

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のみに実施された。

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

#### 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。

#### ②FLT-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。

#### ③HLA 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 GGAGATCACACTGACCU-GGCA 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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirokawa 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.* 102:1622-9, 2011. (PMID: 21668581)
- 2) 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 : 350-9, 2012. (PMID: 22049994)
- 3) 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.* 44:548-54, 2012. (PMID: 22410067)

##### 2. 学会発表

- 1) 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）（口演 #39）。第 15 回日本がん免疫学会総会、大阪 2011 年 6 月 30 日。日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp17, 2011.
- 2) 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（口演）、別府 2011 年 8 月 21 日。
- 3) 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、三好浩之、吉森 保、葛島清隆。膵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（ポスター、#3204）、熊本 2011 年 10 月 5 日。日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp499, 2011.
- 4) 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（ポスター、P-1444）、大阪 2011 年 10 月 3 日。日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp204, 2011.
- 5) 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（ポスター #PS1-262）、名古屋 2011 年 10 月 14 日。臨床血液抄録集 pp204, 2011.
- 6) Yukiya Yamamoto, Sachiko Tsuzuki, Yasushi Akahori, Yoshinori Ukai, Mariko Sumitomo, Masutaka Tokuda, Tadaharu Kanie, Akihiro Abe, Yoshiki Akatsuka, Yoshikazu Kurosawa, Nobuhiko Emi. Isolation of human monoclonal antibodies directly modulating FLT3 signaling. 第 73 回日本血液学会学術集会（ポスター #PS2-284）、名古屋 2011 年 10 月 15 日。臨床血液抄録集 pp584, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

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

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

研究分担者 神田 輝

愛知県がんセンター研究所 腫瘍ウイルス学部 室長

研究要旨 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リンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, 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 (Wilms' tumor gene 1)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。

A. 研究目的

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。

われわれは、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

### 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。

## C. 研究結果

### 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

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

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) 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.
- 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) Kanda T (corresponding author), 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: 5<sup>th</sup> 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) 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
  - 4) 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Murayama Y, Yamamoto K, Inaguma Y, Tokuda M, Abe A, <u>Akatsuka Y</u> , Emi N, Kurosawa Y.	Isolation of human mAbs that directly modulate FMS-related tyrosine kinase 3 signaling.	<i>Cancer Sci.</i>	103(2)	350-359	2012
Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, <u>Akatsuka Y</u> , Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S.	Intracellular interferon- $\gamma$ staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients.	<i>Transplant Proc.</i>	44(2)	548-554	2012
<u>Fujita M</u> , 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.	<i>Cancer Res.</i>	71(7)	2664-2674	2011
Zhu X, <u>Fujita M</u> , Snyder LA, Okada H.	Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy.	<i>J Neurooncol.</i>	104(1)	83-92	2011
Suzuki S, Yoshikawa T, Hirose T, Shibata K, Kikkawa F, <u>Akatsuka Y</u> , Nakatsura T.	Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma.	<i>Cancer Sci.</i>	102(9)	1622-1629	2011
Yasuda A, Noguchi K, Minoshima M, Kashiwazaki G, <u>Kanda T</u> , Katayama K, Mitsuhashi J, Bando T, Sugiyama H, Sugimoto Y.	DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization.	<i>Cancer Sci.</i>	102(12)	2221-2230	2011
Isomura H, Stinski MF, Murata T, Yamashita Y, <u>Kanda T</u> , Toyokuni S, Tsurumi T.	The human cytomegalovirus gene products essential for late viral gene expression assemble into prereplication complexes before viral DNA replication.	<i>J Virol.</i>	85(13)	6629-6644	2011
Noda C, Murata T, <u>Kanda T</u> , Yoshiyama H, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, 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.	<i>J Biol Chem.</i>	286(25)	42524-42533	2011
Murata T, Noda C, Saito S, Kawashima D, Sugimoto A, Isomura H, <u>Kanda T</u> , Yokoyama KK, Tsurumi T.	Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency.	<i>J Biol Chem.</i>	286(25)	22007-22016	2011
Sugimoto A, <u>Kanda T</u> , Yamashita Y, Murata T, Saito S, Kawashima D, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T.	Spatiotemporally different DNA repair systems participate in Epstein-Barr virus genome maturation.	<i>J Virol.</i>	85(13)	6127-6135	2011.
<u>Kanda T</u> , Shibata S, Saito S, Murata T, Isomura H, Yoshiyama H, Takada K, Tsurumi T.	Unexpected Instability of Family of Repeats (FR), the Critical cis-Acting Sequence Required for EBV Latent Infection, in EBV-BAC Systems.	<i>PLoS One.</i>	6(11)	e27758	2011

