

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

がん特異的細胞性免疫の活性化を
基盤とする新たな治療の開発

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 葛島 清隆

平成23（2011）年5月

目 次

I. 総括研究報告

- がん特異的細胞性免疫の活性化を基盤とする新たな治療の開発 1
研究代表者 葛島清隆

II. 分担研究報告

1. 卵巣がん細胞株から作製した人工抗原提示細胞による CTL の誘導 13
葛島清隆 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
2. マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用 18
赤塚美樹 (藤田保健衛生大学医学部)
3. WT1発現リンパ芽球様細胞株の抗原提示細胞としての有用性の検証 26
神田 輝 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍ウイルス学部)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 31

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

がん特異的細胞性免疫の活性化を基盤とする新たな治療の開発

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) 卵巣がん細胞株から作製した人工抗原提示細胞(aAPC)によるCTLの誘導、(b) 同種造血細胞移植後の再発予防のための免疫療法の開発に関する研究、および(c) Wilms' tumor gene 1 (WT1)発現リンパ芽球様細胞株の抗原提示細胞としての有用性の検証について以下のように報告する。

(a) 免疫療法の基盤研究として、がん細胞を傷害するCTLの誘導とその標的抗原の同定が最も重要である。HLA-A24陰性の卵巣がん細胞株であるTOV21Gに、HLA-A, B及びCw遺伝子の共通配列部位に相補的な3種類のsiRNAを導入後、3-5日目には細胞表面でのHLA発現をほぼ完全に消失させることができた。レンチウイルスベクターを用いて、TOV21G細胞にsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A*2402とCD86を予め導入しておき、さらにsiRNA処理を加えることにより、HLA-A24分子のみ発現するaAPCを作製した。健康成人末梢血のナイーブCD8⁺T細胞をこのaAPCで2回刺激し、さらに限界希釈法で多数のCTLクローンを得た。クローンD2は、TOV21Gのみならず、RMGI、RMGII、KOC7などの卵巣がん細胞株をHLA-A24拘束性に傷害した。クローンB1はTOV21GとRMGIのみを傷害した。クローンG3は、TOV21GのみをHLA-A24拘束性に傷害し、他のHLA-A24陽性の卵巣株を傷害しなかった。いずれのクローンもHLA-A24陽性の線維芽細胞株やEpstein-Barr virus(EBV)感染Bリンパ芽球(LCL)を傷害しなかった。これらの結果は、クローンD2, B1およびG3がそれぞれ異なるエピトープを認識していることを示している。今後は、これらのCTLクローンを認識する抗原遺伝子を、TOV21G細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーを用いた発現クローニング法にて同定を進める予定である。

(b) 再発ハイリスク造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植は確立された治療法であるが、移植後再発は依然として大きな問題である。同種移植では移植片対宿主病(GVHD)が予後にかかわる重大な合併症であり、GVHDを起こさずに選択的な移植片対白血病(GVL)効果を誘導する抗原特異的免疫療法は一つの解決策となる。GVL効果の標的として、不適合HLA分子、マイナー組織適合抗原、腫瘍抗原などが考えられる。これらの標的がどのような強さや割合でGVL効果に寄与しているかの検討するために、これまでに同定さ

れた造血器腫瘍に比較的高発現するHLA-A*02:01およびHLA-A*24:02によって提示される腫瘍抗原エピトープを産生するようなミニジーンを移植ドナーの末梢血B細胞由来の活性化B細胞およびLCLにミニジーンを遺伝子導入した。これらを移植後の患者末梢血T細胞に対する抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。これ以外に移植前の患者末梢血由来の活性化B細胞およびLCLをマイナー組織適合抗原の抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。マイナー組織適合抗原に対するCD8陽性T細胞の前駆体頻度は移植後100日前後、半年ともに認められたが、腫瘍抗原に対する反応は検出限界以下であり、少なくとも2症例において、移植後早期の免疫反応の標的はマイナー組織適合抗原であることが示唆された。今後症例を重ね、どの抗原を移植後どの時期に免疫標的とするか効果的かを究明したい。

(c) ヒト末梢血由来のBリンパ球にEBVを試験管内感染させることで樹立できるLCLは抗原提示細胞として機能することが知られている。本研究では、組換えEBV産生の技術を応用することで、広くがん細胞に高発現しているがん抗原であるWT1抗原を発現するLCLを樹立し、その抗原提示細胞としての有用性を検証した。その結果、WT1抗原を恒常発現しつつ*ex vivo*で大量増殖可能なLCL(WT1-LCL)が樹立できた。樹立したWT1-LCLはWT1抗原特異的CTLによりHLA拘束性に細胞溶解を起こすことから、WT1蛋白質がペプチドにプロセッシングされて抗原提示されていることが確認できた。またWT1-LCLを抗原提示細胞として用いたCTL誘導実験において、WT1特異的CTLの誘導がわずかながら検出された。以上の結果より、組換えEBVを用いて樹立可能ながん抗原発現LCLの抗原提示細胞としての有用性が示された。

研究分担者 所属施設名

赤塚美樹 藤田保健衛生大学

神田 輝 愛知県がんセンター研究所

職名

准教授

室長

いる。平成21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. 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タイプのがんでは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

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。K562細胞は、細胞表面にHLAを発現していないため、目的のHLA分子を単独で発現させることは容易である。他の多くのがん細胞株においては、もともと自身のHLA分子を細胞表面に発現しているため、そのままでは目的のHLA分子を単独で発現させることができない。

この問題を解決すれば、がん細胞を傷害するCTLを得るためのaAPCシステムを、他のが

ん種に広げることができる。本年度は、この目的で、以下の検討を行った。1) siRNAによる細胞本来のHLAの発現を抑制、2) そのsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A*2402cDNAを、レンチウイルスベクターを用いて導入、3) 1)と2)を組み合わせることにより、目的のHLA-A*2402のみを発現するaAPCを作製、4) HLA-A*2402拘束性のCTLの誘導。

(b) 同種造血細胞移植は、造血器腫瘍に対して確立された治療である。しかし再発ハイリスク造血器腫瘍患者における再発率は20～50%と高率であり、その多くが死亡している。従って、移植成績の更なる向上が、同種造血細胞移植が今後とも医療として成り立つために求められている。

同種造血細胞移植後にはドナーのリンパ球がマイナー組織適合抗原を標的とする移植片対白血病 (GVL) 効果を誘導し原病の治療をもたらすと考えられている。他方、WT1などの腫瘍抗原に対する免疫反応もGVL効果に関与するという報告がなされつつある。しかし、これまでこれら2つの抗原系のどちらが有意であるかを同時に解析した報告はほとんど無い。

抗原特異的免疫反応を評価するにあたり、最近ではHLAマルチマーを用いたフローサイトメトリー法が多用されているが、同時に多くの抗原を評価するのは困難である。他方、古典的な限界希釈法によるT細胞前駆体頻度の測定は、感度がHLAマルチマー法より10分の1劣るとされるが、*in vitro*の培養を伴うにも関わらずほぼ正確に体内での頻度を推定しうる。そこで本研究ではこれまでに同定された造血器腫瘍に比較的高発現するHLA-A*02:01およびHLA-A*24:02によって提示される腫瘍抗原エピトープを産生するようなミニジーンを移植ドナーの末梢血B細胞由来の活性化B細胞およびEpstein-Barr virus(EBV)不死化Bリンパ芽球 (LCL) にミニジーンを遺伝子導入し、

移植後の患者末梢血T細胞に対する抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。またマイナー組織適合抗原に対する包括的なT細胞前駆体頻度の測定では、患者の移植前に採取した末梢血単核球と、それより作製した活性化B細胞およびLCLを用いた。これら2つの評価を同時に行うことで、どの抗原を移植後どの時期に免疫標的とするか効果的かを究明することを目標とした。

(c) 担癌患者の生体内には、がん細胞に対する特異的免疫応答が存在する。こうした免疫応答を強化することで、がん細胞の増殖抑制を図るのが癌の免疫療法である。そこでがん細胞に特異的に発現しているがん抗原 (腫瘍特異抗原) の同定がすすんでいる。一方で、同定したがん抗原を抗原提示する抗原提示細胞の樹立も一つの大きな課題である。

われわれは、EBV関連腫瘍において既に臨床応用されている免疫療法に着目した。EBVはヒトBリンパ球に高い感染性を示すヘルペスウイルスの一種で、健常成人の大多数に潜伏持続感染している。EBV感染Bリンパ球は免疫原性を有し、既感染者の末梢血中にはEBV抗原を標的とするCTLが存在する。試験管内においてEBVをBリンパ球に感染させて得られるLCLは、EBV抗原の抗原提示細胞として機能し、これを用いてEBV抗原を標的とするCTLを体外において効率良く誘導・増幅できることが報告されている。LCLを抗原提示細胞として用いたCTL誘導法は、EBV関連腫瘍の治療法として既に臨床応用されているものであり、体外で増幅したCTLの輸注に際しての安全確認のプロトコールが米国において既に確立している。

したがって、LCLにがん抗原を恒常発現すれば、LCLの持つ抗原提示能により、体外においてがん抗原を標的とする細胞性免疫を誘導、もしくは増幅できるのではないかと考えられる。

しかし従来の方法ではLCLにがん抗原を効率よく恒常発現させるのは技術的に困難であった。

そこでわれわれはBAC(Bacterial Artificial Chromosome)システムによる組換えEBV産生法を開発した(Kanda et al. *J. Virol.* 78:7004-7015, 2004)。この方法においては、EBVゲノム全長を保持したBACクローンをを用いて、ウイルスゲノム上へ任意の外來遺伝子を迅速・かつ確実に挿入できる。こうしてあらかじめEBVゲノム上にがん抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBVを用いてLCLの樹立を行うと、不死化する細胞はほぼ100%ががん抗原を発現すると期待される。しかもLCLにおいては活性化Bリンパ球特有の表面マーカー、共刺激分子が発現するため、抗原提示能を保持しつつ増殖することが保証されている。

本研究計画では、研究対象とするがん抗原として、固形癌、造血器腫瘍を問わず幅広く高発現している癌抗原であるWT1(Wilms' tumor 1, ウィルムス腫瘍原因遺伝子)を選択した。すなわち1)WT1遺伝子組込み組換えEBVによる健常人ドナー由来LCL樹立、2)樹立したLCLにおけるWT1抗原提示の確認、3)WT1発現LCLの抗原提示細胞としての有効性の検証、を目的として研究を行なった。

B. 研究方法

(a) 卵巣がん細胞株から作製したaAPCによるCTLの誘導：

1) aAPCの作製：

HLA class-I遺伝子のエクソン部位の中で、HLA-A、BおよびCw座に共通な配列部位に結合する3種類のsiRNAを作製した。この内、2種は既に報告されている配列を使用した(*Transplant Proc* 2007, *Molecular therapy* 2005)。1個は、我々で独自に同定した配列を用いた(未発表)。

これらのsiRNA結合部位のコドンを変換した

HLA-A*2402cDNAを、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A24陰性の卵巣がん明細胞株TOV21Gに導入した。CTLの誘導を助けるためにCD86分子もレンチウイルスベクターで導入した。細胞表面のHLAおよびCD86分子の発現は蛍光色素ラベル抗体で染色後、flow cytometerで解析した。

2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導：

コドンを変換したHLA-A*2402cDNAとCD86分子をレンチウイルスベクターで導入したTOV21G細胞に、内在HLAの発現を抑制する3種のsiRNAを一過性にトランスフェクションしてaAPCを作製した。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。TOV21G細胞、コドン変換していないHLA-A24を導入したTOV21G細胞への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。

CTLクローンは限界希釈培養法にて樹立した。クローンの傷害性および特異性の判定は、TOV21G細胞およびHLA-A24導入TOV21G細胞に加え他の卵巣がん細胞株、およびHLA-A24陽性の線維芽細胞やLCLなどの正常細胞を標的としたクロム放出試験にて検討した。

(b) 同種造血細胞移植後の再発予防のための免疫療法の開発に関する研究：

1) 腫瘍抗原ミニジーンベクターの作製：

造血器腫瘍で発現が亢進し、免疫標的となることが報告されているHLA-A*24:02およびHLA-A*02:01拘束性のエピトープを対象とした。これらのC末端にはオリジナルのアミノ酸を最低5残基残した状態で、全ての拡大エピトープをコードする塩基配列をin frameで生化学的にタンデムに結合した。シーケンスにて配列を確認後、さらにNGFRを共発現できるようなレトロウイルスベクターに組み込み、GALV-Phoenixパッケージング細胞にトランスフェクションし、プロデューサーとした。

2) 刺激細胞の作製：

CD40Lを恒常的に発現するマウスNIH-3T3細胞を移植ドナーおよび患者末梢血B細胞培養のフィーダー細胞とした。照射したフィーダー細胞上に末梢血単核球を蒔き、IL-4を添加し、B細胞が集塊を形成して増えて来るまで反復刺激した。患者移植前B細胞はこの段階で一旦凍結保存した。ドナーB細胞は、先に用意した腫瘍抗原ミニジーンレトロウイルスベクターをレトロネクチン法にて感染し、必要に応じてNGFR発現細胞をポジティブセレクションし濃縮し、その後凍結保存した。

3) 限界希釈法による培養：

移植後に試験計画に沿って凍結保存された末梢血単核球を解凍し、MACSシステムによってCD8陽性細胞を純化した。次いで96ウェル丸底プレートのA行12ウェルに均等にCD8陽性T細胞を蒔き、B→H行まで2倍ずつ段階希釈した。これを2枚ペアで作成した。片方のプレートの全ウェルには移植前の患者末梢血単核球細胞または活性化B細胞（33Gy照射）、もう1つのプレートにはミニジーンを導入したドナー活性化B細胞（33Gy照射）を刺激細胞として添加した。ミニジーン導入が不十分な場合は、該当するHLA型に拘束される腫瘍抗原ペプチドを活性化B細胞にパルスしてから用いた。

培養液は3-4おきに半量交換し、IL-2を添加した。解析に十分な細胞が得られるまで7~10日おきに反復抗原刺激を同様に行った。

4) 細胞傷害性試験と前駆体頻度解析：

患者移植前末梢血由来のPHA活性化T細胞、ドナーミニジーン導入LCLをそれぞれマイナー組織適合抗原、腫瘍抗原を提示する標的細胞として用いた。陰性コントロールとしてドナー由来細胞を用いた。細胞は3.7KBqの⁵¹Crにより標識した。培養プレートはマルチチャンネルピペットにて4つのレプリカを作成し、ここにそれぞれ陰性コントロールおよび評価

する抗原提示標的細胞を蒔き、4時間後に上清に遊離する⁵¹Crを測定した。T細胞前駆体頻度の測定にはL-Calc software (StemCell Technologies)を用いた。

(c) WT1発現LCLの抗原提示細胞としての有用性の検証：

1) WT1抗原発現LCLの樹立：

WT1発現LCLの樹立は、最近確立した新しい組換えEBV産生システム(投稿準備中)により行った。すなわちEBV(B95-8株)ゲノム全長(約175 kb)を、BACベクターにクローン化して、これを大腸菌内相同組換え法により改変してWT1遺伝子の発現カセットを組み込んだ。得られたBACクローンDNAをヒト293細胞に導入して、WT1遺伝子組込みEBVを産生した。この組換えEBVを、インフォームドコンセントを得た上で採取した健康人ドナー2名(HLA型A24：1名、A26/A33：1名)由来の末梢血単核球(PBMC)に感染させることで、LCLの樹立を行なった。

2) WT1抗原発現LCLにおけるWT1抗原提示、およびHLA拘束性の確認：

ドナー1名(HLA型 A24)から樹立したWT1発現LCLについて、WT1抗原がプロセッシングされて提示されているか否かを確認した。エフェクター細胞として、WT1特異的CTL (HLA型A24拘束性WT1抗原特異的T細胞受容体をTリンパ球に遺伝子導入して作製したもの愛媛大学・タカラバイオ(株)との共同研究)を用いた。

一方で別のドナー(HLA型 A26/33)から樹立したWT1発現LCLをターゲット細胞として、同様のアッセイを行ない、HLA拘束性の有無を調べた。

3) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

さらにWT1発現LCLの抗原提示細胞としての有用性を以下の二つの方法により調べた第一の方法として、健康人ドナー(A24)由来のWT1発現LCLと同一人由来のPBMCの共培養を3週間行

なった。そこで第二の方法として、以下を行なった。すなわち健康人ドナー(A24)由来CD8⁺T細胞に対して、WT1₁₂₃₅₋₂₄₃(CMTWNQMNL)ペプチドをパルスした同ドナー由来の成熟樹状細胞による前刺激を2回加えた後に、抗原提示細胞をWT1発現LCLに変えて、さらに1週間培養した。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に従って作成した研究計画書を作成し、すでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得た後に、担当医による人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明を実施後書面にて同意を得られた場合にのみ実施された。

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) 卵巣がん細胞株から作製した人工抗原提示細胞(aAPC)によるCTLの誘導:

1) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製:

TOV21G細胞にHLAクラスI分子に特異的な3種のsiRNAを導入すると、3から5日後には、表面のHLAクラスI分子の発現はほぼ完全に消失した。siRNA結合部位のコドンを変換したHLA-A*2402cDNAを導入したTOV21G細胞に、これらのsiRNAを導入すると、HLA-A24分子の発現は低下することなく、むしろ増強した。

2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導:

コドンを変換したHLA-A*2402及びCD86を導入したTOV21G細胞を用いて刺激したCD8⁺T細胞株は、野生型HLA-A*2402を導入したTOV21G細胞に対してIFN- γ を産生したが、元

のTOV21G細胞、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLに対してはIFN- γ を産生しなかった。このCD8⁺T細胞株を限界希釈培養し、複数のCTLクローンを樹立した。クローンD2は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞のみならず、HLA-A24陽性の卵巣明細胞がん細胞株、RMGIとIIおよびHLA-A*2402導入KOC7C細胞を強く傷害した。クローンB1は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞とRMGIを強く傷害したが、RMGIおよびHLA-A*2402導入KOC7C細胞に対する傷害性は軽度であった。クローンG3とC2は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞のみ傷害した。いずれのCTLクローンも、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLを傷害しなかった。

(b) 同種造血細胞移植後の再発予防のための免疫療法の開発に関する研究:

1) 腫瘍抗原ミニジーン発現ベクターの構築:

ミニジーンはタンデムに結合されており、プロテアソームに正しく認識されC末端が切り出されるように5アミノ酸残基を付加した。しかし、このような複雑なミニジーンはこれまで報告がないため、エピトープが正しく産生されHLA分子に提示されているかをまず確認した。

過去に当研究室で樹立されたtelomerase reverse transcriptase (hTERT)由来のHLA-A*24:02拘束性CTLクローン (*Int J Cancer*. 110:403-12, 2004.) およびepithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM)由来のHLA-A*24:02拘束性CTLクローン (*Tissue Antigens*. 64:650-9, 2004.)、他を用いた細胞傷害性試験を行った。HLA-A*24:02陽性のLCL#2は傷害を受けなかったが、ミニジーン発現ベクター(以下、TAA)を感染させたLCL#2/TAAは2つのCTLで良好に認識された。しかしHLA-A*24:02拘束性WT-1エピトープ特異的TAK-1 CTLはLCL#2/TAAを傷害出来なかった。この原因としてTAK-1が長期培養の結果senescence状態であったこと、エフェクター/標的比率が高く

取れなかったこと、WT1エピトープが改変型でなく、天然型（第2番目のアミノ酸がMet）であったことが考えられた。

以上、他のエピトープについては良好なCTLクローンがなく検討が出来なかったが、タンデムに結合したミニジーンは機能しているものと考え、以下の実験を行った。

2) 前駆体頻度の測定：

予後不良悪性リンパ腫に対してHLA一致（A2402/3101, B4007/5601, C0401/-）、性不一致同胞より骨髄移植を受けた患者末梢血（移植前、移植後 105日目、180日目）のCD8陽性細胞について限界希釈を行い、それぞれ患者の移植前末梢血単核球細胞（マイナー組織適合抗原刺激）、ドナーミニジーン導入活性化B細胞で3回刺激後、⁵¹Cr遊離試験を行った。その結果、既知の腫瘍抗原に対するCTL反応は移植ドナーについては認められた（1/123,315）ものの、移植後は検出されなかったのに対し、マイナー抗原に対するCTL前駆体頻度は、移植後105日目で1/47,883、180日目で1/45,500の頻度であった。

2例目（Ph陽性ALL, HLA同胞肝移植、HLA-A*02:01/02:10, B*35:01/40:06, C*03:03 /08:01）においても移植後1年目まで同様な傾向を認めたが、ドナーにおいても既知の腫瘍抗原に反応するCTL前駆体は検出できなかった。

(c) WT1発現LCLの抗原提示細胞としての有用性の検証：

1) WT1抗原発現LCLの樹立：

2名いずれのドナー由来のリンパ球に感染させた場合も、約4週間後に複数のLCLが樹立された。ウェスタンブロット解析によりWT1蛋白質の発現が確認できた。また樹立したLCLにおけるWT1の発現レベルは、WT1高発現細胞として知られるK562細胞よりも高かった。WT1発現LCLは、長期間培養しても、安定にWT1蛋白質を発現しつつ、大量増殖可能であった。

2) WT1抗原発現LCLにおけるWT1抗原提示、およびHLA拘束性の確認：

エフェクター細胞との共培養により、WT1発現LCLでは細胞溶解が起きたが、コントロールのWT1非発現LCLでは細胞溶解が起らなかった。よってWT1発現LCL内で発現するWT1蛋白質は、ペプチドへとプロセッシングされてHLA分子上に抗原提示されていることが確認された。

一方で、別のドナー(HLA型 A26/33)から樹立したWT1発現LCLをターゲット細胞として、同様のアッセイを行なったところ、特異的な細胞溶解はほとんど認められなかったことから、CTLによる細胞溶解はHLA拘束性であることが確認された。

3) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

第一の方法を用いた場合、テトラマー解析の結果、WT1抗原特異的CTLよりもEBV抗原特異的CTLの方が優位に増幅することが判明した。一方、第二の方法を用いた場合は、WT1特異的テトラマー陽性細胞が出現し(0.43%)、しかもこの時点ではEBV抗原特異的CTLは認めなかった。その後、WT1発現LCLとの共培養を継続したものの、WT1特異的テトラマー陽性細胞の増幅は起らなかった。

D. 考察

(a) 卵巣がん細胞株から作製したaAPCによるCTLの誘導：

CTLクローンD2とB1は、卵巣明細胞がんにも共通して発現している腫瘍抗原を認識している可能性がある。

(b) 同種造血細胞移植後の再発予防のための免疫療法の開発に関する研究：

同種造血細胞移植後の免疫反応の標的抗原が同種抗原であるマイナー組織適合抗原であるか、腫瘍抗原であるかを2例について解析した。まだ予備的実験のレベルであるが、過

去に過剰発現する腫瘍抗原として報告のある WT1, hTERT などに対する反応は移植後早期では検出できなかった。1 例目のドナー T 細胞にはこれらの腫瘍抗原に対する CTL 前駆体が存在しており、移植後の免疫抑制状態や、寛解期移植のために腫瘍が存在しなかったことが CTL 前駆体の誘導されなかった原因と考えられた。

対してマイナー組織適合抗原組織適合への反応性は移植後 100 日目、半年の段階で CTL 前駆体が検出され、移植後早期の免疫反応はマイナー組織適合抗原に向けられていると考えられた。これは移植時に残存する患者の血液系細胞がマイナー組織適合抗原の抗原提示細胞として機能するため、想定される結果であった。ただし、以上は限られた症例での検討であり、今後さらに症例の蓄積が必要である。特に寛解期移植と非寛解期移植では上述のごとく、腫瘍抗原に対する CTL 前駆体の誘導効率は異なってくると予想される。

本研究で腫瘍抗原ミニジーンを用いた理由は、endogenous に発現される抗原レベルに近づくことであった。すなわちペプチドパルス抗原提示細胞で刺激し、細胞傷害性試験もペプチドパルス標的細胞を用いるこれまでの研究では、ペプチド依存性の反応を見ているに過ぎない可能性があったことによる。本研究でも反応性が不十分か、腫瘍抗原ミニジーン導入活性化 B 細胞の数が不十分な場合はペプチドパルス抗原提示細胞を要したが、細胞傷害性試験の標的細胞はミニジーン導入細胞を用いることにより、ペプチド依存性の傷害活性はある程度回避できたと考える。今後、活性化 B 細胞をさらに効率よく増やせる方法の開発 (NIH-3T3 に代えて K562 ベースのシステムの利用) とレトロウイルスベクターの感染効率を向上させていく。

なお、マイナー組織適合抗原ペプチドを用いた移植後再発予防ワクチンの臨床試験が進

行中であり、ワクチン後の患者体内における免疫反応を解析中である。

また、同種造血細胞移植が本来養子免疫療法であることから、マイナー組織適合抗原を認識する T 細胞の T 細胞受容体 cDNA を導入した遺伝子改変 T 細胞も準備中であり、今後、機能解析を行う予定である。

(c) WT1 発現 LCL の抗原提示細胞としての有用性の検証：

WT1 発現 LCL には、WT1 蛋白質全長が発現しており、今回調べたエピトープ以外にも複数のエピトープが抗原提示されていることが期待できる。また LCL には HLA クラス I 分子とクラス II 分子の両者が発現しているため、HLA クラス I 分子上のみならず、クラス II 分子上への抗原提示も期待できる。こうした可能性を考慮しつつ、今後 WT1 発現 LCL の有用性の検証を行なっていく必要があると考えられた。

E. 結論

(a) siRNA と siRNA に抵抗性の HLA-A*2402 を導入した細胞を用いて、HLA-A*2402 拘束性に卵巣がんを傷害する CTL クローンを樹立した。今後は、TOV21G 細胞の mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、これらの CTL クローンが認識する抗原 (遺伝子) とエピトープを同定する予定である。これらの情報は、卵巣がんに対する免疫療法を構築するための基盤となるであろう。また、今回用いた方法は、他のがん細胞株にも応用可能である。現在、肺がん細胞株から樹立した CD133 陽性の「がん幹細胞」様の細胞株から同じ方法で aAPC を作製中である。

(b) 移植後の GVL 効果をもたらす免疫反応の標的抗原について検討を開始した。移植後半年～1 年までは腫瘍抗原よりマイナー組織適合抗原が主な標的となることを示唆する予備的な結果を得た。今後さらに症例を蓄積し、

標的となる抗原につき詳細な解析を行いたい。
(c) WT1抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBVの1回感染により、ドナーのHLA型によらず、任意の人の末梢血からWT1発現LCLを樹立できることが明らかになった。また樹立したLCLで発現したWT1蛋白質は、ペプチドへとプロセシングされて、HLAクラスI分子上に抗原提示されていることが示された。一方で、WT1発現LCLを用いたWT1特異的CTLの体外増幅のプロトコール確立には、さらなる条件検討が必要である。

F. 健康危険情報
無し。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Hirose T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraiishi K, Ito M, Shibata K, Kikkawa F, Miyamura K, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched HLA class II-restricted CD8⁺ cytotoxic T cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.*, in press.
- 2) Yamahira A, Narita M, Nakamura T, Watanabe N, Kaji M, Taniguchi T, Hashimoto S, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y, Kuzushima K, Takahashi M. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leuk Res.* in press.
- 3) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Kondo T,

Maekawa R, Takahara M, Nieda M, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. A phase I/IIa clinical trial of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia using dendritic cells co-pulsed with WT1 peptide and zoledronate. *Brit J Haematol.* in press.

- 4) Hoshino Y, Nishikawa K, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8⁺T cells in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol.* 50(3):244-6,2011.
- 5) An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol.* 93(2):176-85, 2011.
- 6) Sato Y, Shirata N, Murata T, Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Kanda T, and Tsurumi T. Transient Increases in p53-responsible Gene Expression at Early Stages of Epstein-Barr Virus Productive Replication. *Cell Cycle.* 9(4):807-814, 2010.
- 7) Murata T, Hotta N, Toyama S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Ohshima T, Kanda T, Tsurumi T. Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J Biol Chem.* 285(31):23925-23935, 2010.
- 8) Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T, Tsurumi T. The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77

gene. *PLoS One*. 5(7):e11901, 2010.

- 9) Nakayama S, Murata T, Yasui Y, Murayama K, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. Tetrameric ring formation of Epstein-Barr virus polymerase processivity factor for viral replication. *J Virol*. 84(24) :12589-12598, 2010.

2. 学会発表

- 1) Akatsuka Y, Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Hamajima T, Nannya Y, Matsubara A, Riddell SR, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally : 第16回日本遺伝子治療学会、宇都宮市、2010年7月
- 2) 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、近藤紳司、廣澤友也、西尾信博、植村靖史、葛島清隆。HLA-A24拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的CTLのエピトープはオートファジーを介して腫がん細胞に提示される : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 3) 永井功造、藤原弘、越智俊元、安軍、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴。Development of anti-leukemia gene immunotherapy using Aurora-A kinase-specific T-cell receptor gene transfer : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 4) 越智俊元、藤原弘、岡本幸子、安軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。内在性TCRを抑制できるWT1特異的TCRペクターを用いたがんに対する新たな免疫遺伝子療法の開発 : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 5) 安軍、藤原弘、越智俊元、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。Engineered T cells using both chemokine-receptor gene and tumor-specific TCR gene transfer for adoptive therapy : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 6) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Utsumi M, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Maekawa R, Kondo T, Nieda M, Yokokawa K, Ito T, Shimizu A, Tada H, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients : 14th International Congress of Immunology、神戸市、2010年8月
- 7) 越智俊元、藤原弘、岡本幸子、安軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。内在性TCR抑制指向性WT1特異的TCRペクターを用いた白血病に対する新たな免疫遺伝子療法の開発 : 第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 8) 永井功造、藤原弘、越智俊元、安軍、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、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2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 9) 安軍、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。ケモカインレセプターとがん特異的T細胞レセプターを利用したがんに対する免疫遺伝子療法の開発 : 第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 10) 藤原弘、安軍、越智俊元、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。養子免疫療法の効果増強を目的にケモカイン受容体とがん腫瘍特異的T細胞受容体の両遺伝子を導入したTリンパ球 : 第69回日

- 本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
- 11) 永井功造、藤原 弘、越智俊元、安 軍、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遺伝子免疫療法の開発：第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
 - 12) 岡村（出町）文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、近藤紳司、廣澤友也、西尾信博、植村靖史、葛島清隆。HLA-A24拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的CTLの認識エピトープはオートファジーを介して提示される：第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
 - 13) 越智俊元、藤原 弘、岡本幸子、安 軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、安川正貴。内在性TCRを抑制できるWT1特異的TCRベクターを用いたがんに対する新たな免疫遺伝子療法の開発：第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
 - 14) 小川誠司、松原亜以子、鬼塚真、柏瀬貢一、真田昌、南谷泰仁、赤塚美樹、佐竹正博、千葉滋、佐治博夫、丸谷悦子、猪子英俊、森島泰雄、小寺良尚、笹月健彦。MHCと疾患GWASの手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索。第13回日本組織適合性学会大会、東京2010年9月
 - 15) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Maekawa R, Kondo T, Nieda M, Yokokawa K, Ito T, Shimizu A, Tada H, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients using autologous apoptotic leukemic cells or a heteroclitic WT1 peptide as antigens: DC2010, Swiss, 2010年10月
 - 16) Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera, Y Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histo-compatibility Antigens. 第17回BMT Tandem Meetings, ハワイ 2011年2月
 - 17) Akatsuka Y. Characterization And Clinical Application of Minor Histocompatibility Antigens. The 15th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation (Plenary session), Muju Resort, South Korea, 2011年2月
 - 18) 藤原 弘、越智俊元、永井功造、安 軍、岡本幸子、峰野純一、浅井洋晶、宮崎幸大、白方俊章、成見弘、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴、Development of gene-immunotherapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene against human leukemia (Update report): Attempts to conquer facing problems. 第33回日本造血細胞移植学会総会、松山市、2011年3月
 - 19) 赤塚美樹. マイナー組織適合抗原の重要性（シンポジウム2）。第33回日本造血細胞移植学会総会、松山市、2011年3月
 - 20) 赤塚美樹、山村武史、Bleakley Marie、疋田潤哉、濱島剛、南谷泰仁、松原亜以子、Riddell Stanley、恵美宣彦、小寺良尚、森島泰雄、小川誠司。HapMap資源を利用したマイナー組織適合抗原に関わるSNP同定のためのオンラインソフトの開発。第33回日本造血細胞移植学会総会、松山市、2011年3月
 - 21) 神田輝、鶴見達也。潜伏感染EBウイルスエピゾームの宿主染色体付着機構の解析。第25回ヘルペスウイルス研究会。第25回ヘルペスウイルス研究会、浜松市、2010年5月
 - 22) 神田輝、鶴見達也。潜伏感染細胞中で

EBNA1蛋白質と相互作用する細胞性因子の解析：第7回EBウイルス研究会、第7回EBウイルス研究会、札幌市、2010年7月

23) 神田輝、鶴見達也. The impact of viral repetitive sequences on the biological properties of Epstein-Barr virus recombinants : 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. 英国 Birmingham、2010年9月

24) 神田輝、越智俊元、安川正貴、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、鶴見達也. WT1蛋白質高発現リンパ芽球様細胞株を用いたWT1特異的細胞性免疫誘導の試み. : 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月

25) 安田愛、野口耕治、片山和浩、三橋純子、

坂東俊和、杉山弘、神田輝、杉本芳一. Epstein-Barr virus由来のEBNA1蛋白質に対する機能的阻害剤探索：第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月

26) 神田輝、鶴見達也. EBウイルス潜伏感染細胞内におけるEBNA1蛋白質結合細胞性因子の解析：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月

27) 野口耕司、安田愛、片山和浩、三橋純子、蓑島維文、坂東俊和、杉山弘、神田輝、杉本芳一. EBNA1蛋白質のDNA結合能を阻害する化合物の探索研究：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11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

卵巣がん細胞株から作製した人工抗原提示細胞によるCTLの誘導

分担研究者 葛島 清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

研究要旨 免疫療法の基盤研究として、がん細胞を傷害する細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導とその標的抗原の同定が最も重要である。平成21年度に報告した人工抗原提示細胞(aAPC)システムを応用し、HLA-A24拘束性に卵巣がん細胞を認識するCTLクローンを樹立した。卵巣がん細胞株であるTOV21Gは、HLA-A24陰性であるが、A11,A26など他のHLA分子を細胞表面に発現している。HLA-A,B及びCw遺伝子の共通配列部位に相補的な3種類のsiRNAをTOV21G細胞に導入後、3-5日目には細胞表面でのHLA発現をほぼ完全に消失させることができた。TOV21G細胞に、上記siRNA部位のコドン変換をしたHLA-A*2402cDNAを、レンチウイルスベクターを用いて予め導入しておき、さらにsiRNA処理を加えることにより、HLA-A24分子のみ発現するaAPCを作製した。CTLの誘導を助けるためにCD86分子もレンチウイルスベクターで導入した。

健康成人末梢血のナイーブCD8⁺T細胞をこのaAPCで2回刺激したところ、TOV21G細胞をHLA-A24拘束性に強く傷害するCTL株を得た。このCTL株から限界希釈法にて多数のCTLクローンを得た。クローンD2は、TOV21Gのみならず、RMGI、RMGII、KOC7などの卵巣がん細胞株をHLA-A24拘束性に傷害した。クローンB1はTOV21GとRMGIのみを傷害した。クローンG3は、TOV21GのみをHLA-A24拘束性に傷害し、他のHLA-A24陽性の卵巣株を傷害しなかった。いずれのクローンもHLA-A24陽性の線維芽細胞株やEBV感染Bリンパ芽球を傷害しなかった。これらの結果は、クローンD2、B1およびG3がそれぞれ異なるエピトープを認識していることを示している。今後は、これらのCTLクローンを認識する抗原遺伝子を、TOV21G細胞のmRNAから作製したcDNAライブラリーを用いた発現クローニング法にて同定を進める予定である。

siRNAとsiRNAに抵抗性の目的HLAcDNA導入の組み合わせ利用は、他のがん由来の細胞株にも応用可能である。現在、肺がん細胞株から樹立したCD133陽性の「がん幹細胞」様の細胞株から同じ方法でaAPCを作製中である。

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タイプのがんでは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。平成21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細胞および膀胱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。K562細胞は、細胞表面にHLAを発現していないため、目的のHLA分子を単独で発現させることは容易である。他の多くのがん細胞株においては、もともと自身のHLA分子を細胞表面に発現しているため、そのままでは目的のHLA分子を単独で発現させることができない。

この問題を解決すれば、がん細胞を傷害するCTLを得るためのaAPCシステムを、他のがん種に広げることができる。本年度は、この目的で、以下の検討を行った。1) siRNAによる細胞本来のHLAの発現を抑制、2) そのsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A*2402cDNAを、レンチウイルスベクターを用いて導入、3) 1)と2)を組み合わせることで、目的のHLA-A*2402のみを発現するaAPCを作製、4) HLA-A*2402拘束性のCTLの誘導。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製：

HLA class-I遺伝子のエクソン部位の中で、HLA-A座、B座およびC座に共通な配列部位に結合する3個のsiRNAを作製した。この内、2個は既に報告されている配列を使用した(Transplant Proc 2007, Molecular therapy 2005)。1個は、我々で独自に同定した配列を用いた (未発表)。

上記3個のsiRNA結合部位のコドンを変

換したHLA-A*2402cDNAを、レンチウイルスベクターを用いてHLA-A24陰性の卵巣がん明細胞株TOV21Gに導入した。CTLの誘導を助けるためにCD86分子もレンチウイルスベクターで導入した。細胞表面のHLAおよびCD86分子の発現は蛍光色素ラベル抗体で染色後、flow cytometerで解析した。

2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導：

コドンを変換したHLA-A*2402cDNAとCD86分子をレンチウイルスベクターで導入したTOV21G細胞に、内在HLAの発現を抑制する3個siRNAを一過性にトランスフェクションしてaAPCを作製した。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。TOV21G細胞、コドン変換していないHLA-A24を導入したTOV21G細胞への反応性をIFN γ キャッチ法にて測定した。

CTLクローンは限界希釈培養法にて樹立した。クローンの傷害性および特異性の判定は、TOV21G細胞およびHLA-A24導入TOV21G細胞に加え他の卵巣がん細胞株、およびHLA-A24陽性の線維芽細胞やEBウイルス感染リンパ芽球株(LCL)などの正常細胞を標的としたクロム放出試験にて検討した。

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：

TOV21G細胞にHLAクラスI分子に特異的な3個のsiRNAを導入すると、3から5日後には、表面のHLAクラスI分子の発現はほぼ完全に消失した。siRNA結合部位のコドン

を変換したHLA-A*2402cDNAを導入したTOV21G細胞に、3個のsiRNAを導入すると、HLA-A24分子の発現は低下することなく、むしろ増強した。

2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導:

コドンを変換したHLA-A*2402及びCD86を導入したTOV21G細胞を用いて刺激したCD8⁺T細胞株は、野生型HLA-A*2402を導入したTOV21G細胞に対してIFN- γ を産生したが、元のTOV21G細胞、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLに対してはIFN- γ を産生しなかった。このCD8⁺T細胞株を限界希釈培養し、複数のCTLクローンを樹立した。クローンD2は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞のみならず、HLA-A24陽性の卵巣明細胞がん細胞株、RMGIとIIおよびHLA-A*2402導入KOC7C細胞を強く傷害した。クローンB1は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞とRMGIを強く傷害したが、RMGIIおよびHLA-A*2402導入KOC7C細胞に対する傷害性は軽度であった。クローンG3とC2は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞のみ傷害した。いずれのCTLクローンも、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLを傷害しなかった。

D. 考察

CTLクローンD2とB1は、卵巣明細胞がんに共通して発現している腫瘍抗原を認識している可能性がある。

E. 結論

siRNAとsiRNAに抵抗性のHLA-A*2402を導入した細胞を用いて、HLA-A*2402拘束性に卵巣がんを傷害するCTLクローンを樹立した。今後は、TOV21G細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製し、これらのCTLクローンが認識する抗原（遺伝子）とエピトープを同定する予定である。これらの情報は、卵巣がんに対する免疫療法を構築するための基盤となるであろう。また、今回

用いた方法は、他のがん細胞株にも応用可能である。現在、肺がん細胞株から樹立したCD133陽性の「がん幹細胞」様の細胞株から同じ方法でaAPCを作製中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirosawa T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Shibata K, Kikkawa F, Miyamura K, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched HLA class II-restricted CD8⁺ cytotoxic T cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.*, in press.
- 2) Yamahira A, Narita M, Nakamura T, Watanabe N, Kaji M, Taniguchi T, Hashimoto S, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y, Kuzushima K, Takahashi M. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leuk Res.* in press.
- 2) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Kondo T, Maekawa R, Takahara M, Nieda M, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. A phase I/IIa clinical trial of immunotherapy for elderly patients with acute myeloid leukemia using dendritic cells co-pulsed with WT1 peptide and zoledronate. *Brit J Haematol.* in press.
- 3) Hoshino Y, Nishikawa K, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8⁺T cells in acute

- infectious mononucleosis. *J Clin Virol.* 50(3):244-6,2011.
- 4) An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol.* 93(2):176-85, 2011.
2. 学会発表
- 1) Akatsuka Y, Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Hamajima T, Nannya Y, Matsubara A, Riddell SR, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally : 第16回日本遺伝子治療学会、宇都宮市、2010年6月
- 2) 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、近藤紳司、廣澤友也、西尾信博、植村靖史、葛島清隆。HLA-A24拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的CTLのエピトープはオートファジーを介して腫がん細胞に提示される : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2011年7月
- 3) 永井功造、藤原弘、越智俊元、安軍、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴。Development of anti-leukemia gene immunotherapy using Aurora-A kinase-specific T-cell receptor gene transfer : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 4) 越智俊元、藤原弘、岡本幸子、安軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。内在性TCRを抑制できるWT1特異的TCRベクターを用いたがんに対する新たな免疫遺伝子療法の開発 : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 5) 安軍、藤原弘、越智俊元、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。Engineered T cells using both chemokine-receptor gene and tumor-specific TCR gene transfer for adoptive therapy : 第14回日本がん免疫学会総会、熊本市、2010年7月
- 6) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Utsumi M, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Maekawa R, Kondo T, Nieda M, Yokokawa K, Ito T, Shimizu A, Tada H, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients : 14th International Congress of Immunology、神戸市、2010年8月
- 7) 越智俊元、藤原弘、岡本幸子、安軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴。内在性TCR抑制指向性WT1特異的TCRベクターを用いた白血病に対する新たな免疫遺伝子療法の開発 : 第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 8) 永井功造、藤原弘、越智俊元、安軍、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、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2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 9) 安軍、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。ケモカインレセプターとがん特異的T細胞レセプターを利用したがんに対する免疫遺伝子療法の開発 : 第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、松山市、2010年8月
- 10) 藤原弘、安軍、越智俊元、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安