

20118044A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 田 貢

平成24（2012）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 藤田 貢

## II. 分担研究報告

1. HLA-A\*24:02 拘束性に卵巣がん細胞を傷害する CTL の樹立と  
その認識抗原の同定 ..... 11  
藤田 貢 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)
2. マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用 ..... 15  
赤塚美樹 (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 ..... 20  
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 ..... 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

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 藤田 貢  
愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部 室長

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) HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定、(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、および(c) Wilms' tumor gene 1 (WT)1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) 様々な種類のがんに対して免疫療法を効果的に実施するためには、個々のがん種に発現している、CTLの標的抗原の同定が必要である。RNA干渉法(siRNA)とsiRNAに抵抗性のHLA-A24を発現するレンチウイルスを用いてHLAを改変した卵巣がん細胞株TOV21Gを抗原提示細胞として、HLA-A24陽性の成人末梢血ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞を刺激し、HLA-A24拘束性にTOV21G細胞を傷害するCTLクローンD2を樹立した。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拘束性に傷害したが、HLA-A24陽性の線維芽細胞株やEBウイルス感染Bリンパ芽球(LCL)を傷害しなかった。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、クローンD2が認識する抗原遺伝子*claudin-1*と、CTLのエピトープのアミノ酸配列、RYEFGQALFを同定した。*claudin-1*は、正常気管支上皮細胞株(NHBE)にも発現しており、クローンD2はNHBEを若干傷害した。今回同定したエピトープに対するT細胞応答は、肺癌患者や自己免疫性肺傷害患者において惹起されている可能性が示唆された。

(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。そこで移植後再発を予防する目的で、我々が同定したマイナー抗原エピトープペプチドを用いたワクチン接種の臨床試験を開始している。平成23年度末の段階で82例について適格性の検討を行い、試験開始から計7例に接種した。うち6例の評価可能症例では、接種したマイナー抗原へのCTL反応

が増強されたのは1例のみであった。今後、接種量をプロトコルどおり増量して検討を試みるが、同時に養子免疫療法およびその関連技術の開発も必要と考えられる。まず移植ドナーからT細胞が得られない臍帯血移植などの場合、代替ドナーのT細胞にマイナー抗原特異的TCRを導入する必要があるが、HLA不適合があると拒絶の原因になる。そこでTCR導入細胞のHLA発現を減弱できないかを検討している。次いでマイナー抗原にとらわれず、白血病関連抗原とされるFLT-3に対する単鎖抗体分子をT細胞に遺伝子導入するシステムを構築しつつある。

(c) ヒト末梢血由来のBリンパ球にEBウイルス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。前年度の研究により、組換えEBウイルス産生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、迅速かつ確実に樹立できることを示した。本年度は、EBウイルス未感染者ドナーより供与された末梢血単核球(PBMC)を用いた実験をおこなった。WT1遺伝子組込みEBウイルス感染後約4週間で複数のWT1発現LCLを樹立できたことから、この方法の汎用性が実証された。EBウイルス未感染ドナー由来のWT1発現LCLを抗原提示細胞として同一ドナー由来の末梢血単核球を刺激する実験を行なったところ、予想通りEBウイルス抗原特異的CTLの増幅は最小限に抑えられた。よって本方法は、特にEBウイルス未感染者におけるWT1特異的CTL誘導において有効である可能性が示された。

|       |              |     |
|-------|--------------|-----|
| 分担研究者 | 所属施設名        | 職名  |
| 赤塚美樹  | 藤田保健衛生大学     | 准教授 |
| 神田 輝  | 愛知県がんセンター研究所 | 室長  |

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\*24:02、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-A24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。さらに平成22年度は、siRNAによる細胞本来のHLAの発現を抑制し、そのsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A\*24:02 cDNAをレンチウイルスベクターを用いて導入する方法を開発し、本方法の有用性を卵巣がん細胞株TOV21Gで検討した。

#### 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。

我々は、アロ反応を回避できる汎用性の

本年度は、このHLA改変TOV21G細胞を用いて誘導したHLA-A24拘束性CTLクローンD2の認識する抗原遺伝子と、そのエpitep部位のアミノ酸配列を決定したので報告する。

(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が、近年よりハイリスク患者に移植が行われるようになった結果、再発ハイリスクは高率のままであり、これを克服する技術の開発が求められている。同種抗原はほとんどが過剰発現した自己蛋白にコードされる腫瘍抗原と比較して、非自己抗原であり、強い抗原性が期待されている。我々は、これら同種抗原のうち、血液系細胞にのみ発現する分化抗原上の多形部位を含むペプチド（マイナー抗原）がHLA上に発現されると、GVHDよりも抗白血病効果（GVL効果）を選択的に誘導できると考え、これらペプチドをワクチンとして移植後再発例もしくは再発ハイリスク例に治療・予防ワクチンとして投与する臨床試験を行っている。しかし移植から長期間が経過すると、マイナー抗原に反応するCTL前駆体が減少してしまうため、ワクチンのみならず、養子細胞療法的なアプローチも並行して検討を始めた。この際の標的はワクチンとしての抗原性より弱いものでも大量細胞移入によりカバーできると考え、マイナー抗原のみならず、抗体の結合できる白血病細胞表面抗原も対象と考えている。後者として、我々の研究協力者が有用な抗体療法の標的として報告したFLT-3分子をモデル抗原として、Chimeric Antigen Receptor (CAR)導入T細胞を誘導する系を準備しつつある。

さらに臍帯血移植は全同種移植の3分の1を占めるに至っているが、大きな問題点は細胞療法のための末梢血が得られないこ

とである。そこでHLAが完全には一致しない第3者からの末梢血T細胞をCARやTCR導入細胞とする必要がある。この際、不適合HLAは患者の免疫細胞によって認識され、拒絶抗原となりうる。海外ではトランスポゾンを用いたHLA遺伝子のノックアウトが試みられているが、我々はsiRNAアプローチでHLAのノックダウンが可能かどうか検討を行うこととした。

(c) EBウイルスはヒト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、健康成人の大多数に潜伏持続感染している。EBウイルス感染Bリンパ球は免疫原性を有し、既感染者の末梢血中にはEBウイルス抗原を標的とするCTLが存在する。試験管内においてEBウイルスをBリンパ球に感染させて得られる不死化細胞株であるリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line、以下LCL)は、EBウイルス抗原の抗原提示細胞として機能し、これを用いてEBウイルス抗原を標的とする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。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。

分担研究者らは、がん抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBウイルスを用いてLCLの樹立を行うと、ほぼ100%がん抗原を発現する細胞が得られることを既に報告した(Kanda et al. *J. Virol.* 78:7004-7015, 2004)。また昨年度の研究により、同様の手法を用いて、がん抗原WT1(Wilms' tumor 1, ウィルムス腫瘍原因遺伝子)を発現するLCLを樹立できること、またこの細胞がWT1抗原を抗原提示していることを示した(Kanda et al, *PLoS One*, 2011、およびKanda et al, 投

稿中)。しかしながらWT1発現LCLにはEBウイルス抗原も提示されているため、EBウイルス既感染者末梢血単核球との共培養による細胞傷害性T細胞(CTL)誘導を行なうと、EBウイルス抗原特異的CTLが優位に増幅する。そこで本年度は、EBウイルス未感染ドナー由来の血液を用いた実験を行なった。

## B. 研究方法

### (a) HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定：

#### 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種の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種は、我々で独自に同定した配列を用いた(未発表)。

上記3種のsiRNA結合部位のコドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNA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、フローサイトメーターで解析した。

#### 2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導：

コドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNA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<sup>+</sup>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-

A\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞への反応性をIFN $\gamma$ 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、HLA-A24陽性の線維芽細胞、EBウイルス感染リンパ芽球株(LCL)および正常気管支上皮から樹立された細胞株NHBE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。

#### 3) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

TOV21G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一過性に導入し、CTLと24時間培養した。CTLから分泌された上清中のIFN $\gamma$ 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。

### (b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

#### 1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

HLA-A\*24:02、HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:06、HLA-B\*44:03拘束性の5種類のエピトープペプチド(ACC-1Y、ACC-1C、HA-1H、ACC-2、ACC-6)がワクチンとして準備されている。少なくともこれらHLAアレルをドナー、患者間で共有し、マイナー抗原が成立するGVL方向の不適合移植を受けた患者で適格基準を満たすものをリクルートして、説明と同意の後、5回ワクチン接種することを目標とした。3回以上ワクチンが接種できた症例を評価可能とした。

#### 2) FLT-3反応性のChimeric Antigen Receptor (CAR)を組み込んだレトロウイルスベクターの作製：

Antagonistic FLT-3 抗体、clone A2は学内研究協力者の山本・赤堀らがphage display システムを用いて単鎖抗体として樹立した (Cancer Sci. 103:350-9, 2012.)。この抗体はFLT-3リガンド (FL) の存在下においてもFLT-3とMAPKのリン酸化を抑制し、daunorubicinによるapoptosisを誘導する。またADCC活性はないが、CDC活性を認めFLT-3陽性白血病細胞を傷害した。そこでこの単鎖部分のcDNAを用い、CARのコンストラクト作成に用いた。ベクターはLZRSpBMNZを基本骨格に用いた。

3) HLAクラスI分子のノックダウンベクターの構築：

HLA分子のノックダウンにはshRNAを用い、同じベクターにTCR $\alpha$ ・ $\beta$ 鎖のcDNAや、CARを搭載できることを目指した。shRNAの配列は、既報の論文を参考にsiRNAを合成し、ノックダウン効率の高いものを組み合わせることとした。

(c) 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：

1) WT1抗原発現LCLの樹立：

インフォームドコンセントを得た上で採取したEBウイルス未感染健康人ドナー1名 (HLA型 A24/11)由来の末梢血単核球 (PBMC)にWT1遺伝子組込みEBウイルスを感染させることで、WT1発現LCLの樹立を行なった。コントロールとしてGFP (green fluorescent protein) 遺伝子組込みEBウイルスを同様に感染させることで、GFP発現LCLを樹立した。

2) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

樹立したWT1発現LCLおよびGFP発現LCLを放射線照射により不活化した後、これを同一人由来のPBMCと共培養することで、CTL誘導を試みた。

(倫理面への配慮)

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

(a) HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定：

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結合部位のコードンを変換したHLA-A\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞に、3種の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：

コードンを変換したHLA-A\*24:02及びCD86を導入したTOV21G細胞を用いて刺激したCD8<sup>+</sup>T細胞株は、野生型HLA-A\*24:02を導入したTOV21G細胞に対してIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ を産生しなかった。このCD8<sup>+</sup>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。この内クローン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-A24導入KOC7C細胞を強く傷害したが、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLは傷害しなかった。NHBEは、弱いながらクローンD2に傷害を受けた。3) CTLクローンD2が認識する抗原をコードする遺伝子の同定：



クローンD2は*claudin-1*がコードする遺伝子産物を認識していた。5'および3'側から短縮したcDNA発現プラスミッドと合成ペプチドを用いた検討により、CTLエピトープのアミノ酸配列をRYEFGQALFと決定した。合成ペプチドは数nMの濃度までクローンD2に認識された。

#### (b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

##### 1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

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23年12月末の時点で81症例のリクルートを終え、内14例がマイナー抗原ミスマッチ適応であった。本年度は悪性リンパ腫の移植後再発例1例に対しペプチドワクチン(300 $\mu$ g)を投与した。有害事象は認めなかったものの、接種途中でProgressive diseaseとなり、試験の中断を余儀なくされた。適格基準は満たされていたものの、腫瘍の急速な進展が予想される症例のリクルートについて課題を残した。

##### 2) FLT-3反応性のCARを組み込んだレトロウイルスベクターの作製：

A2抗体は軽鎖と重鎖がリンカーで結合され、N末端には分泌蛋白用のリーダー配列が、C末端にはIgG1のconstant領域が付加されていた。CARの第3世代は、臨床試験でcytokine syndromeを誘導し死亡例も報告されていたため、現在の主流である第2世代のCARを樹立することとした。すなわち、細胞外constant領域はIgG4を、膜貫通領域はCD28分子配列を、細胞内ドメインにはCD3 $\zeta$ 配列を用い、PCR法にて結合した。

レトロベクターにはLZRSpBMNZを用い、これよりLac-Z遺伝子を除去、また残存するgag-polの一部をpackaging signalから除去し、splice acceptor (SA) として、既報の

elongation factor-1 (EF1)のintron 1-exon 2部位を用いた。SAの配列はwild typeから、ウイルス価が向上するようsplicing 効率を落とす配列に変換した。クローニング部位としてHind III、Not I配列を挿入した。CAR配列全長はPCRプライマーにそれぞれHind III、Not Iを導入し、制限酵素消化後に構築したレトロベクターに組み込んだ。

レトロベクターはPhoenix-GPパッケージング細胞にGalvのエンベロープを導入したPhoenix-Glavパッケージング細胞にtransfectionし、プロデューサー細胞とした。CARの発現は、FLT-3に蛍光タグを付けたものを抗原として用い、現在、ウイルスが十分産生されるか検討中である。

##### 3) HLAクラスI分子のノックダウンベクターの構築：

siRNAとしてスクリーニングした結果、共通exon 1-exon 2部位としてGCTCCCACTCCATGAGGTAT、共通exon 2部位としてGCTACTACAACCAGAGCGA、共通exon 4部位としてGGAGATCACACTGACCUGGCAが選ばれた。これを三重大学とタカラバイオとの共同研究で、shRNAを発現させる構築を行い、レトロベクターのどの部位に挿入すると最もノックダウン効率が良いか検討を行っている。スクリーニングに用いた一過性発現系ではウイルスタイターが低く、細胞内に1コピーしか挿入されないと不十分であった。そこでecotropicプロデューサーを作成し、マウスPG13パッケージング細胞に感染にて導入し、複数コピーをもつウイルス産生細胞をクローニングしている。

#### (c) 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：

##### 1) WT1抗原発現LCLの樹立：

WT1遺伝子組込みEBウイルス感染後、

約4週間で複数のLCLが得られた。抗WT1抗体を用いた蛍光免疫染色法によりWT1蛋白質の発現を確認したところ、LCLごとにWT1発現率に差が見られたものの、約60～80%の細胞で、細胞核内にWT1蛋白質の発現を確認した。またコントロールのGFP発現LCLも複数得られた。

#### 2) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

WT1発現LCLないしGFP発現LCLと、同一人由来のPBMCを共培養しても、EBウイルス抗原特異的CTLは検出限界以下であった。一方、わずかながらWT1特異的テトラマー陽性細胞の出現を認めた。

#### D. 考察

##### (a) HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定：

今回同定したCTLクローンD2が認識する抗原遺伝子*claudin-1*は、タイトジャンクションを構成する蛋白である。このため正常細胞にも発現している。大腸がん細胞では、過剰に発現が見られ、増殖能や転移能など悪性形質の獲得との関連が報告されている(Dhawan P, et al., *JCI*, 115(7):1765, 2005)。今回、HLA-A24を保有する成人のナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞に、*claudin-1*を認識するCTLの前駆細胞が含まれていることが明らかとなった。このことから、今回同定したエピートプに対するT細胞応答が、肺がん患者や自己免疫性肺傷害患者において惹起されている可能性が示唆された。

##### (b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

マイナー抗原ワクチン臨床試験については、対象症例検索のための候補者が80例を超えたが、GVL方向のマイナー抗原不適合が必要という条件があるため、適格例が見つかる可能性が高くない。しかし現在得ら

れている16%の適格例は、理論値に近い。従って、臨床試験の完遂にはさらに対象をリクルートする努力を継続する必要がある。

FLT-3を標的とするCAR導入T細胞療法については、ScFv抗体から第2世代CARを構築するのに時間を要したため、遺伝子導入T細胞の機能解析は次年度の課題である。IgG1フォームで産生されたA2抗体はantagonistとして十分活性を持ち、特異性も良好であったため、CAR-T細胞とした場合にも特異的な細胞傷害活性が得られると思われる。今後、*in vitro*, *in vivo*のアッセイ系で検討したい。

第三者から養子移入された細胞の拒絶を防ぐためには、不適合HLAの発現を低下させる必要がある。米国で試みられているトランスポゾンを用いる方法はHLA-A, B, Cそれぞれの遺伝子、合計6か所をノックアウトする必要がある。HLA-A,B,C全てに共通する配列を標的とするshRNAシステムでは1回の遺伝子導入で目的を達しうる可能性がある。さらにこのベクターにcodon交換を行ってshRNA耐性としたHLA-Gなどを導入すれば、さらに拒絶されにくくなるので、今後、効率を見ながら検討して行く予定である。

##### (c) 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：

一般にEBウイルス既感染者PBMC中にはEBウイルス抗原特異的メモリーT細胞が存在するため、EBウイルス抗原を発現するLCLを用いた刺激を行なうと、EBウイルス特異的CTLが増幅・誘導されてしまう。しかしEBウイルス未感染者のPBMCには、EBウイルス抗原特異的CTLが存在しないため、WT1発現LCLを用いて刺激しても、EBウイルス抗原特異的CTLの増幅が最小限に抑えられたと考えられる。

## E. 結論

(a) siRNA と siRNA に抵抗性の HLA-A24:02 を導入した細胞を用いて、HLA-A24 拘束性に卵巣がんを傷害する CTL クローンを樹立した。TOV21G 細胞の mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、CTL クローン D2 が認識する抗原遺伝子 *claudin-1* とエピトープのアミノ酸配列、RYEFGQALF を同定した。これらの情報は、卵巣がんに対する免疫応答を考察する基盤となると考えられる。また、今回用いた siRNA による HLA 改変法は、他のがん細胞株にも応用可能である。現在、低酸素条件で培養した肺癌細胞株 Calu-6 の HLA を同様に操作し、HLA-A24 拘束性にこの細胞を認識する CTL の樹立を試みている。

(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う予定である。

(c) WT1 抗原発現 LCL を用いた CTL 誘導においては、例えば臍帯血のように EB ウイルス抗原特異的メモリー T 細胞が存在しない場合は、WT1 抗原特異的 CTL をより効率よく増やせる可能性が示された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Murayama Y, Yamamoto

K, Inaguma Y, Tokuda M, Abe A, Akatsuka Y, Emi N, Kurosawa Y. Isolation of human mAbs that directly modulate FMS-related tyrosine kinase 3 signaling. *Cancer Sci.* 103(2): 350-9, 2012.

2) Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S. Intracellular interferon- $\gamma$  staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 44(2):548-54, 2012.

3) Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 71(7):2664-74, 2011.

4) Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol.* 104(1):83-92, 2011.

5) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirose T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102(9):1622-9, 2011.

6) Yasuda A, Noguchi K, Minoshima M, Kashiwazaki G, Kanda T, Katayama K, Mitsuhashi J, Bando T, Sugiyama H, and Sugimoto Y. DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Sci.* 102(12), 2221-2230, 2011.

7) Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, Kanda T, Toyokuni S, and

- Tsurumi T. The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication. *J Virol.* 85(13), 6629-6644, 2011.
- 8) Noda C, Murata T, Kanda T, Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, and Tsurumi T. Identification and Characterization of CCAAT Enhancer-binding Protein (C/EBP) as a Transcriptional Activator for Epstein-Barr virus Oncogene Latent Membrane Protein 1. *J Biol Chem.* 286(25), 42524-42533, 2011.
  - 9) Murata T, Noda C, Saito S, Kawashima D, Sugimoto A, Isomura H, Kanda T, Yokoyama KK, and Tsurumi T. Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency. *J Biol Chem.* 286(25), 22007-22016, 2011.
  - 10) Sugimoto A, Kanda T, Yamashita Y, Murata T, Saito S, Kawashima D, Isomura H, Nishiyama Y, and Tsurumi T. Spatiotemporally different DNA repair systems participate in Epstein-Barr virus genome maturation. *J Virol.* 85(13), 6127-6135, 2011.
  - 11) Kanda T, Shibata S, Saito S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, and Tsurumi T. Unexpected Instability of Family of Repeats (FR), the Critical cis-Acting Sequence Required for EBV Latent Infection, in EBV-BAC Systems. *PLoS One.* 6(11), e27758, 2011.
2. 学会発表
- 1) 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也. Primary sequence heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr virus (EBV) results in strain-specific differences in the FR stability in BAC vectors: 5th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma. マレーシア Penang、2011年6月
  - 2) 神田輝、鶴見達也. Family of repeats(FR)1次配列のEBV株間における多様性と共通点について：第8回EBウイルス研究会、大阪市、2010年7月
  - 3) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田 貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆. 内在性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣癌を傷害するCTLの誘導：第15回日本がん免疫学会総会、大阪市、2011年7月
  - 4) 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆. 同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験（中間報告）. 第15回日本がん免疫学会総会、大阪市、2011年7月
  - 5) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. 第3回造血器腫瘍免疫治療研究会学術集会、別府市、2011年8月
  - 6) 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆. 同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験の中間報告. 第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府市、2011年8月

- 7) 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也. Primary sequence heterogeneity of Family of Repeats (FR) of Epstein-Barr virus (EBV) results in strain-specific differences in the FR stability in BAC vectors : International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011, XV International Congress of Virology. 札幌市、2011年9月
- 8) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells : 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011年10月
- 9) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田 貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆. 内在性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣癌を傷害するCTLの誘導 : 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011年10月
- 10) 神田輝、村田貴之、高田賢蔵、鶴見達也. FR (family of repeats) 1次配列のEBウイルス株間における多様性とその意義 : 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011年10月
- 11) 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、三好浩之、吉森 保、葛島清隆. 腫がん細胞における恒常的高活性オートファジーによるCTLエピトープの産生. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011年10月
- 12) 赤塚美樹、松原亜以子、南谷泰仁、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆、小川誠司、恵美宣彦. マイナー組織適合抗原をコードする一塩基多型のオンライン検索ツール. 第70回日本癌学会総会、名古屋市、2011年10月
- 13) Akatsuka Y, Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Morishima Y, Kodera Y, Riddell SR, Ogawa S, Emi N. An online tool to scan single nucleotide polymorphisms for identification of novel minor antigens. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋市、2011年10月
- 14) Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Tokuda M, Kanie T, Abe A, Akatsuka Y, Kurosawa Y, Emi N. Isolation of human monoclonal antibodies directly modulating FLT3 signaling. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋市、2011年10月
- 15) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells : 第70回日本脳神経外科学会学術総会、横浜市、2011年10月
- 16) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells : 第29回日本脳腫瘍学会、下呂市、2011年11月
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

HLA-A\*24:02拘束性に卵巣がん細胞を傷害するCTLの樹立とその認識抗原の同定

研究分担者 藤田 貢

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部 室長

研究要旨 様々な種類のがんに対して免疫療法を効果的に実施するためには、個々のがん種に発現している、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の標的抗原の同定が必要である。平成22年度には、RNA干渉法(siRNA)とsiRNAに抵抗性のHLA-A24を発現するレンチウイルスを用いて、HLAを改変した卵巣がん細胞株TOV21Gについて報告した。このHLA改変TOV21Gを抗原提示細胞として、HLA-A24陽性の成人末梢血ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞を刺激し、HLA-A24拘束性にTOV21G細胞を傷害するCTLクローンD2を樹立した。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拘束性に傷害したが、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。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、クローンD2が認識する抗原遺伝子*claudin-1*と、CTLのエピトープのアミノ酸配列、RYEFGQALFを同定した。*claudin-1*は、正常気管支上皮細胞株(NHBE)にも発現しており、クローンD2はNHBEを若干傷害した。今回同定したエピトープに対するT細胞応答は、肺癌患者や自己免疫性肺傷害患者において惹起されている可能性が示唆された。

siRNAとsiRNAに抵抗性の目的HLA cDNA導入を用いたHLAの改変は、他のがん由来の細胞株にも応用可能である。現在、低酸素条件で培養した肺癌細胞株Calu-6のHLAを同様に操作し、HLA-A24拘束性にこの細胞を認識するCTLの樹立を試みている。

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。

我々は、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\*24:02、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-A24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。さらに平成22年度は、siRNAによる細胞本来のHLAの発現を抑制し、そのsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A\*24:02 cDNAをレンチウイルスベクターを用いて導入する方法を開発し、本方法の有用性を卵巣がん細胞株TOV21Gで検討した。

本年度は、このHLA改変TOV21G細胞を用いて誘導したHLA-A24拘束性CTLクローンD2の認識する抗原遺伝子と、そのエピトープ部位のアミノ酸配列を決定したので報告する。

## B. 研究方法

### 1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製 :

HLA 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種の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種は、我々で独自に同定した配列を用いた (未発表)。

上記3種のsiRNA結合部位のコドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNA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、フローサイトメーターで解析した。

### 2) 卵巣がんを傷害するCTLの誘導 :

コドンを変換したHLA-A\*24:02 cDNA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<sup>+</sup>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-A\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞への反応性をIFN $\gamma$ 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、HLA-A24陽性の線維芽細胞、EBウイルス感染リンパ芽球株(LCL)および正常気管支上皮から樹立された細胞株NHBE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。

### 3) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子の同定 :

TOV21G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一過性に導入し、CTLと24時間培養した。CTLから分泌された上清中のIFN $\gamma$ 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。

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\*24:02 cDNAを導入したTOV21G細胞に、3種の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\*24:02及びCD86を導入したTOV21G細胞を用いて刺激したCD8<sup>+</sup>T細胞株は、野生型HLA-A\*24:02を導入したTOV21G細胞に対してIFN- $\gamma$ 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- $\gamma$ を産生しなかった。このCD8<sup>+</sup>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。この内クローン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-A24導入KOC7C細胞を強く傷害したが、HLA-A24陽性の線維芽細胞およびLCLは傷害しなかった。NHBEは、弱いながらクローンD2に傷害を受けた。

## 3) CTLクローンD2が認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

クローンD2は*claudin-1*がコードする遺伝子産物を認識していた。5'および3'側から短縮したcDNA発現プラスミッドと合成ペプチドを用いた検討により、CTLエピトープのアミノ酸配列をRYEFGQALFと決定した。合成ペプチドは数nMの濃度までクローンD2に認識された。

## D. 考察

今回同定したCTLクローンD2が認識する抗原遺伝子*claudin-1*は、タイトジャンクションを構成する蛋白である。このため正常細胞にも発現している。大腸がん細胞では、過剰に発現が見られ、増殖能や転移能など悪性形質の獲得との関連が報告されている

(Dhawan P, et al., *JCI*, 115(7):1765, 2005)。今回、HLA-A24を保有する成人のナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞に、*claudin-1*を認識するCTLの前駆細胞が含まれていることが明らかとなった。このことから、今回同定したエピトープに対するT細胞応答が、肺がん患者や自己免疫性肺傷害患者において惹起されている可能性が示唆された。

## E. 結論

siRNAとsiRNAに抵抗性のHLA-A24:02を導入した細胞を用いて、HLA-A24拘束性に卵巣がんを傷害するCTLクローンを樹立した。TOV21G細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製し、CTLクローンD2が認識する抗原遺伝子*claudin-1*とエピトープのアミノ酸配列、RYEFGQALFを同定した。これらの情報は、卵巣がんに対する免疫応答を考察する基盤となると考えられる。また、今回用いたsiRNAによるHLA改変法は、他のがん細胞株にも応用可能である。現在、低酸素条件で培養した肺がん細胞株Calu-6のHLAを同様に操作し、HLA-A24拘束性にこの細胞を認識するCTLの樹立を試みている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, Hamilton RL, Komohara Y, Decker SA, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 71(7):2664-74, 2011.
- 2) Zhu X, Fujita M, Snyder LA, Okada H.

Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. *J Neurooncol.* 104(1):83-92, 2011.

## 2. 学会発表

- 1) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田 貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆. 内在性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣癌を傷害するCTLの誘導：第15回日本がん免疫学会総会、大阪市、2011年7月
- 2) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells：第3回造血器腫瘍免疫治療研究会学術総会、別府市、2011年8月
- 3) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells：第70回日本癌学

会学術総会、名古屋市、2011年10月

- 4) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田 貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆. 内在性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原提示細胞を用いた卵巣癌を傷害するCTLの誘導：第70回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011年10月
  - 5) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells：第70回日本脳神経外科学会学術総会、横浜市、2011年10月
  - 6) Fujita M, Kohanbash G, Ohlfest JR, Okada H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells：第29回日本脳腫瘍学会、下呂市、2011年11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次対がん総合戦略）  
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  
藤田保健衛生大学医学部・准教授

研究要旨

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。そこで移植後再発を予防する目的で、我々が同定したマイナー抗原エピトープペプチドを用いたワクチン接種の臨床試験を開始している。平成 23 年度末の段階で 82 例について適格性の検討を行い、試験開始から計 7 例に接種した。うち 6 例の評価可能症例では、接種したマイナー抗原への CTL 反応が増強されたのは 1 例のみであった。今後、接種量をプロトコルどおり増量して検討を試みるが、同時に養子免疫療法およびその関連技術の開発も必要と考えられる。

まず移植ドナーから T 細胞が得られない臍帯血移植などの場合、代替ドナーの T 細胞にマイナー抗原特異的 TCR を導入する必要があるが、HLA 不適合があると拒絶の原因になる。そこで TCR 導入細胞の HLA 発現を減弱できないかを検討している。次いでマイナー抗原にとらわれず、白血病関連抗原とされる FLT-3 に対する単鎖抗体分子を T 細胞に遺伝子導入するシステムを構築しつつある。

A. 研究目的

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が、近年よりハイリスク患者に移植が行われるようになった結果、再発ハイリスクは高率のままであり、これを克服する技術の開発が求められている。同種抗原はほとんどが過剰発現した自己蛋白にコードされる腫瘍抗原と比較して、非自己抗原であり、強い抗原性が期待されている。我々は、これら同種抗原のうち、血液系細胞にの

み発現する分化抗原上の多形部位を含むペプチド（マイナー抗原）が HLA 上に発現されると、GVHD よりも抗白血病効果（GVL 効果）を選択的に誘導できると考え、これらペプチドをワクチンとして移植後再発例もしくは再発ハイリスク例に治療・予防ワクチンとして投与する臨床試験を行っている。しかし移植から長期間が経過すると、マイナー抗原に反応する CTL 前駆体が減少してしまうため、ワクチンのみならず、養子細胞療法的な

アプローチも並行して検討を始めた。この際の標的はワクチンとしての抗原性より弱いものでも大量細胞移入によりカバーできると考え、マイナー抗原のみならず、抗体の結合できる白血病細胞表面抗原も対象と考えている。後者として、我々の研究協力者が有用な抗体療法の標的として報告した FLT-3 分子をモデル抗原として、Chimeric Antigen Receptor (CAR)導入 T 細胞を誘導する系を準備しつつある。

さらに臍帯血移植は全同種移植の3分の1を占めるに至っているが、大きな問題点は細胞療法のための末梢血が得られないことである。そこで HLA が完全には一致しない第3者からの末梢血 T 細胞を CAR や TCR 導入細胞とする必要がある。この際、不適合 HLA は患者の免疫細胞によって認識され、拒絶抗原となりうる。海外ではトランスポゾンを用いた HLA 遺伝子のノックアウトが試みられているが、我々は siRNA アプローチで HLA のノックダウンが可能かどうか検討を行うこととした。

## B. 研究方法

### ①マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

HLA-A\*24:02、HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:06、HLA-B\*44:03 拘束性の5種類のエピトープペプチド (ACC-1Y、ACC-1C、HA-1H、ACC-2、ACC-6) がワクチンとして準備されている。少なくともこれら HLA アリルをドナー、患者間で共有し、マイナー抗原が成立する GVL 方向の不適合移植を受けた患者で適格基準を満たすものをリクルートして、説明と同意の後、5回ワクチン接種することを

目標とした。3回以上ワクチンが接種できた症例を評価可能とした。

### ② FLT-3 反応性の Chimeric Antigen Receptor (CAR) を組み込んだレトロウイルスベクターの作製：

Antagonistic FLT-3 抗体、clone A2 は学内研究協力者の山本・赤堀らが phage display システムを用いて単鎖抗体として樹立した (Cancer Sci. 103:350-9, 2012.)。この抗体は FLT-3 リガンド (FL) の存在下においても FLT-3 と MAPK のリン酸化を抑制し、daunorubicin による apoptosis を誘導する。また ADCC 活性はないが、CDC 活性を認め FLT-3 陽性白血病細胞を傷害した。そこで この単鎖部分の cDNA を用い、CAR のコンストラクト作成に用いた。ベクターは LZRSpBMNZ を基本骨格に用いた。

### ③HLA クラス I 分子のノックダウンベクターの構築：

HLA 分子のノックダウンには shRNA を用い、同じベクターに TCR  $\alpha \cdot \beta$  鎖の cDNA や、CAR を搭載できることを目指した。shRNA の配列は、既報の論文を参考に siRNA を合成し、ノックダウン効率の高いものを組み合わせることとした。

### (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