

図41-2 TNFRを介するアポトーシス誘導機構

のDEDと結合する。また、FLICEのカルボキシ末端領域には、活性部位にシステイン残基を有し認識配列のアスパラギン酸残基の直後を切断する酵素カスパーゼの活性化領域をもつ。このことからFLICEはカスパーゼ-8とも呼ばれる。カスパーゼ-8は定常状態では不活性な前駆体として細胞内に存在するが、この分子自身に認識および切断される配列をもつため、ひとたび活性化すると自己切断、あるいは近傍のカスパーゼ-8分子間で切断が起こり活性化型フォームとなる。このモデルは、DR分子がリガンド刺激により三量体を形成し、これに伴いDR分子の細胞内領域に会合したFADDおよびカスパーゼ-8が細胞膜近傍の微小領域に集族すると考えるとリーズナブルである。一方、活性化されたカスパーゼ-8はその基質としてカスパーゼ-3を認識および切断し、活性化を誘導する。活性化されたカスパーゼ-3はICAD [inhibitor of CAD (caspase-activated DNase)]の切断を介したCADの活性化を

誘導する。このようにカスパーゼ-3はICADを含むさまざまな細胞内タンパク質を基質として認識・切断し、これらタンパク質の不活性化あるいは活性化の誘導を介してDNAの断片化を促進しアポトーシス誘導の実行因子として働く。

## 2. アポトーシス調節経路

DR分子は前述したようにカスパーゼの活性化経路のみならず、さまざまな細胞内シグナル伝達経路を活性化する(図41-2)。これらを自動車にたとえるとカスパーゼ活性化経路はいわばアポトーシス誘導へのエンジンと位置づけられ、その他の経路はアクセルあるいはブレーキの役割を果たすと考えられる。免疫グロブリン $\kappa$ 鎖遺伝子の発現調節因子として同定されたNF- $\kappa$ B (nuclear factor of kappa B)は同じRelファミリー分子 (RelA/p65, RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1/p105/p50, NF- $\kappa$ B2/p100/p52の5種類)とのホモあるいはヘテロ二量体を形成す

る転写因子である。その後の解析からNF- $\kappa$ Bはさまざまな炎症性サイトカインなどの遺伝子発現に重要であることが明らかにされている。他のサイトカインによる刺激と同様、DRを介したシグナルもまたNF- $\kappa$ Bの活性化を誘導する。DRシグナルにおけるNF- $\kappa$ Bの役割については、その構成因子であるRelAの欠損細胞がTNF刺激によるアポトーシスに感受性であることからアポトーシスの抑制に働くと考えられている。DR分子によるNF- $\kappa$ B経路の活性化の詳細については依然として不明な点が多いが、現在DR分子の細胞内領域に直接的に結合するTRAF (TNF receptor associated factor)ファミリー分子 (TRAF1~6の6つの分子を含む)により活性化されることが示されている。なかでもTRAF2およびTRAF5は、これらの遺伝子のダブルノックアウトマウスの解析からTNF $\alpha$ によるNF- $\kappa$ Bの活性化に必須であることが示された。さらにTRAFタンパク質はRIP1 (receptor interacting protein kinase 1)のユビキチン化を行い、TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1)複合体 [TAB (TAK1 binding protein) 1/2およびTAK1の複合体]をRIP1へリクルートする (図41-2)。シグナル伝達経路においてTAK1はIKK複合体 (IKK $\alpha/\beta/\gamma$ の複合体)の上位に位置するキナーゼであり、リン酸化によりこれらIKK複合体の活性化を誘導する。NF- $\kappa$ Bは定常状態ではI $\kappa$ Bと細胞質内で結合しており、細胞核内への移行が阻害されている。活性化されたIKKはI $\kappa$ Bのリン酸化および分解を誘導する。I $\kappa$ Bより遊離したNF- $\kappa$ Bは細胞核内へ移行し、遺伝子の発現を誘導する。NF- $\kappa$ Bによるアポトーシスの抑制機構については、NF- $\kappa$ Bが転写因子であることから直接的にカスパーゼの活性化経路に関与するよりは新たなタンパク質の発現を誘導することによるものと考えられる。現在、NF- $\kappa$ Bを分子標的とした抗がん剤に関する創薬開発が進められている。これまでにNF- $\kappa$ Bにより発現誘導される因子のうち、アポトーシスを抑制する最も重要な因子についてはいまだ明確な結論が示されていないが、近年、ある種の細胞において、NF- $\kappa$ B活性化を介してTNF $\alpha$ 刺激により発現誘導される因子、cFLIP (FLICE inhibitory protein)が有力視されている。cFLIPはカスパーゼ-8

と似た構造をもち、アミノ末端領域にDEDを、カルボキシ末端領域にシステインプロテアーゼドメイン様構造を有するが、活性中心であるシステインがチロシンに変異しており、プロテアーゼ活性をもたない。cFLIPはカスパーゼ-8と結合し、その活性化を阻害することによりDRを介したアポトーシス誘導を抑制すると考えられている。

一方、TNF $\alpha$ を含むデスリガンドによる刺激はMAPKの1つであるJNKの活性化を誘導する。TNF $\alpha$ 刺激下におけるJNK経路の活性化が、アポトーシス誘導に対して抑制的であるのか促進的であるのかについては依然として多くの議論がなされているが、近年の報告では促進的に働くとする見解が優勢のようである。TNF $\alpha$ 刺激下において、JNKの活性化は刺激後10~30分において強く誘導され、刺激後60分までに速やかに消失する。一方、NF- $\kappa$ Bを介した遺伝子発現が遮断された条件下、たとえばNF- $\kappa$ Bの構成因子であるRelA遺伝子欠損やタンパク質産生阻害剤であるシクロヘキシミド存在下においては、TNF $\alpha$ 刺激後60分以降においてもJNKの活性化が認められる。また、前者の条件下ではTNF $\alpha$ 刺激による細胞死誘導は認められないが、後者の条件下では認められることから、TNF $\alpha$ 刺激による細胞死誘導と刺激後60分以降のJNKの活性化には密接な関係が存在することが示唆される<sup>2,3)</sup>。実際、TNFシグナルにおけるJNKの活性化に重要なASK1の遺伝子欠損細胞は、TNF $\alpha$ によるアポトーシス誘導に対して抵抗性であることが報告されている<sup>4)</sup>。TNFシグナルにおけるJNK経路のアポトーシス促進機構の詳細については依然として不明な点が多いが、近年、M. KarinらのグループはJNKが、cFLIPに対してE3ユビキチンリガーゼとして機能するitchタンパク質の活性を制御して、cFLIPのプロテオソーム依存的なタンパク質分解を誘導すること、また、この経路がTNF $\alpha$ による細胞死誘導に必須であることを示した<sup>5)</sup>。また、cFLIPはTNFシグナルにおいてJNK経路の活性化を抑制することも報告されており<sup>6)</sup>、cFLIPの発現制御はNF- $\kappa$ BやJNKによるカスパーゼ活性化経路の制御メカニズムの重要な作用点の1つと考えられる。これらのアポトーシス制御に働くシグナル分

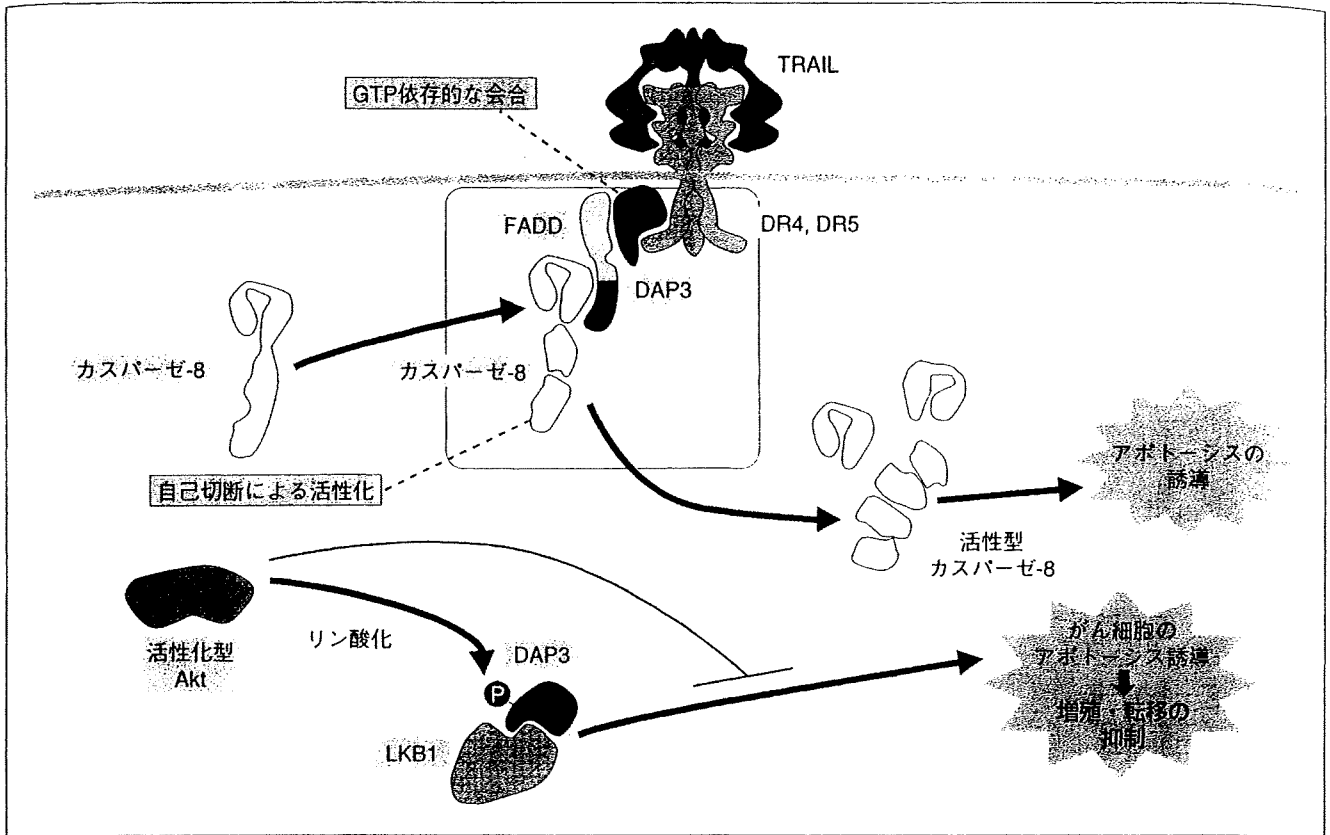


図41-3 DR4, DR5を介するDAP3およびLKB1のアポトーシス誘導機構

子は抗がん剤の標的分子として、今後、創薬開発への応用研究が期待される。

### 3. その他のデス受容体シグナルの制御分子

DAP3 (death-associated protein-3) は Fas,  $TNF\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  および DR4, DR5 を介したアポトーシスのシグナル伝達に重要な GTP 結合タンパク質である<sup>7-9)</sup>. DAP3 は FADD および カスパーゼ-8 と複合体を形成し、カスパーゼ-8 の活性化を介してアポトーシス誘導に働く (図41-3). また、DAP3 はミトコンドリアにも多く存在し、アポトーシスシグナルが伝達される際、ミトコンドリアの分断化および恒常性の維持に関与する<sup>10)</sup>.

また、DAP3 は細胞間接着の喪失により誘導されるアポトーシスとして知られるアノイキス anoikis の誘導にも重要であることが示されており、がんの転移抑制に働くことが示唆されている<sup>11)</sup>. DAP3 のアノイキス誘導能はセリン-トレオニンキナーゼの1つである Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog-1) によって制御されており、活性化された Akt により DAP3 がリン酸化されるとアノイキス誘導能が抑制される (図41-3). また Akt は

DAP3 のほかにもミトコンドリア膜電位の喪失によるアポトーシス誘導に関与する Bad (Bcl2-antagonist of cell death) のリン酸化と機能を抑制し、アポトーシスの阻害機能を有している<sup>12)</sup>. Akt はその活性化に働く PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), および抑制的に働く PTEN (phosphatase and tensin homolog) とともにがん組織において高頻度にその機能制御の喪失が認められており<sup>13)</sup>, 発がんとの相関性が示されている. DAP3 の遺伝子変異と発がんとの相関はまだ報告されていないが、デス受容体のシグナル伝達に関与し、その機能制御に Akt が関与していることから、発がんあるいはがん細胞の増殖に DAP3 が関与していることが推定される.

骨肉腫細胞では、TRAIL によるアポトーシス誘導が起こりにくいため、筆者らは TRAIL 感受性の調節に関与する DAP3 会合分子のスクリーニングを行った. その結果、得られた分子の1つは LIP1 (LKB1 interacting protein 1) であり、この分子はがん抑制遺伝子 *LKB1* (*STK11*) の機能調節因子であった. LKB1 は LIP1 とともに DAP3 と会合し、TRAIL 刺激によるアポトーシス誘導シグナル伝達経路にかかわることが示され、骨肉腫治療の標的分子となる可能

性が示唆された(図41-3)<sup>14)</sup>。また、LKB1は口唇、口腔内、指などの色素沈着と小腸を中心とした消化管に多発性のポリープが生じる遺伝性疾患ポイツ・イエーガー症候群Peutz-Jeghers syndrome (PJS)の原因遺伝子として知られているセリン-トレオニンキナーゼである<sup>15)</sup>。PJSは優性遺伝の先天性遺伝子疾患として知られ、常染色体上の19p13.3に位置するLKB1遺伝子の変異により発症する。また、その遺伝子変異はLKB1のキナーゼ活性にかかわる部位に集中している。PJS患者では腸管で多発

するポリープががん化するリスクは低いとされるが、その一方で膵臓がん、乳がん、肺がん、卵巣がんおよび子宮がんを発症するリスクが高いことから、LKB1はがん抑制遺伝子と考えられている。実際、K-ras [Kirsten rat sarcoma-2 viral (v-Ki-ras2) oncogene homolog]の変異を有するマウス肺がんモデルではLKB1の遺伝子欠損は他のがん抑制遺伝子であるp53やInk4a/Arf (Cdkn2a)の遺伝子欠損に比べ、腫瘍転移の著しい増大が認められており<sup>16)</sup>、がん抑制遺伝子としての重要性が示されている。

#### //// 文 献 ////

- 1) Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 169: 1747-1756, 1989.
- 2) De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G: Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature*, 414: 308-313, 2001.
- 3) Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A: Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, 414: 313-317, 2001.
- 4) Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H: ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, 2: 222-228, 2001.
- 5) Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, Liu YC, Karin M: The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF alpha-induced cell death by inducing c-FLIP (L) turnover. *Cell*, 124: 601-613, 2006.
- 6) Nakajima A, Komazawa-Sakon S, Takekawa M, Sasazuki T, Yeh WC, Yagita H, Okumura K, Nakano H: An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J*, 25: 5549-5559, 2006.
- 7) Kissil JL, Deiss LP, Bayewitch M, Raveh T, Khaspekov G, Kimchi A: Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J Biol Chem*, 270: 27932-27936, 1995.
- 8) Kissil JL, Cohen O, Raveh T, Kimchi A: Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *EMBO J*, 18: 353-362, 1999.
- 9) Miyazaki T, Reed JC: A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol*, 2: 493-500, 2001.
- 10) Kim HR, Chae HJ, Thomas M, Miyazaki T, Monosov A, Monosov E, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC: Mammalian dap3 is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis. *FASEB J*, 21: 188-196, 2007.
- 11) Miyazaki T, Shen M, Fujikura D, Tosa N, Kim HR, Kon S, Uede T, Reed JC: Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem*, 279: 44667-44672, 2004.
- 12) del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 278: 687-689, 1997.
- 13) Castellino RC, Durden DL: Mechanisms of Disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node-an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol*, 3: 682-693, 2007.
- 14) Takeda S, Iwai A, Nakashima M, Fujikura D, Chiba S, Li HM, Uehara J, Kawaguchi S, Kaya M, Nagoya S, Wada T, Yuan J, Rayter S, Ashworth A, Reed JC, Yamashita T, Uede T, Miyazaki T: LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res*, 27: 761-768, 2007.
- 15) Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA: A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391: 184-187, 1998.
- 16) Ji H, Ramsey MR, Hayes DN, Fan C, McNamara K, Kozlowski P, Torrice C, Wu MC, Shimamura T, Perera SA, Liang MC, Cai D, Naumov GN, Bao L, Contreras CM, Li D, Chen L, Krishnamurthy J, Koivunen J, Chirieac LR, Padera RF, Bronson RT, Lindeman NI, Christiani DC, Lin X, Shapiro GI, Jänne PA, Johnson BE, Meyerson M, Kwiatkowski DJ, Castrillon DH, Bardeesy N, Sharpless NE, Wong KK: LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*, 448: 807-810, 2007.

## 第30章 がんペプチド免疫治療

佐藤昇志<sup>\*1</sup>, 廣橋良彦<sup>\*2</sup>, 塚原智英<sup>\*3</sup>,  
田村保明<sup>\*4</sup>, 一宮慎吾<sup>\*5</sup>, 鳥越俊彦<sup>\*6</sup>

### 1 要旨

ヒト癌特異抗原の研究が大きく進展し、日常臨床の現場で世界的に臨床試験が行われてほぼ10年を経過した。その結果、創薬への移行が期待できる成果がみられつつあり、実際、国際レベルで認可をうけようとしているヒト癌ワクチンの候補もでてきている。世界的メガファーマも本格的にのりだし、わが国の製薬企業も本腰を入れだした。流れは出来た。恐らくいくつかは創薬として具現化されるであろう。さらにすぐれた創薬ワクチンになるには何が必要か、どのようなことをクリアすべきか、またどのような課題についてさらに基礎研究すべきかを概説した。

### 2 はじめに

免疫学が大きく進展し、ヒト癌に対する免疫応答も飛躍的な進歩をとげてきた。1980年代までの一時期はヒト癌に免疫応答などは存在しないのではないのか？ ヒト腫瘍抗原などは存在しないのではないのか？ ヒト癌免疫が成立しているのなら、なぜかくも癌が進行するのか？ 等々、癌免疫に関しては否定的、厭世的な空気が支配していた。実際1980年代末の米国癌学会(AACR)でも日本癌学会でもヒト癌免疫に関する発表は極めて少ない時代を迎えていた。しかし、1992年にベルギーブリュセルのブーン博士らによりCTLクローンが認識するヒトメラノーマ腫瘍抗原がはじめて発見され、サイエンス誌で発表された。この時点で状況は一変した。まさにエポックメイキング的な研究であり、多くの免疫学者、癌研究者を驚かせた。他方、我々ヒト

---

\* 1 Noriyuki Sato 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座 教授

\* 2 Yoshihiko Hirohashi 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 3 Tomohide Tsukahara 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 4 Yasuaki Tamura 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 5 Shingo Ichimiya 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

\* 6 Toshihiko Torigoe 札幌医科大学 医学部 病理学第一講座

癌免疫研究をずっと持続していた研究者はこの発見に必ずしも驚かなかった。なぜなら、多くのヒト癌免疫研究者がその時点では程度に強弱はあれ、患者リンパ球が自家腫瘍に明らかに特異的、HLA 拘束性に反応することを観察していたし、私どもの研究室では CTL クローンレベルでそのような反応が多く患者でおこることをリコンビナント IL-2 が入手可能となった 80 年代半ばには、みているからである。

以後図 1 に示すような CTL の直接の標的である HLA クラス I 提示ヒト腫瘍抗原同定の研究が盛んに行われ、早い時期からこれらの抗原を用いた癌ワクチン臨床試験も全世界で様々な腫瘍抗原について行われるようになった<sup>1)</sup>。製薬企業やベンチャー企業との共同研究も近年は加速され、GSK や武田製薬など（表 1）大きな製薬企業も開発に乗り出してきている。ハーセプチンなど抗体医薬がその発見から創薬具現化まで 20 年を要したが、T 細胞癌ワクチンも 2012 年で発見から 20 年になる。恐らくは 2012 年までには世界のメガファーマがひとつあるいは複数の癌ワクチンを創薬化、市販化するであろう。抗体ワクチンと違い、CTL をドライブする癌ワクチンの基盤はとてつもなく広く大きく、すべての癌を対象とできる可能性があり、長年待望されていた治療型癌ワクチンが本当に日常臨床の癌治療のモダリティになると考えられる<sup>2)</sup>。

とはいえ、まだ本当に効力の優れた癌ワクチン開発には至っていない。ここしばらくはそれらの開発研究が大切である。ここではその現状を示し、我々の研究成果を中心にいくつかの点を解説し、一日も早い癌ワクチン創薬の具現化にはどのようなことが必要なのかを述べたい。

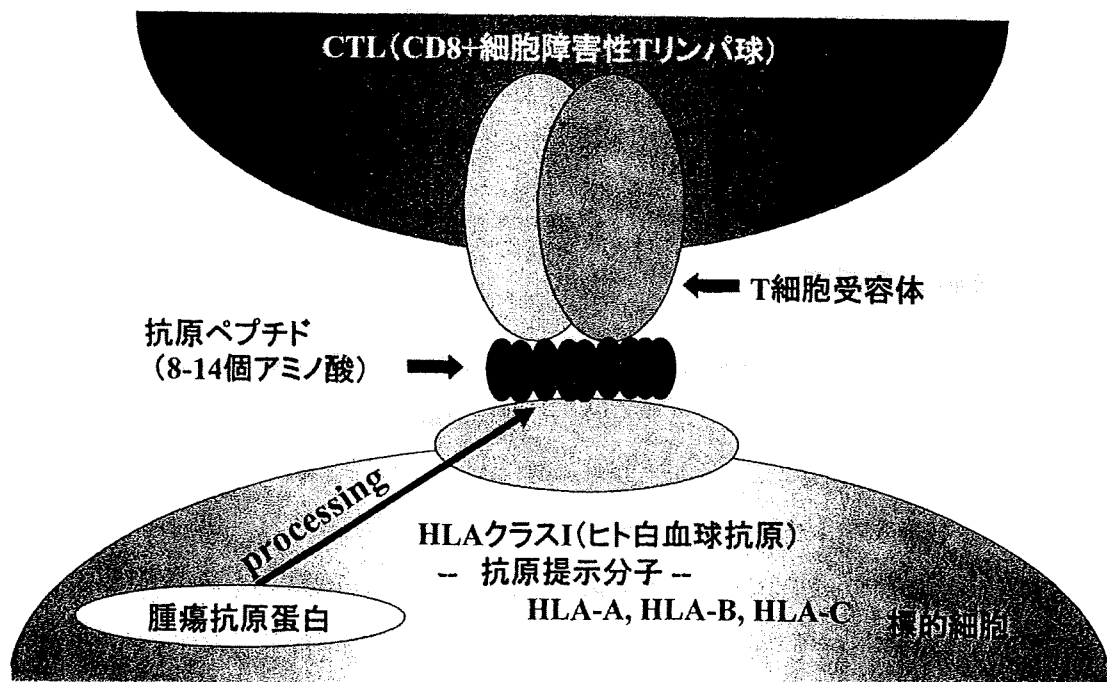


図 1 CD 8 陽性 CTL (細胞障害性 T 細胞; cytotoxic T lymphocyte) による標的細胞破壊

表1 札幌医大第1病理で同定されたヒト癌ワクチン候補

(2008年8月)

腫瘍	ペプチド(ワクチン)	親蛋白	HLA	臨床試験	報告
<b>A) 自家腫瘍</b>					
胃癌	F 4.2 (YSWMDISCWI)	c 98	A 31		<i>J. Immunol.</i> ,(1998)
骨肉腫	PBFP (CTACRWKKACQR)	PBF	B 55	予 定	<i>Cancer Res.</i> ,(2004)
	(AYRPVSRNI)		A 24	予 定	<i>Cancer Sci.</i> ,(2007)
			A 2	予 定	<i>JTM</i> ,(2008)
<b>B) リバースイミノロジー</b>					
1) アポトーシス関連					
種々	2 B (AYACNTSTL)	survivin 2 B	A 24	進行中	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2002) <i>JTM</i> ,(2004), (2008)
	C 58 (FFCFKELEGW)	survivin	A 24	予 定	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2004)
種々	L 7 (KWFPSSCQFLL)	livin	A 24	進行中	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2005)
2) 染色体転座					
滑膜肉腫	A (PYGYDQIMPK)	SYT-SSX	A 24		<i>J. Immunol.</i> ,(2002)
	B (GYDQIMPCK)	SYT-SSX	A 24	進行中	<i>J. Immunol.</i> ,(2002) <i>JTM</i> ,(2005)
	K 9 I (GYDQIMPKI)	SYT-SSX	A 24	進行中	<i>J. Immunol.</i> ,(2004)
<b>C) バイオインフォマティクス</b>					
種々	HIFPH 3-8 (RYAMTVWYF)	HIFPH 3	A 24	予 定	<i>Clin. C. Res.</i> ,(2008)
	Cep 55-10 (VYVKGLLAKI)	Cep 55 (C 10 orf 3)	A 2, A 24	予 定	
	AMACR 2 (NMVEGTAYL)	AMACR	A 24	予 定	
	STEAP-B (QYFYKIPIL)	STEAP	A 24	予 定	
	Lengsin (N. D.)	Lengsin	A 24		
<b>D) SP テクノロジー (癌幹細胞抗原)</b>					
種々	SOX-2-109	SOX-2	A 24	予 定	
	CT antigen A, INTS 1				

### 3 ヒト腫瘍抗原同定

現時点でCTLが認識するヒト腫瘍抗原はメラノーマを中心に多数同定されている。解析は①オーソドックスであるが最も重要なシステムである自家腫瘍とCTLクローンを用いたもの、②リバースイミノロジー的手法によるもの、③バイオインフォマティクスの方法によるもの、などがある。これらの様々な手法を用いて現時点で同定された腫瘍抗原は、正確な数はわからないが、メラノーマでは20～50抗原、上皮性腫瘍、肉腫などで50～70の抗原が少なくとも同定されていると思われる。これらについては他の総説<sup>1)</sup>、あるいはHPアドレス <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase>などを参照されたい。

ここでは我々が同定した腫瘍抗原について述べる。表1に示すように過去14,15年間にわたり

一貫して CTL が認識する腫瘍抗原の同定に我々は力を注いできた。すなわち、①自家腫瘍の解析系<sup>3~6)</sup>、②リバーシムノロジーの方法<sup>7~10)</sup>、③DNA マイクロアレイを利用したバイオインフォマティクスによる手法<sup>11)</sup>、そして④SP (side population) 手法を利用したヒト癌幹細胞 (cancer stem cell ; CSC) の分離による CSC 腫瘍抗原の同定、などにより研究を進めた。その結果いずれの手法、解析法でもヒト腫瘍抗原を同定し得た。ここでいう腫瘍抗原とはあくまで CTL が標的とする immunogenic epitope であるということが大事である。例えばリバーシムノロジーではいくつもの腫瘍抗原の候補は考えられるわけである。すなわち、正常で発現がないか、きわめて弱いもので、かつ、腫瘍で高発現をみせるものである。しかし、これらのすべてが CTL エピトープになるとは限らず、むしろそうならない場合が多い。バイオインフォマティクスによる状況も同様であり、実際我々は DNA マイクロアレイによるスクリーニングの結果、約 300 の腫瘍抗原分子を発現プロファイルの側面からとらえた。しかし、これらのうち 5 つのみ (HIFPH 3, Cep 55, AMACR, STEAP, Lengsin) が CTL の標的になるという事実が判明し<sup>12)</sup>、実に残り 295 の蛋白分子は CTL に non-immunogenic であり、免疫学的にトレラントな可能性が考えられたのである。SP テクノロジーによる CSC 腫瘍抗原については後述する<sup>1)</sup>。

#### 4 癌ワクチン臨床試験

2002 年に我々が HLA-A 24 提示抗原ペプチドとして同定した IAP (inhibitor of apoptosis protein) 由来の survivin 2 B ペプチド (surv 2 B) は 2003 年 12 月から第一相臨床試験に入った。5 年計画で主に大腸癌を対象として臨床試験を行った<sup>1, 12~15)</sup>が、3 つのプロトコルを準備した。①surv 2 B のみ、②surv 2 B + IFA (モンタニド)、そして③DC の分化、活性化に最も重要なサイトカインと考えられる IFN $\alpha$  を併用した surv 2 B + IFA + IFN $\alpha$  の合剤である。その結果、特記すべき副作用はみられず、興味深い臨床効果、および免疫応答の結果が得られた。すなわち、surv 2 B ペプチド単独でも症例により臨床効果あるいは免疫応答を惹起、誘導しえること、+ IFA とは大差ないこと、他方、+ IFN $\alpha$  のプロトコルではより高い頻度で明らかな臨床効果、免疫応答を得られること、が判明した。この③のプロトコルでは 4/6 例に CEA の上昇の停止あるいは低下がみられ、また CT 上で PR あるいは SD をみせたのが 4/6 例、そしてテトラマー、ELISPOT で明らかな反応を示したのが 3/6 例であったのである。そのうちの 1 例の経過を図 2 に示す。ここでは surv 2 B ペプチド + IFA + IFN $\alpha$  の投与後の CEA の値の変動を示しているが、回数を経るごとに CEA が低下し、正常化している。テトラマー、ELISPOT も pre と post vaccination で明らかに CTL の数の増加をみた。さらに 3rd vaccination のテトラマー陽性 CTL をソーティングしたものが図 3 であるが、ほとんどすべての well の T 細胞が surv 2



※手術時腫瘍組織: HLA-Class I強陽性、Survivin強陽性

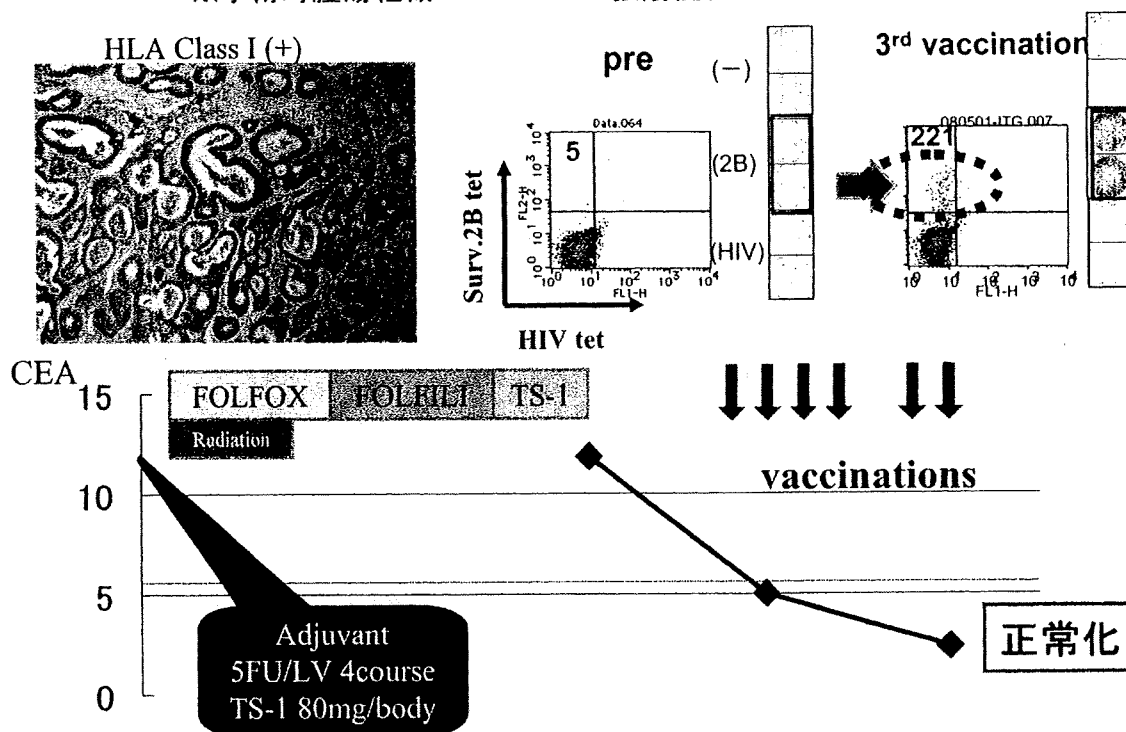


図2 症例 (3)-6 (直腸癌; stage IV) 免疫応答と腫瘍マーカー推移  
vaccination: Survivin-2 B peptide + IFA + IFN- $\alpha$

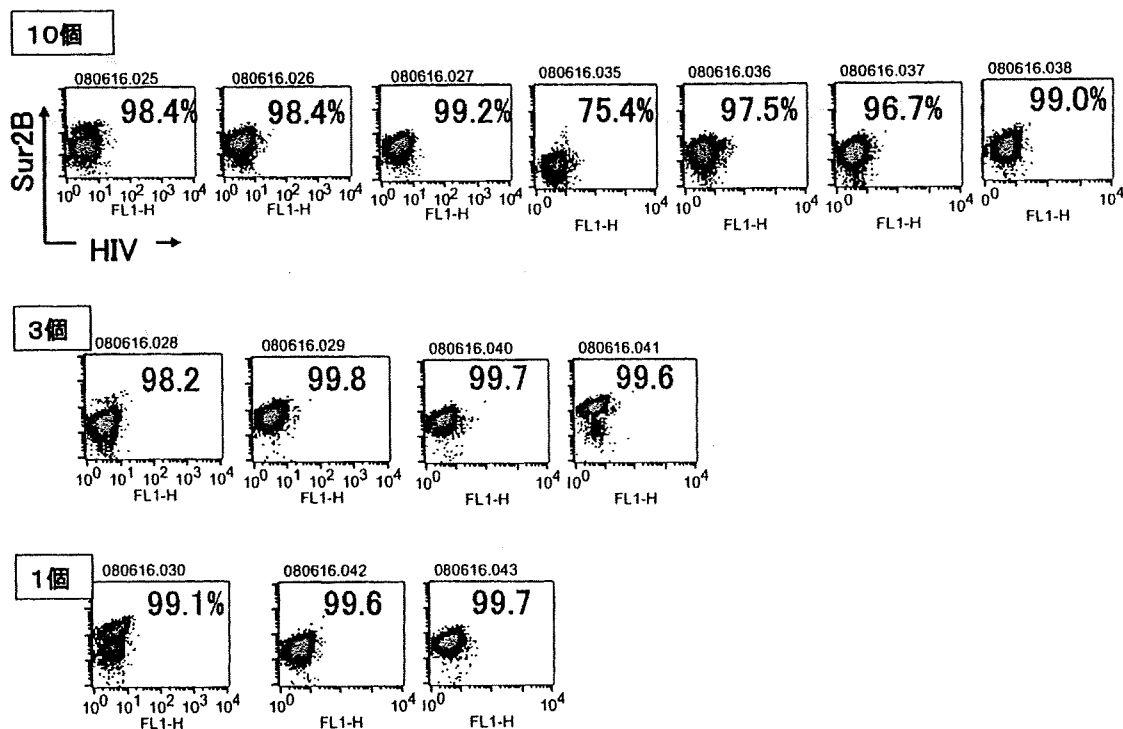


図3 大腸癌患者 (3)-6 CTL の single cell sorting と tetramer analysis

B テトラマーに陽性であり、かつそれらの多くが surv 2 B ペプチド特異的に認識され、標的細胞を破壊することが示された。このようにあざやかな CTL のモニタリングが他の症例でも観察され、図 4 には進行膵癌の症例であるが vaccination 後、ほぼ 3 年間以上も CA 19-9 が正常値を保ち、テトラマー、ELISPOT ともに明らかに検出され、これら CTL のソーティングでも surv 2 B ペプチド特異的標的細胞障害も示された。これらの事実は surv 2 B + IFA + IFN $\alpha$  のプロトコールが癌患者でこのペプチド特異的 CTL を誘導し、活性化し、それらが腫瘍局所で抗腫瘍効果を発揮していることを示唆するものといえる。表 1 に示した我々が同定した他の CTL エピトープも同様な期待がもたれる。それらが創薬化できるか否かについては地道な臨床試験をひとつずつ行い、長い時間は必要とするがピックアップしていくより他にない。持続的な基礎と臨床の腫瘍免疫研究者の努力が大切であり、互いに共通の目標に向かった高い志が必要なゆえんである。

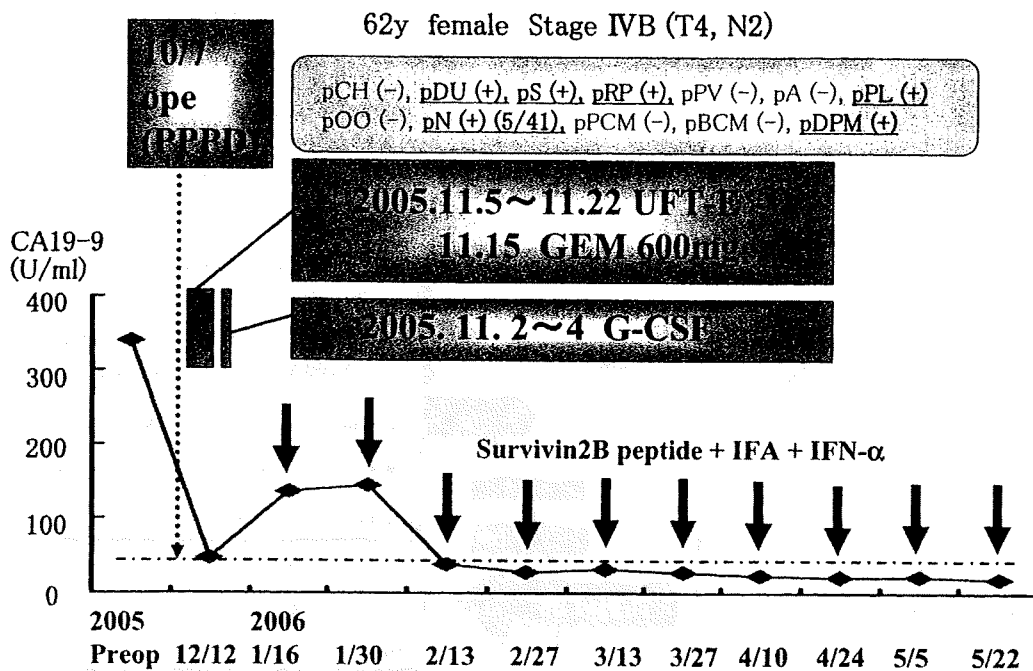


図 4 症例 6 (膵癌) 免疫応答と腫瘍マーカー推移  
vaccination : Survivin-2 B peptide + IFA + IFN- $\alpha$

## 5 ヒト癌幹細胞 (CSC) 腫瘍抗原の同定と癌免疫治療への応用

上述のようにヒト腫瘍に発現する腫瘍抗原, さらに CTL が標的とする HLA 提示 CTL エピトープも多数同定され, 臨床試験も世界中で行われているわけである。他方, 免疫学的により優れた腫瘍抗原検索の研究も極めて大切である。すなわち, 癌研究でトピックスになりつつある癌幹細胞と, これに発現する腫瘍抗原 (cancer stem cell tumor antigens ; CSC Ag) の同定である。我々は CSC Ag の同定を, ほぼ 20 年前から研究着手していた。図 5 に示すようにラット正常胎児線維芽細胞 WFB, あるいは BALB/C マウス胎児線維芽細胞 BALB/3 T 3 に様々な活性型癌遺伝子をトランスフェクトし, 様々な tumorigenic clones を得た。例えば ras 癌遺伝子で得られた W 31, Brash などは  $10^3$  個で 2 W で腫瘍形成を同系ラット, 同系マウスにみせ, 4 W では 1 cm 以上の径を示す極めて造腫瘍性の高いクローンであった。CSC のひとつの重要な特徴として cancer initiating ability が考えられているが, 真にこの特徴を持つものであり, 我々は WFB, BALB/3 T 3 に発現なく, かつ W 31, Brash に高発現の細胞表面腫瘍抗原を単クローン抗体樹立により解析した。その結果, いくつかの抗原を得ることに成功し, ひとつは HSP (heat shock protein) 70 様の分子であり<sup>16)</sup>, あるいは CD 44 であった<sup>17)</sup>。2000 年代に入り, とくに後者は様々なヒト腫瘍の CSC マーカーとなり得ることがわかり, 我々の研究が基盤となった。し

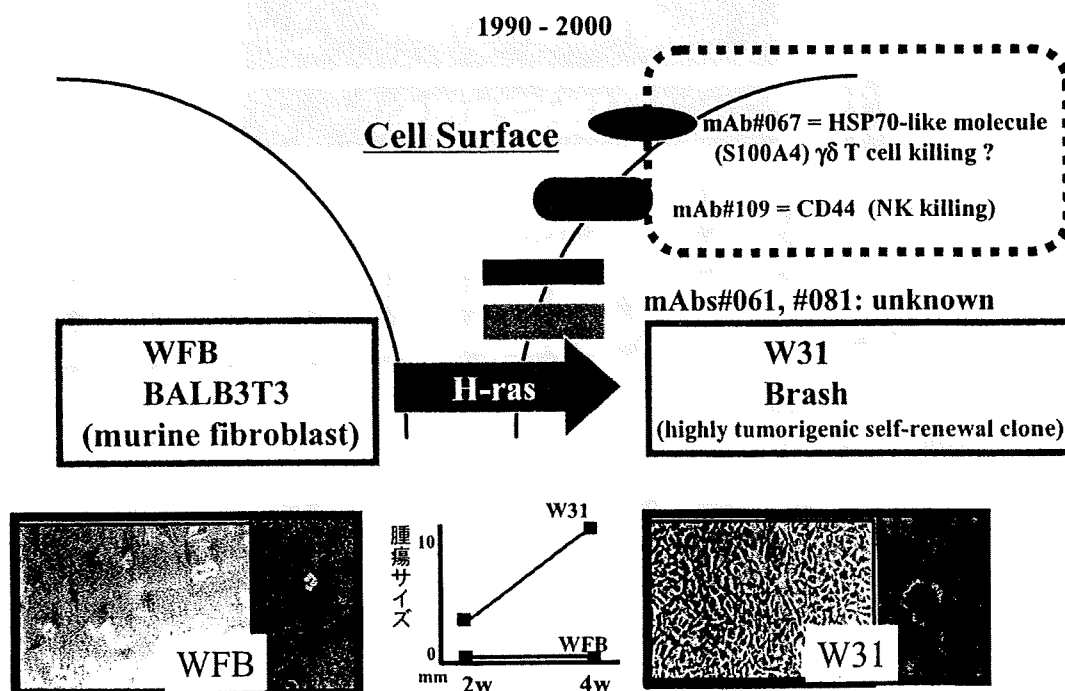


図 5 Murine fibroblasts (WFB/BALB 3 T 3) の腫瘍化に伴う腫瘍抗原発現解析  
 -W 31 and Brash cells as cancer initiating cell counterparts-

かし CD 44 は血管内皮等にも多量に発現し、腫瘍免疫の標的とすることは危険であり、他の CSC Ag の探索を続けた。

数年前、CSC の多くが ATP binding cassette をもつ ABC transporters を発現していることが知られ、これを利用した CSC 分離の可能性が示唆されていた。すなわち Hoechst 33342 等の色素染色を指標にする FACS 上での side population (SP) に CSC が集約される現象である。我々の解析結果に示すように腫瘍細胞によりこの SP technology が有効であることが判った<sup>1)</sup>。図 6 に示すように LHK 2 ヒト肺癌細胞株から SP と non-SP (main population ; MP) をソーティングし、NOD/SCID マウスに移植した。その結果 SP 分画中の 15 個の細胞で明らかな腫瘍形成をみせ、一方、MP 分画は 150,000 個の細胞が必要であった。すなわち、SP 分画細胞は明らかな cancer initiating ability を有していた。DNA マイクロアレイにより SP > MP の腫瘍抗原を解析、その結果 SP 分画に発現する CSC Ag を同定した。ひとつは cancer testis (CT) antigen の特徴を有する SMCP (sperm mitochondrial cystein-rich protein) であり、もうひとつは SOX-2 であった。図 7 には SOX-2 のヒト乳癌の原発組織の免疫染色を示す。case 1 のように多くの乳癌細胞が SOX-2 を発現するも、むしろ多くのケースで case 2 のように一部の腫瘍細胞のみが発現していることが判った。我々は SOX-2 の HLA-A 24 提示 CTL エピトープでもすでに決定しており、近日中にこの抗原ペプチドを用いた事 CSC Ag の世界ではじめての癌ワクチン臨床研究を開始する予定であり、成果が大いに期待される。

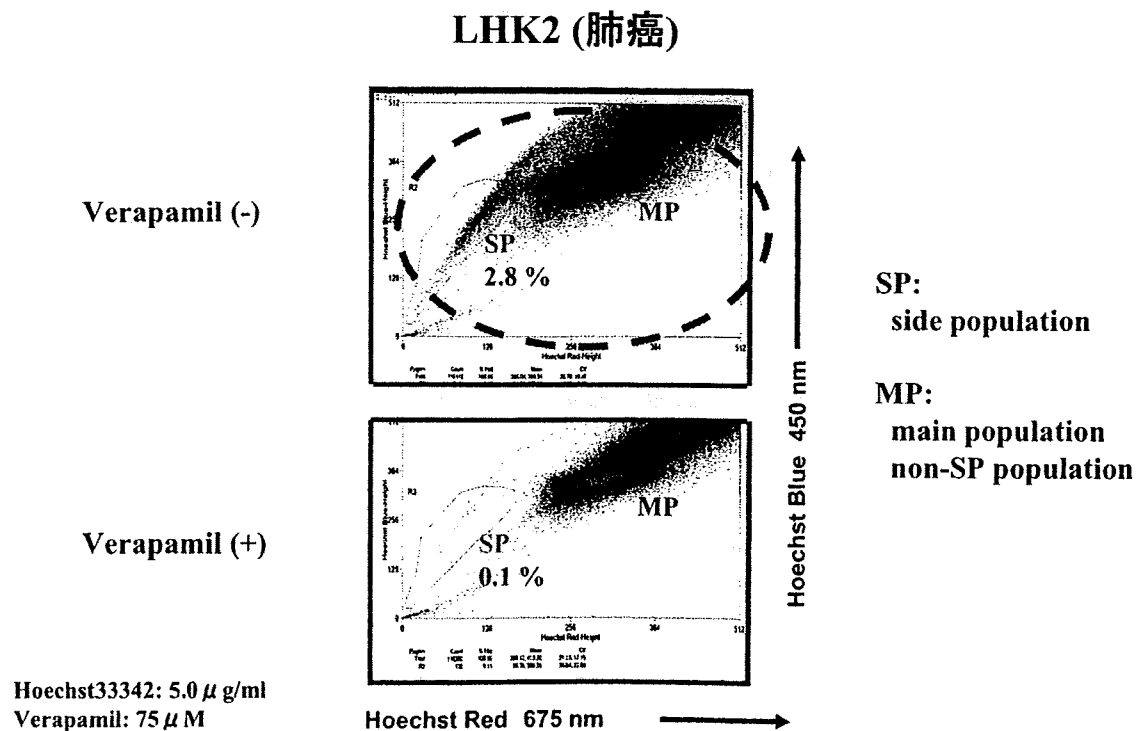


図 6 Side Population (SP)

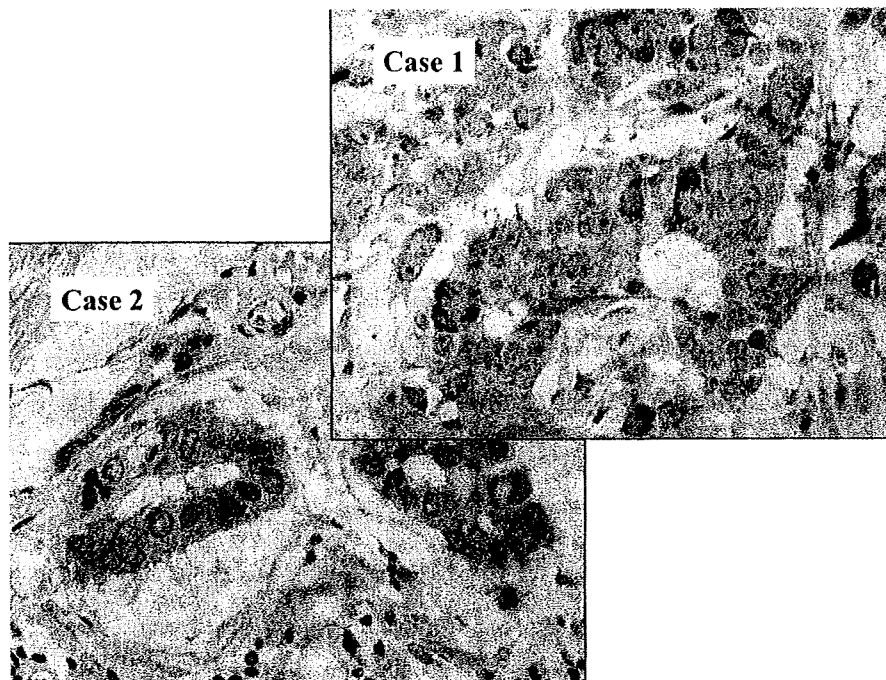


図7 乳癌 SOX-2 発現

## 6 癌ワクチン免疫原性の増強, 制御

上に述べたような CTL が標的とし, かつ CTL 誘導, 活性化する癌抗原蛋白, 抗原ペプチドの持続的研究はヒト癌免疫研究の「いろは」の「い」であり, 今もって最も重要である。他方, これらの抗原だけでは臨床的に有効な癌治療法のひとつとはなり得ないことも事実であろう。従ってこれらの抗原の免疫原性を増強する方法の開発も極めて重要である。古くよりいわゆるアジュバントと称し, 様々な物質, 製剤が存在するが, しかし, 癌ワクチンにとり, その増強の機構がロジカルに判明し, CTL を誘導することが判っているのは実際のところない。これからの重要な研究テーマである理由でもある<sup>1, 18~21)</sup>。

我々は, このような背景のもと, 癌抗原の免疫原性の増強に重要な分子の同定を進めてきた。その結果, 熱ショック蛋白質 (heat shock protein ; HSP) のあるものがこのような活性を選択的にもつことが明らかにされつつある<sup>1)</sup>。図8に示すように近年, 抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) やマクロファージの活性化 (自然免疫活性化) 機構が解明された。すなわち TLR, non-TLR などが自然免疫活性化に重要な APC 細胞表面あるいは細胞内受容体として明らかにされたわけである<sup>20)</sup>。感染症で外因性リガントとして細菌 LPS やウイルス核酸の様々な分子が働くことがわかっている。一方, 内因性リガントのひとつの重要な分子として HSP も知られ, HSP 60 は TLR 2, HSP 70 は TLR 4 を受容体とする。HSP 90 は未だどのような受容体かは不明であ

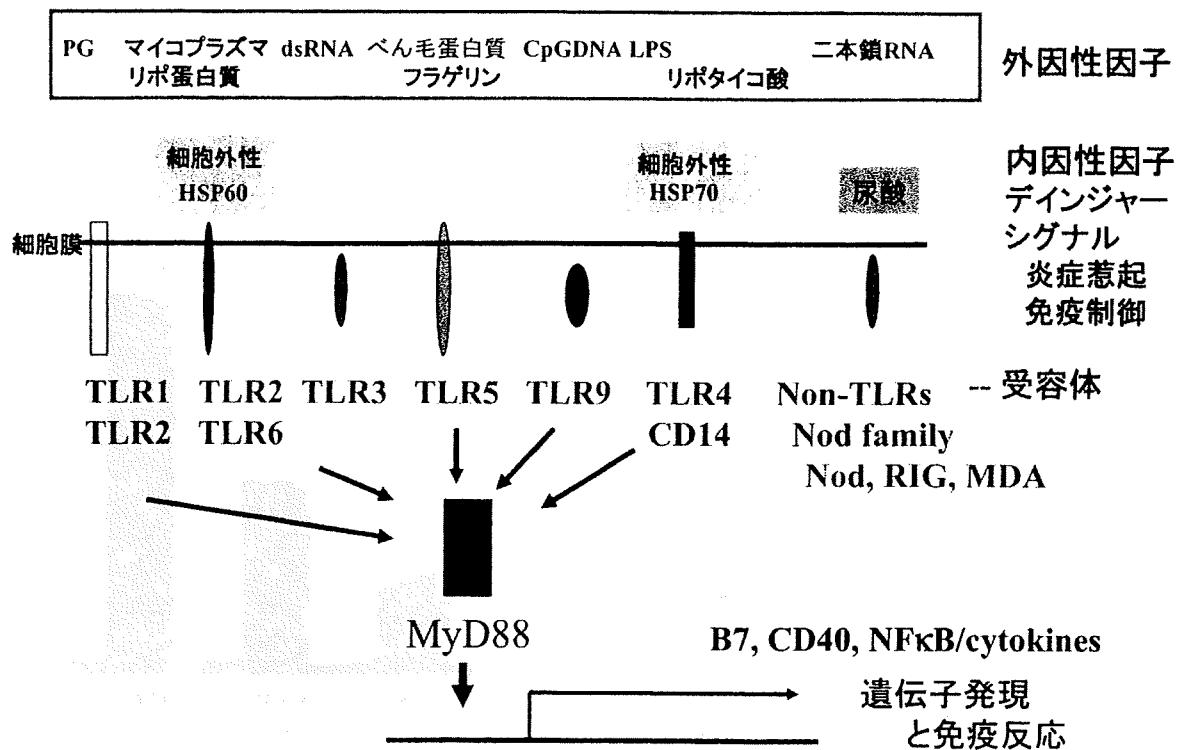


図8 自然免疫活性化に関わる外因性因子, 内因性因子と受容体

るが、DCに外からHSP90を加えるとIFN $\alpha$ を効率よく産生する。

これらHSPが外因性リガントと決定的に異なる側面はHSPが分子シャペロンであり、抗原蛋白、抗原ペプチドを含む種々の分子と会合状態にあり、それら複合体の形で、DCに取り込まれることである。例えばHSP90と癌抗原ペプチド結合体を作りDCに取り込まれると、DC内で抗原ペプチドのMHCクラスIルートへの提示、すなわちクロス提示が大変有効になされること、我々の研究より明らかにされた。CTLの誘導効率は現在最も強力なアジュバントとされるCFAに匹敵する<sup>19)</sup>。In vivoの腫瘍拒絶モデルで、このことを実証した(図9)。すなわち、HLA-A\*2402トランスジェニックマウスに発癌剤メチルコラントレンを投与し、形成された皮膚腫瘍からTG3細胞を株化し、さらにTG3にサバイビン2B遺伝子を移入し、TG3-surv2Bを樹立した。この細胞をトランスジェニックマウスに移植し、HSP90-surv2Bペプチド複合体をvaccinationすると、ペプチド単独より明らかな腫瘍増強低下をみせた。HSP90はその結合体を初期エンドソームにある一定時間とどめることを我々は独自に観察している。例えばHSP90とCpGDNAの結合体も初期エンドソームに処理後2時間の長きにわたりとどまる。その結果、CpGDNA単独ではIFN $\alpha$ 誘導を示さないcDC(conventional DC)もHSP90-CpGDNAでは示すようになった。

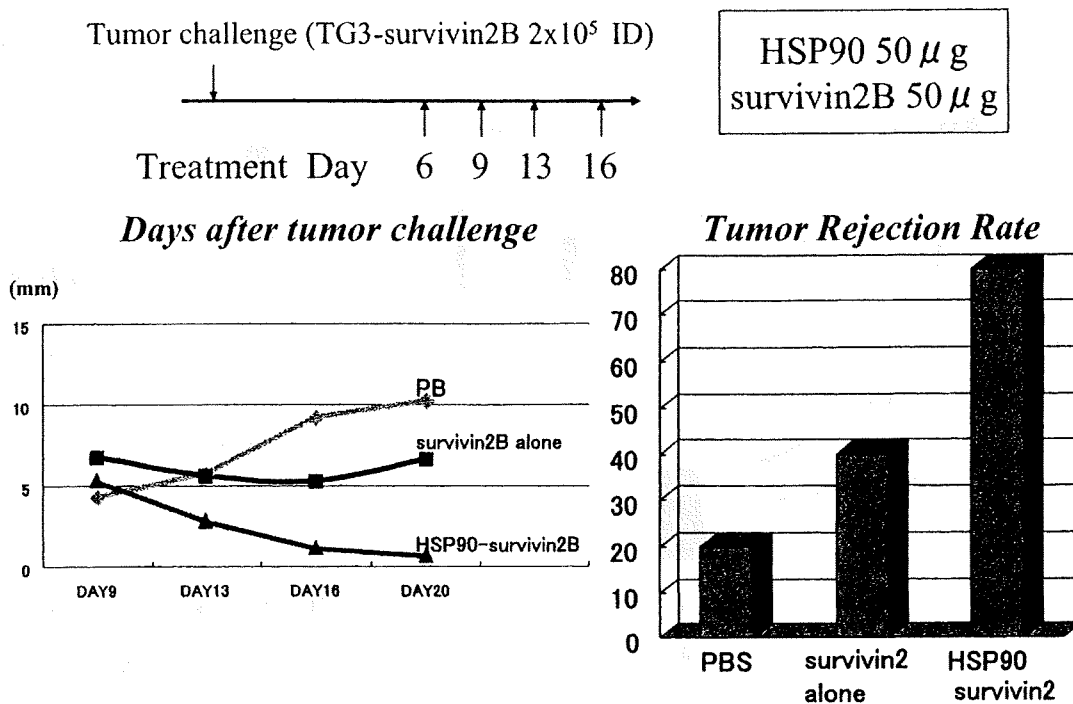


図9 細胞外性 HSP 90-survivin 2 B がんペプチド複合体による *in vivo* 免疫増強

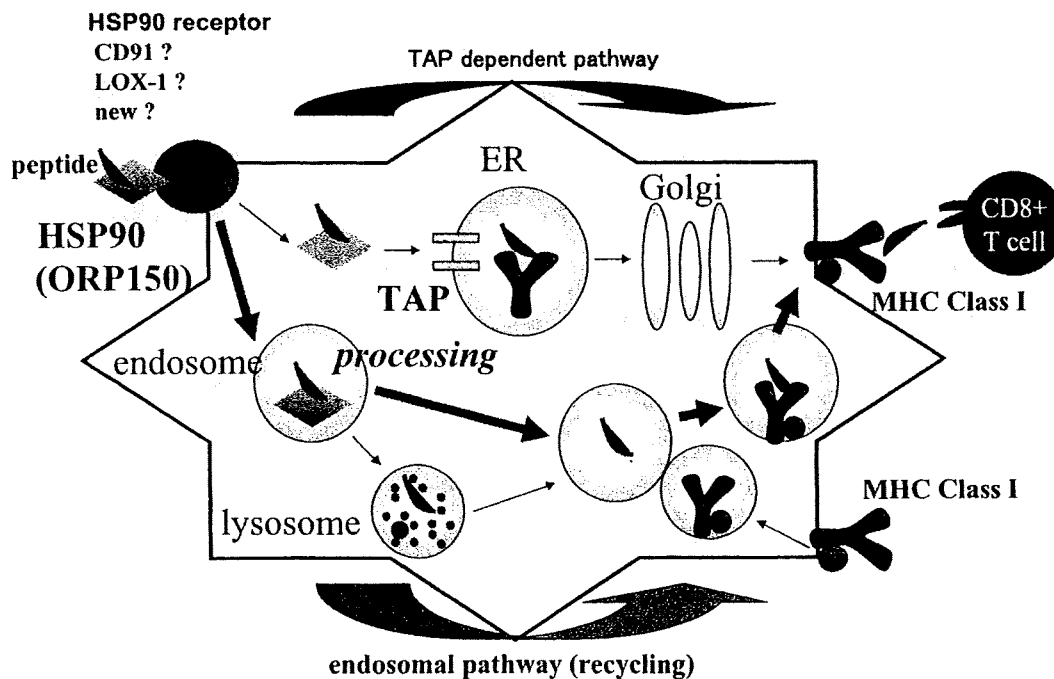


図10 細胞外性の HSP 90 結合抗原ペプチドはエンドゾーム経由で HLA クラス I に高効率で交叉提示される

以上のように HSP 90 は DC を①サイトカイン産生活性に導くばかりでなく、②CTL エピトープのクロス提示、相方を担う免疫増強性因子であることが示唆された (図 10)。

## 7 免疫抑制の解除

腫瘍に免疫学的なエスケープ機序が存在することが明らかであり、多くの事実が今日まで示されている。様々な側面のうち、最も代表的なものは MHC class I 分子の発現低下である。我々はこの課題を解析するため、数年前に病理パラフィン切片上でも検出可能な抗 HLA-クラス I 単クローン抗体 (EMR 8-5) を樹立した (すでに市販化)。その結果、驚いたことに乳癌および前立腺癌では 80%以上の症例で HLA-クラス I が大きく発現低下していることが判明した。その機序を解析したところ、多くの症例で  $\beta 2$  ミクログロブリン (B2M) 遺伝子領域のエピジェネティックな制御による発現低下であることが判明した。特にヒストン脱アセチル化 (HDAC) によるものであることがわかり、HDAC のうち、HDAC1 あるいは HDAC3 酵素の発現上昇によるものであることが示唆された。こうなると HDAC 阻害剤による B2M-HLA クラス I 分子の発現回復の可能性が出てくるが、図 11 に示すようにその可能性が確認された。すなわち HDAC 阻害剤バルプロ酸 (デパケン) 処理によりヒト MCF7 乳癌に B2M, HLA クラス I 重鎖の発現が明らかに増しており、また細胞表面発現の回復もみられた。このことは HDAC 阻害剤によ

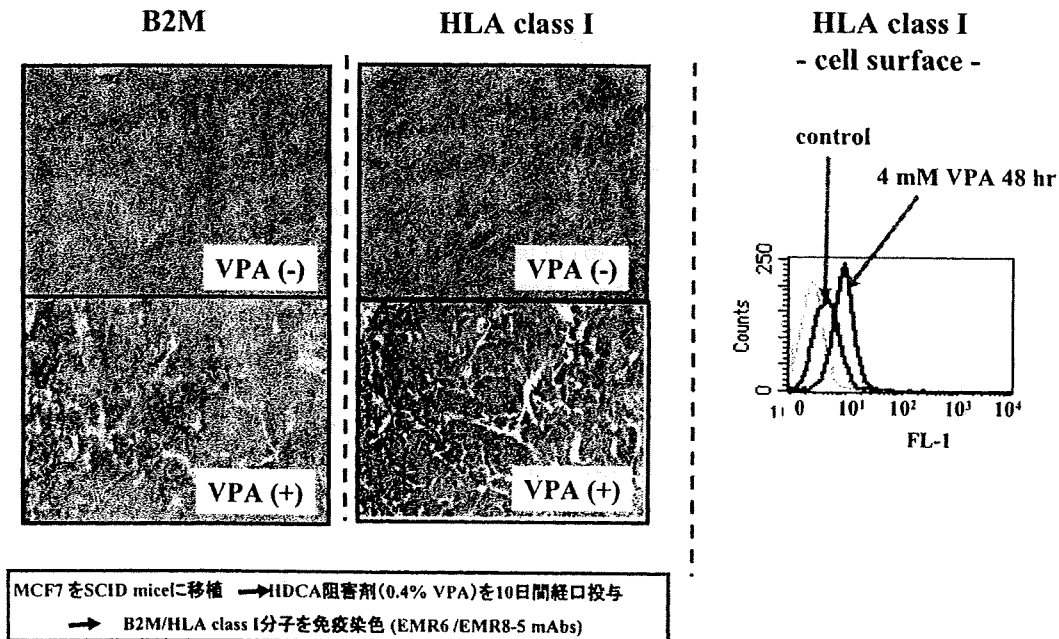


図11 HDAC 阻害剤 (VPA) 投与による B2M/HLA class I 分子 *in vivo* 発現回復



る有効な免疫治療の底上げがなされることを意味しており、今後の臨床試験等を含めた取り組みが期待されている<sup>1, 22-24)</sup>。

## 8 おわりに

以上のようにヒト腫瘍抗原の同定、その臨床試験、癌抗原免疫原性の増強、免疫エスケープの解除等について我々の研究成果を中心にして述べた。癌の免疫による制御をどの程度ヒトでできるのかはまだまだわからない。しかし、一步一步確実に前進しているのは事実である。臨床試験と基礎研究を並行し、互いにクロスオーバーさせることにより、癌の治療のひとつの方法として免疫があることが、必ずや実現されると思われる。

## 文 献

- 1) N. Sato *et al.*, *Pathol. Int.*, in press.
- 2) 河野修己, 特異抗原で開発加速 新型抗がん剤の一翼, がん治療ワクチン, 日経バイオテク, ビジネスレビュー, 10-6, 3-7 (2008)
- 3) T. Tsukahara *et al.*, *Cancer Res.*, **64**, 5442-5448 (2004)
- 4) T. Tsukahara *et al.*, *Cancer Sci.*, **99**, 368-375 (2008)
- 5) K. Suzuk *et al.*, *J. Immunol.*, **163**, 2783-2791 (1999)
- 6) H. Sahara *et al.*, *J. Immunother*, **25**, 235-242 (2002)
- 7) Y. Hirohashi *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **8**, 1731-1739 (2002)
- 8) S. Idenoue *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 1474-1482 (2005)
- 9) Y. Sato *et al.*, *J. Immunol.*, **169**, 1611-1618 (2002)
- 10) K. Ida *et al.*, *J. Immunol.*, **173**, 1436-1443 (2004)
- 11) E. Sato *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 6916-6923 (2008)
- 12) T. Tsuruma *et al.*, *J. Transl. Med.*, **2**, 19-29 (2004)
- 13) T. Tsuruma *et al.*, *J. Transl. Med.*, **6**, 24-35 (2008)
- 14) S. Kawaguchi *et al.*, *J. Transl. Med.*, **3**, 1 (2005)
- 15) T. Tsuruma *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5**, 799-807 (2005)
- 16) A. Konno *et al.*, *Cancer Res.*, **49**, 6578-6582 (1989)
- 17) K. Kanki *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, **44**, 1051-1061 (2000)
- 18) S. Takashima *et al.*, *J. Immunol.*, **157**, 3391-3395 (1996)
- 19) T. Kurotaki *et al.*, *J. Immunol.*, **179**, 1803-1813 (2007)
- 20) Y. Tamura *et al.*, "Extracellular heat shock proteins in immune response: A guide

for cross-presentation." *Heat Shock Proteins in Biology and Medicine*, 119-130 (2006)

- 21) G. Ueda *et al.*, *Cancer Sci.*, **95**, 248-253 (2004)
- 22) T. Tukahara *et al.*, *Cancer Sci.*, **97**, 1374-1380 (2006)
- 23) H. Kitamura *et al.*, *J. Urology*, in press.
- 24) T. Kanaseki *et al.*, *J. Immunol.*, **170**, 4980-4985 (2003)

# Clonal T-Cell Response Against Autologous Pleomorphic Malignant Fibrous Histiocytoma Antigen Presented by Retrieved HLA-A\*0206

Shigeharu Kimura,<sup>1</sup> Yuriko Kozakai,<sup>1</sup> Satoshi Kawaguchi,<sup>1</sup> Tomohide Tsukahara,<sup>1</sup> Kazunori Ida,<sup>1</sup> Masaki Murase,<sup>1</sup> Tadaki Matsumura,<sup>1</sup> Mitunori Kaya,<sup>1</sup> Toshihiko Torigoe,<sup>2</sup> Takuro Wada,<sup>1</sup> Noriyuki Sato,<sup>2</sup> Toshihiko Yamashita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, 060-8543, Japan

<sup>2</sup>Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, 060-8556, Japan

Received 26 January 2007; accepted 5 July 2007

Published online 12 September 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jor.20497

**ABSTRACT:** Towards the goal of identifying tumor-rejection antigens on eradicated tumors in bone and soft tissue sarcomas, we evaluated the immune response against antigens presented by lost HLA class I molecules. Tumor specimens and peripheral blood samples were obtained from a 70-year-old woman with pleomorphic malignant fibrous histiocytoma. Over 1-year culture, a tumor cell line (MFH2004) was established. A B-cell line infected with Epstein–Barr virus (B2004-EBV) was developed from the blood samples. HLA genotypes of B2004-EBV cells were A\*0206/2402, B\*4006/4601, and C\*0102/0801, whereas MFH2004 cells were defective for A\*0206, B\*4006, and C\*0102. Loss of HLA-A2 expression was also proved immunohistochemically in the primary tumor tissues. Lost HLA-A2 in MFH2004 cells was retrieved by transfection of HLA-A\*0206 cDNA to develop MFH2004-A2. Attempts to induce CTLs by mixed culture with autologous T cells and MFH2004 cells resulted in failure. In contrast, those with MFH2004-A2 induced CTL clones CTL2004-c6 and CTL2004-c17. These CTL clones specifically killed MFH2004-A2 but not MFH2004 or B2004-EBV in an HLA-A2-restricted manner. These findings suggest that CTL2004-c6 and CTL2004-c17 recognize autologous tumor-rejection antigens presented by HLA-A\*0206, which may have been expressed by tumor cells that had been eradicated by the host's immunosurveillance system. © 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 26:271–278, 2008

**Keywords:** human leukocyte antigen (HLA) class I; malignant fibrous histiocytoma; tumor-associated antigen; immunotherapy; cytotoxic T lymphocyte

## INTRODUCTION

After a nearly 30-year interval from the initial immunotherapeutic trials for patients with osteosarcoma,<sup>1,2</sup> clinical trials of immunotherapy for bone and soft tissue sarcomas restarted recently with advanced cellular and molecular technologies.<sup>3–7</sup> Despite the use of antigen-specific peptides<sup>4,5,7</sup> or antigen-stimulated dendritic cells<sup>3</sup> as vaccines, only a few tumors have shown responses.<sup>3,4</sup> Such dismal outcomes have also been seen in vaccination trials for other types of solid tumors,<sup>8–10</sup> together suggesting the importance in identifying further efficacious therapeutic antigens.

A dilemma in current antigen identification approaches is that most antigens have been defined from established tumors. These tumors have

developed as a result of escape from immune surveillance of the host. Thus, antigens expressed by these tumor cells do not represent immunodominant antigens. In contrast, the tumor cells that had already been eradicated by the host immune surveillance theoretically had expressed tumor-rejection antigens. Identification of such antigens on the eradicated tumor cells may provide a clue towards efficacious immunotherapy. In this regard, a trace of eradicated tumor cells can be found in the established tumors as a loss of antigen-presenting human leukocyte antigen (HLA) class I molecules.<sup>11,12</sup> According to the concept of immunologic sculpting,<sup>13</sup> the tumor cells expressing normal HLA class I have been eradicated by the host T cells during development. Therefore, lost HLA class I molecules in the established tumor may have presented tumor-rejection antigens.<sup>14</sup> While the concept of immunologic sculpting has been well proved in animal models,<sup>13</sup> there is little evidence with clinical samples.<sup>15</sup>

Towards the goal of identifying antigens on eradicated tumors in bone and soft tissue sarcomas,

Correspondence to: Satoshi Kawaguchi (Telephone: 81-11-611-2111, ext. 3333; Fax: 81-11-641-6026; E-mail: kawaguch@sapmed.ac.jp)

© 2007 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.



the primal question is whether such immunologic sculpting exists in patients with these tumors. To answer this question, we developed a cell line from pleomorphic malignant fibrous histiocytoma (MFH), which showed haplotype loss of HLA class I alleles. We hypothesize that the haplotype loss may have resulted from eradication of the tumor cells that express the HLA class I allele presenting the tumor-rejection antigen. This hypothesis can be proved by demonstration of (i) failure of killing activity of autologous T cells against the tumor cells with haplotype loss and (ii) successful induction of cytotoxic T lymphocyte (CTL) clones that react with the tumor cells where the lost HLA class I allele putatively presenting the tumor-rejection antigen is retrieved.

## MATERIALS AND METHODS

This study was approved under institutional guidelines for the use of human subjects in research. The patient gave informed consent for the use of tissue specimens and blood samples in our research.

### Patient

The patient was a 70-year-old woman suffering a tumor in the left elbow. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed a multinodular mass with isointensity in T1 weighted images and mixed intensity in T2 weighted images. Metastatic lesions were not detected by lung and abdominal computed tomography (CT) scans or gallium scintigraphy. Biopsy specimens of the tumor showed a mixture of spindle and histiocytelike cells, with atypia and mitoses of nuclei (Fig. 1). Bundles of spindle cells were arranged in a storiform pattern. Immunohistochemistry revealed that the tumor cells were diffusely positive for vimentin and CD68 and focally positive for smooth muscle actin, whereas desmin, cytokeratin, S-100, HHF35, caldesmon, EMA, and CD34 were all negative. Upon these findings, the tumor was diagnosed as pleomorphic MFH. The tumor was excised along with brachioradialis and extensor carpi radialis muscles, and a part of the lateral epicondyle of the left humerus on January 17, 2000, to achieve a wide surgical margin. The skin defect was covered by a mesh skin graft. Postoperatively, neither local recurrence or metastasis have been observed for 7 years.

### Establishment of Cell Lines

Fresh specimens taken at surgery from the tumor were minced into small pieces and separately cultured with Iscove's modified Dulbecco Eagle's medium (IMDM; GIBCO BRL, Grand Island, NY), containing 10% fetal calf serum, in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Over 1 year of continuous passages, a cell line was established and designated MFH2004. Epstein-Barr virus-transformed

B cells were also established from a blood sample of the same patient and designated B2004-EBV according to a method described previously.<sup>16,17</sup>

### Xenotransplantation Model

MFH2004 cells ( $2 \times 10^7$ ) were injected subcutaneously into the backs of three 6-week-old NOD-SCID mice (NOD.CB17.prdkc<sup>scid</sup>/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). On day 30, the tumor was resected and fixed in formalin. Paraffin-embedded sections were made and stained with hematoxylin and eosin (HE).

### Immunostaining

For immunostaining, anti-vimentin (Nichirei Corp., Tokyo, Japan), anti-CD68 (Dako, Glostrup, Denmark), anti-EMA (Nichirei Corp.), anti-S-100 (Dako), anti-CD34 antibody (Nichirei Corp.), anti-desmin (Dako), anti-cytokeratin (BioGenex, San Ramon, CA), anti-HHF35 (BioGenex), anti-caldesmon (BioGenex), anti-pan HLA class I (EMR8-5<sup>12</sup>), and anti-HLA-A2 antibodies 0397HA and 0791HA (One Lambda, Canoga Park, CA) were used.

Deparaffinized formalin-fixed paraffin-embedded sections of the original tumor and xenotransplanted tumor tissues were boiled by microwave for antigen retrieval. The sections were blocked and stained by the standard ABC method, as previously described.<sup>12</sup> For staining of HLA-A2, both 0397HA and 0791HA were used in combination as the primary antibodies according to the method described by Zhu and colleagues.<sup>18</sup> Hematoxylin was used for counterstaining.

### Analysis of HLA Genotype

HLA genotypes of MFH2004 and the blood sample were tested by Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories (Tokyo, Japan).

### Cloning of HLA-\*A0206 cDNA and Transfection

Total RNA was extracted from B2004-EBV cells using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR was performed with KOD plus DNA polymerase (Toyobo, Tokyo, Japan), using forward primer 5'-GGGCGATATCGGACTCAGAATCTCCCCA-GACGCCGAG-3' and reverse primer 5'-ATGCGGCCGC-TCACACTTTACAAGCTGTGA-3'. The forward primer contained the EcoRV site (underlined) and the reverse primer contained the NotI site (underlined) for digestion. The mixture was denatured at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles at 94°C for 15 s, 53°C for 30 s, and 68°C for 2 min. The PCR products were ligated into EcoRV and NotI sites of the pIRESpuro expression vector (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). Cloned cDNAs were sequenced with an ABI DNA sequencer (PerkinElmer Japan, Yokohama, Japan) and proved to be identical to the sequence of HLA-\*A0206 cDNA (gene bank number M24042).