

2013/30/9B

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22－25年度 総合研究報告書

研究代表者

葛島清隆（平成22年度、平成25年度）

藤田 貢（平成23年度、平成24年度）

平成26（2014）年4月

目 次

I. 総合研究報告

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（平成 22 年度、平成 25 年度）	
藤田 貢（平成 23 年度、平成 24 年度）	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……………	34
--------------------------	----

I. 総合研究報告書

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）
総合研究報告書

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

平成22年度, 25年度 葛島清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長
平成23年度, 24年度 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。平成22年度から25年度に得られた研究成果として、(a)人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定、(b)マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用、(c)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ならびに(d)肺がん転移性脳腫瘍発症における骨髄由来抑制細胞の役割と治療標的の同定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。CTL誘導するのに必要とされるがん細胞株を樹立しにくい膵がん、肺がんなどではCTL標的抗原の同定が遅れている。免疫療法に有用なCTL標的抗原を新規に同定するために、アロ反応を回避できる汎用性の高い人工抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cell, aAPC) システムの構築をした。まず、HLAを表面に発現していないK562細胞にHLA-A*24:02、CD86および4-1BBLを導入しaAPCを作製した。次に、HLA-A*24:02陰性の卵巣がん細胞株であるTOV21G細胞にHLA発現を抑制するsiRNA部位のコドン変換をしたHLA-A*24:02とCD86を予め導入しておき、さらに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処理を加えることにより、HLA-A*24:02分子のみ発現するaAPCを作製した。HLA-A*24:02陽性成人のCD8⁺T細胞をこれらのaAPCで刺激して、HLA-A*24:02拘束性にK562細胞あるいはTOV21G細胞を認識するが、HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞株やLCLなどの正常細胞は認識しないCTLクローンを複数樹立した。各aAPC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、CTLクローン16F3、D12（以上K562を認識）と、D2（TOV21Gを認識）が標的とする遺伝子を決定しエピトープのペプチドを同定した。また、エピトープ提示機構について詳しい解析を行った。

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 puromycin-sensitive aminopeptidase (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。正常細胞に飢餓状態で培養、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。この結果は、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。

CTLクローンD12は、大腸がん細胞株PMF-ko14およびOUMS-23をHLA-A*24:02拘束性に認識したが、線維芽細胞などの正常細胞には反応しなかった。K562細胞のmRNAから構築したcDNAライブラリーを用いた発現スクリーニング法により、D12の認識する抗原としてheat shock protein(HSP)90 β を同定した。短縮した遺伝子や合成ペプチドを用いて、HLA-A*24:02分子によってD12に提示されるエピトープの最短の配列を決定した。HSP90 β 蛋白が発現していてもCTLに認識されない細胞があることから、このCTLエピトープはがん細胞に特異的な経路でプロセスされ表面に提示されていることが考えられた。検討の結果、興味深いことにこのエピトープはtransporters associated with antigen processing(TAP)分子を介さない経路で提示されていることが判明した。すなわち、TAPの発現を抑制するsiRNAの導入等により、複数のがん細胞株においてD12の認識が増強された。がん患者の体内ではCTLの攻撃から逃れるために、がん細胞の表面HLAが低下することがある。この原因の一つが、TAP分子の発現低下である。TAPは、細胞質内でプロテアソームによって切断されたペプチドを小胞体へ輸送する役割を持っている。CTLの標的抗原として同定したHSP90 β は、正常細胞にも蛋白発現がみられるが、今回同定したHLA-A*24:02拘束性のエピトープはTAP欠損状態においてのみCTLへ提示される。全ての正常細胞はTAPを有しており、細胞からTAPが失われるのは、がん細胞が免疫圧力から逃れて生き残った場合である。すなわち、本エピトープは、一部のがん細胞に選択的に提示されていると推論できるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。

CTL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) 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 (graft-versus-host disease, 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 (graft-versus-leukemia/lymphoma, 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⁺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。

移植後再発を予防する目的で、選択的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実施した。80例以上について適格性の検討を行い、計8例に接種した。評価可能症例では、接種したマイナー抗原へのCTL反応が増強された例もあった。

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。移植例に適用できるモデル抗原としてHLA-A*02:01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chimeric antigen receptor (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10⁻⁹Mレベルの平衡乖離定数 (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。さらに、CAR-T細胞が認識する細胞あたりのHLA/ペプチド複合体数、サイトカイン産生能、また異なったK_D値を持つCARを導入したT細胞との機能比較について検討した。CAR-T型にすることで、フローサイトメトリーでシフトが検出できる閾値レベル検出限界の7分の1以下の抗原量まで細胞傷害能が発現することが明らかになった他、30分の1程度のK_D値のCAR-Tでも同レベルの細胞傷害性が見られるなど、K_D値だけでは予測できないT細胞の認識機序があることが示され、更に検討を要すると考えられた。

(c) ヒト末梢血由来のBリンパ球にEpstein-Barr virus(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の誘導が確認された。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。また、EBV未感染者ドナーより供与された末梢血単核球を用いた実験もおこなった。EBV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EBV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EBV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。さらに、この技術の基盤となる組換えEBV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EBV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がコードされており、そのターゲットとして上皮細胞特異的に発現する遺伝子を同定した。これらのマイクロRNAの発現が効率の良いウイルス産生細胞の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。

(d) がん原発病変に対する治療成績向上に伴い転移性脳腫瘍の罹患率が増加している。なかでもその血行学的特性から肺がんを原発とするものが多い。近年がん増殖・浸潤・転移における免疫系の関わりが明らかとなりつつあり、また2011年初頭、非ステロイド性抗炎症薬(non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID)の長期投与によりがん死亡率が低下することが報告された。一般的にNSAIDはシクロオキシゲナーゼ阻害活性をもち、この作用により免疫賦活効果を有することが示されている。近年我々は、脳腫瘍発生初期において、炎症細胞の一種である骨髄由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)がCCL2/CXCL12ケモカイン依存性に病変部に集積し、発症のトリガーとなり、かつNSAIDによりCOX-2阻害によりMDSC抑制および脳腫瘍発生抑制しうることを示してきた。それらの知見を元に、本研究では、特に肺がん転移性脳腫瘍発症におけるMDSCの影響を、マウスによる非臨床研究およびヒト臨床研究の両面から評価した。

分担研究者	所属施設名	職名
神田 輝	愛知県がんセンター研究所	室長
赤塚美樹	藤田保健衛生大学	準教授
岡村文子	愛知県がんセンター研究所	研究員
藤田 貢	愛知県がんセンター研究所	客員研究員

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

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*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-A*24:02拘束性にK562細胞および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。CTLクローン16F3とD12は、それぞれpuromycin-sensitive aminopeptidase (PSA) および heat shock protein (HSP)90 β 由来のペプチドを認識する。いずれのクローンも、K562細胞に加えていくつかのがん細胞株を認識するが、正常細胞は認識しない。標的抗原のPSAおよびHSP90 β の発現は、がん細胞に限定しているわけではないので、これらのエピトープ生成にはがん細胞固有の抗原処理機構が関与している可能性がある。その分子機構について詳細な検討を行った。

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。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*24:02 cDNA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*24:02のみを発現するaAPCを作製、4) HLA-A*24:02拘束性のCTLの誘導。本方法の有効性は卵巣がん細胞株

TOV21Gで検討した。このHLA改変TOV21G細胞を用いて誘導したHLA-A*24:02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。

(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。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、非自己抗原ゆえ強い抗原性が期待されている。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テトラマー法より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)感染Bリンパ芽球 (lymphoblastoid cell line、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。

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GVL効果を選択的に誘導できると考え、マイナー抗原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企画した。

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。すなわち、HA-1Hマイナー抗原ペプチド+HLA-A*02:01複合体を認識する“TCR様”抗体をもとに、これにCD28-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。

さらに、単鎖抗体とCAR-Tとした場合とで低密度抗原の認識に差があるか、特異性は同じながら異なる平衡乖離定数 (K_D) をもったCAR-T細胞との比較、サイトカイン産生能などを検討した

(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治療法に着目した。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クローンを用いて、ウイルスゲノム上へ任意の外来遺伝子を迅速・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%がん抗原を発現すると期待される。しかもLCLに

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遺伝子組込み組み換え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。

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EBV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。広くLCLの樹立に使われているB95-8株EBVで欠損している約12キロベースの領域を修復したBACクローンをを用いることで、より効率良く組換えEBV産生細胞を樹立できることが示された。そこで最終年度には、修復した12キロベース領域(BARTと呼ばれる転写産物をコードする領域)に存在するウイルス由来マイクロRNA (BART miRNA) に注目し、その機能解析を行うことで、ウイルス産生細胞樹立効率の違いの分子基盤を明らかにすることを目的として研究を行った。

(d) がん原発巣に対する治療成績向上に伴い転移性脳腫瘍罹患率が漸増しており、がん患者の約 10 % が転移性脳腫瘍を発症するとされている。統計的には肺がんを原発

とするものが最も多い (脳腫瘍全国統計第12版)。転移性脳腫瘍は頭蓋内圧亢進症状または局所神経症状により患者の QOL を低下させ、がんにおける主要な予後不良因子となっている (Steege PS, et al. *Nat Rev Cancer*. 11:352-363, 2011)。従って、がん患者における転移性脳腫瘍予防の意義・需要は極めて大きい。

脳実質はリンパ系組織を欠き、実質内への生理的免疫細胞浸潤は極めて稀である。そのため脳・中枢神経系は免疫学的特権部位と言われる。しかし最近では脳組織および脳病変に対し強力な免疫応答が生じることが知られている (Ransohoff RM, et al. *Nat Rev Immunol*. 3:569-581, 2003)。これらの知見を基に、脳・中枢神経系疾患に対してさまざまな免疫学的アプローチがなされており、脳腫瘍についても数多くの免疫療法が試みられている (Fujita M. *Brain Tumor, InTech*, 2011)。

脳腫瘍に対する免疫応答に関し、これまで我々は免疫抑制性細胞内シグナルおよびサイトカインに注目し、研究を行ってきた。特に近年では、STAT3 シグナルが脳腫瘍 CTL 療法に及ぼす影響 (Fujita M, et al. *J Immunol*. 180:2089-2098, 2008)、TGF- β サイトカインが脳腫瘍ペプチド免疫療法に及ぼす影響 (Ueda R, et al. *Clin Cancer Res*. 15:6551-6559, 2010)、CCL2 サイトカインが脳腫瘍ペプチド免疫療法に及ぼす影響 (Zhu X, et al. *J Neurooncol*. 104:83-92, 2011)、脳腫瘍に対する免疫監視機構における COX-2 カスケードの影響 (Fujita M, et al. *Cancer Res* 71:2664-2674, 2011) 等を明らかにした。

これらの研究の中で、原発性脳腫瘍のみならず転移性脳腫瘍発生において、炎症細胞の一種である骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell; MDSC) が CCL2/CXCL12 ケモカイン依存性に病変部に集積し、発症のトリガーとなることが示

唆された。それらの知見を元に、本研究では、特に肺がん転移性脳腫瘍発症におけるMDSCの影響を、マウスによる非臨床研究およびヒト臨床研究から評価した。

B. 研究方法

(a) 人工抗原提示細胞 (aAPC) を使った新規腫瘍抗原の同定：

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製：

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。

卵巣がん明細胞株TOV21GのHLA改変は以下の方法で行った。まず、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）。これらの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。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。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) CTLの誘導：

HLA-A*24:02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-A*24:02導入TOV21G細胞に加え他の卵巣がん細胞株、およびHLA-A*24:02陽性の線維芽細胞やLCLおよび正常気管支上皮から樹立された細胞株NHBEなど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：

K562細胞あるいはTOV21G細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A*24:02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を同定した。

4) 標的細胞のオートファジー誘導とCTLクローン16F3の認識との関係の検討：

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トング法で行った。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。

5) CTLクローンD12の標的細胞認識の検討：

大腸がん細胞、膵がん細胞、K562細胞、

HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞や正常ヒト気管支上皮細胞、LCLなどを抗原提示細胞として用いた。必要に応じて、拘束分子HLA-A*24:02あるいはコントロールとしてHLA-A*02:06を細胞に導入した。TAPの発現を抑制するためにTAP遺伝子に特異的なsiRNAを一過性に導入した細胞も準備した。TAP蛋白のペプチド輸送機能を抑制するために、ヒトサイトメガロウイルスUS6あるいは単純ヘルペスウイルスICP47遺伝子を導入した細胞株を作製した。抗原提示細胞とD12を共培養した上清中に分泌されたIFN- γ をELISA法にて測定した。

(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) 腫瘍抗原ミニジーン発現ベクターおよび抗原提示細胞の構築：

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。

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) 前駆体頻度解析と細胞傷害性試験：

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⁺T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⁺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（33 Gy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（33 Gy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日おきに半量交換し、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。

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。

4) HLA-A*02:01/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-A*02:01/HA-1H-テトラマーと陰性コントロールとしてHLA-A*02:01/MAGEA3-テトラマーを使用した。HLA-A*02:01/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-A*02:01/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。これの単鎖抗体のうちK_D値が最も低いクローン#131の他、異なったK_Dをもつ単鎖抗体(クローン#4, #9)の単鎖部分のcDNAに、CD28の細胞膜貫通領域、CD3ζ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-A*02:01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。

5) 単鎖抗体およびCAR-Tが認識に必要な細胞表面抗原(HLA/ペプチド複合体)密度の検討:

最もK_D値の低いクローン#131単鎖抗体を用いて、T2細胞上に様々な濃度のHA-1Hペプチドを添加した場合、実際にどれくらいのHLA/ペプチド複合体が形成されているかを検討した。QIFIキット(DAKO)を用い、表面に結合した抗体分子数が既知の検量用ビーズと、様々な濃度のHA-1HをパルスしたT2を#131-scFV-PEおよび抗PE抗体で標識し、最後に共通の抗IgG-FITC抗体で蛍光強度を測り、比較検討した。検量線を作成後、HLA/ペプチド複合体数に対応するHA-1Hペプチド濃度を決定した。さらに、得られた濃度と#131-scFV CAR-T細胞による認識との関係を検討した。

さらに単鎖抗体染色による検出感度を上げることで、実際には低濃度のHA-1Hパルスでも単鎖抗体が結合できていないかを検討した。FASERキット(Miltenyi)を用いてPEの蛍光を10倍以上増幅し、フローサイトメトリーによる解析を行った。

6) CAR-T細胞のサイトカイン産生パターンの検討:

昨年度の結果では#131-CAR-T細胞が内在性にHA-1Hエピトープを発現する細胞を傷害出来なかった。そこで、#131, #4scFVを

導入したCAR-T細胞とHLA-A*02:01 cDNAを導入したK562/A2細胞に更にHA-1HまたはHA-1R (Allelic variant) をコードするミニ遺伝子を導入したものと一晚共培養し、上清中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-2を測定した。

(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 A*24:02)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A*24:02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㈱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：

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(A*24:02)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(A*24:02)由来CD8⁺T細胞に対して、WT1₂₃₅₋₂₄₃(CMTWNQMNL)ペプチドをパルスした同一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。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EBV未感染健康人ドナー1名(HLA型 A24/11)由来のPBMCにWT1遺伝子組込みEBV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EBVを同様に感染させることで、GFP発現LCLを樹立した。

4) 欠失領域を修復したEBVの作製およびウイルスマイクロRNAと細胞性遺伝子発現解析：

プロトタイプウイルスとして汎用されているB95-8株EBVは、22個のBART pre miRNAのうち17個のpre miRNAがコードされる約12キロベースの領域を欠損する。この領域をAkata株ゲノム断片で修復したBACクローンを作製した。このDNA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。BART miRNAの発現をノザン法により確認した。BART miRNAの発現の有無による宿主遺伝子発現差異をマイクロアレイ法により調べた。

5) ウイルスマイクロRNAの標的遺伝子候補の同定、および機能アッセイによる確認：

ターゲット検索プログラムを用いて、BART miRNAの標的遺伝子を予測し、上記マイクロアレイ解析において発現抑制がみられる細胞性遺伝子と照らし合わせを行うことで、BART miRNAの標的候補遺伝子を同定した。

(d) 肺がん転移性脳腫瘍発症における骨髄由来抑制細胞の役割と治療標的の同定：

1) マウス肺がん脳転移モデルにおける MDSC の評価：

動物実験モデルとして以下の 2 つを用いた。まず C57B6 野生型マウス脳内に同系肺がん細胞株 LL/2 (1 x 10⁵/匹) を移植し、移植型転移性脳腫瘍モデルを作製した (実験モデル A)。また C57B6 野生型マウスの心尖部より LL/2 (1 x 10⁶/匹) を注入し、血行型転移モデルを作製した (実験モデル B)。一部のマウスでは LL/2 移植前よりアスピリンを経口投与した。また別のマウスでは、LL/2 移植前後に抗 Gr-1 抗体投与により MDSC を除去した。それぞれのモデルについて、生存率および腫瘍生着率、フローサイトメトリーによる腫瘍組織内の免疫細胞浸潤、腫瘍微小環境におけるサイトカイン/ケモカイン等を評価項目とした。MDSC のマーカーとしては CD11b、Ly6G、Ly6C を用いた。

2) 肺がん脳転移症例からの MDSC 採取および評価：

健常人および肺がんの既往がある脳腫瘍症例より末梢血細胞 (PBMC) を採取した。PBMC より CD14⁺CD15⁺HLA-DR^{low} の分画を採取し、mRNA を抽出した。mRNA 純度を確認した上で、Ovation PicoSL WTA System V2 (Nugen Technologies) を用いて cDNA を合成、次いで SureTag DNA Labeling Kit (Aligent) にて蛍光標識後、SurePrint G3 Human 8x60K v2 (Agilent) DNA マイクロアレイチップとハイブリダイゼーションした。結果は Feature Extaction

Software にて検出後、R Environment を用いて解析した。臨床検査項目は、年齢、性別、腫瘍組織系、脳腫瘍サイズ、脳腫瘍組織系 (直達手術症例)、NSAID 服用歴などとした。

(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) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗原の同定：

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*2402cDNAを導入したTOV21G細胞に、これらのsiRNAを導入すると、HLA-A*24:02分子の発現は低下することなく、むしろ増強した。

2) CTLの誘導：

K562から作成したaAPCを使用して、CTLクローン16F3とD12を樹立した。両者とも、HLA-A*24:02拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞、正常ヒト気管/気管支上皮細胞NHBEおよびLCL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クローンは複数の膝がん細胞を、D12はHLA-A*24:02を導入した大腸がん細胞株OUMS23とPMF-ko14を認識した。

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-A*24:02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、CTLクローンD2を樹立した。D2は、HLA-A*24:02導入TOV21G細胞のみならず、HLA-A*24:02陽性の卵巣明細胞がん細胞株、RMGIとIIおよびHLA-A*24:02導入KOC7C細胞を強く傷害したが、HLA-A*24:02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が認識する抗原をコードする遺伝子の同定：

クローン 16F3 は puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)のスプライスバリエーションを認識していた。このスプライスバリエーションは、PSA遺伝子の5'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。

クローンD12が認識する遺伝子としてHSP90AB1(HSP90 β)を同定した。短縮した遺伝子を導入したHEK293T細胞に対する反応に引き続いて、合成ペプチドを用いた検討からアミノ酸9個のエピトープを同定した。

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D2に認識された。

4) 標的細胞のオートファジー誘導とCTLクローン16F3の認識との関係の検討：

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

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。

5) CTLクローンD12の標的細胞認識の検討：

CTLクローンD12は、HLA-A*24:02拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞、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。LCLも認識しなかった。興味深いことに、D12はsiRNA, US6あるいはICP47でTAP機能を抑制した膵がん細胞株MiaPacaとKP-3, および同様の処理をした大腸がん細胞株HCC-56を認識した。処理をしていない親株細胞はいずれも認識されなかった。

(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) 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、内14例がマイナー抗原ミスマッチ適応であった。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 μ 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) 腫瘍抗原ミニジーン発現ベクターおよび抗原提示細胞の構築：

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、WT-1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。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。

以上から、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に進んだ。

3) 前駆体頻度解析と細胞傷害性試験：

予後不良悪性リンパ腫に対してHLA一致 (A*24:02/31:01, B*40:07/56:01, Cw*04:01/-)、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⁺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、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。

4) 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：

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。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。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-A*02:01に反応するのではなく、HLA-A*02:01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。

第2世代のCAR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、#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Galvのエンベロープを導入したPhoenix-Glavパッケージング細胞導入し、puromycinで選択後、その上清をCD3/28で刺激したpri

mary 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-A*02:01/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-A*02:01を導入した細胞には傷害性を与えなかった。

上記は、K_D値の低かった単鎖抗体 (クローン#131) を用いた結果であるが、これをT細胞に導入した場合、scFVとHLA/ペプチド複合体が強固に結合し過ぎてしまい、マイナー抗原のような少ない細胞抗原量 (10コピー程度/細胞) の場合、T細胞がRollingによる連続的な刺激を得ることができないことが、細胞傷害性を発揮できない理由ではないかと考えた。そこで#131より約1/30のK_D値をもつクローン#4で同様なCAR-T細胞を作製してCARの発現と機能を検討した。

次いで、磁性ビーズを用いてCD4、CD8に分離後に解析したところ、HLA-A2/HA-1Hテトラマーによる染色性はK_D値の低い#4の方が若干良好であった。次にHA-1Hペプチドを添加したT2細胞に対する傷害性を検討した。その結果CD4陽性の#4 CAR-T細胞がより強い傷害性を示したものの、低濃度HA-1Hペプチドパルスにおける認識性は#131、#4ともに1 nM付近が検出限界であり、差を認めなかった。このことは、少なくとも30

倍程度K_Dが弱くなる程度ではCAR-T細胞としての細胞傷害性に影響を与えず、今後さらにTCRに近いK_D値のscFvを導入したCAR-T細胞で検討を要すると考えられた。

5) 単鎖抗体およびCAR-Tが認識に必要な細胞表面抗原 (HLA/ペプチド複合体) 密度の検討:

B細胞性腫瘍におけるリツキシマブの標的となるCD20の発現量は10万コピー/細胞前後とされ、抗CD20抗体を搭載したCAR-T細胞にとって標的抗原は十分あると考えられる。他方、HLA上に提示されたマイナー抗原のコピー数については、過去の報告でHA-1Hが10コピー/細胞程度とされる。HA-1Hに特異的なCTLはこのような条件下でも良好な傷害性を示す。#131 CAR-T細胞では内在性にHA-1Hを発現する細胞を傷害出来なかったが、他方10nMのペプチドをパルスすることでT2細胞を傷害した。そこでフローサイトメトリーの染色性 (平均蛍光強度) と細胞あたりのHLA-A2/HA-1H複合体数の関係を検討した。フローサイトメトリーでシフトとして観察される添加ペプチド濃度下限は100nM程度であり、10nMではほぼ検出されなかった。細胞傷害性試験の結果と比較すると、CAR-Tとした場合、少なくとも傷害能で検出される感度はフローサイトメトリーの検出下限の10倍以上であった。

さらにコントロールビーズの染色性との比較から、T2細胞上のHLA/ペプチド複合体数を算出した。その結果、ペプチド100 nMパルスで約2000分子、10 nMで300分子前後であった。すなわちフローサイトメトリーの検出下限は2000分子と高く、CTLでは300分子前後であった。また蛍光増幅を行うと、フローサイトメトリーによる検出限界は100 nM以下となったが、10nMが限界であった。

6) CAR-T細胞のサイトカイン産生パターンの検討:

#131 scFv CAR-T細胞による細胞傷害性

は、エピトープを内在性に発現するHA-1HまたはHA-1R (Allelic variant) をコードするミニ遺伝子を導入したK562/A2細胞では示されなかった。これは細胞表面上のコピー数が300個以下であるためと思われたが、もう1つのCTLの機能であるサイトカイン産生能についても検討した。IFN- γ は#131 scFVを導入したCAR-T細胞から産生され、その産生はCD4陽性分画の方が多かった。また#4はIFN- γ 産生能では#131に劣るか (CD4分画)、産生出来なかった (CD8分画)。

(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。ウエ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。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。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では細胞溶解が起こらなかった。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

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こらなかった。

4) 欠失領域を修復したEBVの作製およびウイルスマイクロRNAと細胞性遺伝子発現解析：

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BACクロンの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。修復したBACクロンを用いることで、修復前のBACクロ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。

修復したBACクロンを導入したHEK293細胞において、BART miRNA群の発現を認めた。発現レベルは、BART miRNAが高発現することで知られている上咽頭がん由来C666-1細胞のそれに匹敵するレベルであった。マイクロアレイ解析により、BART miRNA群が発現している細胞において発現が抑制される細胞性遺伝子を複数同定した。

5) ウイルスマイクロRNAの標的遺伝子候補

の同定、およびその確認：

上記結果、およびBART miRNAのターゲット予測の結果から、標的遺伝子候補としてWnt抑制因子の一つに注目した。この遺伝子の3'-UTRをルシフェラーゼ遺伝子の下流に連結したレポーター遺伝子を作製し、一連のBART miRNA mimicと共に細胞に導入することで、レポーター遺伝子を発現抑制するBART miRNAを同定した。またBART miRNA mimicを細胞へトランスフェクションすると、Wnt抑制因子の蛋白質発現が著明に低下した。

(d) 肺がん転移性脳腫瘍発症における骨髄由来抑制細胞の役割と治療標的の同定：

1) マウス肺がん脳転移モデルの作製：

モデルAにおいては、アスピリン継続投与により脳腫瘍生着率の著明な低下および生存率上昇がみられた。また腫瘍形成したマウス脳腫瘍組織を採取し、腫瘍内浸潤免疫細胞を抽出、フローサイトメトリーにて解析したところ、MDSC腫瘍内集積の著明な低下を認めた。さらにアスピリン治療群の腫瘍組織内では、CCL2およびCXCL12ケモカインの発現低下があり、それぞれがMDSC集積に関わっていると考えられた。抗Gr-1抗体投与によるMDSC除去マウスでは著明な生存率上昇がみられた。モデルBにおいては、アスピリン治療群では転移性脳腫瘍のみならず、肝・腎・肺への転移頻度の低下がみられた。

2) 肺がん脳転移症例からのMDSC採取および評価：

肺がん転移性脳腫瘍症例では健常人と比較し、末梢血中のMDSC増加がみられた。また転移性脳腫瘍症例のMDSCではCD276 (B7-H3) の発現上昇がみられ、かつNSAID服用歴との統計学的有意な相関もみられた。

D. 考察

(a) 人工抗原提示細胞を使った新規腫瘍抗

原の同定：

CTLクローン16F3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。

CTLクローンD12は、様々ながんで高発現していることが知られているHSP90 β 由来のエピトープを標的とする。HSP90 β は、正常細胞にも蛋白発現がみられるが、今回同定したHLA-A*24:02拘束性エピトープはTAP欠損状態においてのみCTLへ提示される。この一見逆説的な現象は以下のように説明できる。細胞内で産生するHLA結合ペプチドの多くは、TAPによって小胞体へ輸送される。一方、特殊な構造のために、TAPを介さずに小胞体に輸送されるペプチドも少数ながら存在しており（今回同定したエピトープペプチドが相当する）、競合的に劣勢であるために、HLAに結合することができないと考えられる。がん細胞においてTAPの発現が低下すると、TAPに依存しないペプチドが選択的に小胞体内に侵入できるため、HLAに結合できるようになり、CTLに提示される。正常細胞はTAPを有しており、細胞からTAPが失われるのは、がん細胞が免疫圧力から逃れて生き残った場合のみと考えられる。すなわち、本エピトープは正常細胞表面では提示されず、免疫逃避した後のがん細胞で選択的に提示されていると推論できるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。今後は、なぜこのCTLエピトープがTAPに非依存的なのかその構造上の理由を明らかに