

法の3通りの方法で処理したところ、いずれの方法においても、細胞内に抗LC3抗体によってドット状に染色されるオートファゴソームの形成を確認できた。オートファジー誘導後のHLA-A*24:02導入MCF10A細胞と16F3クローンを混合培養したところ、活性型K-ras導入法を用いた場合のみ上清中にIFN γ の分泌を認めた。すなわち、飢餓培養法およびmTOR阻害法で誘導されるオートファジーでは、エピトープの産生がみられず、活性型K-ras導入法を用いたオートファジーにおいてのみエピトープの産生がみられた。

D. 考察

16F3クローンは、ユビキタスな発現をするPSA蛋白由来のエピトープを標的とし、膵がん細胞などを傷害する。飢餓培養法およびmTOR阻害法で誘導されるオートファジーでは同エピトープの生成がみられず、活性型K-ras導入法を用いたオートファジーにおいてのみエピトープの産生がみられたことは、活性型K-rasによって細胞内に生じたオートファジー以外の変化が、本CTLエピトープ生成に必要なことが示された結果と考えられる。

E. 結論

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aに活性型変異K-rasを導入すると、恒常的なオートファジーが誘導されるとともに、ユビキタスな発現をするPSA蛋白からHLA-A*24:02拘束性のCTLエピトープが生成されることを示した。活性型変異K-rasを導入したMCF10A細胞および同変異を有する膵がん細胞はオートファジー依存的な増殖能を獲得することが報告されている。がん細胞増殖の維持に必要な代謝経路から、正常細胞表面には

無いCTLエピトープが生成されていることは、がん特異的CTLの概念の幅を拓げるものであると考えられた。また、本結果はオートファゴソームを免疫原とする新しいがんワクチンの開発の契機となる知見と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishio N, Fujita M, Tanaka Y, Maki H, Zhang R, Hirose T, Demachi-Okamura A, Uemura Y, Taguchi O, Takahashi Y, Kojima S, Kuzushima K. Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human $\gamma\delta$ T cells. *J Immunother.* 35(8):598-606, 2012
- 2) Kohanbash G, Ishikawa E, Fujita M, Ikeura M, McKaveney K, Zhu J, Sakaki M, Sarkar S, Okada H. Differential activity of interferon- α 8 promoter is regulated by Oct-1 and a SNP that dictates prognosis of glioma. *Oncoimmunology.* 1(4):487-492, 2012.

2. 学会発表

- 1) 西尾信博、藤田 貢、田中義正、牧 寛之、張エイ、岡村文子、植村靖史、田口修、高橋義行、小島勢二、葛島清隆. Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human gamma-delta T cells : 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、金沢市、2012年8月
- 2) 植村靖史、峰野純一、池田裕明、劉天懿、牧 寛之、近藤紳司、張エイ、

岡村文子、藤田 貢、赤塚美樹、園田
精昭、珠玖 洋、葛島清隆. 腫瘍抗原
特異的TCR遺伝子導入NKT細胞を用い
たがん免疫療法の可能性：第71回日本
癌学会学術総会、札幌市、2012年9月

3) 藤田 貢、張エイ、中田 晋、葛島清隆.

Cox-2阻害による肺がん脳転移の抑制と
その免疫学的メカニズム：第71回日本癌
学会学術総会、札幌市、2012年9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、移植後再発および GVHD は依然として大きな問題である。我々は選択的 graft-versus-leukemia/lymphoma (GVL) 効果を誘導しうるような血液系分化抗原の SNP 部位を含むマイナー抗原エピトープを用いたペプチドワクチン臨床試験を開始実施している。平成 24 年度は 2 例の新規症例があり、合計 8 例に接種が終了、9 例目が第 3 コホートである 1 mg 用量の試験中である。

ワクチンは能動免疫であり、一般に効果発現にはある程度の時間を要する。これに対して養子免疫療法は輸注直後から効果が期待できる。本年度は昨年度開始した FLT3 に反応する抗体を細胞表面に発現させる chimeric antigen receptor(CAR) 導入 T 細胞研究に引き続き、移植例に適用できるモデル抗原として HLA-A2 拘束性に提示される HA-1H マイナー抗原を認識する単鎖抗体を作製し、この抗体分子にて CAR-T 細胞を作製し、その特異性、細胞傷害性について詳細に検討した。その結果、得られた抗体は 10^9 M レベルの K_D 値を発揮するものの、CAR-T 細胞の傷害性は標的抗原上の抗原量に依存し、通常の TCR を用いた認識と異なり CD8 を補助分子として使っていない可能性があることが判明した。

A. 研究目的

分子標的薬やその他の抗腫瘍剤が進歩する中で残されたハイリスク造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植は重要な治療の選択肢であるが、移植後再発は依然として主要な死因となっている。これに対して、前処置増強、HLA 部分不適合移植と NK 細胞の養子移入、腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の養子移入などが試みられているが、効果は限定的である。

我々は HLA 以外の同種 (アロ) 抗原であるマイナー抗原に着目して、ワクチン療法

および養子免疫療法についてトランスレーション研究を行っている。マイナー抗原はドナー・患者間の遺伝子多型に由来する非自己抗原であり、HLA によって T 細胞に提示され、日自己抗原ゆえ強い抗原性が期待されている。実際マウスモデルではわずか 1 つのマイナー抗原不適合で移植された腫瘍が完全に除去される。我々は、選択的 GVL 効果を得るために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マイナー抗原を複数同定し、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。しかしマイナー抗原に反応する CTL 前駆体の体内寿命（テトラマーやクローン特異的 PCR で検出）は移植から1年半程度というデータを得ており、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再検討を行っている。昨年度は FLT3 分子をモデル抗原とした Chimeric Antigen Receptor (CAR)導入 T 細胞を誘導する系の予備実験を行ったが、抗体の親和性が不十分で FLT3 低発現腫瘍は傷害されなかった。

そこで本年度は別研究課題で得られた HA-1H マイナー抗原ペプチド+HLA-A2 複合体を認識する“TCR 様”抗体をもとに、これに CD38-CD3 ζ 鎖を結合し T 細胞に導入した CAR-T 細胞の機能を解析し、その臨床応用の可能性、問題点を検討した。

B. 研究方法

1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

昨年に引き続き、5種類のエピトープペプチド（ACC-1Y、ACC-1C、HA-1H、ACC-2、ACC-6）をテラーメイドワクチンとして用いた。これらのマイナー抗原を提示できる HLA アリルをドナーと患者が共有し、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。マイナー抗原特異的 CTL の減衰を考え、なるべく移植早期症例をリクルートするように努めた。

2) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する単鎖抗体の樹立とこの Chimeric Antigen Receptor (CAR) を遺伝子導入した T 細胞の作製：

HLA-A2/HA-1H-テトラマーと陰性コントロールである HLA-A2/HA-1H-テトラマーは研

究協力者の葛島らが作製した。HLA-A2/HA-1H-テトラマーは Montanide アジュバントとエマルジョンを形成後、B6 マウス皮下に投与した。3回免疫後に脾細胞を取り出し、研究協力者の赤堀らが phage display システムを用いて HLA-A2/HA-1H 複合体に特異的な単鎖抗体として樹立した。この抗体をビオチン化し、ストレプトアビジン-PE を用いてテトラマーとした。HLA-A2 陽性、TAP 欠損 T2 B-LCL に HA-1H、その抗原陰性カウンターパートの HA-1R、その他のペプチドを添加し、抗体との反応性を評価した。

反応性が 10nM 程度であったため、CAR-T 細胞を作製した。まずこの単鎖部分の cDNA に CD28 の細胞膜貫通領域、CD3 ζ 鎖の ITAM ドメインを結合し、CAR のコンストラクトを作製した。ベクターは LZRSpBMNZ を基本骨格に用いた。パッケージング細胞として FHCRC の Topp らが作製した Phoenix-Galv を用いた。

Primary な T 細胞は健常人よりインフォームドコンセント後に採取した末梢血より、磁性ビーズを用いて CD3 ないしは CD8 に純化した。これを当初は CD3 抗体単独、ついで CD3-CD28 コーティングビーズを用いて刺激した。ウイルスベクターの感染は刺激後 48, 72 時間後の2回を基本に行い、IL-2 および IL-7 をサイトカインとして添加した。培養は 3-4 日おきにヒト血清メEDIUM でパッセージを行い、CAR 導入細胞の割合、増殖率を測定した。

培養開始 14~21 日目に機能解析を行った。標的として HLA-A2 陽性の T2 細胞、HLA-A*02:01 導入 K562 細胞、マウス B6 由来の EL4 に HLA-A*02:01 を導入した細胞を用いた。標的細胞は ⁵¹Cr で標識し、通常の4時間細胞傷害性試験をおこなった。この際に HA-1H、HA-1R、Flu-A（インフルエンザ A 由来）、

HA-1Q (マウスの HA-1 カウンターパート) ペプチドをさまざまな濃度で添加しタイトレーションを行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、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)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等に従って作成した研究計画書を作成し、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

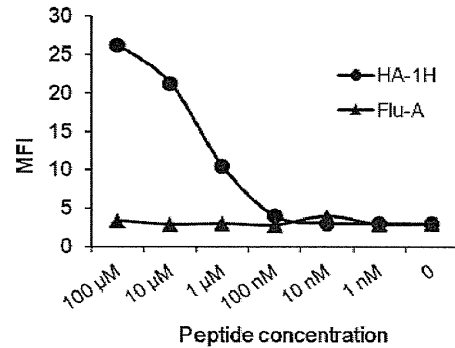
1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

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25年3月末の時点で90症例のリクルートを終え、本年度は2例においてマイナー抗原ミスマッチがあり、ワクチン適応であった。2例とも試験にエントリーしているが、まだ *in vitro* 解析途上であるため、次年度にまとめて報告したい。

2) HLA-A2/HA-1H 特異的単鎖抗体の取得と CAR-T 細胞作製の試み：

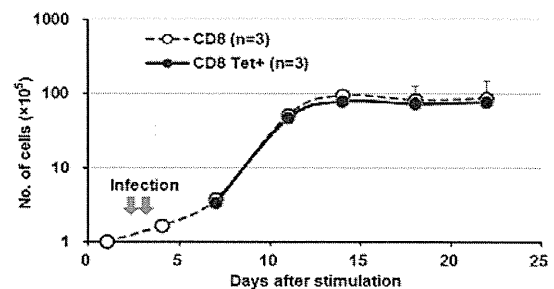
単鎖抗体(クローン#131)をビオチン化した後 streptavidin-PE を用いてテトラマー抗体化した。T2細胞に HA-1H、陰性コントロールとして Flu-A を10倍希釈しつつ添加し、抗

体での染色性を目安に Mean fluorescence intensity (MFI) で検討した(下図)。

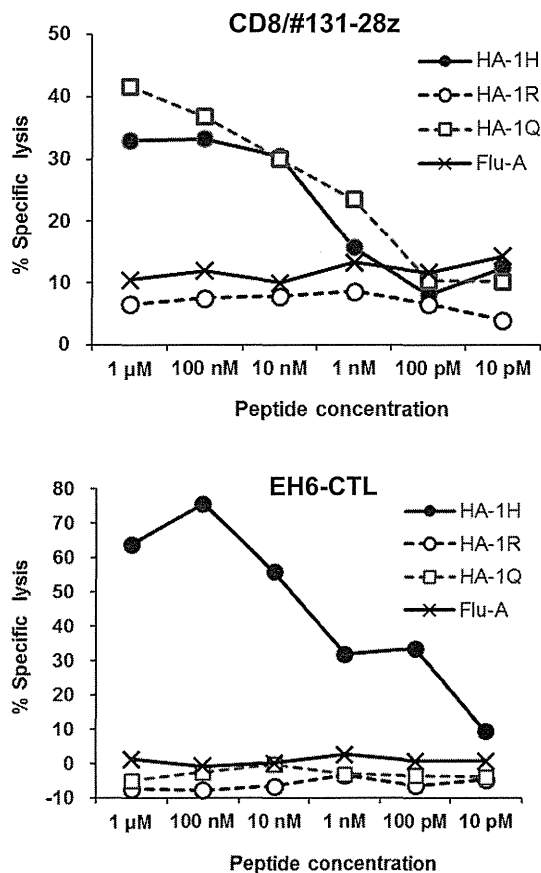


HA-1H はペプチド濃度 100nM 以上で濃度依存性に検出されたが、Flu-A は 1,000 倍の 100μM でも全く染色されなかった。図には示さないが、HA-1R ペプチドの場合も 100μM での若干の染色以外、Flu-A と同様な結果であった。以上より、#131 抗体は HLA-A2 に反応するのではなく、HLA-A2 に結合したペプチドとの複合体に反応していると考えられた。

#131 の C 末端の IgG4 定常領域を除去し、CD28 膜貫通領域と CD3-ζ の ITAM 領域を PCR 法にて合成し、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導入し、puromycin で選択後、その上清を CD3/28 で刺激した primary CD8⁺ T 細胞に感染し、さらに増殖させた (CD8/#131-28z と命名)。2週間に約 90 倍増幅した。並行して HLA-A2/HA-1H-テトラマーで染色される遺伝子導入細胞の割合を測定したが、導入効率はほぼ 95%以上、感染細胞の増幅は下図のように非導入細胞と差はなかった。



ついで T2 にペプチドを各パルスして、細胞傷害性試験を行った。エフェクター/ターゲット比は 10 前後であった。陽性コントロール CTL として、HA-1H 陰性健常人から過去に樹立した EH6-CTL を用いた。



EH6-CTL は HA-1H を 10pM まで認識したが、CD8/#131-28z は 1nM 以下では細胞傷害性が検出されなくなり、100 倍程度の avidity の差があった。面白いことに CD8/#131-28z は HA-1Q に対して HA-1H よりも強く反応した。しかし、B6 由来 EL4 に HLA-A2 を導入した細胞には傷害性を与えなかった（データ示さず）。

D. 考察

マイナー抗原ワクチン臨床試験については、毎年約 10 例程度が検査を受け、20 程度が何らかのマイナー抗原について試験適

格となり、着実に症例を積み重ねている。当初は 3mg までの 4 コーホートを予定していたが、他のペプチドワクチンでは概ね 1mg を上限としており、本臨床試験も 1mg のコーホートで試験を終了する予定であり、残すところあと 2 例となった。ただし、HLA-B44 拘束性の ACC-6 は適格例がなく、現状ではデータを得られていない。次年度に 10 例以上の検査対症症例を得るようにしたい。

HLA-A*02:01 に提示された HA-1H を認識する抗体は、Biacore データは示さなかったが 10^{-9} M オーダーの K_D 値を示し、抗体として非常に良好な Affinity を得た。この 10^{-9} M は TCR の平均 $10^{-5\sim-7}$ M に比較して 100 倍以上高く、CAR-T での良好な細胞傷害性の発揮が期待された。データは示さなかったが、少なくとも HLA-A2/HA-1H-テトラマーでの染色性は EH6-CTL と遜色のないものであった。にもかかわらず T2 細胞を用いたペプチドタイトレーションで 10~100 分の 1 程度の Avidity しか示されなかった理由として、通常の CTL のように CD8 を Co-receptor として使用できないような立体構造が抗体：抗原シナプス部分に存在する可能性がある。この部分については抗体を用いたブロッキング試験を実施し原因を究明中である。

CD8/#131-28z が予想外にマウス由来の HA-1Q (VLQDDLLEA) をより強く認識した理由は不明である。Q 部分が多型であるが、(1) HA-1R が T2 細胞に結合しづらいのに対して、HA-1Q は HA-1H よりも結合しやすい可能性、(2) HA-1H と HA-1Q は同様に HLA-A2 と結合するが、Q の方が #131 抗体のエピトープ認識部位に高い親和性があった可能性が上げられる。しかし、EL4 に HLA-A2 を強制発現させた細胞は傷害されなかったことより、もともと HA-1Q ペプチド

は細胞内で存在しない（プロテアゾームで破壊される）か、Endoplasmic reticulum 内で HLA-A2 と会合できないのかもしれない。これらも今後の検討課題である。さらに HA-1H を Endogenous に発現する細胞に対する傷害活性は、今後 HLA-A2 陽性、HA-1H 陰性（HA-1R/R 型）の健常者から末梢血を得て検討する予定である。

E. 結論

移植後の造血器腫瘍の再発予防・治療のための選択的 GVL 効果をもたらすマイナー抗原についてワクチンの臨床試験を継続し、投与量は最終コホートに至ったので、次年度内に第 1 相試験の結果を評価しうると考えられる。

HLA に結合したペプチドを認識する抗体はマウスへの HLA テトラマー免疫により可能であった。この抗体で CAR-T 細胞を作製し、抗原特異的な細胞傷害性を得ることに成功した。今後はこの CAR-T 細胞を CTL と同等な機能を発揮できるように、どのような Form で CAR-T 細胞にするのがよいかを検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, Akatsuka Y, Weissman IL, Greenberg PD. Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen., *Blood*. 119: 5492-5501, 2012. (PMID: 22529286)
- 2) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirose T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T,

Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens*. 80: 119-125, 2012 (PMID: 22568758)

- 3) Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, Akatsuka Y, Chiba S. HLA-C matching status does not affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by allogeneic natural killer Cells. *Immunol Invest*. 41: 831-846, 2012. (PMID: 22676066)
- 4) Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. *Anticancer Res*. 32: 5201-5209, 2012. (PMID: 23225417)
- 5) Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. *PLoS One*. 7(10):e47126, 2012.

2. 学会発表

- 1) 赤堀 泰, 赤塚美樹, 葛島清隆, 恵美宣彦: HLA-A*02:01 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会. 金沢, H24 年 8 月 18 日. プログラム抄録集抄録集 pp64.
- 2) 赤堀 泰, 稲熊容子, 赤塚美樹, 山本幸也, 村山裕子, 伊庭佐知子, 遠藤明美, 平松可帆, 葛島清隆, 恵美宣彦. HLA-A2 拘束性

に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離とその臨床応用に向けての検討 (口演 11-3). 第 35 回日本造血細胞移植学会、金沢. 2013 年 3 月 8 日. 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp202.

- 3) Yoshiki Akatsuka, Hirofumi Taji, Yasuo Morishima, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodera, Nobuhiko Emi, Toshitada Takahashi, Tomohiro Kinoshita, Kiyotaka Kuzushima. Vaccination With Minor Histocompatibility

Antigen-Derived Peptides In Post-Transplant Patients With Hematological Malignancies - Preliminary Results. 2nd International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2012 年 11 月 6 日, NIH Bethesda, MD, USA. Abstract P-11 (pp34).

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。前年度までの研究により、組換えEBウイルス産生技術を応用することで樹立可能なWT1 (Wilms' tumor gene 1)抗原発現LCL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。本年度は、この技術の基盤となる組換えEBウイルス産生細胞樹立の効率化をめざした研究を行った。その結果、B95-8株EBウイルスで欠損している約12キロベースの領域を修復したBAC(bacterial artificial chromosome)クローンを用いることで、HEK293細胞へ導入後の薬剤選択によるウイルス産生細胞樹立の効率が、従来のBACクローンと比べて著明に改善することを見出した。修復領域には多数のウイルス由来マイクロRNAがコードされていることから、こうしたマイクロRNAの発現がウイルス産生細胞の効率の良い樹立に寄与する可能性が考えられた。この新規BACクローンをを用いた組換えウイルス産生系により、がん抗原等を発現するLCLの樹立が、より迅速化、効率化すると期待された。

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, 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。

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(Akata株由来)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報告した(Kanda et al. J. Virol. 78:7004-7015, 2004)。その後、B95-8株由来の新規BAC(bacterial artificial chromosome)クローンを取得し、このBACクローンをHEK293細胞に導入することで、より確実に高力価の組換えEBウイルス産生細胞を樹立可能であることを報告した(Kanda et al, PLoS One, 6, e27758, 2011)。こ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)を抗原提示するLCLを樹立できることを示した (Kanda et al, Cancer Gene Ther. 19: 566-571, 2012)。

こうした手法を様々ながん抗原について応用していく上で障壁になるのは、組換えEBウイルス産生細胞を樹立する過程において、得られる細胞クローンごとにウイルス産生能が異なるという点が挙げられる。すなわちBACクローンをHEK293細胞に導入後、ハイグロマイシン選択して得られる薬剤耐性クローンのうち、ごく一部の細胞クローンが高力価組換えウイルスを産生するため、こうした細胞クローンを多くの薬剤耐性クローンの中から選別することが必要である。そこで本年度は、この過程の効率化をめざした研究を行った。

B. 研究方法

1) B95-8株で欠失している領域を修復した新規BACクローンの取得：

新たに作製したターゲットングベクターを用いて、B95-8細胞に潜伏感染したEBウイルスゲノムをBACベクターにクローン化した。その後、B95-8株EBウイルスで欠失した約12キロベースのゲノム領域を、Akata株EBウイルスのゲノムDNA断片を用いて大腸菌内相同組換え法により修復した。

2) 欠失領域を修復した新規BACクローンを用いたウイルス産生細胞樹立：

上記「修復済みBACクローン」をHEK293細胞へ導入し、ハイグロマイシン選択した。得られた複数の薬剤耐性細胞クローンに対して、ウイルス産生のスイッチ遺伝子であるBZLF1遺伝子を導入し、ウイルスの初期遺伝子、後期遺伝子の発現を調べた。また得られた細胞上清を用いて、Bリンパ球系細胞への感染実験を行った。さらに末梢血Bリン

パ球へ感染させて、トランスフォーム活性を調べた。

C. 研究結果

1) B95-8株で欠失している領域を修復した新規BACクローンの取得：

大腸菌内相同組換えにより、B95-8株で欠失している約12キロベースの領域を修復した「修復済みBACクローン」を取得した。得られたBACクローンのDNAを調製し、制限酵素解析およびサザンブロット法により、目的とする領域が修復されていることを確認した。

2) 欠失領域を修復した新規BACクローンを用いたウイルス産生細胞樹立：

「修復済みBACクローン」を用いることで、修復前のBACクローンを用いた場合と比較して、より効率良くウイルス産生細胞が得られることを見出した。二つの細胞クローンから得られた細胞上清をBリンパ球系細胞株へ感染させたところ、いずれも30%以上の細胞に感染した。末梢血Bリンパ球感染により、 TD_{50} (50%トランスフォーム濃度)を決定したところ、親株であるB95-8株ウイルスと同等の値(1×10^5 /ml程度)を示した。

D. 考察

B95-8株で欠失が見られる12キロベースの領域には、多数のマイクロRNAがコードされていることが報告されている。実際に、「修復済みBACクローン」を導入したHEK293細胞において、マイクロRNAが発現していることを確認した。したがって、こうしたマイクロRNAの発現が、HEK293細胞への再導入後における効率の良いウイルス産生において何らかの形で関与している可能性が考えられた。

E. 結論

より効率良く組換えEBウイルスを産生可能な新規BACクローンを取得した。今後この新規BACクローンをを用いた組換えウイルス産生を採用することで、がん抗原等を発現するLCLの樹立が、より迅速化、効率化すると期待された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda T, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, and Tsurumi T: HLA-restricted presentation of WT1 tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system. *Cancer Gene Ther.* 19(8), 566-571, 2012.
 - 2) Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, Kanda T, and Tsurumi T: Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol.* 86(9), 4752-4761, 2012.
 - 3) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, and Tsurumi T: Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* 87(4), 2120-2127, 2012.
 - 4) Saito S, Murata T, Kanda T, Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, and Tsurumi T: Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF-kappaB signaling during productive replication. *J Virol.* 87(7), 4060-4070, 2013.
 - 5) Kawashima D, Kanda T, Murata T, Saito S, Sugimoto A, Narita Y, and Tsurumi T: Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Is Dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90. *J Virol.* 87(11), 6482-6491, 2013.
- 6) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* (in press).
- ### 2. 学会発表
- 1) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析とその応用の可能性：第27回ヘルペスウイルス研究会、大府市、2012年6月
 - 2) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析：第9回EBウイルス研究会、米子市、2012年7月
 - 3) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Chromosome binding of Epstein-Barr virus EBNA1 protein is mediated by arginine residues within chromosome binding domains : International Congress on Oncogenic Herpesviruses and Associated Diseases、米国 フィラデルフィア、2012年8月
 - 4) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Mechanism of host chromosome binding of latently infected Epstein-Barr virus episomes : 第71回日本癌学会学術総会、札幌市、2012年9月
 - 5) 神田輝、鶴見達也. EBNA1蛋白質の宿主染色体付着メカニズムの解析：第60回日本ウイルス学会学術総会、大阪市、2012年11月
 - 6) 神田輝、鶴見達也. ウイルス蛋白質の染色体局在におけるアルギニン残基の重

要性：第30回染色体ワークショップ
第11回核ダイナミクス研究会（合同開
催）、淡路、2012年12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 岡村 文子

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部 研究員

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⁺T細胞を刺激し、HLA-A24拘束性にTOV21G細胞を傷害する複数のCTLクローンを樹立した。平成23年度はそのうち一つのCTLクローンが認識する抗原遺伝子として*claudin-1*を同定した。本年度は、もう一つのCTLクローンが認識する遺伝子として*RNA binding motif protein 4*を同定した。

A. 研究目的

担がん患者のリンパ球を自己のがん細胞株で刺激することで得られる細胞傷害性Tリンパ球(CTL)は、CTL標的抗原の同定に必須である。このため、細胞株を樹立しにくいタイプのがんでは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によっ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。平成23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して*claudin-1*を、そのエピトープ部位のアミノ酸配列RYEFGQALFを決定した。本年度は、もう一つのCTLクローンが認識する遺伝子を同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。

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⁺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 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、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 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の同定を試みた。

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⁺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- 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。この内クローンG3は、HLA-A*2402導入TOV21G細胞を傷害したが、HLA-A24陽性の線維芽細胞、LCLおよびNHBEは傷害しなかった。

3) CTLクローンG3が認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

クローンG3は*RNA binding motif protein 4*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エピトープの領域をアミノ酸としてAVRTPYTMSY(196-205番目)まで絞り込んだ。

D. 考察

今回同定したCTLクローンG3が認識する抗原遺伝子*RNA binding motif protein 4*は正常細胞にも発現している。今回、HLA-A24を保有する成人のナイーブCD8⁺T細胞に、*RNA binding motif protein 4*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、卵巣がん患者においても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G3が認識する抗原遺伝子*RNA binding motif protein 4*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と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that

mimics tumor-associated antigens. *PLoS One*. 7(10):e47126, 2012.

- 2) Nishio N, Fujita M, Tanaka Y, Maki H, Zhang R, Hirosawa T, Demachi-Okamura A, Uemura Y, Taguchi O, Takahashi Y, Kojima S, Kuzushima K. Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human $\gamma\delta$ T cells. *J Immunother*. 35(8):598-606, 2012.
- 3) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue Antigens* 80(2): 119-125, 2012.

2. 学会発表

- 1) 葛島清隆、岡村文子. HLAを改変したがん細胞株で誘導したCTLの標的抗原の解析：第16回日本がん免疫学会総会、札幌市、2012年7月
- 2) 西尾信博、藤田 貢、田中義正、牧寛之、張エイ、岡村文子、植村靖史、田口 修、高橋義行、小島勢二、葛島清隆 . Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human gamma-delta T cells：第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、金沢市、2012年8月
- 3) 植村靖史、峰野純一、池田裕明、劉天懿、牧 寛之、近藤紳司、張エイ、岡村文子、藤田 貢、赤塚美樹、園田

精昭、珠玖 洋、葛島清隆. 腫瘍抗原特異的TCR遺伝子導入NKT細胞を用いたがん免疫療法の可能性：第71回日本癌学会学術総会、札幌市、2012年9月

- 4) Zhang R, Liu Tianyi, Suzuki M, Hirosawa N, Kaneko S, Okamura A, Sakamoto Y, Kuzushima K, Uemura Y. Regulation of IL-

27/Osteopontin balance in dendritic cells by ligand activation of invariant NKT cells: 第41回日本免疫学会学術集会、神戸市、2012年12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
Saito S, Murata T, <u>Kanda T</u> , Isomura H, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, and Tsurumi T.	Epstein-Barr virus deubiquitinase downregulates TRAF6-mediated NF-kappaB signaling during productive replication.	<i>J Virol.</i>	87(7)	4060-4070	2013
Kawashima D, <u>Kanda T</u> , Murata T, Saito S, Sugimoto A, Narita Y, and Tsurumi T.	Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Is Dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90.	<i>J Virol.</i>	87(11)	6482-6491	2013
Nishio N, <u>Fujita M</u> , Tanaka Y, Maki H, Zhang R, Hirosawa T, Demachi-Okamura A, Uemura Y, Taguchi O, Takahashi Y, Kojima S, Kuzushima K. 2012	Zoledronate sensitizes neuroblastoma-derived tumor-initiating cells to cytolysis mediated by human $\gamma\delta$ T cells.	<i>J Immunother.</i>	35(8)	598-606	2012
Kohanbash G, Ishikawa E, <u>Fujita M</u> , Ikeura M, McKaveney K, Zhu J, Sakaki M, Sarkar S, Okada H.	Differential activity of interferon- α 8 promoter is regulated by Oct-1 and a SNP that dictates prognosis of glioma.	<i>Oncoimmunology</i>	1(4)	487-492	2012
Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, <u>Akatsuka Y</u> , Weissman IL, Greenberg PD.	Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen.	<i>Blood</i>	119(23)	5492-5501	2012
Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H, Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Koderu Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, <u>Akatsuka Y</u> .	HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype.	<i>Tissue Antigens</i>	80(2)	119-125	2012
Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, <u>Akatsuka Y</u> , Chiba S.	HLA-C matching status does not affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by allogeneic natural killer Cells.	<i>Immunol Invest.</i>	41(8)	831-846	2012
Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, <u>Akatsuka Y</u> , Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H.	Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor.	<i>Anticancer Res.</i>	32(12)	5201-5209	2012
<u>Demachi-Okamura A</u> , Torikai H, <u>Akatsuka Y</u> , Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K.	Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens.	<i>PLoS One</i>	7(10)	e47126	2012
<u>Kanda T</u> , Ochi T, Fujiwara H,	HLA-restricted presentation of WT1	<i>Cancer Gene</i>	19(8)	566-571	2012

Yasukawa M, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, and Tsurumi T.	tumor antigen in B-lymphoblastoid cell lines established using a maxi-EBV system.	<i>Ther.</i>			
Murata T, Kondo Y, Sugimoto A, Kawashima D, Saito S, Isomura H, <u>Kanda T</u> , and Tsurumi T.	Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells.	<i>J Virol.</i>	86(9)	4752-4761	2012
Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, <u>Kanda T</u> , Kimura H, and Tsurumi T.	Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication.	<i>J Virol.</i>	87(4)	2120-2127	2012

