

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390265
 研究課題名（和文） 腫瘍特異的 T 細胞レセプター遺伝子導入による革新的造血幹細胞移植療法
 研究課題名（英文） Novel hematopoietic stem cell transplantation using cancer-specific T-cell receptor gene transfer

研究代表者

安川 正貴 (YASUKAWA MASAKI)
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60127917

研究成果の概要：

革新的造血幹細胞移植療法の開発の目的で、新たな造血器腫瘍関連抗原の同定と腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）由来 T 細胞レセプター（TCR）遺伝子導入による免疫遺伝子治療の開発をおこなった。その結果、新たな白血病関連抗原として、CML66とAurora-Aを同定した。また、がん特異的CTL由来TCR遺伝子導入によって、HLA拘束性のがん特異性を獲得することが確認された。さらに、がん特異的TCR遺伝子導入造血幹細胞が、マウス体内でがん特異的成熟 T 細胞に分化増殖できることを確認しえたことから、今後、GVHDに頼らない新たな自己造血幹細胞移植療法の開発が可能であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：がん免疫療法、細胞傷害性 T 細胞、T 細胞レセプター遺伝子、遺伝子治療、造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

最近、腫瘍関連抗原の同定と相俟って、様々な固形がんに対する細胞免疫療法が進行している。効果的ながん特異的細胞免疫療

法は、生体内でいかに効率よく腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）を誘導するかが重要なポイントであるが、現在行われているペプチドワクチン療法や樹状細胞療法での効果

には限界があることが分かってきた。従って、予め *ex vivo* で大量のがん特異的 CTL を培養し、その体内移入による adoptive immunotherapy (CTL 養子免疫療法) に大きな期待が寄せられている。

われわれは今までに、種々の造血器腫瘍関連抗原を同定し、これら蛋白由来合成ペプチドを用いて、造血器腫瘍細胞を特異的に認識する CTL クローンを樹立し、その機能的解析を行ってきた。また、ヒト腫瘍移植マウスを用いた検討から、これまでにわれわれが同定してきたヒト腫瘍関連抗原特異的 CTL を移入することによって腫瘍サイズの縮小と生存期間の延長が期待できることを示した。しかしながら、末梢血中に存在する腫瘍特異的 CTL の頻度はきわめて低く、その大量培養は必ずしも容易ではない。

CTL は、腫瘍細胞表面に発現している HLA と腫瘍関連抗原由来ペプチドとの複合体を T 細胞レセプター (TCR) で特異的に認識し、腫瘍細胞を殺傷する。従って、がん特異的 CTL クローンから TCR 遺伝子をクローニングし、末梢血リンパ球に遺伝子導入することで、がん特異性が容易に獲得できることが予想される。

2. 研究の目的

このようながん特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞による養子免疫療法を実施するには、頻回に遺伝子導入 T 細胞を調整することが必要となり、多大の労力を有する。本研究ではこの問題を克服する目的で、自己造血幹細胞に TCR を遺伝子導入し、体内に戻すことを計画した。このことによって、体内で持続的に腫瘍特異的 CTL を誘導し、がん細胞を選択的に拒絶しようとする全く新しい概念に基づく革新的自己造血幹細胞移植療法を開発することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞傷害性 T 細胞が認識する新たな造血器腫瘍関連抗原エピトープの同定：

CML66 および Aurora-A のアミノ酸配列から、HLA-A2 および HLA-A24 に結合することが予想される 9-mer ペプチドを合成した。HLA-A2 および HLA-A24 陽性健常者末梢血単球から樹状細胞を誘導し、CML66 ペプチド、Aurora-A ペプチドを添加し、自己 CD8 陽性 T 細胞を繰り返し刺激した。その後、ペプチド特異的に細胞傷害を示す T 細胞株を樹立した。種々の白血病細胞株、新鮮分離白血病細胞ならびに CD34 陽性 CD38 陰性白血病幹細胞における CML66 および Aurora-A の発現を定量的 RT-PCR 法で測定した。CML66 ペプチドおよび Aurora-A ペプチド特異的 CTL の細胞傷害活性を、ペプチド添加自己細胞および種々の白血病細胞を標的細胞として解析した。さらに、CML66 ペプチド/HLA-A24 テトラマーおよび Aurora-A ペプチド/HLA-A テトラマーを作成し、白血病患者ならびに健常人末梢血リンパ球に含まれるそれぞれの CTL 前駆細胞を検出した。

(2) WT1 特異的 CTL クローン由来 T 細胞レセプター遺伝子発現による抗腫瘍効果の獲得：WT1 特異的 HLA-A24 拘束性 CTL クローン TAK-1 から TCR α および TCR β 遺伝子をクローニングし、レンチウイルス発現ベクターおよびレトロウイルスベクターを作製した。健常人末梢血リンパ球に遺伝子導入し、WT1 特異的 TCR の発現を、テトラマーを用いて解析した。また、TCR 遺伝子導入細胞のペプチド添加細胞ならびに各種白血病細胞に対する細胞傷害性を検討した。さらに、臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞に遺伝子導入した後、新たな免疫不全マウスである NOD/SCID/common γ^{null} マウスに移植した。移植が約 3 ヶ月後に、脾細胞および骨髄細胞に含まれる WT1 特異的 TCR 発

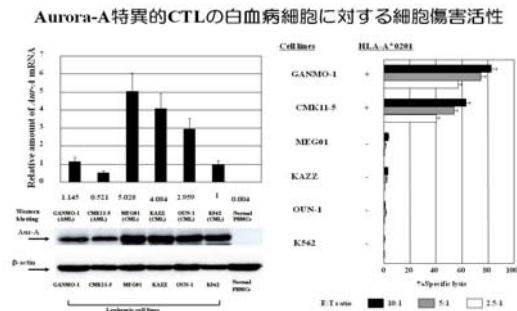
現ヒト T 細胞をテトラマーを用いて検出するとともに、ペプチド刺激による IFN- γ 産生を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト細胞傷害性 T 細胞が認識する新たな造血器腫瘍関連抗原エпитープの同定：

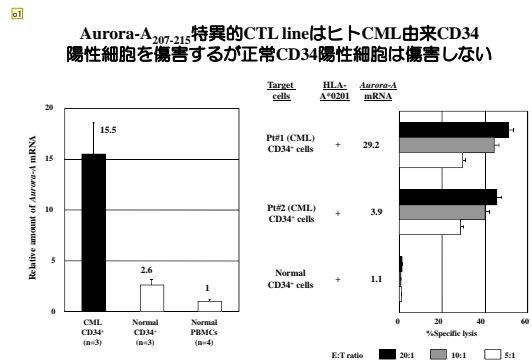
健常者末梢血から CML66 ペプチド特異的 HLA-A24 拘束性 CD8 陽性 CTL および Aurora-A ペプチド特異的 HLA-A2 拘束性 CTL を誘導した。CML66 ならびに Aurora-A はほとんどの白血病細胞に強く発現され、正常細胞には発現が極めて低いことが確認された。また特に、白血病幹細胞が含まれると考えられる CD34 陽性 CD38 陰性分画に極めて高い発現が認められたが、正常 CD34 陽性 CD38 陰性造血幹細胞における発現量は低値であった。

図 1. Aurora-A 特異的 CTL の白血病細胞に対する細胞傷害活性



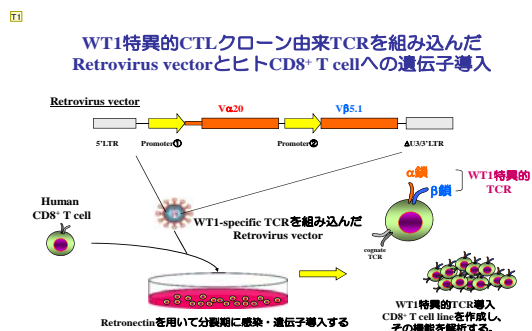
CML66 特異的 CTL および Aurora-A ペプチド特異的 CTL は白血病細胞株ならびに新鮮分離白血病細胞を HLA 拘束性に傷害したが、正常細胞には影響を与えなかった。また、CD34 陽性 CD38 陰性白血病幹細胞は強く傷害したが、正常造血幹細胞へは全く影響を与えなかった。さらに、白血病患者末梢血中には健常人と比べ、CML66 特異的 CTL 前駆細胞および Aurora-A ペプチド特異的 CTL 前駆細胞が高頻度に確認された。

図 2. Aurora-A 特異的 CTL は白血病幹細胞を特異的に認識して傷害する



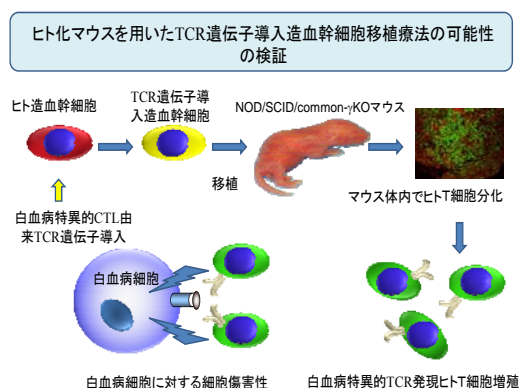
(2) WT1 特異的 CTL クローン由来 T 細胞レセプター遺伝子発現による抗腫瘍効果の獲得：健常人末梢血 CD4 および CD8 陽性 T 細胞に遺伝子導入したところ、効率よく TAK-1 由来 TCR の発現が確認された。TCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞は TAK-1 同様に、HLA-A24 拘束性に白血病細胞に対して細胞傷害性を示したが、正常細胞には全く影響を与えなかった。他方、CD4 陽性 T 細胞も HLA-A24 拘束性に Th1 サイトカインを産生したが、この反応には白血病細胞に HLA クラス II の発現が必要であることが示唆された。そこで、HLA クラス II 陰性白血病細胞株に C II TA 遺伝子を強制発現させ、新たに HLA クラス II を発現させた白血病細胞株を作成したところ、これらの白血病細胞の反応が誘導されることが確認された。以上のことから、high affinity を有する CTL 由来 TCR 遺伝子導入によって、CD8 陽性 T 細胞のみならず、CD4 陽性 T 細胞も HLA クラス I 拘束性が特異性を獲得することが明らかとなった。

図 3. WT1 特異的 CTL 由来 TCR 遺伝子発現ベクターの作成



他方、WT1 特異的 TCR 遺伝子導入ヒト造血幹細胞移植免疫不全マウスから WT1 特異的 TCR を発現するヒト T 細胞が分化、増殖することが確認された。これらの T 細胞は、WT1 ペプチド特異的に IFN- γ を産生したことから、機能的にも WT1 特異性を有していることが確認された。

図 4. ヒト化マウスを用いた新たな造血幹細胞移植療法の開発



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 19 件)

1. Suemori, K., Yasukawa, M., et al. HBZ is an immunogenic protein but not a target antigen for HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* in press. 査読有
2. Suemori, K., Yasukawa, M., Yakushijin, Y., et al. Identification of a novel epitope derived from CML66 which is recognized by anti-leukaemia cytotoxic T lymphocytes. *Br. J. Haematol.* in press. 査読有
3. Yasukawa, M., Yakushijin, Y., et al. Clinical efficacy of WT1 peptide vaccination in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Am. J. Hematol.* in press. 査読有
4. Tanimoto, K., Yakushijin, Y., Yasukawa, M., et al. Clinical significance of co-expression of CD21 and LFA-1 in non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* in press. 査読有
5. Matsubara E, Yasukawa M., Yakushijin, Y., et al. The role of zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein in erythroid cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 284:3480-3487, 2009. 査読有
6. Ochi, T., Yasukawa, M., Yakushijin, Y., et al. Aurora-A kinase: A novel target of cellular immunotherapy for leukemia. *Blood* 113:66-74, 2009. 査読有
7. Suemori, K., Yasukawa, M., Yakushijin, Y., et al. Identification of an epitope derived from CML66, a novel tumor-associated antigen broadly expressed in human leukemia, recognized by HLA-A*2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Sci.* 99:1414-1419, 2008. 査読有
8. Fujiwara, H., Yasukawa, M., et al. 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. *Int. J. Hematol.* 87:319-326, 2008. 査読有
9. Hato, T., Yakushijin, Y., Yasukawa, M., et al. Cooperative role of the membrane-proximal and distal residues of the integrin beta 3 cytoplasmic domain in regulation of talin-mediated alpha IIbeta 3 activation. *J. Biol. Chem.* 283:5662-5668, 2008. 査読有
10. Hasegawa, H., Yasukawa, M. et al. Therapeutic effect of accumulation of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Therapy* 15:171-182, 2008. 査読有
11. Tsuboi, A., Yasukawa, M., et al. Wilms tumor gene WT1 peptide-based immunotherapy induced a minimal response in a patient with advanced therapy-resistant multiple myeloma. *Int J Hematol.* 86:414-417, 2007. 査読有
12. Nagafuji, K., Yasukawa, M., et al. Perforin gene mutations in adult-onset hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica* 92:978-981, 2007. 査読有
13. Ishii, E., Yasukawa, M., et al. Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int. J. Hematol.* 86:58-65, 2007. 査読有

14. Tohyama, M., Yasukawa, M., et al. Association of human herpesvirus-6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome. *Br. J. Dermatol.* 157:934-940, 2007. 査読有
15. Hasegawa, H., Yasukawa, M., et al. Therapy for pneumonitis and sialadenitis by accumulation of CCR2-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells in MRL/lpr mice. *Arthritis Res. Ther.* 2007;9(1):R15. 査読有
16. Abe, Y., Yasukawa, M. et al. A mitotic kinase TOPK enhances cdk1/cyclin B1-dependent phosphorylation of PRC1 and promotes cytokinesis. *J. Mol. Biol.* 370:231-245, 2007. 査読有
17. Yakushijin, Y., Yasukawa, M. et al. Absence of chlamydial infection in Japanese patients with ocular adnexal MALT lymphoma. *Int. J. Hematol.* 85:223-230, 2007. 査読有
18. Ikeda, K., Yasukawa, M., et al. The role of Wilms' tumor gene peptide-specific cytotoxic T lymphocytes in immunologic selection of a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *Exp. Hematol.* 35:618-626, 2007. 査読有
19. Fujiki, F., Yasukawa, M., et al. Identification and characterization of a WT1 (Wilms' tumor gene) protein-derived HLA-DRB1*0405- restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunother.* 30:282-293, 2007. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. Yamanouchi, J., Yasukawa, M., et al. Integrin $\beta 3$ membrane-proximal and - distal residues cooperatively regulate talin-mediated $\alpha \square \beta 3$ activation. 50th American Society of Hematology Annual Meeting. 2008,12,6 San Francisco, CA, USA
2. Tanimoto, K., Yasukawa, M., et al. Clinical significance of CD21 Co-Expression with LFA-1 in Non-Hodgkin's B-cell lymphoma 50th American Society of Hematology Annual Meeting. 2008,12,6 San Francisco, CA, USA
3. Ochi, T., Yasukawa, M. et al. Aurora-A kinase : A novel target of cellular immunotherapy for human

- leukemia. 50th American Society of Hematology Annual Meeting. 2008,12,6 San Francisco, CA, USA
4. 松原悦子、安川正貴、他 Zinc finger protein 521/early hematopoietic zinc finger protein の赤血球分化における役割 第 67 回日本癌学会学術総会 2008,10,30 名古屋
 5. Ochi, T., Yasukawa, M., et al. Development of anti-leukemic immunotherapy targeting Aurora-A kinase. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008,10,30 名古屋
 6. Suemori, K., Yasukawa, M., et al. Establishment and characterization of a novel CD8+ T cell line with cytotoxicity via perforin / granzyme B. 第 67 回日本癌学会学術総会 2008,10,30 名古屋
 7. 越智俊元、安川正貴、他. Aurora-A kinase を標的とした抗白血病免疫療法の開発第 70 回日本血液学会総会 2008,10,10 京都
 8. 末盛浩一郎、安川正貴、他 腫瘍関連抗原 CML66 の臨床的有用性 70 回日本血液学会総会 2008,10,10 京都
 9. 松原悦子、安川正貴、他 Zinc finger protein 521 の赤血球分化における制御機構の解析 70 回日本血液学会総会 2008,10,10 京都

[図書] (計 1 件)

1. Fujiwara, H., Yasukawa, M. Oncogene proteins: Targets for cancer immuno-cell therapy. Oncogene proteins: Structures, Functions and Analyses. Pp55-85, 2008. Nova Biomedical Books. New York.

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/int.m ed1/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 正貴 (YASUKAWA MASAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 60127917

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

薬師神 芳洋 (YAKUSHIJIN YOSHIHIRO)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 30294797