

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 客員研究員

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) 活性型変異K-rasによって提示が誘導されるCTLエピトープの解析研究、(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、(c) Wilms' tumor gene 1 (WT1)発現リンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)の抗原提示細胞としての有用性の検証および(d) 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について以下のように報告する。

(a) HLA-A*24:02を導入したK562細胞の刺激により誘導・樹立したCTLクローン16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)由来の12 merペプチドを認識する。CTLクローン16F3は、K562細胞のほかいくつかの膵がん細胞株も認識するが、正常細胞は認識しない。一方、標的抗原のPSAはユビキタス蛋白であり、がん細胞にも正常細胞にも同程度発現している。このことから、本エピトープの生成にはがん細胞固有の抗原処理機構が関与していることが示唆され、詳細な検討の結果、膵がん細胞などで恒常的に亢進しているオートファジーに依存していることがこれまでの研究であきらかとなった。本年度は、正常細胞に異なる手段でオートファジーを誘導し、どのような条件が本エピトープの生成に必要なか検討を行った。すなわち、飢餓状態で培養、ラパマイシン処理、活性型変異K-ras (G12V)導入の3種の方法で、正常細胞にオートファジーを誘導したところ、変異K-ras導入においてのみこのエピトープの提示が認められた。変異K-rasは、膵がん、大腸がん、肺がん他、多種のがんで認められており、発がんの初期に発生している遺伝子変異と考えられている。今回、変異K-ras導入によってオートファジーが誘導され、正常細胞表面には存在しないCTLエピトープが新たに提示されることが示された。この事実は、変異K-rasが発生した時点で細胞の蛋白代謝経路に変化が生じ、その結果ユビキタス蛋白の一部ががん特異的CTLの標的になっている可能性を示している。がん特異的免疫を考察する上で、新たな視点を提示した研究結果と考えられた。

(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考えられた。

(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。

(d) 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。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を作製した。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ープCD8⁺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G3を樹立した。さらにこの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。

分担研究者	所属施設名	職名	
赤塚美樹	藤田保健衛生大学	準教授	A. 研究目的
神田 輝	愛知県がんセンター研究所	室長	(a) 我々はこれまでに、HLAを表面に発現し
岡村文子	愛知県がんセンター研究所	研究員	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、このaAPCを使用してHLA-A*24:02拘束性にK562細胞および膵がん細胞株を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)クローン16F3を樹立している。16F3は、puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)由来の12 merペプチドを認識する。CTLクローン16F3は、K562細胞のほか、いくつかの膵がん細胞株も認識するが、正常細胞は認識しない。標的抗原のPSAはがん細胞および正常細胞に同程度発現しており、本エピトープの生成にはがん細胞固有のオートファジーが、抗原処理機構に関与していることが示されている。本年度は、正常細胞に異なる手段でオートファジーを誘導し、どのような条件が本エピトープの生成に必要なか検討を行った。

(b) 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。

(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。

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。

(d) 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

(a) 活性型変異K-rasによって提示が誘導されるCTLエピトープの解析研究：

1) CTLの誘導と標的遺伝子の同定：

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*24:02、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。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。

2) オートファジーの誘導とCTLエピトープ生成の検討：

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aに拘束分子のHLA-A*24:02を導入後、以下の3通りの方法でオートファジーを誘導した。飢餓培養法；アミノ酸およびグルコースを培養液から除去するためにハンクス緩衝液中で数時間培養した。mTOR阻害法；mTOR阻害剤であるラパマイシンを培養液中に一定期間添加した。活性型K-ras導入法；活性型変異(G12V)を有するK-rasのcDNAを、レトロウイルスベクターを用いてMCF10A細胞に導入した。K-ras蛋白質の発現の確認はウエスタンブロットング法で行った。オートファ

ジー誘導の確認は、LC3に対する免疫染色法およびウエスタンブロッティング法で行った。CTLエピトープ生成の判定は、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、ELISA法で測定した上清中のIFN γ を指標にした。(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：

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/MAGEA3-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細胞に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。

(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) 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ティ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。

(d) 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。

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、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。

(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。

C. 研究結果

(a) 活性型変異K-rasによって提示が誘導されるCTLエピトープの解析研究：

1) CTLの誘導と標的遺伝子の同定：

CTLクローン16F3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。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、16F3クローンは複数の膵がん細胞を認識した。16F3クローンは puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエントを認識していた。このスプライスバリエントは、PSA遺伝子の上流側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。

2) オートファジーの誘導とCTLエピトープ生成の検討：

正常乳腺上皮細胞株MCF10Aを飢餓培養法、mTOR阻害法およびに活性型K-ras導入法の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。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

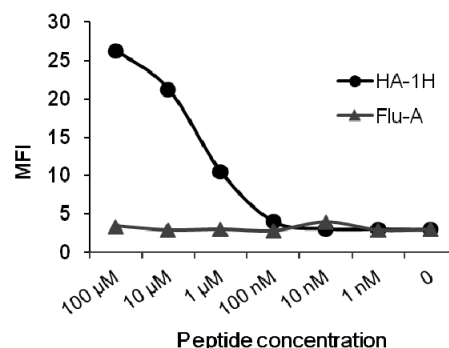
1) マイナー抗原ワクチンの臨床試験：

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

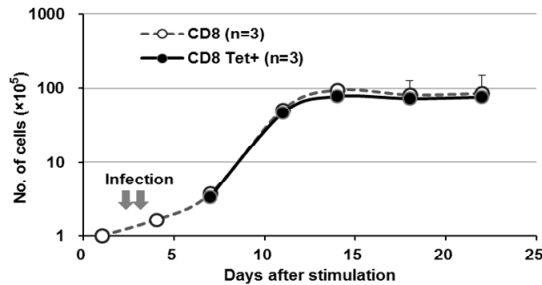
単鎖抗体(クローン#131)をビオチン化した後streptavidin-PEを用いてテトラマー抗体化した。T2細胞にHA-1H、陰性コントロールとしてFlu-Aを10倍希釈しつつ添加し、抗体での染色性を目安にMean fluorescence intensity (MFI)で検討した(下図)。



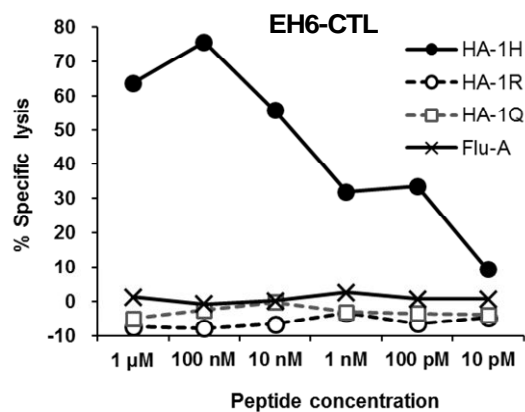
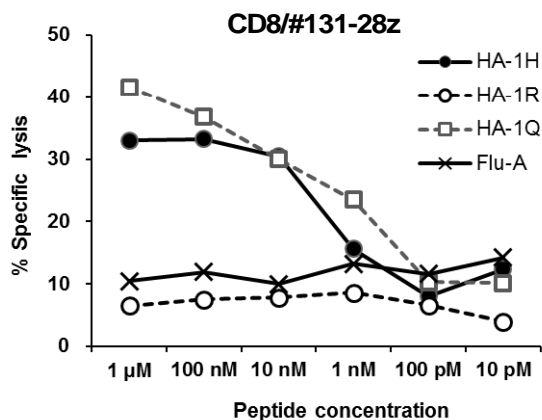
HA-1Hはペプチド濃度100nM以上で濃度依存性に検出されたが、Flu-Aは1,000倍の100 μ Mでも全く染色されなかった。図には示さないが、HA-1Rペプチドの場合も100 μ Mでの若干の染色以外、Flu-Aと同様な結果であった。以上より、#131抗体はHLA-A2に反応するのではなく、HLA-A2に結合したペプチドとの複合体に反応していると考えられた。

#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）。

(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) 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株で欠損している約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、TD₅₀(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(1×10⁵/ml程度)を示した。

(d) 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

(a) 活性型変異K-rasによって提示が誘導されるCTLエピトープの解析研究：

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であることが示された結果と考えられる。

(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、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、Biscore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 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 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ク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

Endogenously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。

(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：

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。

(d) 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

(a) 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。

(b) 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。

(c) 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。

(d) 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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) 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. *Oncimmunology*. 1(4):487-492, 2012.
- 5) 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(23): 5492-5501, 2012.
- 6) 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(2): 119-125, 2012.
- 7) 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(8): 831-846, 2012.
- 8) 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(12): 5201-5209, 2012.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
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、金沢市、2012年8月
 - 3) 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、金沢市、2012年8月
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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).
 - 8) Zhang R, Liu Tianyi, Suzuki M, Hirohara 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
- 13) 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
- 14) 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