

**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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 葛島 清隆

平成26(2014)年4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 葛島清隆

II . 分担研究報告

- 1 . 免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定..... 16
葛島清隆（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に対する CTL 応答に関する研究 21
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28
神田 輝（愛知県がんセンター研究所・腫瘍ウイルス学部）
- 4 . 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..... 31
藤田 貫（愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部）

III . 研究成果の刊行に関する一覧表34

I . 總 括 研 究 報 告 書

II. 分担研究報告書

III . 研究成果の刊行に関する一覧表

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 葛島清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

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) 免疫逃避したがん細胞が提示する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) 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) 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) がん細胞を選択的に認識する細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)の樹立とその標的抗原の同定は細胞性免疫療法の基盤である。本年度は、HLA-A*24:02陽性成人のナイーブCD8+T細胞を、HLA-A*24:02を導入したK562細胞(慢性骨髄性白血病細胞株)で刺激し、CTL株を樹立した後に限界希釈法にてCTLクローンD12を得た。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HSP90 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。

(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においては、最近ではHLA半合致移植後のcyclophosphamideなどの導入でドナーソースが増え適応患者が増えつつあるが、移植後再発とGVHDは依然として大きな問題である。我々は選択的抗腫瘍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同定し、移植後再発の予防や治療への応用を検討してきた。能動免疫法は予防で特に有用であるが、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。昨年度は同種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chimeric antigen receptor (CAR) を導入したT細胞について初期の検討結果を報告した。本年度はこの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、また異なった平衡乖離定数 (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EBVを用いて任意のがん抗原を発現するLCLを樹立できること、また樹立したLCLにおいて実際にかん抗原WT1が抗原提示されることを示した。さらに広く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(bacterial artificial chromosome)クローンをを用いることで、より効率良く組換えEBV産生細胞を樹立可能であることを明らかにした。本年度は、修復した12キロベース領域に存在するウイルス由来マイクロRNA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。その結果、ウイルスマイクロRNAのターゲット遺伝子の候補として、上皮細胞特異的に発現する細胞性因子を同定した。この因子はWntシグナル経路の抑制因子であることから、ウイルスマイクロRNAが細胞のシグナル伝達経路の抑制を解除することが、効率の良いウイルス産生に寄与する可能性が示唆された。

(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
赤塚美樹	藤田保健衛生大学	準教授
神田 輝	愛知県がんセンター研究所	室長
藤田 貢	愛知県がんセンター研究所	客員研究員

依然として限定的である。最近では米国に於いてHLA-A2拘束性WT-1ペプチドを認識するT細胞を用いた養子免疫療法がある程度の効果を上げつつあり、エフェクター細胞を大量に輸注する治療法は、難度が高いものの有望と思われる。

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。我々は以前に、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を導入し人工抗原提示細胞(artificial antigen presenting cells, aAPC)を作製した。今年度は、このaAPCを使用して誘導したCTLクローンD12の認識する抗原について詳しい検討を行った。

(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。最近ではHLA適合ドナーが見つからない場合HLA半合致の血縁から移植を行うPost-cyclophosphamide方法が報告され移植適応患者の増加が期待される。しかし、このHLA不適合移植後でも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、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、B細胞性腫瘍に対するCD19/CD20-chimeric antigen receptor (CAR)導入T細胞療法を除き、効果は

我々はHLA以外の同種抗原であるマイナー抗原に着目して、日本人移植患者において重要な役割をもっているものを複数種類新規同定し、報告してきた。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。その中で我々は、選択的graft-versus-leukemia/lymphoma (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について集中的に検討してきた。昨年度はHLA-1Hマイナー抗原ペプチド+HLA-A2複合体を認識する“TCR様”抗体の樹立、単鎖化抗体の性質、これにCD38-CD3鎖を結合しT細胞に導入したCAR-T細胞の細胞傷害機能と問題点を報告した。今年度はさらに、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ので報告する。

(c) 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ある。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不死化細胞株であ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。われわれは、がん抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBV(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)クローンをを用いて実験系を改良し(Kanda et al, *PLoS One*, 6, e27758, 2011)、この系を用いてがん抗原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)。組換えウイルス産生細胞の樹立は、EBVゲノムDNAのBACクローンをHEK293細胞に導入し、薬剤耐性クローンを取得することで行う。前年度の研究により、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(bacterial artificial chromosome)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。そこで本年度は、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(Steeg 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) 免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定：

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製とCTLの誘導：

HLAを表面に全く発現していないK562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。aAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。特異性はエリスポット法とIFN- γ キャッチ法にて確認した。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定：

K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を導入した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。

3) 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-A24陽性の線維芽細胞や正常ヒト気管支上皮細胞、EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球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) HLA-A2/HA-1H複合体を認識する単鎖抗

体の樹立と異なった親和性を持つCARを遺伝子導入したT細胞との比較：

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-テトラマーは主任研究者の葛島らが作製した。HLA-A2/HA-1H-テトラマーをHLA-A2遺伝子導入B6マウスに3回免疫した。1週間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を複数樹立した。これらの単鎖抗体のうち K_D 値が最も低いクローン#131を直接PEで標識し、HA-1H、HA-1Rを含むHLA-A2結合性のペプチドをHLA-A2陽性TAP欠損T2細胞に添加後、抗HLA抗体(W6/32)および抗HLA-A2抗体を用いて表面HLA-A2の安定化度を評価した。

引き続きCAR-T細胞の作製を行った。まずクローン#131の他、異なった K_D をもつ単鎖抗体(クローン#4, #9)のcDNAの3'末部分にCD28の細胞膜貫通領域、CD3鎖のITAMドメインを結合し、「第2世代」のCARのレトロウイルスコンストラクトを作製した。

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陽性T細胞に純化した。これをCD3-CD28コーティングビーズを用いて刺激し、48、72時間後にウイルス上清で2回感染、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日目に必要に応じてCD4、CD8陽性細胞に分画してから機能解析を行った。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 ^{51}Cr 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、他、HLA-A2結合性ペプチドをさま

ざまな濃度で添加しタイトレーションを行った。

2) 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。

3) 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-1HE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晩共培養し、上清中のIFN- γ 、TNF- α 、IL-2を測定した。

(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) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析:

プロトタイプウイルスとして汎用されて

いるB95-8株EBウイルスは、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「BART欠損ウイルス」である。この領域をAkata株ゲノム断片で修復した「BART修復ウイルス」を作製した。「BART欠損ウイルス」および「BART修復ウイルス」のBACクローンDNAをHEK293細胞へ導入してウイルス産生細胞を樹立し、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変化をマイクロアレイ法により調べた。

2) 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(1×10^5 /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(1×10^6 /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に実施された。

C. 研究結果

(a) 免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定:

1) 人工抗原提示細胞(aAPC)の作製:

HLA-A*24:02、CD86及び4-1BBLを導入し

たK562細胞は長期間にわたりこれらの蛋白を発現していた。HLA-A*24:02拘束性にK562を認識するT細胞株から、限界希釈培養法にてCTLクローンD12を得た。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定:

CTLクローンD12が認識する遺伝子としてHSP90AB1(HSP90β)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。

3) D12の標的細胞認識の検討:

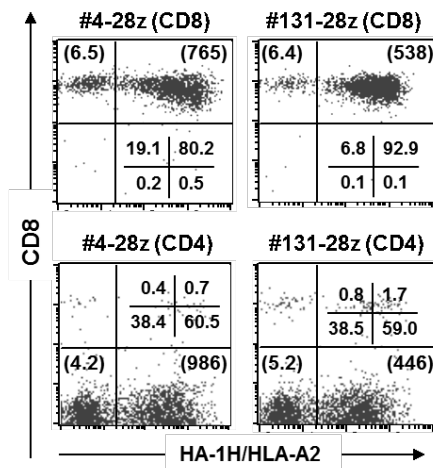
CTLクローンD12は、HLA-A*24:02拘束性にK562細胞を認識するが、HLA-A*24:02陽性の線維芽細胞、正常ヒト気管/気管支上皮細胞などの正常細胞は認識しなかった。EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球も認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、HLA-A*24:02を導入した大腸がん細胞株OUMS23とPMF-ko14のみを認識した。興味深いことに、D12はsiRNA、US6あるいはICP47でTAP機能を抑制した膵がん細胞株MiaPacaとKP-3、および同様の処理をした大腸がん細胞株HCC-56を認識した。

(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用:

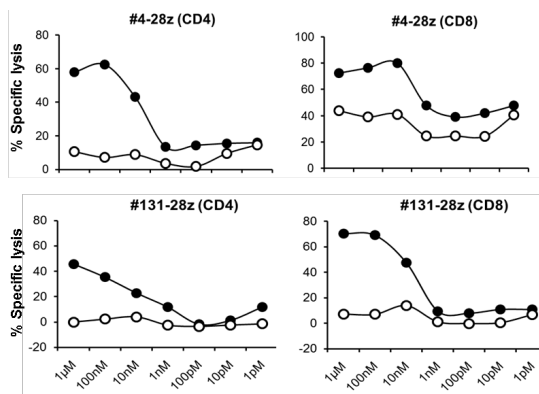
1) HLA-A2/HA-1H複合体を認識する異なった親和性を持つCARを遺伝子導入したT細胞との比較:

昨年度は最もK_D値の低かった単鎖抗体(クローン#131)を用いたが、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細胞を作成

してCARの発現（下図）と機能を検討した。



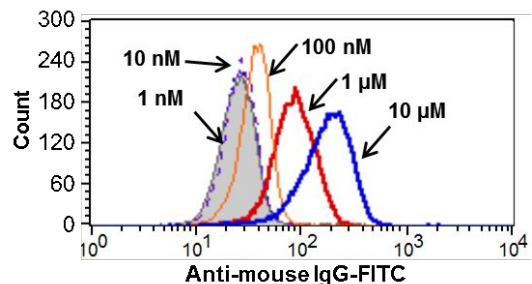
次いで、磁性ビーズを用いてCD4、CD8に分離後に解析したところ、HLA-A2/HA-1Hテトラマーによる染色性は K_D 値の低い#4の方が若干良好であった。次にHA-1Hペプチドを添加したT2細胞に対する傷害性を検討した。その結果CD4陽性の#4 CAR-T細胞がより強い傷害性を示したものの、低濃度HA-1Hペプチドパルスにおける認識性は#131、#4ともに1 nM付近が検出限界であり、差を認めなかった（下図）。



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。

2) 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（上図）。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（下図）。



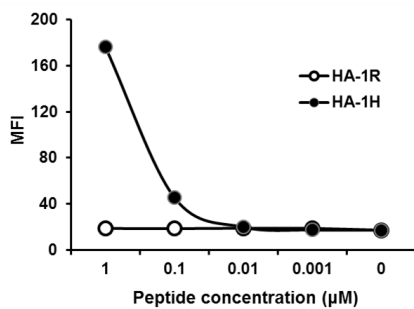
細胞傷害性試験の結果と比較すると、CAR-Tとした場合、少なくとも傷害能で検出される感度はフローサイトメトリーの検出下限の10倍以上であった。

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（下表）。

HA-1H concentration on T2 cells (μ M)	MFI	ABC	SABC
Irrelevant scFv	24.67	4104	0
1 nM	25.28	4213	109
10 nM	26.26	4388	284
100 nM	35.52	6067	1963
1 μ M	84.46	15359	11255
10 μ M	176.81	33919	29815

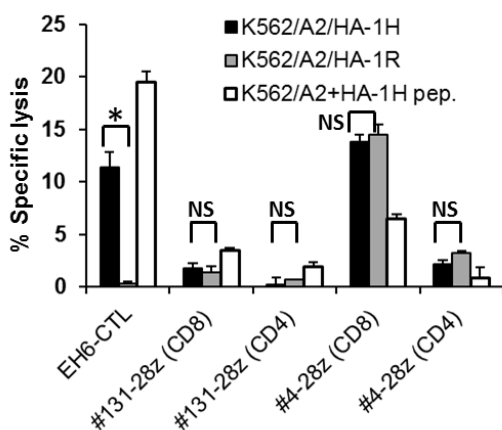
表でSABCが細胞あたりの抗原複合体の分子数を示す。100 nMで約2000分子、10 nMで300分子前後であった。すなわちフローサイトメトリーの検出下限は2000分子と高く、CTLでは300分子前後であった。

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100nM以下となったが、10nMが限界であった(下図)。



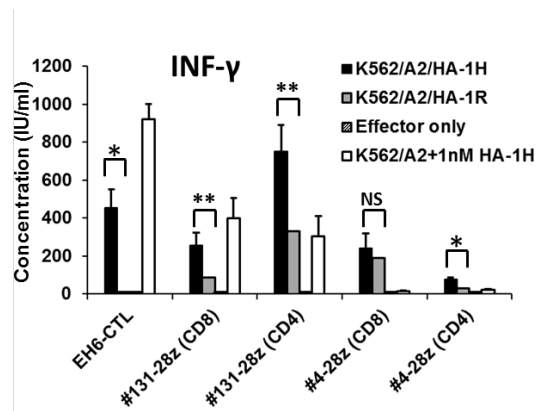
3) CAR-T細胞のサイトカイン産生パターンの検討:

#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(下図、ポジティブコントロールは10nM HA-1HペプチドをパルスしたK562/A2)。



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。代表的なIFN- γ 産生の結果を示

す(下図)。



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)。図には示さないが、#4 scFv CAR-T細胞はTNF- α およびIL-2産生能では#131より良好であった。

(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) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析:

「BART修復ウイルス」を導入したHEK293細胞において、修復した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。

2) 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) 免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定：

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。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するとともに、HLA-A*24:02/HSP90 β ペプチド複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、正常組織およびがん組織を免疫染色することで本複合体の分布を検討する予定である。(b) マイナー組織適合抗原特異的CTLの解析と臨床応用：

本年度はK_D値が高すぎることでCAR-Tとした場合に細胞傷害活性がでない原因なのか、またどの程度の細胞表面抗原量が今回作成したHLA-A*02:01拘束性HA-1Hを認識するTCR-like抗体の検出限度か、そして細胞傷害活性に加えサイトカイン産生能について検討を加えた。

K_D値の検討では、30倍K_D値の弱い（TCRでは最大のKD値 10⁻⁷Mに相当）#4 scFvを用いて検討したが、HA-1H特異的CTLとしてクローニングされたEH6というCTLのような活性は見られなかった。以上のことより、

高すぎる K_D 値のためにT細胞に連続的な刺激が入らないためという仮説は否定的となった。CAR-Tは細胞内シグナルドメインは鎖のITAMだけであり、またHLA/ペプチド複合体とscFv結合部分にTCRで形成されるような免疫シナプスが形成されるかも不明であり、今後の検討課題と考えられた。

今回のCAR-T細胞が細胞傷害性を発揮するには細胞あたり300分子程度の抗原が必要と判明した。サイトカイン産生能で評価した場合は更に1桁以上低い抗原量で反応が出ていたので、CAR-T細胞のエフェクター相では抗原量に応じサイトカイン産生>細胞傷害活性が発現すると考えられた。フローサイトメトリーで検出される下限でもCAR-Tとすることにより細胞傷害活性が出ることで、これまで親和性が低いとして断念していた抗体や、抗原量が少ないとして効果が期待できないと想像された腫瘍でもCAR-Tとすることで治療効果が期待できると考えられた。

本研究はモデル抗原としてHA-1Hを用いたが、これはHLA-A2トランスジェニックマウスが入手できたことが主な理由である。今後は日本人の6割以上が有するHLA-A24に拘束される抗原エピトープペプチド複合体を認識する抗体およびCAR-T細胞を開発し、対象を広げる必要があると考えられた。

(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：

「BART修復ウイルス」を産生するHEK293細胞においては、一連のBART miRNA群が発現することで、宿主遺伝子の発現変化が生じることが判明した。興味深いことにBART miRNAのターゲット遺伝子候補として同定されたWnt抑制因子は、上皮細胞で特異的に高発現する因子であった。すなわちBART miRNAは、上皮細胞の一種であるHEK293細胞においてWnt抑制因子によるシグナル経路抑制を解除し、結果的に

Wnt経路が活性化されることが明らかになった。こうしたシグナル伝達経路の活性化が、効率の良い組換えウイルス産生に貢献する可能性が示された。上皮細胞におけるWntシグナル経路の活性化は、発がん過程においても重要であると考えられており、ウイルスマイクロRNAによる発がん促進という観点からも注目される。

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

マウス実験モデルにより、転移性脳腫瘍の発症初期にMDSCが組織内に集積し、腫瘍に有利な微小環境を形成していると考えられた。また肺がん脳転移症例から得られたMDSC解析により、共刺激分子CD276がMDSCの免疫抑制機能に関わっていることが示唆された。

E. 結論

(a) TAPの欠損または機能不全になった細胞表面のHLA-A*24:02分子によって提示される、HSP90 β に由来するCTLエピトープをcDNA発現クローニング法によって同定した。本エピトープは、免疫逃避した後のがん細胞に選択的に提示されていると推察されるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。

(b) HLAに結合したマイナー抗原ペプチドを認識するTCR-like抗体とCAR-Tを作製し、その機能、抗体の K_D 値や抗原量との関係、エフェクター機能について詳細に解析し、TCR-like抗体を組み込んだCAR-TがHLA/ペプチド複合体を認識することを示した。今後は実際の抗腫瘍効果やOff-target効果の有無を検討し、トランスレーションが可能かを見極める必要がある。

(c) 組換えEBV産生細胞の樹立過程において、細胞性遺伝子発現がウイルスのコードするマイクロRNAによる制御を受ける可能性が示された。組換えEBVを用いて樹立で

きるLCLは、各種免疫学的解析において非常に有用な研究ツールであり、本研究成果はこうした実験系のさらなる改良に資するものと考えられた。

(d) 肺がん転移性脳腫瘍発症では MDSC増加および腫瘍床への集積がおこり、転移性腫瘍生着に有利な微小環境を形成している。転移性脳腫瘍発症制御のためには、従来の抗癌剤治療に加え、MDSC除去を目的とした新規治療法の可能性が示唆され、そのMDSC特異的標的分子としてCD276が考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther.* in press.
- 2) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7(1):3, 2014.
- 3) Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirose T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. *Hum Immunol.* 74(9):1103-1110, 2013.
- 4) Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood.* 121(24):4894-4901, 2013.
- 5) Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Inoue H, Yasukawa M. Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific T-cell receptor. *PLoS One.* 8(2):e56820, 2013.
- 6) Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kuzushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Nakayama E. Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int J Cancer.* 132(2):345-354, 2013.
- 7) Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, and Tsurumi T. Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. *J Biol Chem.* 288(33):24189-24199, 2013.
- 8) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T,

- Narita Y, Kawashima D, Kimura H, and Tsurumi T. Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol.* 87(12):6693-6699, 2013.
- 10) 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.
 - 11) Murata T, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Kanda T, and Tsurumi T. Contribution of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency. *J Virol.* 87(18):10148-10162, 2013.
 - 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, 2013.
 - 13) 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.
 - 14) Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor-alpha. *Cancer Res.* 73:6413-6423, 2013
2. 学会発表
 - 1) 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス感染上皮細胞におけるウイルス由来マイクロ RNA による宿主遺伝子発現制御：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
 - 2) 杉本温子、佐藤好隆、神田輝、木村宏、鶴見達也. Replication compartment 内において EBV 初期遺伝子と後期遺伝子の転写産物では異なった分布を示す：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
 - 3) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells : 6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma、トルコ イスタンブール、2013 年 6 月
 - 4) 神田輝、鶴見達也. ウイルス由来マイクロ RNA による上皮細胞特異的因子の発現制御：第 10 回 EB ウイルス研究会、京都市、2013 年 7 月
 - 5) 岡本幸子、天石泰典、池田裕明、藤原弘、葛島清隆、安川正貴、珠玖洋、峰野純一. 高親和性NY-ESO-1特異的TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
 - 6) 朝井洋晶、藤原弘、越智史博、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、北澤莊平、赤塚美樹、珠玖洋、安川正貴. 経静脈的に輸注されたWT1特異的人工CTLは腎系球体たこ足細胞を傷害しない：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
 - 7) 赤塚美樹、赤堀泰、稲熊容子、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、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を認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第17回日本がん

- 免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 8) 越智史博、藤原弘、谷本一史、宮崎幸大、朝井洋晶、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、石井榮一、安川正貴．抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
 - 9) Okamoto S, Iwase N, Amaishi Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J. EFFECTIVE AND SAFE TCR GENE THERAPY WITH SILENCING ENDOGENOUS TCRs AND HIGH AFFINITY TCR VARIANTS: 第19回日本遺伝子治療学会、岡山市、2013年7月
 - 10) 岡村文子、葛島清隆．K-rasの活性化変異に伴うオートファジーによるCTLエピソードの産生：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
 - 11) 赤塚美樹、田地浩史、森島泰雄、宮村耕一、小寺良尚、高橋利忠、木下朝博、葛島清隆、恵美宣彦．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：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
 - 12) 稲熊容子、赤塚美樹、赤堀泰、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、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を認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
 - 13) 藤原弘、越智史博、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、神田輝、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴．抗体療法と細胞療法を組み合わせたハイブリッド型抗腫瘍免疫療法の開発研究：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
 - 14) 藤原弘、越智史博、朝井洋晶、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴．HLAクラスI拘束性白血病抗原特異的CD4陽性T細胞の抗白血病効果：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 15) 越智史博、藤原弘、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、安川正貴．抗体依存性細胞傷害活性を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 16) 柴川伸吾、垣見和宏、磯辺みどり、和田尚、上中明子、葛島清隆、西川博嘉、鶴殿平一郎、岡三喜男、中山睿一．NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T細胞免疫応答の誘導：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 17) 赤塚美樹、岡村文子、山本幸也、西村泰治、高橋利忠、葛島清隆、恵美宣彦．HLA-A2に提示されたマイナー抗原HA-1認識抗体の開発と応用：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 18) 岡本幸子、天石泰典、池田裕明、藤原弘、葛島清隆、安川正貴、珠玖洋、峰野純一．高親和性TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 19) 宮原慶裕、杉野早穂子、王立楠、葛島清隆、藤田知信、河上裕、岡本幸子、天石泰典、峰野純一、珠玖洋．HLA-A0201拘束性NY-ESO-1由来ペプチド (p157-165) 特異的T細胞受容体はHLA-A0206陽性NY-ESO-1陽性腫瘍を認識する：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
 - 20) 神田輝、鶴見達也．Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、

2013年10月

- 21) 藤田貢、中田晋、加藤天美、義江修. COX-2阻害による肺癌脳転移抑制の免疫学的作用機序. 第72回日本癌学会学術集会総会、横浜市、2013年10月
- 22) 葛島清隆. Artificial antigen presenting cells and basic research for advanced immunotherapy : 第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 23) 朝井洋晶、藤原弘、宮崎幸大、越智史博、越智俊元、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、珠玖洋、安川正貴. Preclinical evaluation for renal safety of WT1-targeting adoptive immunotherapy : 第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 24) 越智史博、藤原弘、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖洋、石井榮一、安川正貴. Artificial CD16 positive T cells successfully display in vivo anti-tumor effect through ADCC : 第75回日本血液学会学術総会、

札幌市、2013年10月

- 25) 赤塚美樹、細川晃平、岡本晃直、片桐孝和、稲熊容子、岡村文子、葛島清隆、恵美宣彦、中尾眞二. Isolation of a HLA-B*40:02-restricted CTL to HPCs from a patient with aplastic anemia with 6pLOH : 第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 26) 神田輝、鶴見達也. EBウイルス由来マイクロRNAによる上皮細胞特異的因子の発現制御 : 第61回日本ウイルス学会学術総会、神戸市、2013年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 葛島清隆、伊藤嘉規、出町文子、赤塚美樹、森島泰雄、愛知県、株式会社医学生物学研究所. United States Patent No.US8481051B2: CYTOTOXIC T-CELL EPITOPE PEPTIDES THAT SPECIFICALLY ATTACK EPSTEIN-BARR VIRUS-INFECTED CELLS AND USES THEREOF. 2013年7月9日登録

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

免疫逃避したがん細胞が提示する新規腫瘍抗原の同定

分担研究者 葛島 清隆 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 部長

研究要旨 がん細胞を選択的に認識する細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)の樹立とその標的抗原の同定は細胞性免疫療法の基盤である。本年度は、HLA-A*24:02陽性成人のナイーブCD8⁺T細胞を、HLA-A*24:02を導入したK562細胞（慢性骨髄性白血病細胞株）で刺激し、CTL株を樹立した後に限界希釈法にてCTLクローンD12を得た。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HSP90β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。HSP90β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HSP90β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。

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。我々は以前に、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

導入し人工抗原提示細胞(artificial antigen presenting cells, aAPC)を作製した。今年度は、このaAPCを使用して誘導したCTLクローンD12の認識する抗原について詳しい検討を行った。

B. 研究方法

1) 人工抗原提示細胞 (aAPC) の作製とCTLの誘導:

HLAを表面に全く発現していないK562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。aAPCで2回刺激してT細胞株を樹立した。特異性はエリスポット法とIFN γ キャッチ法にて確認した。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定:

K562細胞のmRNAからcDNAライブラリーを作製した。HLA-A24を導入した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。

3) 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-A24陽性の線維芽細胞や正常ヒト気管支上皮細胞、EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球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。

本研究計画は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:

HLA-A*24:02、CD86及び4-1BBLを導入したK562細胞は長期間にわたりこれらの蛋白を発現していた。HLA-A*24:02拘束性にK562を認識するT細胞株から、限界希釈培養法にてCTLクローンD12を得た。

2) CTLが認識する抗原をコードする遺伝子とエピトープの同定:

CTL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。

3) 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。EBウイルスでトランスフォームしたBリンパ芽球も認識しなかった。他のがん種細胞株への反応性を調べたところ、HLA-A*24:02を導入した大腸がん細胞株OUMS23とPMF-ko14のみを認識した。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。

D. 考察

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。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するとともに、HLA-A*24:02/HSP90 β ペプチド複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、正常組織およびがん組織を免疫染色することで本複合体の分布を検討する予定である。

E. 結論

TAPの欠損または機能不全になった細胞表面のHLA-A*24:02分子によって提示される、HSP90 β に由来するCTLエピトープをcDNA発現クローニング法によって同定した。本エピトープは、免疫逃避した後のがん細胞に選択的に提示されていると推察されるため、将来の新しい免疫療法の標的となり得る可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y,

Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. *Gene Ther.* in press.

2) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7(1):3, 2014.

3) Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirose T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. *Hum Immunol.* 74(9):1103-1110, 2013.

4) Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood.* 121(24):4894-4901, 2013.

5) Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Inoue H, Yasukawa M. Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer

- functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific T-cell receptor. *PLoS One*. 8(2):e56820, 2013
- 6) Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, Kuzushima K, Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Nakayama E.: Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide. *Int J Cancer*. 132(2):345-354. 2013.
2. 学会発表
- 1) 岡本幸子、天石泰典、池田裕明、藤原弘、葛島清隆、安川正貴、珠玖 洋、峰野純一．高親和性NY-ESO-1特異的TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 2) 朝井洋晶、藤原 弘、越智史博、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、北澤莊平、赤塚美樹、珠玖 洋、安川正貴．経静脈的に輸注されたWT1特異的人工CTLは腎系球体たこ足細胞を傷害しない：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 3) 赤塚美樹、赤堀 泰、稲熊容子、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、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を認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 4) 越智史博、藤原 弘、谷本一史、宮崎幸大、朝井洋晶、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、石井榮一、安川正貴．抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第17回日本がん免疫学会総会、宇部市、2013年7月
- 5) Okamoto S, Iwase N, Amaishi Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J. EFFECTIVE AND SAFE TCR GENE THERAPY WITH SILENSING ENDOGENOUS TCRs AND HIGH AFFINITY TCR VARIANTS: 第19回日本遺伝子治療学会、岡山市、2013年7月
- 6) 岡村文子、葛島清隆．K-rasの活性化変異に伴うオートファジーによるCTLエピートープの産生：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 7) 赤塚美樹、田地浩史、森島泰雄、宮村耕一、小寺良尚、高橋利忠、木下朝博、葛島清隆、恵美宣彦．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：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 8) 稲熊容子、赤塚美樹、赤堀 泰、村山裕子、辻川朱里、平松可帆、西村泰治、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を認識する抗体の単離とCAR-Tの機能：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 9) 藤原 弘、越智史博、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、神田輝、葛島清隆、珠玖 洋、安川正貴．抗体療法と細胞療法を組み合わせたハイブリッド型抗腫瘍免疫療法の開発研究：第5回造血器腫瘍免疫研究会、名古屋市、2013年8月
- 10) 藤原 弘、越智 史博、朝井 洋晶、岡本幸子、峰野 純一、葛島 清隆、珠玖 洋、安川 正貴．HLAクラスI拘束性白血病抗原特異的CD4陽性T細胞の抗白血病効果：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 11) 越智 史博、藤原 弘、谷本一史、朝井

- 洋晶、宮崎幸大、岡本 幸子、峰野 純一、葛島 清隆、珠玖 洋、安川 正貴．抗体依存性細胞傷害活性を介した抗腫瘍効果を示す人工CD16陽性T細胞の開発：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 12) 柴川 伸吾、垣見 和宏、磯辺 みどり、和田 尚、上中 明子、葛島 清隆、西川 博嘉、鶴殿 平一郎、岡 三喜男、中山 睿一．NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T細胞免疫応答の誘導：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 13) 赤塚 美樹、岡村 文子、山本 幸也、西村 泰治、高橋 利忠、葛島 清隆、恵美宣彦．HLA-A2に提示されたマイナー抗原HA-1認識抗体の開発と応用：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 14) 岡本 幸子、天石 泰典、池田 裕明、藤原 弘、葛島 清隆、安川 正貴、珠玖 洋、峰野 純一．高親和性TCR発現siTCRベクターを用いた高効率かつ安全性の高いTCR遺伝子治療：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 15) 宮原 慶裕、杉野 早穂子、王 立楠、葛島 清隆、藤田 知信、河上 裕、岡本 幸子、天石 泰典、峰野 純一、珠玖 洋．HLA-A0201拘束性NY-ESO-1由来ペプチド (p157-165) 特異的T細胞受容体はHLA-A0206陽性NY-ESO-1陽性腫瘍を認識する：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013年10月
- 16) 葛島 清隆．Artificial antigen presenting cells and basic research for advanced immunotherapy：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 17) 朝井洋晶、藤原 弘、宮崎幸大、越智史博、越智俊元、峰野純一、岡本幸子、葛島清隆、池田裕明、珠玖 洋、安川正貴．Preclinical evaluation for renal safety of WT1-targeting adoptive immunotherapy：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 18) 越智史博、藤原 弘、谷本一史、朝井洋晶、宮崎幸大、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、石井榮一、安川正貴．Artificial CD16 positive T cells successfully display in vivo anti-tumor effect through ADCC：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- 19) 赤塚美樹、細川晃平、岡本晃直、片桐孝和、稲熊容子、岡村文子、葛島清隆、恵美宣彦、中尾眞二．Isolation of a HLA-B*40:02-restricted CTL to HPCs from a patient with aplastic anemia with 6pLOH：第75回日本血液学会学術総会、札幌市、2013年10月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 葛島清隆、伊藤嘉規、出町文子、赤塚美樹、森島泰雄、愛知県、株式会社医学生物学研究所．United States Patent No.US8481051B2: CYTOTOXIC T-CELL EPITOPE PEPTIDES THAT SPECIFICALLY ATTACK EPSTEIN-BARR VIRUS-INFECTED CELLS AND USES THEREOF. 2013年7月9日登録

マイナー組織適合抗原特異的 CTL の解析と臨床応用

分担研究者 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においては、最近では HLA 半合致移植後の cyclophosphamide などの導入でドナーソースが増え適応患者が増えつつあるが、移植後再発と GVHD は依然として大きな問題である。我々は選択的抗腫瘍効果を誘導す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同定し、移植後再発の予防や治療への応用を検討してきた。能動免疫法は予防で特に有用であるが、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。昨年度は同種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 chimeric antigen receptor (CAR) を導入した T 細胞について初期の検討結果を報告した。本年度はこの 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。

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。最近では HLA 適合ドナーが見つからない場合 HLA 半合致の血縁から移植を行う Post-cyclophosphamide 方法が報告され移植適応患者の増加が期待される。しかし、この HLA 不適合移植後でも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、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、B 細胞性腫瘍に対する CD19/CD20-chimeric antigen receptor (CAR)導

入 T 細胞療法を除き、効果は依然として限定的である。最近では米国に於いて HLA-A2 拘束性 WT-1 ペプチドを認識する T 細胞を用いた養子免疫療法がある程度の効果を挙げつつあり、エフェクター細胞を大量に輸注する治療法は、難度が高いものの有望と思われる。

我々は HLA 以外の同種抗原であるマイナー抗原に着目して、日本人移植患者において重要な役割をもっているものを複数種類新規同定し、報告してきた。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。その中で我々は、選択的 graft-versus-leukemia/lymphoma (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について集中的に検討してきた。昨年度は HA-1H マイナー抗原ペプチド + HLA-A2 複合体を認識する“TCR 様”抗体の樹立、単鎖抗体の性質、これに CD38-CD3 鎖を結合し T 細胞に導入した CAR-T 細胞の細胞傷害機能と問題点を報告した。今年度はさらに、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ので報告する。

B. 研究方法

1) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する単鎖抗体の樹立と異なった親和性を持つ CAR を遺伝子導入した T 細胞との比較：

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-テトラマーは主任研究者の葛島らが作製した。HLA-A2/HA-1H-テトラマーを HLA-A2 遺伝子導入 B6 マウスに 3 回免疫した。1 週間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を複数樹立した。これの単鎖抗体のうち K_D 値が最も低いクローン#131 を直接 PE で標識し、HA-1H, HA-1R を含む HLA-A2 結合性のペプチドを HLA-A2 陽性 TAP 欠損 T2 細胞に添加後、抗 HLA 抗体 (W6/32)・抗 HLA-A2 抗体を用いて表面 HLA-A2 の安定化度を評価した。

引き続き CAR-T 細胞の作製を行った。まずクローン#131 の他、異なった K_D をもつ単鎖抗体 (クローン#4, #9) の cDNA の 3' 末部分に CD28 の細胞膜貫通領域、CD3 鎖の

ITAM ドメインを結合し、「第 2 世代」の CAR のレトロウイルスコンストラクトを作製した。

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 陽性 T 細胞に純化した。これを CD3-CD28 コーティングビーズを用いて刺激し、48, 72 時間後にウイルス上清で 2 回感染、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 日目に必要に応じて CD4、CD8 陽性細胞に分画してから機能解析を行った。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 ^{51}Cr 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、他、HLA-A2 結合性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。

2) 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。

3) 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晩共培養し、上清中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 を測定した。

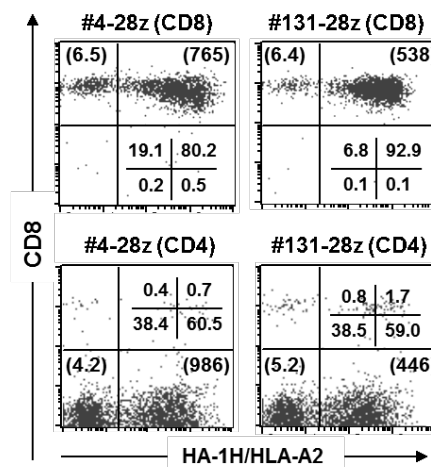
(倫理面への配慮)

本研究で行う HLA 型やマイナー抗原型に関するゲノム解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (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。

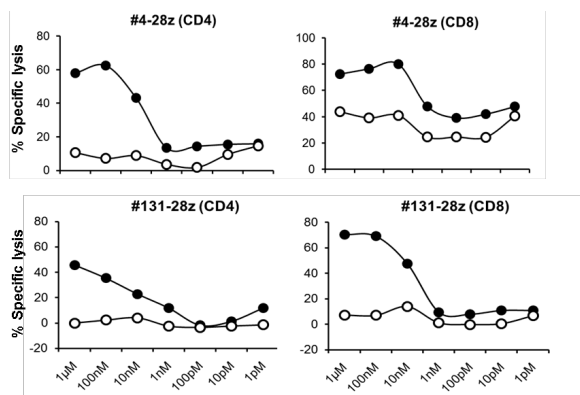
C. 研究結果

1) HLA-A2/HA-1H 複合体を認識する異なった親和性を持つ CAR を遺伝子導入した T 細胞との比較：

昨年度は最も K_D 値の低かった単鎖抗体 (クローン#131) を用いたが、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 細胞を作成して CAR の発現 (下図) と機能を検討した。



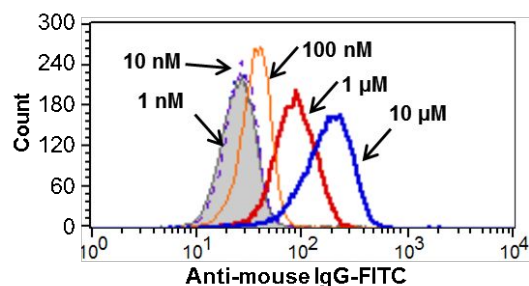
次いで、磁性ビーズを用いて CD4、CD8 に分離後に解析したところ、HLA-A2/HA-1H テトラマーによる染色性は K_D 値の低い #4 の方が若干良好であった。次に HA-1H ペプチドを添加した T2 細胞に対する傷害性を検討した。その結果 CD4 陽性の#4 CAR-T 細胞がより強い傷害性を示したものの、低濃度 HA-1H ペプチドパルスにおける認識性は#131、#4 とともに 1 nM 付近が検出限界であり、差を認めなかった (下図)。



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。

2) 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 に特異的なキラー T 細胞 (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 (上図)。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 (下図)。



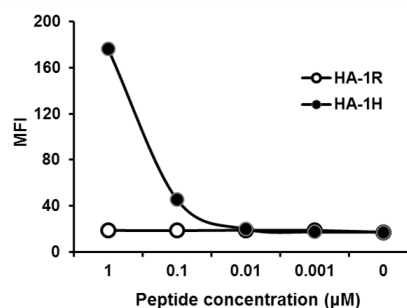
細胞傷害性試験の結果と比較すると、CAR-T とした場合、少なくとも傷害能で検出される感度はフローサイトメトリーの検出下限の 10 倍以上であった。

さらにコントロールピース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 (下表)。

HA-1H concentration on T2 cells (μM)	MFI	ABC	SABC
Irrelevant scFv	24.67	4104	0
1 nM	25.28	4213	109
10 nM	26.26	4388	284
100 nM	35.52	6067	1963
1 μM	84.46	15359	11255
10 μM	176.81	33919	29815

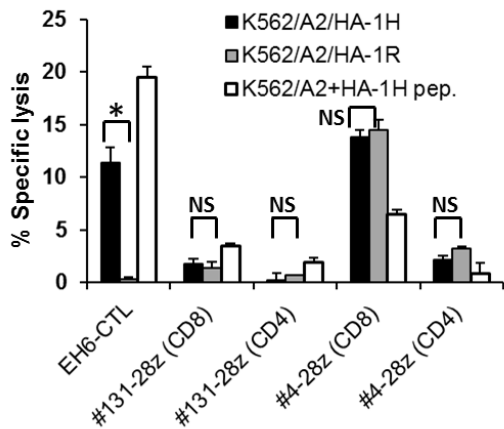
表で SABC が細胞あたりの抗原複合体の分子数を示す。100 nM で約 2000 分子、10 nM で 300 分子前後であった。すなわちフローサイトメトリーの検出下限は 2000 分子と高く、CTL では 300 分子前後であった。

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 100nM 以下となったが、10nM が限界であった (下図)。

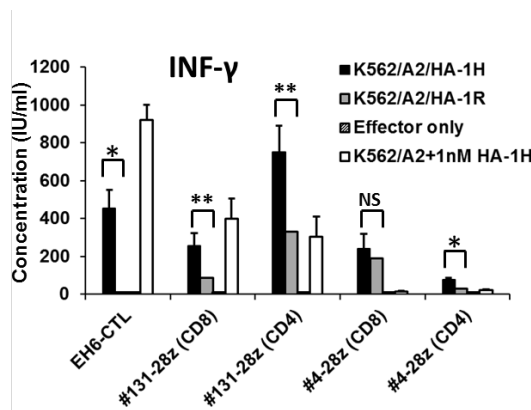


3) CAR-T 細胞のサイトカイン産生パターンの検討:

#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 (下図、ポジティブコントロールは 10nM HA-1H ペプチドをパルスした K562/A2)。



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るが、もう一つの 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。代表的な IFN- γ 産生の結果を示す (下図)。



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)。図には示さないが、#4 scFv CAR-T 細胞は TNF- α および IL-2 産生能では #131 より良好であった。

D. 考察

本年度は K_D 値が高すぎるのが CAR-T とした場合に細胞傷害活性がでない原因なのか、またどの程度の細胞表面抗原量が今回作成した HLA-A*02:01 拘束性 HA-1H を認識する TCR-like 抗体の検出限度か、そして細胞傷害活性に加えサイトカイン産生能について検討を加えた。

K_D 値の検討では、30 倍 K_D 値の弱い (TCR では最大の K_D 値 $10^{-7}M$ に相当) #4 scFv を用いて検討したが、HA-1H 特異的 CTL としてクローニングされた EH6 という CTL のような活性は見られなかった。以上のことより、高すぎる K_D 値のために T 細胞に連続的な刺激が入らないためという仮説は否定的となった。CAR-T は細胞内シグナルドメインは 鎖の ITAM だけであり、また HLA/ペプチド複合体と scFv 結合部分に TCR で形成されるような免疫シナプスが形成されるかも不明であり、今後の検討課題と考えられた。

今回の CAR-T 細胞が細胞傷害性を発揮するには細胞あたり 300 分子程度の抗原が必要と判明した。サイトカイン産生能で評価した場合は更に 1 桁以上低い抗原量で反応が出ていたので、CAR-T 細胞のエフェクター相では抗原量に応じサイトカイン産生 > 細胞傷害活性が発現すると考えられた。フローサイトメトリーで検出される下限でも CAR-T とすることにより細胞傷害活性が出ることより、これまで親和性が低いとして断念していた抗体や、抗原量が少ないとして効果が期待できないと想像された腫瘍でも CAR-T とすることで治療効果が期待できると考えられた。

本研究はモデル抗原として HA-1H を用いたが、これは HLA-A2 トランスジェニック

マウスが入手できたことが主な理由である。今後は日本人の 6 割以上が有する HLA-A24 に拘束される抗原エピートープペプチド複合体を認識する抗体・CAR-T 細胞を開発し、対象を広げる必要があると考えられた。

E. 結論

HLA に結合したマイナー抗原ペプチドを認識する TCR-like 抗体と CAR-T を作製し、その機能、抗体の KD 値や抗原量との関係、エフェクター機能について詳細に解析し、TCR-like 抗体を組み込んだ CAR-T が HLA/ペプチド複合体を認識することを示した。今後は実際の抗腫瘍効果や off-target 効果の有無を検討し、トランスレーションが可能かを見極める必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inaguma Y, Akahori Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y, Yamamoto N, Yasuharu Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N, Akatsuka Y. Construction and molecular characterization of a T-cell receptor-like antibody and CAR-T cells specific for minor histocompatibility antigen HA-1H. Gene Ther. 2014 (In press).
- 2) Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirokawa T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, Akatsuka Y, Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, Kuzushima K. An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules. Hum Immunol. 74:1103-10, 2013. (PMID: 23806269)

- 3) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. J Hematol Oncol. 7:3. 2014. (PMID: 24393438)

2. 学会発表

- 1) 赤塚美樹, 赤堀泰, 稲熊容子, 村山裕子, 辻川朱里, 平松可帆, 西村泰治, 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 を認識する抗体の単離と CAR-T の機能. 第 17 回日本がん免疫学会総会. 宇部, 2013 年 7 月 5 日. (口演 OS6-1) プログラム・抄録集 pp117.
- 2) 稲熊容子, 赤塚美樹, 赤堀泰, 村山裕子, 辻川朱里, 平松可帆, 西村泰治, 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 を認識する抗体の単離と CAR-T の機能 (口演 S3-4). 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会, 名古屋. 2013 年 8 月 24 日. 造血器腫瘍免疫療法研究会総会プログラム・抄録集 pp76.
- 3) Akatsuka A, Demachi-Okamura A, Yamamoto Y, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and molecular characterization of a single chain antibody specific for HA-1 minor H antigen. (ポスター P-1247). 第 72 回日本癌学会総会, 横浜. 2013 年 10 月 3 日. 日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp119.
- 4) Inaguma Y, Akahori Y, Akatsuka Y, Murayama Y, Shiraishi K, Tsuzuki-Iba S, Endoh A, Tsujikawa J, Demachi-Okamura A, Hiramatsu K, Saji H, Yamamoto Y,

Yamamoto N, Nishimura Y, Takahashi T, Kuzushima K, Emi N. Construction and Molecular Characterization Of a T-Cell Receptor-Like Antibody and CAR-T Cells Specific For Minor Histocompatibility Antigen HA-1H. The 55th ASH Annual

Meeting, New Orleans, 米国. 2013 年 12 月 9 日 . (Poster, Abstract 4490). 抄録集 Blood 2013;122:

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

分担研究者 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ウイルスを用いて任意のがん抗原を発現するLCLを樹立できること、また樹立したLCLにおいて実際にはがん抗原WT1が抗原提示されることを示した。さらに広くLCLの樹立に使われている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)クローンをを用いることで、より効率良く組換えEBウイルス産生細胞を樹立可能であることを明らかにした。本年度は、修復した12キロベース領域に存在するウイルス由来マイクロRNA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。その結果、ウイルスマイクロRNAのターゲット遺伝子の候補として、上皮細胞特異的に発現する細胞性因子を同定した。この因子はWntシグナル経路の抑制因子であることから、ウイルスマイクロRNAが細胞のシグナル伝達経路の抑制を解除することが、効率の良いウイルス産生に寄与する可能性が示唆された。

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ある。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)は抗原提示細胞として機能する。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)クローンをを用いて実験系を改良し(Kanda et al, PLoS One, 6, e27758,

2011)、この系を用いてがん抗原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)。

組換えウイルス産生細胞の樹立は、EBウイルスゲノムDNAのBACクローンをHEK293細胞に導入し、薬剤耐性クローンを取得することで行う。前年度の研究により、広くLCLの樹立に使われている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)クローンをを用いることで、より効率良く組換えEBウイルス産生細胞を樹立できることが示された。そこで本年度は、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。

B. 研究方法

1) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析：

プロトタイプウイルスとして汎用されているB95-8株EBウイルスは、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「BART欠損ウイルス」である。この領域をAkata株ゲノム断片で修復した「BART修復ウイルス」を作製した。「BART欠損ウイルス」および「BART修復ウイルス」のBACクローンDNAをHEK293細胞へ導入してウイルス産生細胞を樹立し、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変化をマイクロアレイ法により調べた。

2) 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。

C. 研究結果

1) ウイルスマイクロRNA発現の有無による細胞性遺伝子発現変化の網羅的解析：

「BART修復ウイルス」を導入したHEK293細胞において、修復した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。

2) 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. 考察

「BART修復ウイルス」を産生するHEK293細胞においては、一連のBART miRNA群が発現することで、宿主遺伝子の発現変化が生じることが判明した。興味深いことにBART miRNAのターゲット遺伝子候補として同定されたWnt抑制因子は、上皮細胞で特異的に高発現する因子であった。すなわちBART miRNAは、上皮細胞の一種であるHEK293細胞においてWnt抑制因子によるシグナル経路抑制を解除し、結果的にWnt経路が活性化されることが明らかになった。こうしたシグナル伝達経路の活性化が、効率の良い組換えウイルス産生に貢献する可能性が示された。上皮細胞におけるWntシグナル経路の活性化は、発がん過程においても重要であると考えられており、ウイルスマイクロRNAによる発がん促進という観点からも注目される。

E. 結論

組換えEBウイルス産生細胞の樹立過程において、細胞性遺伝子発現がウイルスのコードするマイクロRNAによる制御を受ける可能性が示された。組換えEBウイルスを用いて樹立できるLCLは、各種免疫学的解析において非常に有用な研究ツールであり、本研究成果はこうした実験系のさらなる改良に資するものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda T, Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, and Tsurumi T: Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. *J Biol Chem.* 288(33), 24189-24199, 2013.
- 2) Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, and Tsurumi T: Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol.* 87(12), 6693-6699, 2013.
- 3) 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.
- 4) Murata T, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, Kanda T, and Tsurumi T: Contribution of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency. *J Virol.* 87(18), 10148-10162, 2013.
- 5) 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, 2013.

- 6) 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. 学会発表

- 1) 神田輝、鶴見達也. EB ウイルス感染上皮細胞におけるウイルス由来マイクロ RNA による宿主遺伝子発現制御：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
- 2) 杉本温子、佐藤好隆、神田輝、木村宏、鶴見達也. Replication compartment 内において EBV 初期遺伝子と後期遺伝子の転写産物では異なった分布を示す：第 28 回ヘルペスウイルス研究会、淡路市、2013 年 5 月
- 3) 神田輝、村田貴之、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells：6th International Symposium on Nasopharyngeal Carcinoma、トルコ イスタンブール、2013 年 6 月
- 4) 神田輝、鶴見達也. ウイルス由来マイクロ RNA による上皮細胞特異的因子の発現制御：第 10 回 EB ウイルス研究会、京都市、2013 年 7 月
- 5) 神田輝、鶴見達也. Roles of BART microRNAs in EBV-infected epithelial cells：第72回日本癌学会学術総会、横浜市、2013 年10月
- 6) 神田輝、鶴見達也. EBウイルス由来マイクロRNAによる上皮細胞特異的因子の発現制御：第61回日本ウイルス学会学術総会、神戸市、2013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次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 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 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。

A. 研究目的

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 (Steeg 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

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 (1×10^5 /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 (1×10^6 /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。

C. 研究結果

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

マウス実験モデルにより、転移性脳腫瘍の発症初期に MDSC が組織内に集積し、腫瘍に有利な微小環境を形成していると考えられた。また肺がん脳転移症例から得られた MDSC 解析により、共刺激分子 CD276 が MDSC の免疫抑制機能に関わっていることが示唆された。

E. 結論

肺がん転移性脳腫瘍発症では MDSC 増加および腫瘍床への集積がおり、転移性腫瘍生着に有利な微小環境を形成している。転移性脳腫瘍発症制御のためには、従来の抗癌剤治療に加え、MDSC 除去を目的とした新規治療法の可能性が示唆され、その MDSC 特異的標的分子として CD276 が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda T, Fujita M, Yoshioka T, Tasaki T, Kato A. Novel surgical technique to solidify cyst-type metastatic brain tumors using autologous fibrin glue for complete resection. *Surg Neurol Intl.* in press.
- 2) Okuda T, Hayashi H, Fujita M, Yoshioka H, Tasaki T, Nakagawa K, Kato A. Administration of gefitinib via nasogastric tube effectively improved the performance status of a patient with lung adenocarcinoma-derived meningeal carcinomatosis. *Intl Canc Conf J.* DOI

10.1007/s13691-013-0148-0, 2014.

- 3) Okuda T, Yamashita J, Fujita M, Yoshioka H, Tasaki T, Kato A. Chicken egg and skull model of endoscopic endonasal transsphenoidal surgery improves trainees drilling skills. *Acta Neurochir.* DOI 10.1007/s00701-014-2035-7, 2014.
- 4) Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor-alpha. *Cancer Res.* 73:6413-6423, 2013.

2. 学会発表

- 1) 藤田 貢、中田 晋、加藤天美、義江修. COX-2阻害による肺癌脳転移抑制の免疫学的作用機序. 第 72 回日本癌学会学術集会総会、横浜市、2013年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, <u>Akatsuka Y</u> , Okamoto S, Mineno J, <u>Kuzushima K</u> , Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M.	Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury.	<i>J Hematol Oncol.</i>	7(1)	3	2014
Kondo S, Demachi-Okamura A, Hirosawa T, Maki H, Fujita M, Uemura Y, <u>Akatsuka Y</u> , Yamamoto E, Shibata K, Ino K, Kikkawa F, <u>Kuzushima K</u> .	An HLA-modified ovarian cancer cell line induced CTL responses specific to an epitope derived from claudin-1 presented by HLA-A*24:02 molecules.	<i>Hum Immunol.</i>	74(9)	1103-1110	2013
Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, <u>Kuzushima K</u> , Shiku H, Yasukawa M.	Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia.	<i>Blood</i>	121(24)	4894-4901	2013
Asai H, Fujiwara H, An J, Ochi T, Miyazaki Y, Nagai K, Okamoto S, Mineno J, <u>Kuzushima K</u> , Shiku H, Inoue H, Yasukawa M.	Co-introduced functional CCR2 potentiates in vivo anti-lung cancer functionality mediated by T cells double gene-modified to express WT1-specific T-cell receptor.	<i>PLoS One</i>	8(2)	e56820	2013
Eikawa S, Kakimi K, Isobe M, <u>Kuzushima K</u> , Luescher I, Ohue Y, Ikeuchi K, Uenaka A, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Nakayama E.	Induction of CD8 T-cell responses restricted to multiple HLA class I alleles in a cancer patient by immunization with a 20-mer NY-ESO-1f (NY-ESO-1 91-110) peptide.	<i>Int J Cancer</i>	132(2)	345-354	2013
<u>Kanda T</u> , Horikoshi N, Murata T, Kawashima D, Sugimoto A, Narita Y, Kurumizaka H, and Tsurumi T.	Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance.	<i>J Biol Chem.</i>	288(33)	24189-24199	2013
Sugimoto A, Sato Y, <u>Kanda T</u> , Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, and Tsurumi T.	Different distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments.	<i>J Virol.</i>	87(12)	6693-6699	2013
Murata T, Narita Y, Sugimoto A, Kawashima D, <u>Kanda T</u> , and Tsurumi T.	Contribution of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) family transcription factors to BZLF1 expression in Epstein-Barr virus reactivation from latency.	<i>J Virol.</i>	87(18)	10148-10162	2013
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	2013
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 BRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90.	<i>J Virol.</i>	87(11)	6482-6491	2013
Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, <u>Fujita M</u> , Ohlfest JR, Okada H.	GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor-alpha.	<i>Cancer Res.</i>	73(21)	6413-6423	2013