

平成22年 5月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016089

研究課題名（和文） マイナー抗原を標的とした免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of immunotherapy targeting minor antigens

研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA YOSHIKI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：70333391

研究成果の概要（和文）：本研究では造血器腫瘍に対する同種骨髄移植後の抗腫瘍免疫の主要な標的であるマイナー抗原を同定し、移植後の再発の予防ワクチンや治療標的としての応用を目指した。移植患者から樹立したCTLクローンをを用い、CTSH, HMSD, HMHA1, BCL2A1, SLC1A5, UGT2B17, P2RX7, DPT1 遺伝子産物上の多型部位に8種類の新規マイナー抗原を同定した。抗原の迅速な同定のため、プールDNAの全ゲノム解析法、HapMapゲノムデータを用いた相関解析法を新規に開発した。

研究成果の概要（英文）：We have identified novel minor histocompatibility antigen (mHAg) epitopes that could serve as good targets for immunotherapy against recurrent malignancies following allogeneic blood and marrow transplantation. Using CTL clones isolated from recipient peripheral blood post-transplant, eight novel mHAgs encoded by CTSH, HMSD, HMHA1, BCL2A1, SLC1A5, UGT2B17, P2RX7, DPT1 have been determined. We have shown for the first time that both a whole genome analysis against the DNA pools and also an association study using the International HapMap genomic database are powerful methods that can quickly identify mHAgs of interest.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	11,200,000	0	11,200,000
2006年度	10,800,000	0	10,800,000
2007年度	10,800,000	0	10,800,000
2008年度	10,800,000	0	10,800,000
2009年度	10,800,000	0	10,800,000
総計	54,400,000	0	54,400,000

研究分野：血液免疫学

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：造血器腫瘍、同種移植、マイナー組織適合抗原、腫瘍免疫、一塩基多型、抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後には抗腫瘍（GVT）効果が誘導され、難治性腫瘍が根絶される。このGVT効果の標的抗原は、患者のHLA上に提示されている同種抗

原の一つであるマイナー組織適合抗原（mHAg）であり、このmHAgに特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）が腫瘍の排除を行っていると考えられている。mHAgはドナーと患者間で異なる一塩基多型（SNP）に起因するア

ミノ酸の置換により抗原性を獲得した自己ペプチドである。造血器腫瘍を含む血液細胞にのみ発現する多型蛋白質に由来する mHAg を標的とする免疫反応は GVHD を起こすことなく、選択的 GVT 効果を誘導すると期待される。

研究当初までに同定されていた mHAg は日本人に多い HLA アリルによって提示されるものがなく、本邦における免疫療法への応用には不適切であった。そこで本申請者らは、①日本人に多い HLA アリルによって提示される新規 mHAg を同定し、②移植後再発の予防や治療を目的とした免疫療法へ応用することを目標とした。

2. 研究の目的

(1) 日本人に多く見られる HLA-A24, A2, A33, B44 などによって提示される新規 mHAg エピトープを同定する。

(2) 従来の発現クローニングによる方法では同定に 1 年近い時間を要したので、最新のゲノム医学の技術を利用し、より普遍的で迅速な同定方法を開発する。

(3) mHAg に特異的な CTL クローンが白血球幹細胞でも発現しているかどうかをモデル動物を用いて検討する。

(4) 同定した mHAg のうち、GVHD を回避しつつ、選択的 GVT 効果誘導が期待できるものについて GMP グレードのペプチドを合成して臨床試験を行い、安全性と有効性を評価する。

3. 研究の方法

(1) HLA 一致同胞より同種造血細胞移植を受けた患者の末梢血 T 細胞を、患者の移植前の末梢血単核球で刺激し CTL 株を樹立、次いで限界希釈法で CTL クローンを得る。

(2) 得られた CTL クローンの HLA 拘束性、造血系細胞特異性を種々の細胞パネルを用いて確認し、有望なものをさらに増幅して以後の実験のプロープとする。

(3) CTL クローンで拘束性 HLA を遺伝子導入した CEPH 家系由来 B 細胞株 (B-LCL) パネルをスクリーニングし、mHAg 陽性・陰性の 2 群に分け、連鎖解析を行い mHAg 責任遺伝子座を特定する。次いでその領域に存在する複数の候補遺伝子の中から、組織分布パターンや SNP 部位が HLA に結合するかなどを検討しつつ mHAg エピトープを決定する。

(4) 以上の方法で解像度が不十分な場合、mHAg 陽性・陰性の各 B-LCL より DNA を抽出、プール化した後、SNP アレイにて全ゲノム解

析を行い 2 群間で有意差をもって偏在する SNP を特定し、その部分を含む領域に mHAg エピトープが存在するか検索する。

(5) DNA プール法をさらに発展させ、300 万 SNP が解析されている国際 HapMap 計画で収集された B-LCL を用いてコンピュータ上で相関解析を行い、国際的にも汎用性のあるソフトウェアを構築し、将来的にインターネット上で公開する。さらに共同研究を通じて、さまざまな CTL について本法が有用であるかを確認する。

(6) 超免疫不全 NOG マウスにおいて、樹立した mHAg 特異的 CTL が造血器腫瘍を駆逐できるか検討する。次いで有望な mHAg について臨床試験を通じて移植後の造血器腫瘍の再発予防や治療効果の有効性と安全性を検討する。

4. 研究成果

(1) HLA-A31, A33 拘束性 CTSH 由来 mHAg の同定。本 mHAg 遺伝子はユビキタスに発現しているにもかかわらず、CTL は造血器細胞のみを傷害した。これは細胞内でのエピトープのプロセッシングが細胞種によって異なることを示唆し、単純に mRNA や蛋白質の発現だけで抗原性を判定出来ないことを示した。

(2) HLA-B44 拘束性 HMSD 由来 mHAg の同定。本遺伝子は偽遺伝子であったが、mHAg エピトープを形成すること、またスプライドナー部位の SNP がスプライズバリエントを生成し、このバリエントのみが抗原性を持つという全く新規の mHAg 生成メカニズムを見出した。遺伝子発現は血液系細胞に限局し、選択的 GVT 効果の良い標的と考えられた。実際 NOG マウスを用いた *in vivo* 試験で、HMSD 特異的 CTL は白血球幹細胞の生着を完全に阻害した。本 mHAg はペプチドワクチンの臨床試験で安全性・有用性を評価中である。

(3) HLA-A24 拘束性 BCL2A1 由来 mHAg の同定。この mHAg を規定する SNP は方法論 (4) の DNA プール法でピンポイントで同定された。mHAg を DNA プール法で同定した初の報告となった。本 mHAg は研究代表者が過去に報告した mHAg の反対側アリルでコードされており、世界で 2 番目の biallelic mHAg となった。BCL2A1 の組織分布は造血組織に限局しており、GVT 効果の標的として有望と考えられた。本 mHAg もペプチドワクチンの臨床試験で安全性・有用性を評価中である。

(4) HLA-A31 拘束性 SLC1A5 および HLA-A2 拘束性 UGT2B17 の同定。これらは方法論 (5) で示した HapMap B-LCL を用いて同定された。

HapMap ゲノムデータに世界で初めて免疫学的手法からアプローチし、責任 SNP を同定した。本法は HapMap B-LCL を細胞バンクから入手しさえすれば、SNP アレイなどの特殊技術なしに責任 SNP を決定できる画期的方法として認められた。

(5) 上記と同様な方法で、Fred Hutchison 癌研究所で移植後再発患者に養子免疫療法として投与された CTL クローンが認識する mHAg を共同研究として同定した。その結果、本 mHAg (P2RX7 由来) は血液細胞のみならず、肺胞上皮に強発現していたことが定量 PCR と免疫染色で判明し、患者が発症した肺 GVHD との関連が明確に示された。

(6) 臨床試験において、移植後再発および再発ハイリスク患者、計 2 名に 2 種類の mHAg ペプチドワクチンを投与した。まだ臨床試験中であるので結論は示せないが、GVHD 等の有害事象は認められなかった。

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 13 件)

- ① Warren EH, Fujii N, Akatsuka Y, et al. (14 名中 3 番目) Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. (査読有) Blood. 115, 2010, 3869-3678.
- ② Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, et al. (11 名中 3 番目) Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. (査読有) Blood. 115, 2010, 3158-3161.
- ③ Kamei M, Nannya Y, Torikai H, et al. (20 名中最終) HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. (査読有) Blood. 113, 2009, 5041-5048.
- ④ Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, Toji S, Kawase T, Takahashi T, Kuzushima K, Akatsuka Y. CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. (査読有) Int J Hematol. 88, 2008, 311-320.
- ⑤ Torikai H, Akatsuka Y, Yatabe Y, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Aberrant expression of BCL2A1-restricted minor histocompatibility antigens in melanoma cells: application for allogeneic trans-

plantation. (査読有) Int J Hematol. 87, 2008, 467-473.

- ⑥ Rosinski KV, et al. (12 名中 9 番目) DDX3Y encodes a class I MHC-restricted H-Y antigen that is expressed in leukemic stem cells. (査読有) Blood. 111, 2008, 4817-26.
- ⑦ Kawase T, Nannya Y, Torikai H, et al. (14 名中最終) Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA. (査読有) Blood. 111, 2008, 3286-3294.
- ⑧ Torikai H, Akatsuka Y, Miyauchi H, et al. (全 11 名 2 番目) The HLA-A*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1H peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A*0206. (査読有) Bone Marrow Transplant. 40, 2007, 165-174.
- ⑨ Akatsuka Y, Morishima Y, Kuzushima K, Kodera Y, Takahashi T. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. (査読有) Cancer Sci. 98, 2007, 1139-1146.
- ⑩ Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, et al. (15 名中 2 番目) Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. (査読有) Blood. 110, 2007, 1055-1063.
- ⑪ Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, et al. (全 8 名 1 番目) Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. (査読有) Br J Haematol. 135, 2006, 413-414.
- ⑫ Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, et al. (全 13 名 2 番目) The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A*3101 and -A*3303. (査読有) Br J Haematol. 134, 2006, 406-416.
- ⑬ Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, et al. (9 名中 5 番目) Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. (査読有) Immunol Lett. 106, 2006, 48-56.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 赤塚美樹ら。移植後再発白血病に対するマイナー抗原特異的 CTL 養子免疫療法後に重症肺 GVHD の合併を来した標的抗原の同定。第 13 回日本がん免疫学会総会、2009 年 6 月 24 日、福岡。
- ② 赤塚美樹ら。骨髄移植症例に誘導される GVL 効果の解析。第 67 回日本癌学会総会シンポジウム、2008 年 10 月 28 日、愛知。

③ 鳥飼宏基ら. Public Resource を用いたゲノムワイド解析による新規マイナー抗原同定法の開発. 第 12 回基盤的癌免疫研究会総会、2008 年 7 月 2 日、埼玉.

④ 赤塚美樹. Minor Antigen 反応性 CTL の移植医療への関与. 第 31 回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム. 2008 年 2 月 5 日、札幌.

⑤ 赤塚美樹. GVHD を増強せずに GVL 効果を高める治療法の可能性. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会シンポジウム、2007 年 10 月 12 日、横浜.

⑥ 赤塚美樹. 造血器腫瘍に対する細胞免疫療法の今後. 第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、教育講演、2007 年 10 月 12 日、横浜.

⑦ 赤塚美樹. GVL の標的としての造血細胞特異的マイナー適合抗原. 第 29 回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム. 2007 年 2 月 16 日、福岡.

⑧ 赤塚美樹. マイナー抗原を標的とした移植後再発白血病に対する免疫療法の可能性. 第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会、シンポジウム. 2006 年 10 月 8 日、福岡.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: ウイルス特異的 CTL の製造方法.

発明者: 鈴木進ら 6 名.

権利者: 医学生物学研究所および愛知県

種類: 特許

番号: PCT/JP2007/066439

出願年月日: 2007 年 8 月 24 日

国内外の別: 国内外 (PCT)

名称: LOC284293 バリエント遺伝子並びに該遺伝子がコードする CD8+細胞傷害性 T リンパ球 mHA エピトープペプチド及びその用途.

発明者: 赤塚美樹ら 4 名.

権利者: 愛知県

種類: 特許

番号: 特許出願 2006-152098

出願年月日: 2006 年 5 月 31 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-05.html>

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/300/313/313-10/00.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤塚 美樹 (AKATSUKA YOSHIKI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号: 70333391

(H17: 研究分担者、H18→H21: 研究代表者)

高橋 利忠 (TAKAHASHI TOSHITADA)

愛知県がんセンター・総長

研究者番号: 00124529

(H17 のみ)

(2) 研究分担者

辻村 邦夫 (TSUJIMURA KUNIO)

浜松医科大学・感染症学講座

・生体防御部門・准教授

研究者番号: 10227407

葛島 清隆 (KUZUSHIMA KIYOTAKA)

愛知県がんセンター・研究所

・腫瘍免疫学部・部長

研究者番号: 30311442

(H21 のみ)