慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	白血病幹細胞を標的とした新規免疫治療法の開発
Sub Title	Development of novel immunotherapy targeting leukemic stem cells.
Author	松下, 麻衣子(Matsushita, Maiko) 服部, 豊(Hattori, Yutaka) 河上, 裕(Kawakami, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	新規がん抗原CXorf48は慢性骨髄性患者検体より分離した白血病幹細胞に高発現していた。我々が同定したHLA-A24拘束性エピトープを用いて健常人リンパ球から誘導したCXorf48特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)はこれらの患者骨髄細胞中の白血病幹細胞を認識した。また, 白血病患者末梢血中の同CTLの有無と臨床経過に相関が認められた。更に, 白血病細胞株において, 脱メチル化剤の添加によって本遺伝子の発現が上昇する一方, 正常血液細胞では遺伝子発現が変化せず, 脱メチル化剤の併用が有用である可能性を示した。以上より, 新規がん抗原CXorf48を用いて, 白血病幹細胞を除去する免疫療法の開発が期待される。 Novel cancer antigen, CXorf48, was highly expressed in patients-derived leukemic stem cells. Cytotoxic T cells induced with HLA-A24-restricted epitope could recognize these leukemic stem cells from leukemic patients. We also found the correlation between existence of anti-CXorf48 CTL in peripheral blood of leukemic patients and their clinical courses. Moreover, demethylating agent up-regulated expression of CXorf48 gene in leukemic cells, but not in normal blood cells, suggesting that combination of demethylating agent with immunotherapy might be effective. Therefore, immnotherapy targeting CXorf48 would be a promising treatment for leukemia by eradicating leukemic stem cells.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26461453 研究分野 : 腫瘍免疫学 血液内科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26461453seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６１４５３

研究課題名（和文）白血病幹細胞を標的とした新規免疫治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy targeting leukemic stem cells.

研究代表者
松下　麻衣子（Matsushita, Maiko）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・准教授

研究者番号：１０３２７５２０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：新規がん抗原CXorf48は慢性骨髄性患者検体より分離した白血病幹細胞に高発現していた。我々が同定したHLA-A24拘束性エピトープを用いて健常人リンパ球から誘導したCXorf48特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）はこれらの患者骨髄細胞中の白血病幹細胞を認識した。また、白血病患者末梢血中の同CTLの有無と臨床経過に相関が認められた。更に、白血病細胞株において、脱メチル化剤の添加によって本遺伝子の発現が上昇する一方、正常血液細胞では遺伝子発現が変化せず、脱メチル化剤の併用が有用である可能性を示した。以上より、新規がん抗原CXorf48を用いて、白血病幹細胞を除去する免疫療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Novel cancer antigen, CXorf48, was highly expressed in patients-derived leukemic stem cells. Cytotoxic T cells induced with HLA-A24-restricted epitope could recognize these leukemic stem cells from leukemic patients. We also found the correlation between existence of anti-CXorf48 CTL in peripheral blood of leukemic patients and their clinical courses. Moreover, demethylating agent up-regulated expression of CXorf48 gene in leukemic cells, but not in normal blood cells, suggesting that combination of demethylating agent with immunotherapy might be effective. Therefore, immnotherapy targeting CXorf48 would be a promising treatment for leukemia by eradicating leukemic stem cells.

研究分野：　腫瘍免疫学　血液内科学

キーワード：　白血病幹細胞　がん抗原　CTL　脱メチル化剤

１．研究開始当初の背景

難治性白血病患者において、再発の原因の一つと考えられている白血病幹細胞を排除することは再発予防の観点から大変重要である。また、近年種々のがん抗原を用いたがん免疫療法が注目されている。しかし現時点で白血病幹細胞に発現していることが証明されている抗原は限られている。

代表者らは、がん免疫療法に有用な新規がん抗原を探索する過程で、新規がん精巣抗原である *CXorf48* 遺伝子を得た。同遺伝子は、乳がん、大腸がん、胃がんに加えて、慢性骨髄性白血病などの造血器腫瘍において広く発現が認められた。さらに、白血病細胞株を用いた予備検討にて、本遺伝子は白血病幹細胞を多く含む CD34 陽性 CD38 陰性分画に発現していた。代表者はすでに、同抗原に由来する HLA-A*24:02 拘束性の新規エピトープペプチドを同定している（特許特願 2012-132288）。従って、CXorf48 は、白血病幹細胞抗原として難治性造血器腫瘍患者に対する抗原特異的免疫療法の理想的な標的となり得ると考えられた。

２．研究の目的

CXorf48 を標的とした白血病幹細胞に対する複合的な免疫療法を開発するための研究基盤を確立することが本研究の目的である。

そのために、以下の 2 点を明らかにする。

(1)CXorf48 抗原由来エピトープペプチドを用いてがん幹細胞分画を効果的に排除できるかどうか。

(2)エピジェネティック調節を利用してがん幹細胞特異的に CXorf48 遺伝子の発現を増強させ、免疫療法の抗腫瘍効果を高めることができるかどうか。

３．研究の方法

(1)患者由来白血病幹細胞における CXorf48 遺伝子の発現検索

同意を得て提供された患者腫瘍細胞より CD34 陽性 CD38 陰性分画をソーティングした後 total RNA を抽出し、real time PCR 法により *CXorf48* 遺伝子の発現量を測定する。

(2)脱メチル化剤処理による CXorf48 遺伝子発現への影響の検討

脱メチル化剤である 5-azacitidine（5-aza）または 5-deoxycytidine(DAC)を造血器腫瘍細胞または健常人由来骨髄単核球中の CD34 陽性細胞に 24 時間毎に 48 時間添加した後、total RNA を抽出し、RT-PCR 法および real time PCR 法により CXorf48 遺伝子の発現強度を測定する。

(3)CXorf48 特異的ＣＴＬの白血病幹細胞に対する免疫効果の検討

健常人末梢血から単核球を分離し、代表者が同定した HLA-A*24:02 に結合する 9mer のエピトープペプチドをパルスした樹状細胞および PHA 刺激細胞を用いて１週毎に計４回刺激し、テトラマー染色、エリスポット法および ^{51}Cr 細胞障害性試験により抗原特異性を解析する。また CXorf48 陰性細胞を 5-aza および DAC で処理した場合に、CTL による認識能が増強するかどうかを検討する。

(4)同 CTL が患者白血病幹細胞を認識するかどうかを、CTL と患者白血病細胞中の CD34 陽性分画を共培養した後に CD107a アッセイで検討する。

(5)患者末梢血リンパ球を CXorf48 特異的デキストラマーで染色し、抗原特異的 CTL の有無と臨床経過の関連を検討する。

(6)(3)で得られた抗原特異的 CTL より、デキストラマー陽性細胞をソーティングで抽出し、限界希釈法により 96 ウェルプレート内で CTL クローンを培養する。増殖した細胞を再度デキストラマー染色し、陽性細胞を CXorf48 陽性 CTL クローンと判定する。

４．研究成果

(1)患者由来白血病幹細胞における CXorf48 遺伝子および蛋白質の発現検索

同意を得て提供された複数の慢性骨髄性白血病患者検体全てにおいて、CD34 陽性 CD38 陰性分画において、CD34 陰性分画、CD34 陽性 CD38 陽性分画と比較して CXorf48 の強い発現が認められた（図１）。

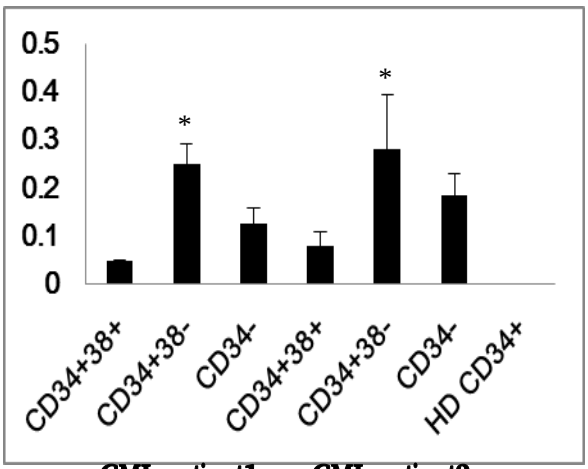

図１　白血病幹細胞における CXorf48 発現量

(2)脱メチル化剤処理による CXorf48 遺伝子発現への影響の検討

CXorf48 を発現していない白血病細胞株である HL60 および PL21 を 5-aza または DAC で処理したところ、CXorf48 遺伝子の発現が著増した。この現象は、5-aza、DAC のいずれにおいても濃度依存性を認めた（図２）。

さらに、健常人末梢血由来単核球細胞、または同細胞より誘導した PHA blast にも脱メチル化剤を用いて同様の検討を行ったところ、これらの健常人に由来する細胞では CXorf48 遺伝子の発現は全く増加しなかった。以上より、CXorf48 遺伝子は腫瘍特異的なエピジェネティクス機構により発現が調節さ

れていることが示唆された。従って、将来 CXorf48 を標的とした免疫療法において脱メチル化剤を併用しても、正常血液細胞への影響が少ないことから血液毒性が少ないと予想された。

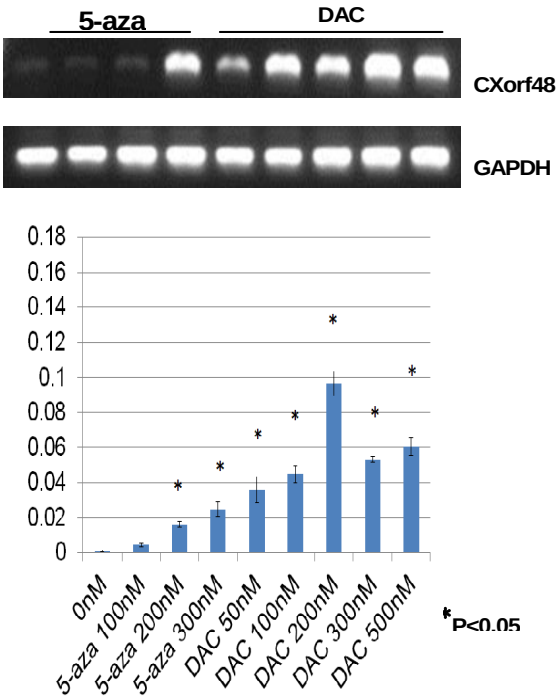

図２脱メチル化剤による *CXorf48* 発現の変化

（３）CXorf48 特異的 CTL の白血病幹細胞に対する免疫効果の検討

HLA-A*24:02 陽性健常人リンパ球より、CXorf48 由来ペプチドを添加した樹状細胞および PHAblast を用いて誘導した CTL は、Elispot アッセイおよび ^{51}Cr 遊離試験において、抗原特異的な反応を示した。すなわち、CXorf48 由来ペプチドを添加した CIR-A24 細胞または、HLA-A*24:02 および CXorf48 陽性である KMS21 細胞に対して、有意に高い IFN-γ 産生および細胞傷害活性を示した（図 3）。

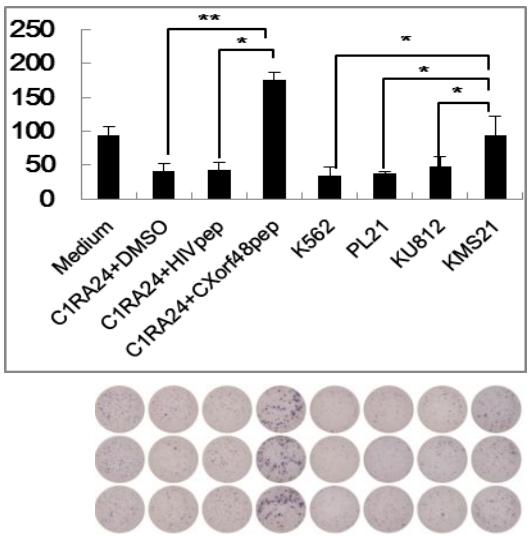

図３　CXorf48 特異的 CTL による IFNγ 産生

しかし、この CTL は、DAC で処理し、*CXorf48* 遺伝子の発現を増強させたがん細胞を認識することができなかった。DAC 処理により、がん細胞上の PD-L1 の発現が上昇することを確認しており、DAC 処理により抗原の発現量が増加すると同時に免疫抑制機構も作動している可能性が考えられた。従って抗 PD-1 抗体の併用が抗原認識能の増強に必要であるかもしれない。

更に、同 CTL が CML 患者検体中の白血病幹細胞を認識するかどうかを CD107a アッセイで検討したところ、CTL が CML 細胞中の CD34 陽性分画を認識することが判明した。一方、CD34 陰性細胞や、HLA-A24 陰性である K562 細胞を認識する CTL は認められなかった（図４）。

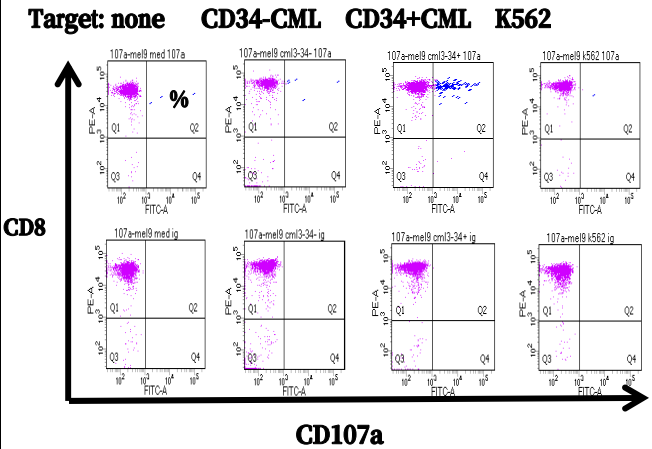

図 4　CXorf48 特異的 CTL の白血病幹細胞に対する反応性（上段　CD107a 抗体添加時、下段　コントロール抗体添加時）

最後に、実際に白血病患者において CXorf48 に対する免疫反応が白血病幹細胞の除去に有効であるかを検討するために、イマチニブ投与によって 2 年以上の完全分子遺伝学的寛解を維持した後にイマチニブを中止した CML 患者 14 例の患者末梢血よりリンパ球を分離し、CXorf48 特異的デキストラマーで染色したところ、3 例において、末梢血中に同デキストラマー陽性細胞を認めた。この 3 例は、いずれもイマチニブ中止後も 3 年以上寛解を維持している。一方、デキストラマー陽性細胞を検出できなかった 11 例のうち 7 例で再発を認めており（63.6%）CTL 陽性例で寛解維持率が高いことから（p=0.051）CXorf48 に対する免疫反応が白血病幹細胞の除去に関与している可能性が示唆された。

なお、今回、デキストラマー陽性細胞を用いて抗原特異的 CTL のクローン化を試みたが、有用なクローンを得ることができなかった。従って CTL クローンの樹立は今後の課題である。CTL クローンを用いた in vivo での検討により、さらに詳細に CXorf48 を標的とした抗腫瘍効果の検証が可能となり、免疫療法の開発につながると考えられる。

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０件）

〔学会発表〕（計４件）
①Ozawa K, Matsushita M, Yokoe S, Kanchi S, Uchiumi A, Ichikawa D, Matsuki E, Sakurai M, Karigane D, Kasahara H, Kawakami Y, Okamoto S, Hattori Y. Immunogenecity of Novel Antigen Exoressed in Leukemia Stem Cells. The 5th JCA-AACR Joint Conference、 2016 年 7 月 13 日、東京ベイ舞浜ホテル（千葉県・浦安市）
②Matsushita M, Koji Ozawa, Kanchi S, Uchiumi A, Suzuki T, Ichikawa D, Matsuski E, Sakurai M, Karigane D, Nakajima H, Okamoto S, Hattori Y. Monitoring of immunity against leukemia stem cell in CML patients after cessation of TKI. 30th Annual Meeting of The Society for Immunotherapy of Cancer（SITC）、2015 年 11 月 5 日、ナショナルハーバー（アメリカ合衆国）
③神地沙織、小澤光司、松下麻衣子、松木絵里、櫻井政寿、雁金大樹、市川大樹、岡本真一郎、服部豊、イマチニブ投与中止後 CML 患者におけるがん幹細胞抗原特異的 CTL の解析．第７回血液疾患免疫療法研究会学術集会、2015 年 9 月 26 日、東京大学国際学術研究センター伊藤謝恩ホール（東京都・文京区）
④小澤光司、松下麻衣子、中村美紀、鈴木拓真、市川大樹、塚本信夫、河上裕、服部豊、白血病幹細胞に発現する新規がん精巣抗原の同定、第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会、2015 年 2 月 28 日、東京ガーデンパレス（東京都・文京区）

６．研究組織
(1)研究代表者
松下　麻衣子（MATSUSHITA, Maiko）
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号：10327520

(2)研究分担者
服部　豊（HATTORI, Yutaka）
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：20189575

研究分担者
河上　裕（KAWAKAMI, Yutaka）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号： 50161287