

200924026A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 葛島 清隆

平成22(2010)年5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…………… 9
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……………13
赤塚美樹（愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部）
森島泰雄（愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 23

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) 膵がん細胞表面に提示される新規腫瘍抗原エピトープ生成過程の研究、(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用について以下のように報告する。

(a) CTL誘導するのに必要とされるがん細胞株を樹立しにくい膵がん、肺がんなどではCTL標的抗原の同定が遅れている。今年度は、以前に確立した人工抗原提示細胞（aAPC）システムを用いて誘導した HLA-A24拘束性に膵がん細胞を認識するCTLクローンの認識抗原を同定し、認識エピトープの生成機序を詳細に解析した。HLA-A24導入aAPCの刺激により誘導樹立したCTLクローン16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)由来の12 merペプチドを認識した。PSAは正常細胞にも発現しているが、クローン16F3は膵がん細胞を特異的に認識する。本エピトープの生成はクロロキンや3-メチルアデニンによって阻害されるので、class-I拘束性エピトープにも関わらずエンドソーム-リソソーム系で抗原プロセッシングが行われている。さらにRNAiを用いた実験から、本エピトープの生成にオートファジーが関与していることを証明した。一般的に、がん細胞においてはオートファジーが亢進している。CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを提示した。

(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が、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おらず、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。

昨年度、国際HapMap計画に登録されたB-LCLとゲノムデータを活用した迅速なマイナー抗原検索法を確立した。本年度は共同研究として、米国Fred Hutchinson癌研究所において移植後再発白血病に対し実施された養子免疫後に肺の重症GVHDを惹起したマイナー抗原を同定した。同定したP2RX7遺伝子は肺胞上皮に強く発現しており、CTLの直接的な標的になったと考えられた。FHCRCはCTLクローンを作成後、その造血器細胞特異性は患者のB細胞株と皮膚線維芽細胞に対する細胞傷害活性のみ決定してきた。今回の知見はその方法の限界を示すものであり、地道なマイナー抗原の同定とその分子学

的、組織学的性格付けの重要性が改めて示された。

マイナー抗原ペプチドを用いた移植後再発造血器腫瘍に対するワクチン療法臨床研究については、平成21年9月末の時点で72症例のリクルートを終え、内12例（17%）がマイナー抗原ミスマッチ適応であり、2例に対しペプチドワクチン(30 μ g)を投与した。有害事象は認めなかったものの、ワクチン前後で有意な特異的CTLの誘導は認められなかった。現在、新規に同定したACC-6抗原もワクチンに加え、また試験投与量の増量を行いつつある。

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

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膵がん、肺がんなどでは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。昨年度は、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HLA-A*2402拘束性にK562細胞および膵がん細胞株を認識するCTLを樹立し、抗原とそのエピトープ領域を同定した。さらにこのエピトープの生成過程について詳しく検討し、CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを解明することを目的とした。

(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移植片対白血病・リンパ腫(GVL)効果を誘導し原病の治癒をもたらす。しかし同時に患者の主要臓器をも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し、元来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、我々や他のグループから、移植後マイナー抗原特異的CTLの増加と、残存腫瘍の減少・消失の関連が報告されている。

昨年度は、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した。本年度は、米国シアトルのFred Hutchinson Cancer

Research Centerとの共同研究で行われた、実際に養子免疫療法として患者に投与されたCTLクローンが認識するマイナー抗原の同定に成功したので報告する。

B. 研究方法

(a) 膵がん細胞表面に提示される新規腫瘍抗原エピトープ生成過程の研究：

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製とCTLの誘導：

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。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。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、および膵がん細胞株への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。

2) 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。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いてエピトープを同定した。

3) CTLが認識するエピトープ生成過程の解析：

細胞内の抗原プロセッシングを阻害する種々の薬剤、およびオートファジー関連遺伝子 *atg5*, *atg6*, *atg7* の発現をそれぞれ阻害する siRNA で標的細胞を処理したのち、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の解析と

臨床応用

1) 新規マイナー抗原の同定：

Fred Hutchinson Cancer Center (FHRC)では1998年より第I相試験として、移植後再発白血病に対する患者マイナー抗原反応性細胞傷害性T細胞 (CTL) クローンによる養子免疫療法 (ClinicalTrials番号：NCT00107354) を開始し、2009年2月に終了した。このうち3例がCTLの養子免疫療法後に軽度から重度の肺合併症を来した。投与されたCTLを移送し、昨年度我々が開発した国際HapMap計画に登録された不死化B細胞株 (B-LCL) と SNP データを用いた相関解析法を応用した。用いた白人由来の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。最後に、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FHRCとの共同研究を通して決定した。

2) ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24拘束性ACC-1Y、HLA-B44拘束性ACC-2D、HLA-A*0201/A*0206拘束性HA-1Hのペプチドに加え、本年度HLA-A24拘束性のACC-1C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、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子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。また共同研究で用いた CTL クロームは FHCRC の IRB にて承認されたプロトコルに基づいて患者末梢血より樹立されたものであった。

以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

(a) 膵がん細胞表面に提示される新規腫瘍抗原エピトープ生成過程の研究：

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製と CTL の誘導：

HLA-A*2402、CD86 及び 4-1BBL を導入した K562 細胞を用いて刺激した CD8⁺T 細胞株から樹立した全ての CTL クロームは、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 クロームは複数の膵がん細胞を認識した。

2) CTL が認識する抗原をコードする遺伝子の

同定：

16F3 クロームは puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) のスプライスバリエーションを認識していた。このスプライスバリエーションは、PSA 遺伝子の 5' 側 12 個のエクソンとその直下のイントロンから構成されており、イントロン内にある poly-A 付加シグナルにより mRNA が生成されていると考えられた。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いた検討により、PSA 上の 12mer ペプチドがエピトープであった。3) CTL が認識するエピトープ生成過程の解析：

このエピトープの生成はラクタシスチンおよびブレフェルジン A で阻害されることから、通常の CTL エピトープと同様、細胞質プロテアソームおよび endoplasmic reticulum-ゴルジ経路が関わっていた。興味深いことに、本エピトープの生成がクロロキンや 3-メチルアデニンによって阻害されるので、class-I 拘束性エピトープにも関わらずエンドソーム-リソソーム系で蛋白の分解が行われていることが示唆された。オートファジー関連遺伝子 atg5, atg6, atg7 に対する siRNA はエピトープの生成を抑制した。

(b) マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用：

1) 新規マイナー抗原の同定：

まず患者に 4 度の肺 GVHD を来した CTL クロームが認識するマイナー抗原の同定を試みた。この CTL は HLA-A*2901 拘束性であったため日本人と中国人由来の 72 種類の HapMap B-LCL にこの HLA cDNA を導入後、細胞傷害性試験を行った。その結果、27 個のマイナー抗原陽性 LCL と 44 個の陰性 LCL、10 個の判定不能 LCL の 3 群に分類した。この陽性 27 個人と陰性 44 個人に相当する HapMap の SNP データで相関解析を施行し、 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 12q2.4 の位置に存在する P2RX7 遺伝子

まで直接絞り込むことができた。このSNP (rs7958311) はATPチャンネルであるプリン受容体をコードするP2RX7のExon 8上に存在し、その χ^2 値は最高40であった。確認実験としてもともとHLA-A*2901陽性の個人の末梢血から樹立したB-LCLを細胞傷害性試験でマイナー抗原の表現型を決定する傍ら、B-LCLから精製したゲノムDNAについて該当SNP周辺の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。候補SNPがAdenosineの場合のみ傷害活性が認められ、完全な相関が確認された。HLA-A*2901導入HEK293T細胞にドナー型および患者型のP2RX7 ミニ遺伝子を導入し発現させたものとCTLを反応させたところ、ドナー型のExonや推定エピトープ部分を導入した場合CTLはIFN- γ を産生しなかったが、レシピアント型を発現させたものにはIFN- γ を産生した。以上より、エピトープのアミノ酸配列はP2RX7のexon 8部分でコードされる9-merのWFHHCHPKYであった。さらに、エピトープ titrationでもWFHHCHPKYがドナー型のWFHHCHPKYより100倍以下の低濃度でCTLに認識されたことも確認した。

遺伝子が決定されたので、定量PCRでP2RX7の発現量を検討したところ、この遺伝子は確かに白血病を含む造血器系細胞で強発現していたが、同時に肺胞や卵巣でも発現していた。また免疫染色でも肺胞上皮において抗P2RX7抗体による強い染色性が示された。

同様な方法で弱いながら肺合併症をきたした別のCTLが認識する17p13.3に存在するマイナー抗原遺伝子DPH1を同定した。この遺伝子もUbiquitousな発現を示すことが判明したほか、養子免疫療法でも白血病が間もなく再発したのはこのDPH1の発現が再発時にDown-regulationしていたためと判明した(データ示さず)。

2) ペプチドワクチン療法臨床試験:

HLA-A24拘束性ACC-1Yおよび本年度より加わったACC-1C、HLA-B44拘束性ACC-2D、HLA-A*0201/A*0206拘束性HA-1H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°C で凍結保存されている。その後、各1バイアルずつ外注で安定性・純度試験を行ったが、分解や汚染は認められなかったため使用可と判定した。

マイナー抗原ペプチドを用いた移植後再発造血器腫瘍に対するワクチン療法臨床研究については、平成22年3月末の時点で72症例のリクルートを終え、内12例(17%)がマイナー抗原ミスマッチ適応であり、愛知県がんセンター中央病院にて2例に対しペプチドワクチン(30 μg)を投与した。有害事象は認めなかったものの、研究所におけるin vitroの解析では、ワクチン前後で有意な特異的CTLの誘導は認められなかった。現在、新規に同定したACC-6抗原もワクチンに加え、また試験投与量の増量を行いつつある。本年6月に2例で実施される予定となっている。

D. 考察

(a) 膵がん細胞表面に提示される新規腫瘍抗原エピトープ生成過程の研究:

16F3クローンは、ユビキタスな発現をするPSAのスプライスバリエント由来のエピトープを標的とし、このエピトープはオートファジー経路によって生成されている。16F3クローンは、K562細胞と一部の膵がん細胞のみを認識し、正常細胞を認識しない。オートファジー経路を含む抗原プロセッシングの差異がエピトープ提示に影響していると考えられる。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

く予定である。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

今回、実際に養子免疫療法として患者に投与されたCTLクローンが認識するマイナー抗原遺伝子およびエピトープを同定しえたことには2つの意義がある。1つは、国際HapMap計画のリソースを用いた新規相関解析法により、2つのCTLのそれぞれが認識する新たなマイナー抗原遺伝子を確実に同定できたことである。これは本法の信頼性の向上につながる。2点目は、従来は*in vitro*で誘導されただけのCTLクローンが認識するマイナー抗原を同定しただけであったが、今回はすでに患者に投与されその臨床的意義が明瞭であったことである。とくに2点目は、CTLの特異性を限られた標的細胞だけで決定することのリスクを示しており、これまで我々が行ってきた移植後患者末梢血からのCTL樹立、標的抗原の樹立、有望な抗原の臨床試験での検討といった一連の流れがより安全で科学的であることを示すものだと考えられる。

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。マイナー抗原は非自己抗原であり、強いGVL効果が期待できるが、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、再発ハイリスク患者への移植の割合が増えつつある現在、その最終的な治療である移植を実施した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られる。ワクチンがよいのか、養子免疫がよいのかといった治療のモダリティは今後の検討課題と考える。

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、*puromycin-sensitive aminopeptidase*のスプライスバリエントであった。エピトープはオートファジー経路によって生成されていた。一般的に、がん細胞においてはオートファジーが亢進している。CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを提示した。

(b) 昨年度開発したHapMapの試料とゲノムデータを利用したマイナー抗原遺伝子同定法を用い、実際に養子免疫療法として移植後再発白血病患者に投与されたCTLクローンの標的抗原を同定できた。これにより、実際に患者が呈した肺合併症や、治療後再発の原因を究明できた。今後免疫療法の対象となる抗原のさらなる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。

F. 健康危険情報

本邦での臨床試験に関しては無し。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010 Jan 13. [Epub ahead of print]
- 2) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse

- of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 115:3158-61, 2010.
- 3) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459: 712-716, 2009.
 - 4) 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*, 113:5041-8, 2009.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) Yasukawa M, Fujiwara H, Ochi T, Suemori K, Narumi H, Azuma T, Kuzushima K. Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 84:314-5, 2009.
 - 8) Isobe M, Eikawa S, Uenaka A, Nakamura Y, Kanda T, Kohno S, Kuzushima K, Nakayama E. Correlation of high and decreased NY-ESO-1 immunity to spontaneous regression and subsequent recurrence in a lung cancer patient. *Cancer Immun*. 9:8-17, 2009.
2. 学会発表
- 1) 赤塚美樹、藤井伸治、Warren Edus、森島泰雄、高橋利忠、小川誠司、葛島清隆、Riddell Stanley. 移植後再発白血病に対するマイナー抗原特異的CTL養子免疫療法後に重症肺GVHDの合併を来した標的抗原の同定：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
 - 2) 岡村（出町）文子、森島聡子、渡邊友紀子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
 - 3) 越智俊元、藤原弘、末盛浩一郎、葛島清隆、峰野純一、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴. WT1特異的CTL由来T細胞レセプター遺伝子を用いた免疫遺伝子療法の開発：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
 - 4) 鳥飼宏基、柳沢真弓、今橋伸彦、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、宮村耕一、森島泰雄、小寺良尚、葛島清隆、赤塚美樹. HLA一座不一致同胞間骨髓移植患者より樹立したHLA class IIを直接認識するCD8+CTLクローンの意義：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
 - 5) 永井功造、藤原弘、越智俊元、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴. Aurora-

- A kinase特異的T細胞受容体遺伝子を用いたがん免疫遺伝子療法の開発：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 6) 越智俊元、藤原弘、永井功造、葛島清隆、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴. WT1特異的CTL由来T細胞レセプター遺伝子を用いた免疫遺伝子療法の開発：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 7) 赤塚美樹、鳥飼宏基、岡村文子、葛島清隆. HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8+CTLクローンの解析：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 8) 葛島清隆、岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹. 新規腫瘍抗原探索を目的とした人工抗原提示細胞システムの検討：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 9) 岡村（出町）文子、森島聡子、渡邊友紀子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 10) 鳥飼宏基、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、森島泰雄、葛島清隆、赤塚美樹. HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8+CTLクローンの解析：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 11) 藤原弘、越智俊元、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴. Aurora-A kinase特異的T細胞受容体(TCR)遺伝子を用いた免疫遺伝子療法の検討：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 12) 越智俊元、藤原弘、白方俊章、葛島清隆、峰野純一、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴. 造血幹細胞へのWT1特異的T細胞レセプター遺伝子導入による新たな免疫遺伝子療法の開発：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 13) 鳥飼宏基、柳澤真弓、今橋伸彦、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、宮村耕一、森島泰雄、小寺良尚、葛島清隆、赤塚美樹. HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8+CTLクローンの解析：第71回日本血液学会学術集会、京都市、2009年10月
- 14) 高橋義行、ブストス イツツエル、村松秀城、西尾信博、永田俊人、濱麻人、加藤元博、小川誠司、赤塚美樹、小島勢二. ハプロ一致幹細胞移植後の白血病再発メカニズム：6番染色体短腕欠失による免疫監視機構からの逃避. 第71回日本血液学会総会、京都 2009年10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

膵がん細胞表面に提示される新規腫瘍抗原エピトープ生成過程の研究

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 細胞傷害性T細胞(CTL)誘導するのに必要とされるがん細胞株を樹立しにくい膵がん、肺がんなどではCTL標的抗原の同定が遅れている。今年度は、以前に確立した人工抗原提示細胞（aAPC）システムを用いて誘導したHLA-A24拘束性に膵がん細胞を認識するCTLクローンの認識抗原を同定し、認識エピトープの生成機序を詳細に解析した。HLA-A24導入aAPCの刺激により誘導樹立したCTLクローン16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)由来の12 merペプチドを認識した。PSAは正常細胞にも発現しているが、クローン16F3は膵がん細胞を特異的に認識する。本エピトープの生成はクロロキンや3-メチルアデニンによって阻害されるので、class-I拘束性エピトープにも関わらずエンドソーム-リゾソーム系で抗原プロセッシングが行われている。さらにRNAiを用いた実験から、本エピトープの生成にオートファジーが関与していることを証明した。一般的に、がん細胞においてはオートファジーが亢進している。CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを提示した。

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膵がん、肺がんなどでは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。昨年度は、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HLA-A*2402拘束性にK562細胞および膵がん細胞株

を認識するCTLを樹立し、抗原とそのエピトープ領域を同定した。さらにこのエピトープの生成過程について詳しく検討し、CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞（aAPC）の作製とCTLの誘導：

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。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。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、および膵がん細胞株への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。

2) 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。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いてエピトープを同定した。

3) CTLが認識するエピトープ生成過程の解析：

細胞内の抗原プロセッシングを阻害する種々の薬剤、およびオートファジー関連遺伝子atg5, atg6, atg7の発現をそれぞれ阻害するsiRNAで標的細胞を処理したのち、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）の作製とCTLの誘導：

HLA-A*2402、CD86及び4-1BBLを導入したK562細胞を用いて刺激したCD8⁺T細胞株から樹立した全ての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クローンは複数の膵がん細胞を認識した。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の

同定：

16F3クローンは puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエントを認識していた。このスプライスバリエントは、PSA遺伝子の上流側12個のエクソンとその直下のイントロンから構成されており、イントロン内にあるpoly-A付加シグナルによりmRNAが生成されていると考えられた。短縮遺伝子と合成ペプチドを用いた検討により、PSA上の12merペプチドがエピトープであった。

3) CTLが認識するエピトープ生成過程の解析：

このエピトープの生成はラクタシスチンおよびブレフェルディンAで阻害されることから、通常のCTLエピトープと同様、細胞質プロテアソームおよびendoplasmic reticulum-ゴルジ経路が関わっていた。興味深いことに、本エピトープの生成がクロロキンや3-メチルアデニンによって阻害されるので、class-I拘束性エピトープにも関わらずエンドソーム-リソゾーム系で蛋白の分解が行われていることが示唆された。オートファジー関連遺伝子atg5, atg6, atg7に対するsiRNAはエピトープの生成を抑制した。

D. 考察

16F3クローンは、ユビキタスな発現をするPSAのスプライスバリエント由来のエピトープを標的とし、このエピトープはオートファジー経路によって生成されている。16F3クローンは、K562細胞と一部の膵がん細胞のみを認識し、正常細胞を認識しない。オートファジー経路を含む抗原プロセッシングの差異がエピトープ提示に影響していると考えられる。今後は、膵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予定である。

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、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエーションであった。エピトープはオートファジー経路によって生成されていた。一般的に、がん細胞においてはオートファジーが亢進している。CTLが正常細胞とがん細胞を区別する新しいメカニズムを提示した。

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*, 113:5041-8, 2009.
- 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) Yasukawa M, Fujiwara H, Ochi T, Suemori K, Narumi H, Azuma T, Kuzushima K. Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 84:314-5, 2009.
- 4) Isobe M, Eikawa S, Uenaka A, Nakamura Y, Kanda T, Kohno S, Kuzushima K, Nakayama E. Correlation of high and decreased NY-ESO-1 immunity to spontaneous regression

and subsequent recurrence in a lung cancer patient. *Cancer Immun*. 9:8-17, 2009.

2. 学会発表

- 1) 赤塚美樹、藤井伸治、Warren Edus、森島泰雄、高橋利忠、小川誠司、葛島清隆、Riddell Stanley. 移植後再発白血病に対するマイナー抗原特異的CTL養子免疫療法後に重症肺GVHDの合併を来した標的抗原の同定：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
- 2) 岡村（出町）文子、森島聡子、渡邊友紀子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆. 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
- 3) 越智俊元、藤原弘、末盛浩一郎、葛島清隆、峰野純一、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴. WT1特異的CTL由来T細胞レセプター遺伝子を用いた免疫遺伝子療法の開発：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
- 4) 鳥飼宏基、柳沢真弓、今橋伸彦、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、宮村耕一、森島泰雄、小寺良尚、葛島清隆、赤塚美樹. HLA一座不一致同胞間骨髓移植患者より樹立したHLA class IIを直接認識するCD8⁺CTLクローンの意義：第13回日本がん免疫学会総会、北九州市、2009年6月
- 5) 永井功造、藤原弘、越智俊元、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴. Aurora-A kinase特異的T細胞受容体遺伝子を用いたがん免疫遺伝子療法の開発：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 6) 越智俊元、藤原弘、永井功造、葛島清隆、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴. WT1特異的CTL由来T細胞レセプター遺伝子を用い

た免疫遺伝子療法の開発：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月

- 7) 赤塚美樹、鳥飼宏基、岡村文子、葛島清隆。HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8⁺CTLクローンの解析：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 8) 葛島清隆、岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹。新規腫瘍抗原探索を目的とした人工抗原提示細胞システムの検討：第1回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、大阪市、2009年8月
- 9) 岡村（出町）文子、森島聡子、渡邊友紀子、鳥飼宏基、赤塚美樹、葛島清隆。人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 10) 鳥飼宏基、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、森島泰雄、葛島清隆、赤塚美樹。HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8⁺CTLクローンの解析：第68回日本癌学会学術総会、横

浜市、2009年10月

- 11) 藤原弘、越智俊元、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴。Aurora-A kinase特異的T細胞受容体(TCR)遺伝子を用いた免疫遺伝子療法の検討：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 12) 越智俊元、藤原弘、白方俊章、葛島清隆、峰野純一、小澤秀俊、石川文彦、安川正貴。造血幹細胞へのWT1特異的T細胞レセプター遺伝子導入による新たな免疫遺伝子療法の開発：第68回日本癌学会学術総会、横浜市、2009年10月
- 13) 鳥飼宏基、柳澤真弓、今橋伸彦、渡邊友紀子、岡村文子、高橋利忠、宮村耕一、森島泰雄、小寺良尚、葛島清隆、赤塚美樹。HLAクラスII不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラスII拘束性アロCD8⁺CTLクローンの解析：第71回日本血液学会学術集会、京都市、2009年10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）

研究分担者 森島泰雄（愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部 部長）

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が、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おらず、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。

昨年度、国際 HapMap 計画に登録された B-LCL とゲノムデータを活用した迅速なマイナー抗原検索法を確立した。本年度は共同研究として、米国 Fred Hutchinson 癌研究所において移植後再発白血病に対し実施された養子免疫後に肺の重症 GVHD を惹起したマイナー抗原を同定した。同定した P2RX7 遺伝子は肺胞上皮に強く発現しており、CTL の直接的な標的になったと考えられた。FHCRC は CTL クローンを作成後、その造血器細胞特異性は患者の B 細胞株と皮膚線維芽細胞に対する細胞傷害活性のみ決定してきた。今回の知見はその方法の限界を示すものであり、地道なマイナー抗原の同定とその分子学的、組織学的性格付けの重要性が改めて示された。

マイナー抗原ペプチドを用いた移植後再発造血器腫瘍に対するワクチン療法臨床研究については、平成 21 年 9 月末の時点で 72 症例のリクルートを終え、内 12 例（17%）がマイナー抗原ミスマッチ適応であり、2 例に対しペプチドワクチン(30 μ g)を投与した。有害事象は認めなかったものの、ワクチン前後で有意な特異的 CTL の誘導は認められなかった。現在、新規に同定した ACC-6 抗原もワクチンに加え、また試験投与量の増量を行いつつある。

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移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果を誘導し原病の治癒をもたらす。しかし同時に患者の主要臓器をも傷害

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し、元来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、我々や他のグループから、移植後マイナー抗原特異的 CTL の増加と、残存腫瘍の減少・消失の関連が報告されている。

昨年度は、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した。本年度は、米国シアトルの Fred Hutchinson Cancer Research Center との共同研究で行われた、実際に養子免疫療法として患者に投与された CTL クローンが認識するマイナー抗原の同定に成功したので報告する。

B. 研究方法

① 新規マイナー抗原の同定： Fred Hutchinson Cancer Center (FHCRC)では 1998 年より第 I 相試験として、移植後再発白血病に対する患者マイナー抗原反応性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンによる養子免疫療法 (ClinicalTrials 番号：NCT00107354) を開始し、2009 年 2 月に終了した。このうち 3 例が CTL の養子免疫療法後に軽度から重度の肺合併症を来した。投与された CTL を移送し、昨年度我々が開発した国際 HapMap 計画に登録された不死化 B 細胞株 (B-LCL) と SNP データを用いた相関解析法を応用した。用いた白人由来の 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。最後に、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 FHCRC との共同研究を通して決定した。

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、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子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。また共同研究で用いた CTL クローンは FHCRC の IRB にて承認されたプロトコルに基づいて患者末梢血より樹立されたものであった。

以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものと考えられる。

C. 研究結果

①-1 新規マイナー抗原の同定： まず患者に4度の肺 GVHD を来した CTL クローンが認識するマイナー抗原の同定を試みた。この CTL は HLA-A*2901 拘束性であったため日本人と中国人由来の 72 種類の HapMap B-LCL にこの HLA cDNA を導入後、細胞傷害性試験を行った。その結果、27 個のマイナー抗原陽性 LCL と 44 個の陰性 LCL、10 個の判定不能 LCL の 3 群に分類した (図 1)。この陽性 27 個人と陰性 44 個人に相当する HapMap の SNP データで相関解析を施行し、 χ^2 検定により関連する SNP を絞り込んだ。この結果、関連の強い SNP の位置を染色体 12q2.4 の位置に存在する *P2RX7* 遺伝子まで直接絞り込むことができた (図 2)。この SNP (rs7958311) は ATP チャンネルであるプリン受容体をコードする *P2RX7* の Exon 8 上に存在し、その χ^2 値は最高 40 であった (表 1)。確認実験としてもともと HLA-A*2901 陽性の個人の末梢血から樹立した B-LCL を細胞傷害性試験でマイナー抗原の表現型を決定する傍ら、B-LCL から精製したゲノム DNA について該当 SNP 周辺の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。表 2 に示すごとく、候補 SNP が Adenosine の場合のみ傷害活性が認められ、完全な相

関が確認された。HLA-A*2901 導入 HEK293T 細胞にドナー型および患者型の *P2RX7* ミニ遺伝子を導入し発現させたものと CTL を反応させたところ、ドナー型の Exon や推定エピトープ部分を導入した場合 CTL はインターフェロン(IFN)- γ を産生しなかったが、レシピエント型を発現させたものには IFN- γ を産生した。以上より、エピトープのアミノ酸配列は *P2RX7* の exon 8 部分でコードされる 9-mer の WFHHCHPKY であった (図 3 左)。さらに、エピトープ titration でも WFHHCRPKY がドナー型の WFHHCHPKY より 100 倍以下の低濃度で CTL に認識されたことも確認した (図 3 右)。

遺伝子が決定されたので、定量 PCR で *P2RX7* の発現量を検討したところ、この遺伝子は確かに白血病を含む造血器系細胞で強発現していたが、同時に肺胞や卵巣でも発現していた。また免疫染色でも肺胞上皮において抗 *P2RX7* 抗体による強い染色性が示された(図 4. **Blood** にて報告済み)。

同様な方法で弱いながら肺合併症をきたした別の CTL が認識する 17p13.3 に存在するマイナー抗原遺伝子 *DPH1* を同定した。この遺伝子も Ubiquitous な発現を示すことが判明したほか、養子免疫療法でも白血病が間もなく再発したのはこの *DPH1* の発現が再発時に Down-regulation していたためと判明した (データ示さず)。

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°C で凍結保存されている。その後、各 1 バイアルずつ外注で安定性・純

度試験を行ったが、分解や汚染は認められなかったため使用可と判定した。

マイナー抗原ペプチドを用いた移植後再発造血器腫瘍に対するワクチン療法臨床研究については、平成 22 年 3 月末の時点で 72 症例のリクルートを終え、内 12 例 (17%) がマイナー抗原ミスマッチ適応であり、愛知県がんセンター中央病院にて 2 例に対しペプチドワクチン(30 μ g)を投与した。有害事象は認めなかったものの、研究所における *in vitro* の解析では、ワクチン前後で有意な特異的 CTL の誘導は認められなかった。現在、新規に同定した ACC-6 抗原もワクチンに加え、また試験投与量の増量を行いつつある。本年 6 月に 2 例で実施される予定となっている。

D. 考察

今回、実際に養子免疫療法として患者に投与された CTL クローンが認識するマイナー抗原遺伝子およびエピトープを同定したことには 2 つの意義がある。1 つは、国際 HapMap 計画のリソースを用いた新規相関解析法により、2 つの CTL のそれぞれが認識する新たなマイナー抗原遺伝子を確実に同定できたことである。これは本法の信頼性の向上につながる。2 点目は、従来は *in vitro* で誘導されただけの CTL クローンが認識するマイナー抗原を同定しただけであったが、今回はすでに患者に投与されその臨床的意義が明瞭であったことである。とくに 2 点目は、CTL の特異性を限られた標的細胞だけで決定することのリスクを示しており、これまで我々が行ってきた移植後患者末梢血からの CTL 樹立、標的抗原の樹立、有望な抗原の臨床試験での検討といった一連の流れがより安全で科学的であることを示すものだと考えられる。

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。マイナー抗原は非自己抗原であり、強い GVL 効果が期待できるが、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、再発ハイリスク患者への移植の割合が増えつつある現在、その最終的な治療である移植を実施した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られる。ワクチンがよいのか、養子免疫がよいのかといった治療のモダリティは今後の検討課題と考える。

E. 結論

昨年度開発した HapMap の試料とゲノムデータを利用したマイナー抗原遺伝子同定法を用い、実際に養子免疫療法として移植後再発白血病患者に投与された CTL クローンの標的抗原を同定できた。これにより、実際に患者が呈した肺合併症や、治療後再発の原因を究明できた。今後免疫療法の対象となる抗原のさらなる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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, Chaney CN, Mito JK, Loeb KR, Gooley TA, Brown ML, Koo KK, Rosinski KV, Ogawa S, Matsubara A, Appelbaum FR, Riddell SR. Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplant with T cells