまでの同定法では多大な時間を要した。

本年度は、過去にクローニングしたHLA-A*0206およびB*4001拘束性のCTLクローンが認識する新規マイナー抗原を、免疫学的手法とHapMap計画で収集された細胞株及びSNPデータを組み合わせ解析するという新手法で同定に成功したことを中心に報告する。また、ワクチン療法の臨床試験の進捗状況についても報告する。

(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成する。

B. 研究方法

(a) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：

1) 人工抗原提示細胞（aAPC）の作製：

HLAを表面に全く発現していないK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞）に、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A*2402、CD86及び4-1BBLを導入した。さらにこの細胞に、多くの上皮性がんが発現するEpithelial cell adhesion molecule(EpCAM)をモデル抗原として導入したaAPC-Epを作製した。

2) aAPCの抗原特異的誘導能の検討：

HLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞をaAPC-Epで2回刺激後に、HLA-A24/EpCAM₁₇₃₋₁₈₁-tetramerにて染色した。

3) aAPCを用いたHLA-A*2402拘束性K562細胞特異的CTLの誘導：

HLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞をaAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。特異性はエリスロット法とIFN γ キャッチ法にて確認した。限界希釈培養法にてCTLクローンを複数得た。HLA-A24あるいはHLA-A2を導入したK562細胞、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞、および膀胱がん細胞株への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。限界希釈培養法にてCTLクローンを得た。

4) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を発現するHEK293T細胞にcDNAライブラリーのプラスミッドを導入し、CTLと24時間培養した。上清中にCTLから分泌されたIFN γ をELISA法により測定した。

(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法の開発：

国際HapMap計画に登録された日本人、中国人、白人由来の不死化B細胞株（B-LCL）は米国のCoriell財団から購入した。これらのB-LCL

にマイナー抗原特異的CTLの拘束性HLA分子が発現できるよう、レトロウイルスベクターを用いてcDNAを導入した。各B-LCLがCTLの抗原をもっているか(SNP型が陽性か)の検討には⁵¹Cr遊離法による細胞傷害性試験を用いた。得られたデータによりマイナー抗原陽性および陰性の表現型に分け、このパターンともっとも良く関連するSNPをHapMapのゲノムデータと照合することにより選択した(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各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のペプチドに加え、本年度HLA-A24拘束性のACC-1^CペプチドがGMPグレードで準備できたため、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、適応例に説明と同意後臨床試験を開始した。ワクチンは初期のがん抗原ペプチドワクチンの容量に準じ、30マイクログラムからの3倍量の増量を別々の患者で行うこととした。アジュバントとしてMontanide ISA51VGを用いた。主要評価項目としてGVHD誘発の有無とその他の有害事象、副次評価項目として抗腫瘍効果とマイナー抗原特異的免疫反応の誘導の程度を設定した。

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

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイピング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座における不適合な組み合わせ症例の再発リスク(HR)をHLA座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。

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) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定:

1) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製:

HLA-A*2402、CD86及び4-1BBLを導入したK562細胞は長期間にわたりこれらの蛋白を発現していた。K562細胞は中程度のEpCAMを表面に保有しているが、EpCAMを強制発現したaAPC-Epは発現が増加していた。

2) aAPCの抗原特異的誘導能の検討:

aAPC-Epで2回刺激したHLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞には、HLA-A24/EpCAM₁₇₃₋₁₈₁-tetramerにて染色される細胞集団が出現した。

3) aAPCを用いたHLA-A*2402拘束性K562細胞特異的CTLの誘導:

全てのCTLクローンは、HLA-A24拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞は認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、16F3クローンは複数の腫瘍細胞を認識した。また種々の細胞への反応性パターンから、樹立したクローンはそれぞれ異なる抗原を認識していると考えられた。

4) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定:

4個のCTLクローンがそれぞれ認識する4種類の抗原を同定した。同定した遺伝子は、①赤芽球系の転写因子、②慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、③胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、④ユビキタスな発現をする遺伝子(のスプライスバリエント)であった。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析:

1)-① 新規マイナー抗原の同定法の検証:

まず昨年度我々が樹立し、新たな拘束性HLAアリルとしてHLA-A*0206を報告した既知のマイナー抗原であるHA-1遺伝子(HMHA1)がHapMapリソースを用いて同定できるか後方視的に検証した。HLA-A*0206のCTL-4B1を用いて58種類の日本人および中国人由来のB-LCLをタイピングしたところ、37の抗原陽性B-LCLと21の抗原陰性B-LCLが同定された。相関解析の結果、HA-1の表現型に関連すると考えられる高い χ^2 値(52.8)を示すSNPが染色体19q13.3にのみ局在することが判明した。実際このSNPはHMHA1遺伝子のintron 2内に存在した。HA-1をコードするSNPそのものはHapMapのデータには登録されていなかった(dbSNPデータベースには登録済み)が、両者はそれぞれ隣

り合ったintronとexonに存在しており、仮に前向き研究として行ったとしてもHA-1エピトープの同定は容易であると推定された。

1)-② 新手法を用いた前方視的な同定:

次に過去に樹立したHLA-B*4002拘束性のCTL-3B6とHLA-A*0206拘束性のCTL-1B2を用いて、未知のマイナー抗原エピトープの同定を試みた。CTL-3B6は日本人と中国人由来の72種類のHapMapパネルのスクリーニングにより36個のマイナー抗原陽性LCLと14個の陰性LCL、22個の判定不能LCLの3群に分類した。CTL-1B2は日本人由来のHapMap B-LCLを約半々使い、計45種類を細胞傷害性試験でスクリーニングし、13の抗原陽性B-LCLと32の陰性B-LCLに選別した。CTL-4B1の場合と同様に、HapMapの遺伝子配列データから χ^2 検定により関連するSNPを絞り込んだ。この結果、相関の強いSNPの位置を染色体19q13.3の位置に存在するSLCIA5遺伝子まで直接絞り込むことができた。このSNPはSLCIA5の5'非翻訳領域に存在し、その χ^2 値は最高50であった。確認実験としてHLA-B*4002導入HEK293T細胞にドナー型および患者型のSLCIA5 cDNAを遺伝子導入し発現させたものとCTL-3B6を反応させたところ、ドナー型を導入した場合CTL-3B6はインターフェロン(IFN)- γ を産生しなかったが、レシビエント型を発現させたものにはIFN- γ を産生した。ミニ遺伝子を作成して同様な方法で抗原決定部位を絞り込んでいった結果、エピトープのアミノ酸配列はSLCIA5のexon 1部分でコードされるAEATANGGLALであった。相関解析で同定されたSNPが5'非翻訳領域に存在し、エピトープはexon 1であったことから、本法は有効な手段と考えられた。

さらに、HLA-A*0206拘束性のCTL-1B2のスクリーニングを実施した。日本人由来のHapMap B-LCLを用い、計42種類を細胞傷害性試験でスクリーニングし、13の抗原陽性B-LCLと2

9の陰性B-LCLに選別した。相関解析では、4q13.1のUGT2B17遺伝子に存在するSNPに χ^2 値44のピークがみられた。過去にUGT2B17がHLA-A*2902拘束性のマイナー抗原をコードし、マイナー抗原が生成される理由としてドナーにおける本遺伝子の欠損が報告されていたため、PCRを用いて抗原陽性および陰性B-LCLについてUGT2B17遺伝子の有無を検討した。その結果、ドナー型SNPをもつ個人が相関してUGT2B17遺伝子を欠損していることがわかり、ドナーだけが本遺伝子をホモで欠失する場合に患者が本遺伝子を有していると抗原性が発現する機序が判明した。詳細な遺伝子内マッピングの結果、UGT2B17遺伝子のexon 6上にCTLエピトープCVATMIFMIが同定された。(亀井美智・南谷泰仁、*Blood*, *in press*)。

2) ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24拘束性ACC-1^Yおよび本年度より加わったACC-1^C、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℃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21年2月末の段階で60例がタイピング検査を受け、この中で13例(22%)が4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。うち最近の2例が、再発治療(PTCL-u症例)および再発予防(ハイリスクT-ALL)目的でワクチン接種を投与した。使用したマイナー抗原はそれぞれACC-1^C、HA-1^Hであった。

PTCL-u症例は移植後1年以上経過後の鼠経部再発で、腫瘍の形成を認めた。初回容量で

ある30マイクログラムのワクチンを隔週で投与したが、3回投与したところで腫瘍が進行したため投与を中止した。3回以上投与可能例は主要評価項目の判定は可能としており、本例はワクチン局所の発赤以外、GVHDも含め有害事象は認めなかった。T-ALL症例は移植後104日目から30マイクログラムのワクチンの投与を開始し、予定の5回の接種を終了した。本例も局所の発赤以外、有害事象は認めなかった。2例のワクチン投与前、各ワクチン投与後の末梢血をテトラマーおよびIFN- γ ELISPO T法にてワクチンの免疫誘導能に関し検討を行ったが、2例とも前後で有意な変動は認められなかった。

(c) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応：

- 1) 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(移植片対白血病効果: GVL効果)、HLA-A, B, DRB1, DQB1座の違いは移植後の再発に影響しないことが判明した。
- 2) 白血病の病型別の解析では、急性骨髄性白血病(AML)と慢性骨髄性白血病(CML)においてHLA-DPB1抗原/座の違いがGVL効果に関与していた。

D. 考察

(a) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：

16F3クローンは、ユビキタスな発現をする遺伝子(のスプライスバリエント)由来のエピトープを標的とするが、なぜK562細胞と一部の腫瘍細胞のみを認識し、正常細胞を含めた他の細胞を認識しないのか不明である。抗原プロセッシングの差異、エピトープ発現を抑制する何らかの因子の存在、エピトープを産生する他のスプライスバリエントの存在、等の仮説を立てて検証実験を計画している。

同定された抗原のうち3個は白血病細胞に特

微的な遺伝子であった。これは、本aAPCシステムが、使用したがん細胞株に発現する新規腫瘍抗原を同定するのに有効なツールとなり得ることを示している。今後は、肺がんおよび膀胱がん細胞株を用いた同様のaAPCを作製し、これらのがんに対する免疫療法に有用なCTL標的抗原を同定していく。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析：

今回新たに開発したHapMap計画で収集されたリソースを用いる相関解析法は、マイナー抗原頻度が5%以上95%以下であればHapMapに登録されている各民族90以下のB-LCLをタイピングすればほぼ抗原遺伝子が同定できることがシミュレーションにより示されている。実際、新規に同定した抗原は45程度のB-LCLをタイピングただけで抗原遺伝子まで絞り込むことが可能であった。しかもCTL-1B2が認識するUGT2B17は遺伝子欠損型であり、このようなものがSNPタイピングで見つかるということは、本法がいかにパワフルな方法であることを示している。

従来の同定法はcDNAライブラリーのスクリーニングの他、昨年度我々が報告した抗原陽性・陰性のB-LCLから抽出したDNAプールをSNPアレイで解析方法であった。後者は抗原遺伝子同定の迅速化に有効ではあったが、依然DNAのプール化、SNPアレイでのタイピングが必要であった。今回の方法は公的なリソースであるHapMapの試料・データセットを利用するもので、世界各国のマイナー抗原研究者が容易に追試可能である。また、B-LCLの表現型を別の視点から分類できれば、マイナー抗原のみならず薬剤感受性遺伝子の多型などの同定にも利用出来る可能性がある。

なお本法においてさらに新規の2マイナー抗原の同定にほぼ成功している。これらは共同研究先である米国Fred Hutchinson癌研究所で養子免疫療法として患者に実際に投与され

たCTLが認識するマイナー抗原であり、今後その臨床経過との関係を明らかにし、論文として投稿予定である。さらに、現在用いている⁵¹Crを使った古典的な細胞傷害性試験は依然として時間制限因子であるため、今後をさらにアッセイ法を改良し、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た。マイナー抗原は非自己抗原であるため、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。しかし、今後もドナーソースが非血縁ドナーや臍帯血に置き換わることといえ、同種造血細胞移植の有用性に変わりはなく、その最終治療である移植後の再発を抑える特異的免疫療法の開発は、再発後の患者のQOL、コスト負担などを考慮すれば重要と考える。

(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た。白血病病型によりGVL効果が異なることは、GVLの標的抗原の表出が病型により異なることを示唆している。

E. 結論

(a) K562細胞をベースにした人工抗原提示細胞を作製し、新規のCTL認識抗原を同定した。同定した遺伝子は、①赤芽球系の転写因子、

②慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、③胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、④ユビキタスな発現をする遺伝子（のサブタイプ）であった。

(b) 公的リソースであるHapMapの試料とゲノムデータを利用した新規のマイナー抗原遺伝子同定法を開発し、実際に抗原遺伝子がほぼピンポイントに同定できることを示した。これにより、マイナー抗原の同定がさらに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抗原の蓄積をはかるとともに、臨床試験を通じてその安全性・有用性を示したい。

(c) HLA座不適合と再発との関連を解析し、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) Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood*, in press.
- 2) Taniguchi K, Shimazaki C, Ochiai N, Maruya E, Akatsuka Y, Ashihara E, Maekawa T, Taniwaki M, Saji H. Modified ELISPOT assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens. *Int J Lab Hematol*. in press.
- 3) Ishizawa K, Ogura M, Hamaguchi M, Hotta T, Ohnishi K, Sasaki T, Sakamaki H, Yokoyama H, Harigae H, Morishima Y. Safety and efficacy of rasburicase (SR29142) in a Japanese phase II study. *Cancer Sci*. in press.
- 4) Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Kodera Y, Terakura S, Taniguchi S, Miyakoshi S, Usui N, Yano S, Kawano Y, Nagatoshi Y, Harada M, Morishima Y, Okamoto S, Saito AM, Ohashi Y, Ueda R, Takaue Y. Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study. *Bone Marrow Transplant*. in press.
- 5) Kawase T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Kato S, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y. HLA mismatch combinations associated with decreased risk of relapse: Implications for molecular mechanism. *Blood*, in press.
- 6) Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Kuzushima K, Yasukawa M. Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood*, 113(1):66-74, 2009.
- 7) Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15(1 Suppl):39-41, 2009.
- 8) Atsuta Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kasai M, Fukuda T, Azuma H,

- Takanashi M, Okamoto S, Tsuchida M, Kawa K, Morishima Y, Kodera Y, Kato S. Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplant compared with unrelated bone marrow transplant in adult patients with acute leukemia. *Blood*, 113(8):1631-8, 2009.
- 9) Lu X, Kondo Y, Takamatsu H, Ohata K, Yamazaki H, Takami A, Akatsuka Y, Nakao S. CD16⁺ CD56⁺ NK cells in the peripheral blood of cord blood transplant recipients: a unique subset of NK cells possibly associated with graft-versus-leukemia effect. *Eur J Haematol*. 81: 18-25, 2008.
- 10) 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*. 122(11):2542-53, 2008.
- 11) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci*. 99(8):1633-42, 2008.
- 12) Akamatsu T, Watanabe N, Kido M, Saga K, Tanaka J, Kuzushima K, Nishio A, Chiba T. Human TSLP directly enhances expansion of CD8⁺T cells. *Clin Exp Immunol*. 154(1):98-106, 2008. 11.
- 13) Torikai H, Akatsuka Y, Yatabe Y, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Aberrant expression of BCL2A1-restricted minor histocompatibility antigens in melanoma cells: application for allogeneic transplantation. *Int J Hematol*, 87:467-473, 2008.
- 14) Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, Toji S, Kawase T, Takahashi T, Kuzushima K, Akatsuka Y. CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. *Int J Hematol*, 88: 311-320, 2008.
- 15) 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*. 109(1):117-22, 2008.
- 16) Kawase T, Nannya 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.
- 17) 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.
- 18) Oki Y, Yamamoto K, Kato H, Kuwatsuka Y, Taji H, Kagami Y, Morishima Y. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. *Eur J Haematol*. 81(6):448-53, 2008.
- 19) Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R,

- Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru J, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. De novo CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*. 93(8):1195-202, 2008.
- 20) Oki Y, Kato H, Matsuo K, Kuwatsuka Y, Taji H, Yamamoto K, Kagami Y, Morishima Y. Prognostic value of serum soluble interleukin-2 receptor level in patients with diffuse large B cell lymphoma, treated with CHOP- or RCHOP-based therapy. *Leuk Lymphoma*. 49(7):1345-51, 2008.
2. 学会発表
- 1) 鳥飼宏基、亀井美智、南谷泰仁、川瀬孝和、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆、小川誠司、赤塚美樹. Public Resource を用いたゲノムワイド解析による新規マイナー抗原同定法の開発：第12回基盤的癌免疫研究会総会、さいたま市、2008年7月
- 2) 渡邊友紀子、岡村文子、森島聡子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆. Induction of EBNA1-specific CD4⁺T lymphocytes by CD40-activated B cells electroporated with mRNA encoding EBNA1: 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月
- 3) 赤塚美樹、森島泰雄. 骨髄移植症例に誘導されるGVL効果の解析. 第67回日本癌学会総会シンポジウム、名古屋、2008年10月
- 4) Ogawa S, Matsubara A, Kashiwase K, ら. Genome-wide association studies of genetic incompatibility that is relevant to the development of GvHD in unrelated bone marrow transplantation. 第50回米国血液学会総会、サンフランシスコ 2008年12月
- 5) Nannya Y, Kamei M, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi Ta, Yazaki M, Morishima S, Miyamura K, Ito T, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, and Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens: 第50回米国血液学会総会、サンフランシスコ、2008年12月
- 6) 葛島清隆. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原同定の試み：第19回群馬 Clinical Oncology Research勉強会、前橋市、2008年12月
- 7) 赤塚美樹. Minor Antigen 反応性CTLの移植医療への関与. 第31回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム. 札幌市、2009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

人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定

研究分担者 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 免疫療法に有用な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)標的抗原を新規に同定するために、アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞(aAPC)システムの構築を開始した。今年度は、HLAを表面に発現していないK562細胞(慢性骨髄性白血病細胞)にHLA-A*2402、CD86および4-1BBLを導入しaAPCを作製した。HLA-A24陽性成人のCD8⁺T細胞をaAPCで刺激して、HLA-A24拘束性にK562細胞を認識しHLA-A24陽性の正常細胞を認識しないCTLクローンを樹立した。K562細胞のmRNAから構築したcDNAライブラリーを用いた発現スクリーニングにより、4個のCTLクローンがそれぞれ認識する4種類の抗原を同定した。同定した遺伝子は、1)赤芽球系の転写因子、2)慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、3)胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、4)ユビキタスな発現をする遺伝子(のスプライスパリアント)であった。同定された抗原のうち3個は白血病細胞に特徴的な遺伝子であった。これは、本aAPCシステムが、使用したがん細胞株に発現する新規腫瘍抗原を同定するのに有効なツールとなり得ることを示している。今後は、肺がんおよび膀胱がん細胞株を用いた同様のaAPCを作製し、これらのがんに対する免疫療法に有用なCTL標的抗原を同定していく。

A. 研究目的

担がん患者のリンパ球を自己のがん細胞株で刺激することで得られる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、CTL標的抗原の同定に必須である。このため、細胞株を樹立しにくい膀胱癌などではCTL標的抗原の同定が遅れている。他の患者から樹立されたがん細胞株を抗原提示細胞として使用すると、一致していないHLAに対する強いアロ反応がCTLの誘導を阻害する。

アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞(aAPC)システムの構築を試みている。今年度は、HLAを表面に発現し

ていないK562細胞(慢性骨髄性白血病細胞)にHLA-A*2402、CD86および4-1BBLを導入しaAPCを作製した。このaAPCを使用してCTL誘導能の検討を行った。加えてHLA-A*2402拘束性にK562細胞および膀胱癌細胞株を認識するCTLを樹立し、抗原を同定したので報告する。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製:

HLAを表面に全く発現していないK562細胞(慢性骨髄性白血病細胞)に、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A*2402、CD86及び4-1BBLを導入した。さらにこの細

胞に、多くの上皮性がんが発現する Epithelial cell adhesion molecule(EpCAM)をモデル抗原として導入したaAPC-Epを作製した。

2) aAPCの抗原特異的誘導能の検討：

HLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞をaAPC-Epで2回刺激後に、HLA-A24/EpCAM₁₇₃₋₁₈₁-tetramerにて染色した。

3) aAPCを用いたHLA-A*2402拘束性K562細胞特異的CTLの誘導：

HLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞をaAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。特異性はエリスロット法とIFN γ キャッチ法にて確認した。限界希釈培養法にてCTLクローンを複数得た。HLA-A24あるいはHLA-A2を導入したK562細胞、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞、および膀胱がん細胞株への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。限界希釈培養法にてCTLクローンを得た。

4)CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を発現するHEK293T細胞にcDNAライブラリーのプラスミッドを導入し、CTLと24時間培養した。上清中にCTLから分泌されたIFN γ をELISA法により測定した。

本研究計画はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（厚生労働省）を遵守して作成され、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会および組換えDNA研究審査委員会の承認を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1) 人工抗原提示細胞（aAPC）の作製：

HLA-A*2402、CD86及び4-1BBLを導入したK562細胞は長期間にわたりこれらの蛋白

を発現していた。K562細胞は中程度のEpCAMを表面に保有しているが、EpCAMを強制発現したaAPC-Epは発現が増加していた。

2) aAPCの抗原特異的誘導能の検討：

aAPC-Epで2回刺激したHLA-A24陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞には、HLA-A24/EpCAM₁₇₃₋₁₈₁-tetramerにて染色される細胞集団が出現した。

3) aAPCを用いたHLA-A*2402拘束性K562細胞特異的CTLの誘導：

全てのCTLクローンは、HLA-A24拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A24陽性の繊維芽細胞や正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞は認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、16F3クローンは複数の膀胱がん細胞を認識した。また種々の細胞への反応性パターンから、樹立したクローンはそれぞれ異なる抗原を認識していると考えられた。

4)CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

4個のCTLクローンがそれぞれ認識する4種類の抗原を同定した。同定した遺伝子は、①赤芽球系の転写因子、②慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、③胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、④ユビキタスな発現をする遺伝子（のサブライスバリエント）であった。

D. 考察

16F3クローンは、ユビキタスな発現をする遺伝子（のサブライスバリエント）由来のエピトープを標的とするが、なぜK562細胞と一部の膀胱がん細胞のみを認識し、正常細胞を含めた他の細胞を認識しないのか不明である。抗原プロセッシングの差異、エピトープ発現を抑制する何らかの因子の存在、エピトープを産生する他のサブライス

バリエーションの存在、等の仮説を立てて検証実験を計画している。

同定された抗原のうち3個は白血病細胞に特徴的な遺伝子であった。これは、本aAPCシステムが、使用したがん細胞株に発現する新規腫瘍抗原を同定するのに有効なツールとなり得ることを示している。今後は、肺がんおよび膵がん細胞株を用いた同様のaAPCを作製し、これらのがんに対する免疫療法に有用なCTL標的抗原を同定していく。

E. 結論

K562細胞をベースにした人工抗原提示細胞を作製し、新規のCTL認識抗原を同定した。同定した遺伝子は、①赤芽球系の転写因子、②慢性リンパ性白血病患者血清を用いたSEREX法により、過去に同定された腫瘍抗原、③胎児期に赤芽球系細胞で発現が見られる遺伝子、④ユビキタスな発現をする遺伝子（のサブライスバリエーション）であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamei M, Nannya Y, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi T, Yazaki M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Ito T, Togari H, Riddell SR, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood*, (in press)
- 2) Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Kuzushima K, Yasukawa M. Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood*, 113(1):66-74, 2009.
- 3) 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*. 122(11):2542-53, 2008.
- 4) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1-specific CD4⁺T cells directly kill Epstein-Barr virus-carrying natural killer and T cells. *Cancer Sci*. 99(8):1633-42, 2008.
- 5) Akamatsu T, Watanabe N, Kido M, Saga K, Tanaka J, Kuzushima K, Nishio A, Chiba T. Human TSLP directly enhances expansion of CD8⁺T cells. *Clin Exp Immunol*. 154(1):98-106, 2008. 11.
- 6) Torikai H, Akatsuka Y, Yatabe Y, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Aberrant expression of BCL2A1-restricted minor histocompatibility antigens in melanoma cells: application for allogeneic transplantation. *Int J Hematol*, 87:467-473, 2008.
- 7) Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, Toji S, Kawase T, Takahashi T, Kuzushima K, Akatsuka Y. CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. *Int J Hematol*, 88: 311-320, 2008.
- 8) 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*. 109(1):117-22, 2008.

- 9) 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.
- 10) 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.
2. 学会発表
- 1) 鳥飼宏基、亀井美智、南谷泰仁、川瀬孝和、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆、小川誠司、赤塚美樹. *Public Resource* を用いたゲノムワイド解析による新規マイナ
- 一抗原同定法の開発：第12回基盤的癌免疫研究会総会、さいたま市、2008年7月
- 2) 渡邊友紀子、岡村文子、森島聡子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆. Induction of EBNA1-specific CD4⁺T lymphocytes by CD40-activated B cells electroporated with mRNA encoding EBNA1: 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月
- 3) Nanya Y, Kamei M, Torikai H, Kawase T, Taura K, Inamoto Y, Takahashi Ta, Yazaki M, Morishima S, Miyamura K, Ito T, Kodera Y, Morishima Y, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S, and Akatsuka Y. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens: 第50回米国血液学会総会、サンフランシスコ、2008年12月
- 4) 葛島清隆. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原同定の試み：第19回群馬 Clinical Oncology Research勉強会、前橋市、2008年12月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用

研究分担者 赤塚 美樹 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 室長

研究要旨

最近の抗体療法、分子標的療法の進歩により造血器腫瘍の予後は大きく改善した。他方、そうした新薬が適応でないか、再発ハイリスクの症例では依然として同種移植が最後の治療法である。そうしたハイリスク症例が増えた結果として、移植を行ったにもかかわらず再発する割合は減っていない。移植後再発の1つの原因として移植片対腫瘍（GVL）効果が不十分であることが挙げられる。移植後の免疫を全般に高めれば GVH 病が増え致命的合併症を起こすため、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。その標的として、我々は新規マイナー抗原の同定を進めるとともに臨床応用を目指している。本年度は、これまで時間のかかったマイナー抗原遺伝子の同定を、公共のリソースである HapMap 計画で収集された細胞株と SNP データを用いることで短時間のうちに可能にする方法を開発した。これにより新規の抗原を2種類同定した。

臨床試験においては、これまで同定した造血系腫瘍特異的マイナー抗原を標的としたペプチドワクチンを開始し、臨床試験の適応となりうる症例を11例までリクルートしており、実際に2例に投与した。有害事象は認められておらず、今後臨床試験プロトコルに沿って投与量の増量をはかりつつ、免疫モニタリングにてデータの集積をはかる予定である。

A. 研究目的

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、移植の適応となる難治性造血器腫瘍では移植後も再発が20～50%と高率であるため、成績の改善の余地がある。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、多かれ少なかれ患者の主要臓器を傷害する移植片対宿主病

（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、もとは自己抗原である多くの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。実際、再発時にドナーリンパ球輸注を行って再寛解に到達する際に複数のマイナー抗原に反応する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が血中に 1% 程度まで増加しているという複数の報告がある。

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が、これまでの同定法では多大な時間を要した。

本年度は、過去にクローニングした HLA-A*0206 および B*4001 拘束性の CTL クローニングが認識する新規マイナー抗原を、免疫学的手法と HapMap 計画で収集された細胞株及び SNP データを組み合わせて解析するという新手法で同定に成功したことを中心に報告する。また、ワクチン療法の臨床試験の進捗状況についても報告する。

B. 研究方法

① 新規マイナー抗原の同定法の開発：国際 HapMap 計画に登録された日本人、中国人、白人由来の不死化 B 細胞株 (B-LCL) は米国の Coriell 財団から購入した。これらの B-LCL にマイナー抗原特異的 CTL の拘束性 HLA 分子が発現できるよう、レトロウイルスベクターを用いて cDNA を導入

した。各 B-LCL が CTL の抗原をもっているか (SNP 型が陽性か) の検討には ^{51}Cr 遊離法による細胞傷害性試験を用いた。得られたデータによりマイナー抗原陽性および陰性の表現型に分け、このパターンともっとも良く関連する SNP を HapMap のゲノムデータと照合することにより選択した (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各 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 のペプチドに加え、本年度 HLA-A24 拘束性の ACC-1^C ペプチドが GMP グレードで準備できたため、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、適応例に説明と同意後臨床試験を開始した。ワクチンは初期のがん抗原ペプチドワクチンの容量に準じ、30 マイクログラムからの 3 倍量の増量を別々の患者で行うこととした。アジュバントとして Montanide ISA51VG を用いた。主要評価項目として GVHD 誘発の有無とその他の有害事象、副次評価項目として抗腫瘍効果とマイナー抗原特異的免疫反応の誘導の程度を設定した。

(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に準拠し、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り、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