

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591121
 研究課題名（和文） T細胞悪性リンパ腫に対するガンワクチンを併用した同種造血幹細胞移植療法の研究
 研究課題名（英文） Development of immune-cell therapy for human T cell lymphoma: Cancer vaccine in combination with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.
 研究代表者
 藤原 弘(FUJIWARA HIROSHI)
 愛媛大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：20398291

研究成果の概要：治療抵抗性である成人 T 細胞性白血病（ATL）を含む末梢性 T 細胞性悪性リンパ腫（PTCL）の治療成績の向上を目指して、抗腫瘍性細胞傷害性 T リンパ球（CTL）を利用する細胞免疫療法の開発研究を行った。臨床では同種免疫を利用して抗腫瘍免疫能を強化した HLA 抗原不適合ドナーからの同種造血幹細胞移植の有効性を示した。基礎研究では造血幹細胞移植と併用して抗腫瘍免疫を強化するガンワクチン開発を目指して腫瘍抗原の同定を行った。さらに、ATL の原因ウイルス HTLV-1 関連蛋白（Tax と HBZ）特異的 CTL の検討を行い、標的特異的 CTL の抗腫瘍活性低下機序の幾つかを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：腫瘍免疫、造血器悪性腫瘍、T 細胞性悪性リンパ腫、成人 T 細胞白血病（ATL）、細胞傷害性 T リンパ球、がんワクチン、造血幹細胞移植術

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病（ATL）を含む末梢性 T 細胞性悪性リンパ腫（PTCL）は、抗がん剤治療抵抗性で予後不良である。同種造血幹細胞移植術（allo-HSCT）の有効性は示唆されるものの、通常の allo-HSCT は強い有害作用の為に、高齢者に多いこれら疾患には適応出来ない場合が多く、一方で有害作用を避ける為に前処置強度を下げた骨髄非破壊的前処置を用いた移植（RIST）は、高齢者にも適応可能であるが再発率が非常に高い。そこで RIST 後に患者の抗腫瘍性 T リンパ球（CTL）

を主とした細胞性免疫能を高めることが出来れば、新たな治療戦略として PTCL 患者の生存期間の延長を図ることが期待出来る。しかし、現時点で、実地臨床に応用できる腫瘍抗原は、同定されていない。

2. 研究の目的

①ATL を主とした治療抵抗性成人 PTCL に対する RIST の抗腫瘍免疫作用増強の一つとして、ドナーリンパ球輸注（DLI）を前提とした同種抗原を標的とする HLA 不適合ドナーからの造血幹細胞の効果を検討すること。

②HLA 一致ドナー及び自己造血幹細胞移植を前提とした際の CTL 誘導性癌ワクチンとなる CTL の標的抗原分子の検索を行なうこと。その際 ATL の原因ウイルスである HTLV-1 ウイルス関連蛋白と造血器悪性腫瘍関連抗原としての標的抗原の検索と検討を行なうこと。これらを目的とした。

3. 研究の方法

①同種抗原を標的とした RIST の抗腫瘍免疫増強法としての HLA 不適合移植：臨床試験として治療抵抗性 ATL を含む PTCL 患者に対して HLA 不適合血縁ドナーからの RIST を行い、臨床的指標による抗腫瘍効果と抗腫瘍免疫活性モニタリングを行ない、それら指標の相関を検討した。臨床効果：生着率、100 日生存率、無病生存率、再発率、腫瘍量モニター（血清 LDH、血清可溶性 IL-2 レセプター値、末梢血 HTLV-1 provirus 量）、免疫モニタリング：移植片対宿主反応（血清可溶性 IL-2 レセプター値、臨床所見、病理所見）、抗腫瘍免疫モニタリング（リンパ球分類、NK 活性、HTLV-1 Tax 特異的 tetramer アッセイ）、感染免疫モニタリング（日和見感染病原体サイトメガロウイルス再活性化）、これらを経時的に測定して、生存率、再発率との相関を検討した。

②腫瘍関連抗原の同定とその評価

(1)ATL に対する HTLV-1 関連抗原：

(a)Tax 蛋白特異的 CTL の検討：抗癌剤治療及び造血幹細胞移植前後の ATL 患者、さらに無症候性 HTLV-1 キャリア由来の末梢血単核球 (PBMC) 中の HLA-A*0201 または HLA-A*2402 特異的 Epitope を含むテトラマーによる CTL を検討した。さらに、その CTL 機能低下 (Exhaustion) を CTL 機能抑制性受容体 PD-1 (Programmed death-1) 発現と細胞傷害性脱顆粒試験 (CD107a アッセイ) で検討した。

(b)HBZ (HTLV-1 bZIP factor) 蛋白の抗 ATL 腫瘍抗原としての有用性の検討：Reversed Immunology 法 (項目(2)に詳述。)を用いて HBZ 蛋白由来の日本人に多い HLA-A*0201 及び HLA-A*2402 拘束性 CTL 誘導活性を持つ 9 アミノ酸 (9mer) エピトープを同定し、その CTL を誘導して抗 ATL 腫瘍活性を細胞株と臨床検体を用いて検討した。CTL 機能は ⁵¹Cr 放出試験、flow-based の細胞内 cytokine assay (Interferon-g など)、CD107a assay を用いて検討した。また、HBZ エピトープを同定後、そのエピトープと HLA 分子を含むテトラマーを作成し、HTLV-1 キャリア、治療前 ATL 患者、RIST 後 ATL 患者 (HTLV-1 陰性 HLA 一致血縁ドナー由来) 検体を用いて検討した。

(2)新たな造血器悪性腫瘍関連抗原の同定：

ATL 患者細胞の 30-40%に過剰発現が指摘されている Aurora-A kinase 蛋白及び、固形癌及び白血病で抗原活性が指摘されている CML66 蛋白の造血器悪性腫瘍関連抗原活性を Reversed Immunology 法を用いて同様に検討した。具体的には、腫瘍抗原となり得る可能性のあるタンパク質のアミノ酸配列から、日本人に頻度の高い HLA-A*2402、HLA-A*0201 分子に高親和性を持って結合できる可能性のある 9 アミノ酸ペプチド抗原 (9mer エピトープ) を website で公開されている予測プログラムを用いて選定し合成した後、HLA 安定化試験を用いて、各 HLA に対する結合程度を確認する。次に標的 9mer ペプチドを添加した自己成熟樹状細胞を CD8 陽性 T リンパ球と複数のサイトカイン存在下に共培養して標的特異的 CTL を樹立する。樹立した CTL の患者細胞や細胞株など造血器腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を ⁵¹Cr 放出試験を中心に機能解析する。CTL の標的である造血器腫瘍細胞の標的抗原 mRNA を定量的リアルタイム PCR 法を用いて、蛋白量を Western blotting 法で検討する。患者末梢血中に標的特異的 CTL が存在するか否かを Tetramer assay や Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT 法) を用いて検討する。

4. 研究成果

①HLA 不適合ドナーを用いることで同種免疫を標的に抗腫瘍免疫能を増強した RIST の治療抵抗性 ATL 及び PTCL に対する有効性の検討

50 歳以上の高齢者非寛解期治療抵抗性 ATL 患者 7 例と PTCL 患者 1 例に HLA 不適合血縁ドナー (全例成人した子供) から骨髄非破壊的前処置で同種造血幹細胞移植 (RIST) を行った。全例ドナー幹細胞は 14 日以内に迅速に生着し、1 例の Grade IV (皮膚) GVHD を除き、全例軽度の急性 GVHD に留まり、全例良好にコントロール出来た結果、全例が移植後 100 日以上生存した。化学療法単独では予後数ヶ月以内と予測された症例が登録されたが、移植後 6 ヶ月以内の死亡は 2 例 (25%) に留まり 4 例が 1 年以上の長期生存を得た。長期生存例中 3 例は再発したがドナーリンパ球輸注 (DLI) を行い再寛解導入に成功した。以上から、同種免疫を標的とした抗腫瘍免疫を強化した HLA 不適合ドナーからの RIST は、化学療法抵抗性 ATL を含む PTCL 患者に生存期間の延長をもたらした。ATL 症例に関する検討を発表論文⑥に掲載した。サブ解析した症例報告等を学会発表し、現在論文投稿中である。

②(1)ATL の腫瘍関連抗原の検討

(a)HTLV-1 Tax 特異的 CTL の検討

ATLの原因ウイルス HTLV-1 関連抗原は、ヒトにとっては外来抗原であり、かつ腫瘍特異的であることから、腫瘍特異的抗原として期待される。しかし、HTLV-1 陰性ドナーから同種移植を受けた ATL 患者 11 例の検討では、4 例に移植後誘導された Tax 特異的 CTL が検出されたが、何れも PD-1 陽性の疲弊した状態であったり、抗患者 ATL 細胞傷害活性を有していなかった (学会発表、論文投稿中)。唯一抗 HTLV-1 感染細胞活性を示唆したのは HTLV-1 キャリアで急性白血病 (非 ATL) 症例で、ATL とは無関係に背景の HTLV-1 感染細胞に対して誘導された (論文投稿中)。無症候性 HTLV-1 キャリアと治療前 ATL 患者に於ける Tax 特異的 CTL の疲弊による機能低下の有無を 27 例の無症候性 HTLV-1 キャリアと 27 例の ATL 患者 PBMC を用いて 18 例の健常者を対照として検討した。結果 HTLV-1 キャリアと ATL 患者において PD-1 陽性 Tax 特異的テトラマー陽性 CD8 陽性 T リンパ球は、健常者に比較して著しく高頻度であった。さらに、ATL 患者の 21.7% で PD-1 のリガンドである PD-L1 を検出した。一方で HTLV-1 キャリアの CD4+CD25+細胞では PD-L1 の発現は認めなかった。PD-1 陽性 Tax 特異的 CTL の HTLV-1 応答性は抗 PD-L1 抗体で改善した。以上から、ATL 患者体内では HTLV-1 Tax 特異的 CTL は、既に疲弊し抗 HTLV-1 活性が低下していることを示した (発表論文②)。

(b) HBZ (HTLV-1 bZIP factor) 特異的 CTL の検討

ATL の発症原因として近年 HTLV-1 bZIP factor (HBZ) が注目されているが、その腫瘍抗原活性は全く解析されていない。そこで HBZ 由来の CTL 誘導活性を持つ抗原エピートープの同定を試みた。結果、新規 HLA-A*0201 拘束性抗原エピートープ HBZ₂₆₋₃₄; GLLSLEEEL を同定した。このエピートープに対する T 細胞受容体遺伝子 V β 10-3*01 / D1*01/J1-5*01 を持つ CTL クローン (HBZ-1) を樹立した。この HBZ-1 を用いた検討で、HBZ cDNA を遺伝子導入した K562-A*0201 細胞及び CIR-A*0201 細胞を傷害し、HBZ は CTL の標的抗原として機能することを確認した。しかし、この HBZ-1 細胞は HTLV-1 感染 CD4+細胞や ATL 患者細胞、HTLV-1 キャリアの CD4+細胞を傷害しなかった。その原因として ATL 細胞や HTLV-1 感染 CD4+細胞では、HBZ mRNA 発現量 (定量的リアルタイム PCR 法) とかい離して HBZ 蛋白発現量が著しく低く (Western blotting 法)、これらの細胞の HBZ 特異的 CTL 感受性を低下させていることを明らかにした。さらに HTLV-1 感染自体が感染 CD4+細胞に HBZ 特異的 CTL への抵抗性を付与していた。これら 2 つの機序により、HBZ は ATL 関連腫瘍抗原としては、不相当であ

った。言い換えると、HTLV-1 は HBZ 蛋白発現量を何らかの翻訳後修飾の機序を用いて減弱させることにより、ATL 発がんに必要なこの分子が CTL の標的になることから回避させる免疫回避機構を持っていることを示唆していることを明らかにした (学会発表、論文投稿中)。以上の一連の検討は、ATL に対する免疫療法を考える時、HTLV-1 関連抗原の Tax や HBZ は、その標的として適切ではない可能性を示した。そこで、ATL や PTCL にも応用可能な新規造血器悪性腫瘍関連抗原の同定を目的に検索を行った。

(2) 新規造血器悪性腫瘍関連抗原の同定

(a) Aurora-A kinase (Aur-A)

セリン・スレオニンキナーゼファミリーの一つで、細胞の有糸分裂に際して染色体の正常分離を維持する酵素である。その機能異常は細胞のがん化を誘導する。一方で、正常細胞では精巣細胞に限局して、さらに様々な癌細胞での過剰発現が知られてる、いわゆる“がん精巣抗原”の一つと考えられる。約 30% の ATL 症例で、その過剰発現が指摘されている。我々は Aur-A 由来の HLA-A*0201 拘束性 9 アミノ酸抗原ペプチド Aur-A207-215 : YLILEIAPL を同定した。このエピートープ特異的な CTL (AUR-1) を樹立し、抗白血病活性を検討した。その結果、AUR-1 は HLA-A*0201 拘束性に Aur-A を過剰発現する白血病細胞株を傷害した。Aur-A 発現の検討は mRNA を定量的リアルタイム PCR 法で、蛋白発現を Western blotting 法を用いて検討した。さらに、患者急性リンパ性・骨髄性白血病細胞、特に慢性骨髄性白血病細胞で Aur-A mRNA が過剰発現されていた。これら患者白血病細胞に対して、AUR-1 は HLA-A*0201 拘束性に細胞傷害活性を示した。加えて慢性骨髄性白血病をモデルとして、白血病性幹細胞における Aur-A mRNA の過剰発現と AUR-1 による細胞傷害を示し、Aur-A が白血病性幹細胞を標的とした細胞免疫療法の標的抗原となる可能性を示した。最後に Aur-A207-215 : YLILEIAPL と HLA-A*0201 分子からなるテトラマーを作成し、寛解期白血病細胞患者末梢血中にテトラマー陽性細胞 (Aurora-A kinase 特異的 CTL) が存在することを示し、患者体内でも白血病関連抗原として機能していることを示した。さらにこのテトラマー陽性細胞がエピートープ特異的反応性を示すことを ELISPOT アッセイを用いて示した (学会発表、および発表論文③)

(b) CML66 (NUDCD1)

2001 年 Yong 等によって造血幹細胞移植後再発した慢性骨髄性白血病患者で DLI で再度寛解を得た症例から SEREX 法を用いて同定された分子量 66Kd の蛋白質である

CML66 (NUDCD1)は、その後の検討で広汎な癌細胞に発現すること、および癌細胞の腫瘍性形質の維持に重要な分子であることが明らかにされた。これらの所見は、CML66が有望な造血器腫瘍関連抗原となり得る可能性を示唆している。そこで、Reversed Immunology 法を用いて、CML66由来のCTL誘導活性のある9mer エピトープの同定を試みた。結果 CML66由来のHLA-A*2402拘束性の2つの抗原エピトープ CML66 70-78:WYQDSVYYI及びCML66 76-84: YYIDTLGRIを同定し、各エピトープ特異的CTLを樹立した。これらCTLは、各々異なるCML66 mRNA発現量を過剰発現したヒト骨髄性白血病細胞株をHLA-A*2402拘束性に傷害した。患者白血病細胞でのCML66 mRNA発現量も同様に定量的リアルタイムPCR法を用いて検討したところ、急性骨髄性・リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病進行病期及び慢性骨髄性白血病性前駆細胞(CD34+細胞)に過剰発現が認められた。さらに、これら2つのエピトープに対して特異的反応性にInterferon- γ を産生するCTLを、白血病患者末梢血PBMC中に検出し、CML66が、実際の白血病患者体内で抗原性を発揮し、細胞免疫療法の標的抗原になり得る可能性を示した。(学会発表、発表論文①と④)

以上、この研究期間中にATLを含む治療抵抗性PTCL患者へのがんワクチンを含む抗腫瘍免疫能強化を併用した同種造血幹細胞移植療法の開発に関して、腫瘍免疫増強の臨床的有効性を明らかにし、次いで、ATLにおけるHTLV-1関連抗原特異的CTLの機能障害機序の幾つかを明らかにし、加えて、がんワクチン候補となる可能性の高い、2つの新規造血器腫瘍関連抗原の同定を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Azuma T, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Identification of a novel epitope derived from CML66 which is recognized by anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes. *British Journal of Haematology*, in press. 査読有

②Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White I, Akimoto M, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Tei C,

Arima N. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. 2009, *Leukemia*, 23:375-382. 査読有

③Ochi T, Fujiwara H, Suemori K, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Kuzushima K, Yasukawa M. Aurora-A kinase: a novel target of cellular immunotherapy for leukemia. 2009, *Blood* 113:66-74. 査読有

④Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Azuma T, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Hasegawa H, Yasukawa M. Identification of an epitope derived from CML66, a novel tumor-associated antigen expressed broadly in human leukemia, recognized by human leukocyte antigen-A*2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. 2008, *Cancer Science* 99:1414-9. 査読有

⑤Fujiwara H, Ozaki A, Yoshimitsu M, Hamada H, Masamoto I, Matsushita K, Yasukawa M, Tei C. Allogeneic stem cell transplantation for refractory adult T-cell leukemia using a non-T-cell-depleted HLA-incompatible family donor graft, with reference to the grown-up child donor to parent recipient setting: report of a pilot study. 2008, *International Journal of Hematology* 87:319-326. 査読有

[学会発表] (計12件)

①Aurora A kinase: a novel target of immunotherapy against human leukemia. Hiroshi Fujiwara, Toshiki Ochi, Taichi Azuma, Kiyotaka Kuzushima, Masaki Yasukawa. 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow

Transplantation. 2009, March30 Goeteborg, Sweden.

②抗ATL腫瘍免疫抗原としてのHBZの検討。小川泰司、藤原 弘、末盛浩一郎、東 太地、松岡雅雄、松元 正、安川正貴 第31回日本造血細胞移植学会総会 2009年2月5日札幌

③Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for human leukemia. Toshiki Ochi, Hiroshi Fujiwara, Koichiro Suemori, Taichi Azuma, Kiyotaka Kuzuhima, Masaki Yasukawa. 50th Annual Meeting of American Society of Hematology. 2008,December 6-9, San Francisco, California, USA.

④HBZ 特異的細胞傷害性 T 細胞クローンの樹立と機能解析。安川正貴、末盛浩一郎、藤原 弘、松岡雅雄 第56回日本ウイルス学会総会 2008年10月28日 岡山

⑤細胞傷害活性を持った新しいCD3+CD8+腫瘍性 T 細胞株 (SF-1) の樹立 藤原 弘、末盛浩一郎、東 太地、新家敏之、安川 正貴 第70回日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都

⑥腫瘍関連抗原 CML66 の臨床的有用性 末盛浩一郎、藤原 弘、越智俊元、東 太地、成見 弘、安川正貴 第70回 日本血液学会総会 2008年10月10-12日 京都

⑦CTL exhaustion in persistent HTLV-1 infection and ATLL is restored through PD-1/PD-L1 pathway. Tomohiro Kozako, Makoto Yoshimitsu, Hiroshi Fujiwara, Izumi Masamoto, Sawako Horai, Masaki Akimoto, Yukio Suruga, Hideaki Kawada, Heiichiro Hamada, Noriko Aoki, Sinsuke Suzuki, Kakushi Matsushita, Kimiharu Uozumi, Chuwa Tei, Naomichi Arima. 49th Annual meeting of American Society of

Hematology 2007,December 8-11,Atlanta, Georgia, USA

⑧Aurora-A kinase: A novel target for the immunotherapy against human leukemias. Toshiki Ochi, Hiroshi Fujiwara, Koichiro Suemori, Taichi Azuma, Kiyotaka Kuzushima, Masaki Yasukawa. 49th Annual meeting of American Society of Hematology 2007, December 8-11,Atlanta, Georgia, USA

⑨Cytotoxic T-lymphocyte harnessing CML66 can kill human myeloid leukemia cells, in vitro. Koichiro Suemori, Hiroshi Fujiwara, Toshiki Ochi, Masaki Yasukawa. 49th Annual meeting of American Society of Hematology 2007,December8-11,Atlanta, Georgia, USA

⑩パーフォリン/グランザイム B を介した細胞傷害活性を示す新たな CD8 陽性 T 細胞株の樹立。 末盛浩一郎、藤原 弘、越智俊元、東 太地、安川正貴。第67回日本癌学会学術総会 2007年10月28-30日 名古屋

⑪HTLV-1 陽性 donor 由来の HTLV-1Tax 特異的 CTL は、移植後早期の移植片対 ATL 効果に必ずしも寄与しない。藤原 弘、尾崎厚夫、吉満誠、小迫知弘、濱田平一郎、政元いずみ、安川正貴、鄭忠和 第69回日本血液学会総会 2007年10月10-12日 横浜

⑫成人 T 細胞白血病リンパ腫における PD-1/PD-L1 経路の関与の検討。吉満 誠、小迫知弘、藤原 弘、政元いずみ、鈴木伸介、松下格司、魚住公治、鄭 忠和、有馬直道 第69回日本血液学会総会 2007年10月10-12日 横浜

〔図書〕（計1件）

1. Fujiwara H., Yasukawa M, Nova Publishers, **Oncogene Proteins: Structure, Functions and Analyses.**
Edited by Peter B Murphy and Jason R. Clarke, 2008, Chapter 2, Oncogene proteins: Targets for cancer immuno-cell therapy. pp55-85.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：CML66 抗原によるがんワクチンの製造

発明者：安川正貴、藤原 弘、末盛浩一郎

権利者：愛媛大学

種類：特許権

番号：特願 2007-179843

出願年月日：2007年7月9日

国内外の別：国内

2. 名称：HLA-A2 拘束性抗原ペプチドおよびその用途（Aurora-A ペプチド）

発明者：安川正貴、藤原 弘、越智俊元

権利者：愛媛大学

種類：特許権

番号：特願 2007-139441

出願年月日：2007年5月25日

国内外の別：国内

〔その他〕

愛媛大学大学院生体統御内科学分野ホームページ

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.med1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 弘 (FUJIWARA HIROSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20398291

(2) 研究分担者：なし。

(3) 連携研究者：なし。