

200924026B

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19-21年度 総合研究報告書

主任研究者 葛島 清隆

平成22(2010)年5月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	23
------------------------	----

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総合研究報告書

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。平成19年度から21年度に得られた研究成果として、(a) Epstein-Barr virus(EBV)陽性がんに対するT細胞応答の研究、(b) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定、(c) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、ならびに(d) 同種造血幹細胞移植における移植免疫反応の解明とその細胞治療への応用について以下のように報告する。

(a) EBV陽性がん局所には多数のCTLとCD4⁺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) 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。免疫療法に有用な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)システムの構築をした。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、④puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライズバリエーションであった。①②③は白血病細胞に特徴的な遺伝子であった。PSAは、がん細胞にも正常細胞にも発現しているが、PSA特異的CTL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。以上の結果は、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。

(c) 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。

平成19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。こ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。

平成20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。

平成21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。Fred Hutchinson癌研究所ではCTLクローンを作製後、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。

(d) 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 (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。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。白血病の病型別の解析では、急性骨髄性白血病と慢性骨髄性白血病において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

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。

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。

(b) 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。

(c) 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。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。

平成19年度は、過去にクローニングしたHLA-A*24拘束性のCTLが認識する新規マイナー抗原を同定するために、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を目的とした。

平成20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することを目的とした。

平成21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を同定することを目的とした。

(d) HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1遺伝子型適合度と臨床成績、とくに白血病再発との関連(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した。

B. 研究方法

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答の研究:

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) 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。

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。

(c) 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：

マイナー抗原特異的CTLは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。国際HapMap計画に登録された日本人、中国人、白人由来のB-LCLは米国のCoriell財団から購入した。HLA-A24拘束性の1B9-CTLが認識するマイナー抗原の同定には、健康人末梢血から樹立したEBV不死化細胞株(B-LCL)パネルを使用した。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。

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CTLクローンによる養子免疫療法(Clinical Trials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-1H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、IFN- 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-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 μ g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。

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

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日文部科学省・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。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。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承認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細胞応答の研究：

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) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：

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。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、④puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエントであった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、④PSAのスプライスバリエントに特異的な16F3クローンは複数の脾がん細胞を認識した。このスプライスバリエントは、PSA遺伝子上流側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。

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。

(c) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

1)-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。B-LCLパネルから抽出した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)を作製し、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AC C-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DYLQC*VLQI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CDR3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の病勢とは関連しなかった。

1)-② 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をタイプングしたところ、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)-③ 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*SLC1A5*遺伝子まで直接絞り込むことができた。このSNPは*SLC1A5*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*SLC1A5* 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。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*SLC1A5*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29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をもつ個人が関連し

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。

1)-④ Fred Hutchinson Cancer Center (FHCC)で養子免疫療法に使用したCTLクローンが認識するマイナー抗原の同定：

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。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。

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22年3月末の時点で72症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 μg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 μg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 ELISPOT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。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。平成22年6月に2例で実施される予定となっている。

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

1) 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) 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。

3) 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（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。

4) 白血病の病型別の解析では、急性骨髄性白血病と慢性骨髄性白血病においてHLA-DPB1抗原/座の違いがGVL効果に関与していた。

D. 考察

(a) EBV陽性がんに対するT細胞応答の研究：

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) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：

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。さらに、16F3クローンは、ユビキタスな発現をするPSAのサブタイプ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。

(c) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

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^C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。

今期開発した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。

さらに改良を加えた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をタイピングし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かを示している。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方法は、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。

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計画のリリ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。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。

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。

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

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。

さらに、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) 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) 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、④puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエントであった。PSA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。

(c) 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。

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。同法を使用して、米国で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、免疫療法の標的として使用でき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。

(d) 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

本邦での臨床試験においては無し。

G. 研究発表

- 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 specific for minor histocompatibility antigens. *Blood*. 2010 Jan 13. [Epub ahead of print]
- 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*. 32:e163-8,2010.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 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) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
 - 10) 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.* 100(2):357-362, 2009.
 - 11) 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.* 43(8):611-7, 2009.
 - 12) 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*, 113(12):2851-8, 2009.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
- 21) Kawase T, Nannya Y, Torikai H, Yamamoto G, Onizuka M, Morishima S, Tsujimura K, Miyamura K, Koderu 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) 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.
 - 25) Rosinski KV, Fujii N, Mito JK, Koo KK, 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*,111(9):4817-26,2008.
 - 26) 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, Koderu 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. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(1):75-87,2008.
 - 27) 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*, 260 (1-2):137-145, 2008.
 - 28) Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Koderu 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.
 - 29) Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Koderu Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci.*, 98: 1139-1146, 2007.
 - 30) Torikai H, Akatsuka Y, Miyauchi H, Terakura S, Onizuka M, Tsujimura K, Miyamura K, Morishima Y, Koderu 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.
- 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) 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.
 - 34) 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.
 - 35) Setterholm M, Morishima Y, Pepperall J, Schmidt A. Strategies for typing new volunteer donors. *Tissue Antigens*, 69 (Suppl 1):6-7, 2007.
 - 36) 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.
 - 37) 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.
 - 38) 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.
 - 39) 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.
 - 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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. p202-7, 2008.
- 44) 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.
- 45) 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) 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、Riddel 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