

## WT1ペプチドワクチン施行したCML患者における 抗原特異的細胞障害性T細胞のT細胞受容体β鎖可変領域レパトワの解析

岩谷 俊平<sup>1)</sup>・成田美和子<sup>1)</sup>・増子 正義<sup>2)</sup>・西澤 幹則<sup>1)</sup>・大岩 恵理<sup>1)</sup>・柴崎 康彦<sup>2)</sup>  
内山 孝由<sup>1)</sup>・柴崎 康彦<sup>2)</sup>・瀧澤 淳<sup>2)</sup>・曾根 博仁<sup>2)</sup>・高橋 益廣<sup>1)</sup>

**Key words** : WT1ペプチドワクチン, CML, 細胞傷害性T細胞(CTL), T細胞受容体(TCR), β鎖可変領域(Vβ)レパトワ

**要旨** 抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)は抗腫瘍免疫療法において重要な役割を担っている。微量残存CML細胞を根絶するため、imatinib療法を4年間受けたCML症例にWT1ペプチドワクチンを投与した。混合リンパ球ペプチド培養(MLPC)を行い、WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の出現頻度の評価によって末梢血中のWT1特異的CTLの増幅効果の推移を確認した。その結果、WT1ペプチドワクチン投与を終了し6年経過した現在も、WT1特異的CTLはCD8陽性細胞中5-15x10<sup>6</sup>の頻度で検出され続けていることが確認された。

CTLの検出の検討に加えて、長期間増幅されたWT1特異的CTLのT細胞受容体β鎖可変領域(TCRVβ)のレパトワを8回の解析を試みた。MLPC後、CD8<sup>+</sup>T細胞中のWT1特異的CTLの割合が高いwellについてレパトワ解析を行った。WT1ペプチドワクチンやMLPCには単一の9merのペプチドを使用した。3種類のTCRVβの使用が見られた。

imatinibとWT1ペプチドワクチン併用療法はCML症例においてWT1特異的CTLを長期間持続させる点で有効であることが確認された。さらに、本研究では、WT1特異的CTLにおいてはoligoclonalなTCRVβが使用されている可能性が示唆された。

### 緒言

抗原特異的CTLを体外あるいは体内で増幅することで腫瘍量が減少することは明らかにされてきているが、殆どの症例は腫瘍量の多い末期例であり、ヒトを対象とした場合、CTLの長期的増幅の有無、長期的な臨床効果や抗腫瘍免疫に直接関わったCTLの詳細な性格や機能に関する十分な解析は行われていない。

慢性骨髄性白血病(CML)は、造血幹細胞移植以外の治療では根治不可能な疾患であったが、本邦でも2001年にbcr/ablタンパクをターゲットとした分指標の治療薬(tyrosine kinase inhibitor:TKI)が導入され、TKI継続服用により90%以上の症例で細胞遺伝学寛解(cytogenetic remission)が得られるようになり、さらには遺伝子学的寛解(molecular remission)、すなわちCML微量残存病変の根絶や服薬中止も期待できるようになった。しか

し、一部には、TKIを増量しても細胞遺伝学的寛解にも到達できない症例も存在し、このような症例にはTKI治療に併用できる副作用の少ない新たな治療法の開発が望まれている。

TKIの第一世代であるimatinibを用いて4年間継続治療されたが細胞遺伝学的寛解に到達できず、微量残存CML細胞を根絶することを目的として、WT1ペプチドワクチンを併用投与されたCML例について、我々は新潟大学血液内科との共同で効果判定の確認研究を継続している。

CML細胞に最も特異的に発現しているbcr/ablタンパクを標的とするワクチンの開発は、bcr/ablタンパクの分子量が大きくCTLを誘導するのに効果的な主要組織適合遺伝子複合体(MHC) class Iに親和性の高いペプチドを同定することが困難であること、さらに、細胞遺伝学寛解近くまで腫瘍量が減少している場合、感度

1) 新潟大学大学院保健学研究科 血液・腫瘍検査学  
2) 新潟大学医歯学総合病院 内分泌・代謝・血液内科  
平成27年7月30日受理

の高い腫瘍抗原をCTL誘導の標的とすることが望ましいことから、多くの腫瘍に対するCTL誘導に最も適しているペプチドのひとつであるWT1ペプチドが選択された。

WT1遺伝子は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子として発見された。白血病や固形腫瘍においても腫瘍関連遺伝子/抗原タンパクとして高発現していることが確認されている。本邦や欧米を中心としてWT1ペプチドワクチンやWT1ペプチドをパルスした単球由来樹状細胞を用いた樹状細胞療法の効果が報告されている<sup>1), 2)</sup>。

抗原特異的なCTLの誘導には、抗原提示細胞のMHC class I上に提示された抗原ペプチドをCD8<sup>+</sup>T細胞がT細胞受容体(TCR)によって認識することが必要である。CD8<sup>+</sup>T細胞のTCRは主に $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなり、いずれも可変部と定常部を持つ。可変部の中でも抗原ペプチドに対する特異性を決定する領域が相補性決定領域(CDR; complementarity-determining region)であり、variable(V), diversity(D), joining(J)遺伝子断片の遺伝子再構成によって形成されることで10<sup>11</sup>レベル以上の多様性を獲得し、種々の抗原に対応している<sup>3), 4)</sup>。

本研究では、新潟大学医歯学総合病院血液内科において、TKIの第一世代であるimatinib治療にWT1ペプチドワクチンの併用を行ったCML症例における抗腫瘍効果を評価した。臨床効果として残存CML細胞量(bcr/abl mRNA量)の末梢血単核球を用いた定量PCRによる測定を行った(血液内科研究室)。CTLの持続的誘導効果に関しては、リンパ球ペプチド混合培養法(MLPC)を用いて増幅したWT1特異的CTLをMHC tetramerを用いて検出し定量した。また、検出したWT1特異的CTLにおけるT細胞受容体 $\beta$ 鎖可変領域レパトワ(TCRV $\beta$ )を解析した。

## 材料と方法

### 症例

51歳男性。慢性骨髄性白血病慢性期(CML-CP; chronic myelocytic leukemia-chronic phase)の診断でイマチニブ400mg通常量の内服を開始した。末梢血bcr/abl mRNAのコピー数はRNA1 $\mu$ gあたり700前後まで減少したが、治療開始29ヶ月後に4000まで増加したためimatinibを600mgへ増量した。しかし、副作用としての貧血の進行、右下肢痛やCK値上昇などが出現し、36ヶ月後に400 mgへ戻した。末梢血bcr/ablコピー数は増量の効果にて低下傾向となり500前後まで減少した

が、治療開始後51ヶ月目に再度上昇に転じ1000程度まで増加した。imatinibのみで、治療目標のbcr/ablコピー数の細胞遺伝学的寛解レベル到達は困難と判断し、HLA-A\*24:02陽性であったことから、治療開始後57ヶ月目よりHLA-A\*24:02特異的改変型WT1ペプチドワクチンの併用を大阪大学のプロトコルに従って開始した。なお、本治療と検討は、新潟大学倫理委員会とIRBの承認、および本人の同意を得た後に施行された。

### WT1ペプチド投与

大阪大学のプロトコルに従い改変型WT1ペプチド(CYTWNQMNL)3mgをDMSOで溶解後、5%ブドウ糖液にて希釈し、Montanideを加えてemulsionを作成し、その1mgを上腕と大腿の2箇所皮下注射した。1から11回目は2週間間隔で、その後は4週間間隔で投与した。

### 混合リンパ球ペプチド培養(MLPC; mixed lymphocyte peptide culture)

末梢血を採取し、2500 rpm、20分の遠心により血漿を分離した。血漿にトロンビン(ミドリ十字, 大阪)を5 U/ml加え37°Cで1-2時間反応させた後、2500 rpm、20分遠心により血清を分離した。また、血漿分離時のinterfaceからLymphoprep(Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)を用いて単核球分離を行った。得られた単核球を3x10<sup>5</sup>個/wellになるように、penicillin / streptomycin (Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を加えたRoswell Park Memorial Institute-1640培養液(PMI1640; Life technologies)に浮遊させ、5%自己血清と改変型WT1ペプチド(CYTWNQMNL, NeoMPS, San Diego, CA, USA)10 $\mu$ g/mlを加えて、各wellあたり100 $\mu$ lずつを96well U-bottomプレートに敷き込んで培養を開始した。3日後にInterleukin-2(IL-2; シオノギ製薬, 大阪)50 U/mlを加えた培養液を100 $\mu$ l加え、その後は2-3日毎に上清を100 $\mu$ lずつIL-2を加えた培養液と交換した。培養開始後14日目に各wellについてフローサイトメトリーを用いて改変型WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が増幅され検出されるか否かについての解析を行った。末梢血中のWT1特異的CTL、すなわちWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の頻度は(WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>陽性細胞が検出されたwell)/(well当たりの培養単核球数×培養well数×CD8<sup>+</sup>細胞の割合)の計算式から算出した。

### フローサイトメトリーを用いたWT1/MHC-tetramer解析

MLPC後のwell中の全ての細胞を抗体染色した。Fc $\gamma$ レセプターブロック試薬、各種蛍光標識抗体を加え

## WT1ペプチドワクチン施行したCML患者における抗原特異的細胞障害性T細胞のT細胞受容体β鎖可変領域レパトワの解析

4℃, 20分間反応させ染色した。抗体は, fluorescein isothiocyanate(FITC)標識IgG1(BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD8(BioLegend, San Diego, CA, USA), phycoerythrin(PE)標識改変型WT1/MHC-tetramer (HLA-A\*24:02 WT1 mutant tetramer- CYTWNQMNL, 医学生物学研究所,長野), HIV tetramer(Lot No.110d A\*24:02-HIV-1 env-RYL-PE:RYLRDQQLL,がんセンター腫瘍免疫学部,愛知), PC5標識CD8(Beckman Coulter, Marseille, France)を使用した。染色後, PBSで1回洗浄し, FACSCalibur(BD Biosciences)で測定し, データはCellQuest software(BD Biosciences)で解析した。

### TCRVβレパトワ解析

Tetramer解析の結果から, CD8<sup>+</sup>T細胞中におけるWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が高いwellの細胞をさらに1週間培養した。1週間後, それぞれのウェルの細胞を2つのウェルに分けて, さらに1週間培養した。次いで, 分離培養を行った細胞を48ウェルプレートの1つのウェルにまとめて播種し, さらに1週間培養した。増殖培養後, 培養細胞のtetramer解析を行い, 検出可能なWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞を含む培養細胞についてTCRVβレパトワ解析を行った。WT1特異的CTLの検出にperidinin Chlorophyll Protein-Cyanin 5.5(PerCP-Cy5.5)標識CD8 (Biolegend), allophycocyanin(APC)標識mWT1/MHC tetramer(Medical & Biological Laboratories)を使用し, 解析にはIOTest Bet Mark TCRVβ Repertoire Kit(Beckman Coulter)を用いて, 付属プロトコルに従った。

### 結果

#### MLPCによるWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>細胞の検出

末梢血単核球をWT1ペプチドと共培養せず直接染色した場合はWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は極めて小数で, frequencyの継時的解析を行うにはMLPCを用いた解析の方が優れていた(図1)。なお, ペプチドワクチン治療開始前の末梢血を用いたMLPCでは tetramer陽性wellは認められなかった。MLPC後の各wellの細胞について, WT1特異的T細胞が増幅したか否かを確認し, 明らかにWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出されたwellを陽性wellとしてその割合を算出した(図2)。ワクチン投与2回目以降から, WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出され, WT1ペプチドワクチン投与を終了し6年経過した現在でも末梢血中のCD8陽性細胞中5-15x10<sup>-6</sup>の頻度で検出されている。

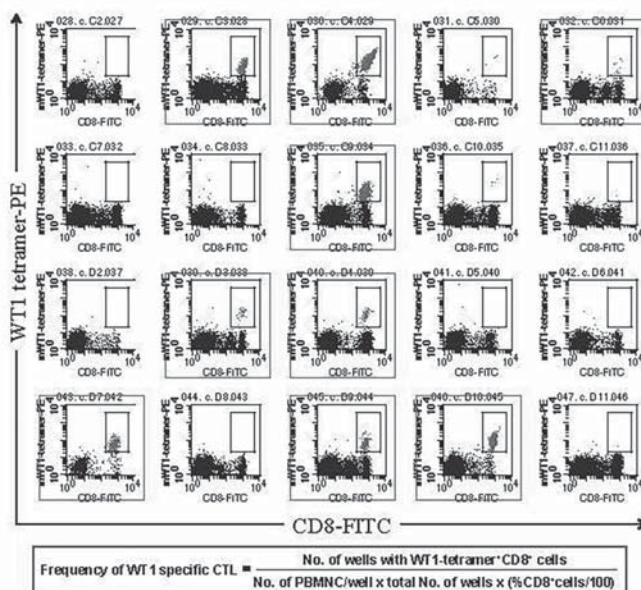


図1. MLPCを行った各wellのWT1/MHC-tetramer解析。

WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出されたwellを陽性wellとしてその出現頻度を算出した。

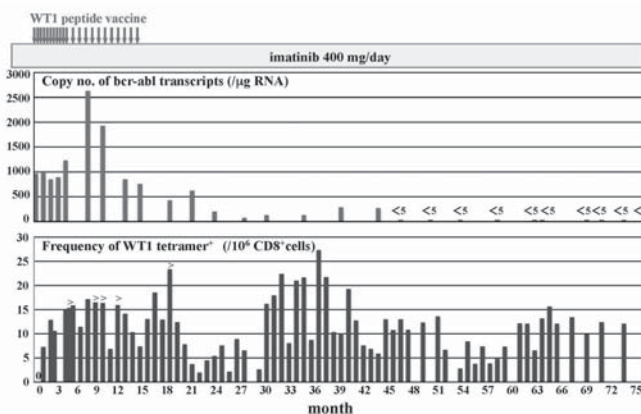


図2. WT1ペプチドワクチン投与後の経過, bcr-abl mRNAコピー数の変化とWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の出現頻度の推移。

#### MLPCにより誘導したWT1特異的CTLのTCRVβレパトワ解析

CML症例より分離した末梢血単核球を用いてMLPC開始前のCD8<sup>+</sup>細胞のTCRVβレパトワ解析を行った(図3)。培養前の細胞では, 本検討で調べた24種類のTCRVβ遺伝子を様々な割合で使用しており, 健康人コントロールと差は認められなかった。

MLPC法による培養後, CD8<sup>+</sup>T細胞中におけるWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が高いウェルにおいてTCRVβレパトワ解析を行なった(図4)。MLPCにより

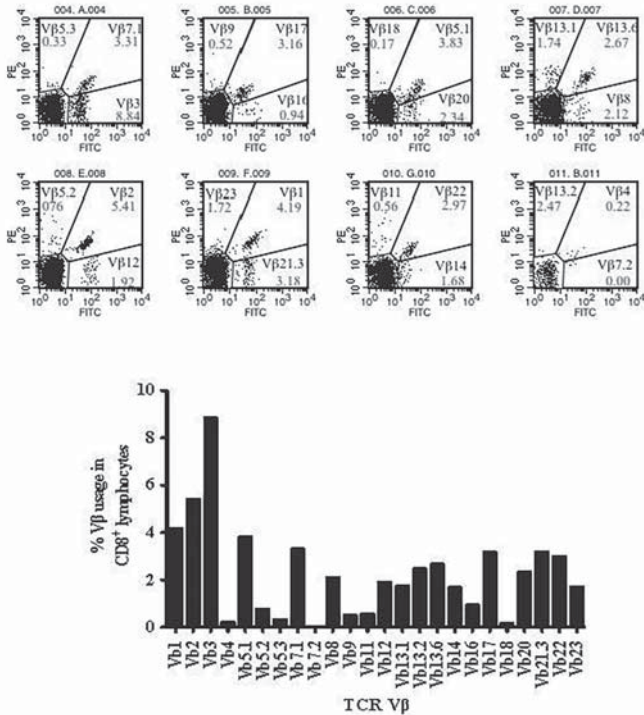


図3. CML症例より分離した末梢血単核球中のMLPC前のCD8<sup>+</sup>細胞のTCRVβレパトワ解析。

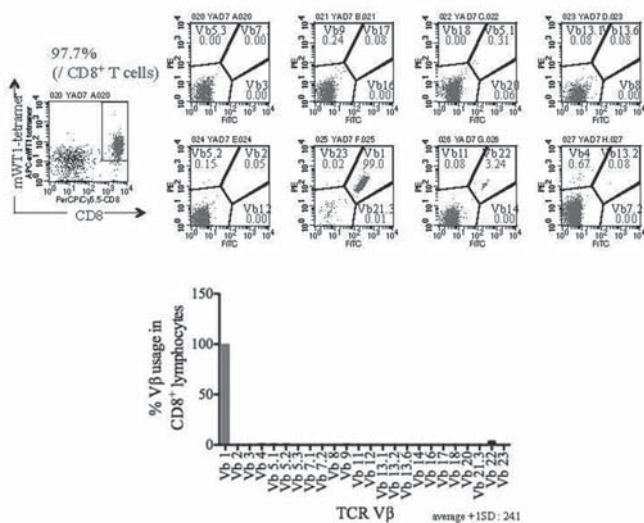


図4. MLPC法による培養後のCD8<sup>+</sup>T細胞中におけるWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が高いウェルにおけるTCRVβレパトワ解析。

誘導されたWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞においてはmonoclonalなTCRVβ遺伝子の使用が見られた。このことにより、MLPC法が1種類のCTLを増幅するに適した培養法であることも確認された。同様の検討を8ウェルで行い、それぞれの解析で得られたTCRVβ遺伝子の使用頻度をまとめた(図5)。解析を行った8ウェルすべてにおいて個別にはmonoclonalなTCRVβ遺伝

子の使用が確認されたが、TCRVβ 5.1だけではなく、TCRVβ 1および7.1が使用されていることが明らかとなった。

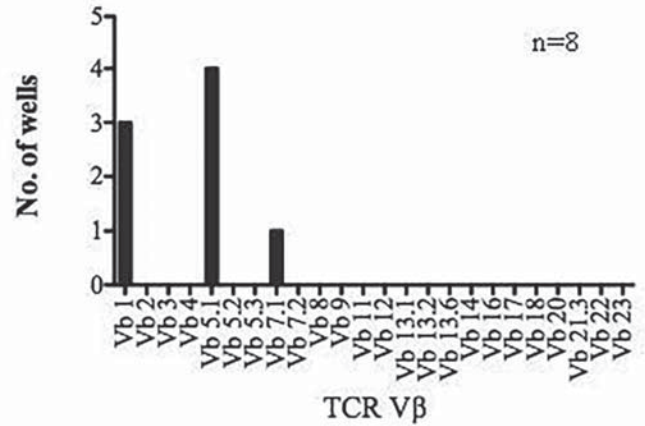


図5. MLPC法による培養後のCD8<sup>+</sup>T細胞中におけるWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が高いウェルにおけるTCRVβレパトワ解析を8ウェルで行い、それぞれの解析で得られたTCRVβ遺伝子の使用頻度をまとめた。

### 考察

WT1遺伝子はWilms腫瘍の原因遺伝子として発見され、白血病や各種固形腫瘍で高発現していることが確認されている<sup>5),6)</sup>。WT1タンパクのアミノ酸配列の中でもヒトのHLA-A\*24:02分子との結合能が高い9個のアミノ酸配列のペプチドを用いることでin vitroにおいてHLA-A\*24:02拘束性の細胞傷害活性を有するWT1特異的CTLが誘導可能であることが報告された<sup>7)</sup>。また、HLA-A\*24:02に対する結合力は野生型WT1ペプチド(CMTWNQMNL)に比べ2番目のメチオニン(M)をチロシン(Y)に置換した改変型WT1ペプチド(CYTWNQMNL)で強く、固形腫瘍例に対する改変型WT1ペプチドワクチンの安全性と体内のWT1特異的CTLの増幅が報告されていたことから、本症例に投与するWT1ペプチドワクチンとしては改変型WT1ペプチドが選択された<sup>8),9)</sup>。改変型ペプチドワクチンによって実際に体内で増幅されたCTLが野生型WT1ペプチドを提示している細胞に対しても特異的細胞傷害性を示すことは、本研究室においても既に確認し報告済みである<sup>10)</sup>。

末梢血中のWT1特異的CTLは非常に少なく、tetramerを用いた末梢血単核球を直接染色する方法で正確に定量しその出現頻度を長期間観察することは難しい。我々は、MLPC法を用いることによって末梢血中WT1

## WT1ペプチドワクチン施行したCML患者における抗原特異的細胞障害性T細胞のT細胞受容体β鎖可変領域レパトワの解析

特異的CTLの頻度を正確に算出することが可能であることを確認してきた<sup>11)</sup>。この方法で本症例のCTLを4週間毎に追跡した結果、22回のWT1ペプチドワクチン終了から6年以上経過してもWT1特異的CTLはワクチン投与期間中と同程度の頻度で存在していることが確認された。

腫瘍や感染症における抗原とそれを認識するCTLの関係については、まず、抗原提示細胞のMHC class Iに8-10merのペプチドが提示され、そのペプチドがリンパ節などの抗原情報提示の場においてCD8陽性T細胞のTCRに認識されることから始まる。このペプチドを認識できるTCRを有するCD8陽性T細胞の中で抗原認識のシグナルが核内に伝達されることにより、活性化や増幅がおこる。活性化されたCD8陽性T細胞は、リンパ節を出て、標的である腫瘍細胞や感染細胞の表面に提示された大量の抗原ペプチドの中から、抗原提示細胞から指示を受けた8-10merのペプチドを認識し、この抗原への特異的な細胞傷害活性を開始する。すなわち、樹状細胞に代表される抗原提示細胞によって提示された一種類のアミノ酸配列のペプチドを認識できるTCRは一種類であると考えられてきた。一方、最近、ペプチドのアミノ酸配列の一つを他のアミノ酸に置換することによって、TCRとの新和性が増強可能であることも判明してきているが、MHCおよびTCRによる抗原認識機構については、未だ解明されていない点が多いと思われる。

腫瘍抗原特異的CTLにおけるTCRVβレパトワ解析や腫瘍抗原特異的TCR遺伝子を用いた免疫療法の臨床試験はいくつか報告されている<sup>12),13)</sup>。HLA\*A24:02陽性例に対するWT1ペプチドに関しては、TCR遺伝子導入を用いたCTL増幅の報告には、従来in vitroのCTL増幅実験系において確認されたVβ5.1のTCR遺伝子が用いられており、in vitroの実験系およびマウスを用いた検討において確実な細胞傷害性が認められている<sup>14)</sup>。一方、in vivo研究の方面からは、HLA\*A24:02陽性腫瘍患者におけるWT1特異的CTLをtetramerを用いて回収し、single cell DNA解析によって、TCRVβの偏り、すなわち、単一のTCRが用いられていることの確認を試みた報告が出されたが、結論として複数のTCRが確認され、TCRの使用され方は健康人と差が認められなかったという結論となっている<sup>15),16)</sup>。

我々は、MLPC法を用いて、WT1ペプチド (CYTWNQMN) ワクチンによって体内で誘導されたCYTWNQMNのみを認識するCTLを一個から増幅し、その単一CTL集団の有するTCRをFACSによって解明すると

いう検討を試みた。上記の2種類の報告と異なる点は、ヒトの体内で一定のペプチドによって長期間誘導され細胞傷害活性も証明されているCTLを純化しin vitroで増幅し目に見える形で解析したという点である。その結果、これまで確認されてきたTCRVβ5.1以外のTCRも使用されていることが明らかとなった。

本検討同様の結果が、他のWT1を高発現する腫瘍から各種治療によって回復した症例においても認められる現象か否かを本研究室独自の方法によって解析すること、TCRVβ5.1以外のTCRを有するCTLにもTCRVβ5.1を有するCTLと同等の抗原特異的細胞傷害活性が認められることを証明すること、さらに、DNAレベルでもTCRVβの配列の差が存在することの確認などが今後の研究目標である。

## 引用文献

- 1) Miyatake T, Ueda Y, Morimoto A, et al. WT1 peptide immunotherapy for gynecologic malignancies resistant to conventional therapies: a phase II trial. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(3):457-63.
- 2) Coosemans A, Vanderstraeten A, Tuyaerts S, et al. Wilms' Tumor Gene 1 (WT1) - loaded Dendritic Cell Immunotherapy in Patients with Uterine Tumors: A Phase I/II Clinical Trial. *Anticancer Res.* 2013;33(12):5495-500.
- 3) Davis MM, Bjorkman PJ, et al. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* 1988;334(6181):395-402.
- 4) Hawse WF, De S, Greenwood AI, et al. TCR scanning of peptide/MHC through complementary matching of receptor and ligand molecular flexibility. *J Immunol.* 2014;192(6):2885-91.
- 5) Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 1990;60(3):509-20.
- 6) Gessler M, Poustka A, Cavenee W, et al. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature.* 1990;343(6260):774-8.
- 7) Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S, et al. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood.* 2000;95(1):286-93.
- 8) Maier R, Falk K, Röttschke O, et al. Peptide motifs of HLA-A3, -A24, and -B7 molecules as determined by pool sequencing. *Immunogenetics.* 1994;40(4):306-8.
- 9) Kondo A, Sidney J, Southwood S, et al. Prominent roles of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A24 human class I molecules. *J Immunol.* 1995;155(9):4307-12.
- 10) Saitoh A, Narita M, Watanabe N, et al. WT1 peptide vaccination in a CML patient: induction of effective cytotoxic T lymphocytes and significance of peptide administration interval. *Med Oncol.* 2011;28(1):219-30.
- 11) Narita M, Masuko M, Kurasaki T, et al. WT1 peptide vaccination in combination with imatinib therapy for a patient with CML in the chronic phase. *Int J Med Sci.* 2010;7(2):72-81.
- 12) Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, et al. T-cell receptor gene therapy

targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/ $\gamma$  cnull mice. *Cancer Sci.* 2012;103(1):17-25.

- 13) Hiasa A, Hirayama M, Nishikawa H, et al. Long-term phenotypic, functional and genetic stability of cancer-specific T-cell receptor (TCR) alphabeta genes transduced to CD8+ T cells. *Gene Ther.* 2008;15(9):695-9.
- 14) Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, et al. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood.* 2011;118(6):1495-503.
- 15) Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, et al. Biased usage of T cell receptor  $\beta$ -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8+ T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci.* 2012;103(3):408-14.
- 16) Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, et al. Biased usage of BV gene families of T-cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific CD8+ T cells in patients with myeloid malignancies. *Cancer Sci.* 2010;101(3):594-600.

## The usage of T cell receptor $\beta$ -chain variable region of WT1 specific Cytotoxic T lymphocytes in CML patient treated WT1 peptide vaccination

Shunpei IWAYA<sup>1)</sup>, Miwako NARITA<sup>1)</sup>, Masayoshi MASUKO<sup>2)</sup>, Yoshinori NISHIZAWA<sup>1)</sup>, Tori IDA<sup>2)</sup>  
Eri OIWA<sup>1)</sup>, Yasuhiko SHIBAZAKI<sup>2)</sup>, Takayoshi UCHIYAMA<sup>1)</sup>, Hirohito ONE<sup>2)</sup>, Masuhiro TAKAHASHI<sup>1)</sup>

1) Graduate School of Health Sciences, Niigata University

2) Niigata University Medical and Dental General Hospital, Niigata, Japan

*Key words* : WT1, TCR, CTL

**Abstract** Antigen specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play an important role in cancer immunotherapy. To eradicate tumor cells, we administrated WT1 peptide vaccine for a CML patient who was being treated imatinib therapy. The appearance of WT1 specific CTLs in peripheral blood was confirmed by evaluating the frequency of MHC/WT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells by using mixed lymphocyte peptide culture (MLPC) system. After the cessation of vaccination, WT1 specific CTLs remained at the level of  $5-15 \times 10^{-6}$  in CD8<sup>+</sup> T cells, which is lasting thereafter for 6 years. These cells showed cytotoxicity against WT1 peptide with MHC class I restricted.

In order to identification of T cell receptor  $\beta$ -chain variable region (TCRV  $\beta$ ) in CML patient received WT1 peptide vaccine, We also investigated the usage of T CV  $\beta$  of WT1 specific CTLs. MLPC cells with high proportion of CD8<sup>+</sup> WT1 tetramer<sup>+</sup> T cells were assessed for TCRV  $\beta$  usage by using TCRV  $\beta$  gene family specific monoclonal antibodies and flow cytometry. Cells from each well cultured by MLPC showed various types of TCRV  $\beta$  repertoires from well to well.

WT1 peptide vaccination for an imatinib pretreated CML patient is effective in terms of longterm generation of WT1 specific CTLs with cytotoxicity against WT1 peptide. The present study suggested that CTLs detected by MLPC possessed oligoclonal features of TCRV  $\beta$  gene used, but not identical. Taken together, CTLs induced by tumor antigen specific peptide are potent for antitumor immunity.

Accepted : 2015.7.30