学位論文

Doctor's Thesis

レシピエントと MHC を一部共有する マウス ES 細胞に由来する樹状細胞を用いた 抗腫瘍免疫の誘導

Anti-tumor immunity induced by dendritic cells derived from semi-allogeneic embryonic stem cells

福間　大喜

Daiki　Fukuma

指導教授

篠原 正徳　教授

熊本大学大学院医学教育部臨床医科学専攻顎口腔病態学

西村 泰治　教授

熊本大学大学院医学教育部生体医科学専攻免疫識別学

審査委員

ウイルス制御分野	滝口 雅文　教授
予防開発分野	岡田 誠治　教授
消化器内科学分野	佐々木 裕　教授
病態制御分野	松下 修三　教授

2007 年 3 月

目次

1　要旨 3
2　発表論文リスト 5
3　謝辞 7
4　略語一覧 8
5　研究の背景と目的 9
　5－1）HLA 分子による T 細胞への抗原提示 9
　　図 1　MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの $CD8^+$ 細胞傷害性 T 細胞(CTL)への提示 10
　　図 2　MHC クラスⅡ分子による抗原ペプチドの $CD4^+$ ヘルパー T 細胞への提示 12
　5-2）抗腫瘍免疫のあらまし 14
　　図 3　樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化 15
　5－3）樹状細胞と抗腫瘍免疫応答 16
　5－4）ES 細胞由来樹状細胞（ES-DC）を用いた免疫制御療法の開発 16
　　図 4　ES 細胞から樹状細胞を分化誘導するための in vitro 培養法 17
　　図 5　遺伝子改変胚性幹（ES）細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強 18
　　図 6　ES-DC の形態 18
　5－5）Serine proteinase inhibitor 6(SPI6）について 19
　5－6）本研究の目的 19
6　実験方法 20
　6－1）マウス 20
　6－2）使用した細胞 20
　6－3）マウス骨髄細胞由来樹状細胞（BM-DC）の作製 20
　6－4）ペプチドとサイトカイン 20
　6－5）マウス ES 細胞由来の樹状細胞（ES-DC)の作製 21
　6－6）in vivo における OVA 特異的 CTL の誘導と細胞傷害活性の測定 21
　6－7）腫瘍増殖抑制実験 21
　6－8）プラスミドの作製 21
　6－9）OVA と SPI6 を共発現する ES-DC の作製 22
　6-10）Western blot 解析 22
　6-11）　統計学的解析 22
7　実験結果 23
　7－1）シンジェニックあるいはセミアロジェニックマウスへの ES-DC 腹腔内投与による OVA 抗原特異的な CTL の誘導 23
　　図 7　シンジェニックあるいはセミアロジェニックマウスへの ES-DC 腹腔内投与による OVA 抗原特異的な CTL の誘導 24
　7－2）セミアロジェニックマウスにおける ES-DC-OVA による OVA を発現する腫瘍細胞の増殖抑制に関する予防効果 25

図８　セミアロジェニックマウスにおける ES-DC-OVA による OVA を発現する
腫瘍細胞の増殖抑制に関する予防効果 26

7-3）セミアロジェニックマウスにおいて、抗原遺伝子を発現する遺伝子改変 ES-DC は、
抗原ペプチドを負荷された BM-DC よりも効率良く抗原特異的 CTL を誘導する 27
図９　セミアロジェニックマウスにおける OVA ペプチドを負荷した DC と
OVA を発現する ES-DC による OVA 特異的 CTL 誘導能の比較 28
7-4）OVA と SPI6 を発現する ES-DC による抗原特異的 CTL 誘導能の増強 28
図 10 セミアロジェニックマウスにおける OVA と SPI6 を発現する
ES-DC による効率の良い OVA 特異的 CTL の誘導 30
8　考察 31
9　結語 35
１０ 参考文献 36

1　要旨

【背景】 我々は、マウスの胚性幹（ES）細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行い、これをin vitroにおいて樹状細胞（ES-DC）に分化誘導し、遺伝子改変樹状細胞を作製する技術を開発している。さらに腫瘍抗原遺伝子を発現させたES-DCをマウスへ投与することにより、当該腫瘍抗原に特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）、ならびに当該抗原を発現する腫瘍細胞に対する拒絶効果が誘導されることを報告してきた。一方で、ES-DCの臨床応用に際しては、ES細胞とレシピエント間のヒト主要組織適合遺伝子複合体（HLA）を始めとした、組織不適合性による拒絶反応が問題となる。

【目的】 本研究は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）をレシピエントと一部共有するセミアロジェニックES-DCを用いて、共有されたMHCに拘束されたT細胞応答を惹起し、抗腫瘍免疫を誘導することが可能であるか否か検討することを目的とする。さらに遺伝子改変を行ったアロES-DCが、アロ反応性T細胞による細胞傷害から逃れて抗原提示を行うことにより、その効果をさらに増強することができるか否かを、マウスモデルを用いて検討する。

【方法】 ES細胞（TT2株）からモデル腫瘍抗原として卵白アルブミン（OVA）単独、あるいはOVAと、CTLが産生する細胞傷害性分子であるGranzyme Bの特異的な阻害分子であるSerine protease inhibitor （SPI6）を共発現するES-DCを誘導した。この遺伝子改変ES-DCをTT2と同系の（CBA x C57BL/6）F1（CBF1）マウス（H-$2^{k/b}$）、およびH-2^{b}ハプロタイプを共有するセミアロジェニックな関係のC57BL/6マウス（H-2^{b}）、あるいは(BALB/c x C57BL/6) F1 (BBF1)マウス（H-$2^{d/b}$）の腹腔内へ投与した。その後、脾細胞中におけるH-2K^{b}に拘束されたOVA抗原特異的なCTLの誘導の有無を、^{51}Cr放出試験を用いて解析した。さらに、同様にOVA抗原を発現するES-DCをマウスの腹腔内へ投与した後、OVAを発現するC57BL/6マウス由来の腫瘍細胞（MO4）を皮下移植し、腫瘍の増殖とマウスの生存期間を観察した。

【結果】 OVAを発現するTT2由来ES-DCを投与することにより、同系のCBF1マウス、およびセミアロジェニックなC57BL/6マウス、あるいはBBF1マウスのいずれにおいても、H-2K^{b}に拘束されたOVA抗原特異的なCTLを誘導できた。さらに、このES-DCを投与されたCBF1マウスおよびC57BL/6マウスでは、MO4の増殖が明らかに抑制され、生存期間が有意に延長した。またその効果は、ES-DCにSPI6を共発現させることにより有意に増強された。

【考察】 MHCを一部共有するアロES-DCの投与により、レシピエントマウスに共有されたMHCクラスⅠ分子に拘束されたモデル腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを活性化し、抗腫瘍免疫応答を誘導することが可能であった。HLA対立遺伝子は各民族集団によって遺伝子頻度が異なり、中でもHLA-A24は日本人集団で約60％が陽性であることが報告されている。このような各民族集団中で遺伝子頻度が高いHLAを有するヒトアロES-DCを用いた、抗腫瘍ES-DCワクチンの実用化の可能性が示唆された。

【結論】 マウスにおいて MHC をレシピエントと一部共有するアロ ES-DC を用いて、共有された MHC に拘束されたモデル腫瘍抗原特異的 CTL を誘導することが可能であり、腫瘍増殖抑制ならびに生存期間の延長を誘導することが可能であった。さらに Granzyme B の特異的な阻害分子である SPI6 を遺伝子導入することにより、その効果はさらに増強された。

Summary

Purpose: We recently established a novel method for the genetic modification of dendritic cell (DC). In the method, we generated DC from mouse embryonic stem (ES) cells by in vitro differentiation. The capacity of ES cell-derived DC (ES-DC) to simulate T cells was comparable to that of DC generated in vitro from bone marrow (BM) cells (BMDC). On the other hands, in the future clinical application of this technology, we will face the problem of histoincompatibility between patients to be treated and the ES cells as source of DC. In the present study, we tested whether the transferred semi-allogeneic ES-DC can activate antigen-specific CTL restricted to the shared MHC class I molecules before they are eliminated by allo-reactive CTL.

Experimental design: We established OVA-transfectant ES-DC derived from TT2 ES cells (H-$2^{k/b}$) and OVA, Serine Proteinase Inhibitor 6(SPI6)-double-transfectant. We adoptively transferred OVA-expressing ES-DCs to semi-allogeneic C57BL/6 mice(H-2^{b}) and examined whether or not they could activate OVA-specific CTL restricted to the shared MHC class I and elicit protective immunity against tumor cells expressing OVA.

Results: We observed that OVA-expressing ES-DC transferred into semi-allogeneic mice potently primed OVA-specific CTL restricted by the shared MHC class I and elicited a significant protection against challenge with OVA-expressing tumor and plolonged survisal rate. In addition, these effects were enhanced by overexpression of SPI6 by ES-DC.

Conclusion: These results suggest the potential of allogeneic ES-DC as a novel means for anti-cancer immunotherapy.

2　発表論文リスト

1. **Fukuma D,** Matsuyoshi H, Hirata S, Kurisaki A, Motomura Y, Yoshitake K, Shinohara M, Nishimura Y and Senju S. Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. ***Biochem. Biophys. Res. Comm.*** 335: 5-13, 2005.

2. Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Kurisaki A, Uemura Y, Nishimura Y* and Senju S* (*equal contribution) Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis: Preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. ***J. Immunol.*** 178: 918-925, 2007.

3. Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, Fukuma D, Yokomine K, Harao M, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, Sato N, Baba H and Nishimura Y.Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. ***Clin Cancer Res.*** 12:2689-97,2006.

4. Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, Matsuyoshi H,Hirata S ,Monji M, Komori H, Fukuma D, Baba H and Nishimura Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3,a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. ***Cancer Res.*** 66:2414-22,2006.

5. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Uemura Y and Nishimura Y. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. ***J. Immunol.*** 174:1888-97, 2005.

6. Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake K, Motomura Y, Fukuma D, Kurisaki A, Nakatsura T, Nishimura Y and Senju S. Therapeutic effect of a-galactosylceramide-loaded dendriticcellsgenetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. ***Cancer Sci.*** 96:889-96 ,2005.

7. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, Yoshitake Y, Fukuma D, Motomura Y ,and Nishimura Y. Cancer immunotherapy by genetically modified embryonic stem cell-derived dendritic cells. ***Immunology 2004 (The proceeding of the 12th International Congress of Immunology, ed. By Skamene, E.) Medimond S.r.l. (Bologna, Italy)***, p487-491, 2004.

8. Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, Matsuyoshi H, Hirotake T, Hosaka S, Komori H, Fukuma D, Ikuta Y, Katagiri T, Furukawa Y, Itoh H, Shinohara M, Nakamura Y and Nishimura Y. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis. ***Clin Cancer Res.*** 10:6437-48,2003.

3　謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授に深く感謝いたします。また、当教室における研究の機会を与えて下さいました顎口腔病態学分野の篠原正徳教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授、平田真哉助手に深く感謝いたします。また、ヒトリコンビナント IL-2 を供与して頂いた株式会社「味の素」に深く感謝いたします。

4　略語一覧

BM-DC	; bone marrow cell-derived dendritic cell
cDNA	; complementary DNA
CTL	; cytotoxic T lymphocyte
DC	; dendritic cell
DNA	; deoxyribonucleic acid
ES cell	; embryonic stem cell
ES-DC	; embryonic stem cell-derived dendritic cell
GM-CSF	; granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HLA	; human histocompatibility leukocyte antigens
Ig	; immunoglobulin
IL	; interleukin
i.p.	; intraperitoneal injection
IRES	; internal ribosomal entry site
MHC	; major histocompatibility complex
mAb	; monoclonal antibody
mRNA	;messenger ribonucleic acid
neo-R	; neomycin resistant
OVA	; ovoalbumin
PEF	; primary embryonic fibroblast
PI9	; protease inhibitor 9
RT-PCR	; reverse transcription-PCR
s.c.	:subcutaneous injection
SPI6	; serine protease inhibitor 6
TCR	; T cell receptor

5　研究の背景と目的

5-1）HLA 分子による T 細胞への抗原提示

主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex: MHC ）によりコードされる MHC 分子は、細胞内で抗原が分解されてできたペプチドを分子の先端に結合して細胞表面に発現する。T 細胞は抗原を直接認識することはできず、細胞表面に発現する抗原ペプチドと MHC 分子を複合体として認識する。MHC 分子にはクラス I とクラス II の 2 種類があり、それぞれ細胞内での局在が異なる抗原に由来するペプチドを機能の異なる T 細胞に提示して活性化を促す(1)。ヒトの MHC は白血球の血液型として発見されたために、ヒト組織適合性白血球抗原(human histocompatibility leukocyte antigen; HLA)系と呼ばれる。

$\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプター (TCR)を発現する T 細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞(CTL）は、HLA クラス I 分子に結合する性質を持つ CD8 分子を発現する。HLA クラス I 分子は主に核や細胞質の蛋白質に由来するペプチドを結合して、すべての有核細胞と血小板の表面に発現する。CTL は TCR を介して自己の HLA クラス I 分子に結合した、ウイルスあるいは細菌などの非自己蛋白質に由来するペプチドを認識して感染細胞を破壊する。さらに、腫瘍細胞の表面に発現する HLA クラス I 分子に結合した自己あるいは非自己ペプチドを認識した CTL は腫瘍細胞を破壊する(2)。また HLA クラス I 分子は、特定のウイルスあるいは細菌に感染した細胞、あるいは腫瘍細胞を破壊する性質をもつナチュラルキラー（NK）細胞のレセプターである、KIR（killer-cell inhibitory receptors）に結合し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する（図 1C）(3)。

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム（proteasome）あるいは LMP（large multifunctional protease）と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体によりエネルギー（ATP）依存性に分解されてできたものである(4, 5)。最近、細胞質内で新規に産生された蛋白質のうち 30%にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing）分子により、エネルギー（ATP）依存性に小胞体の内腔へと導かれ、そこで HLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する（図 1）(6)。

図 1

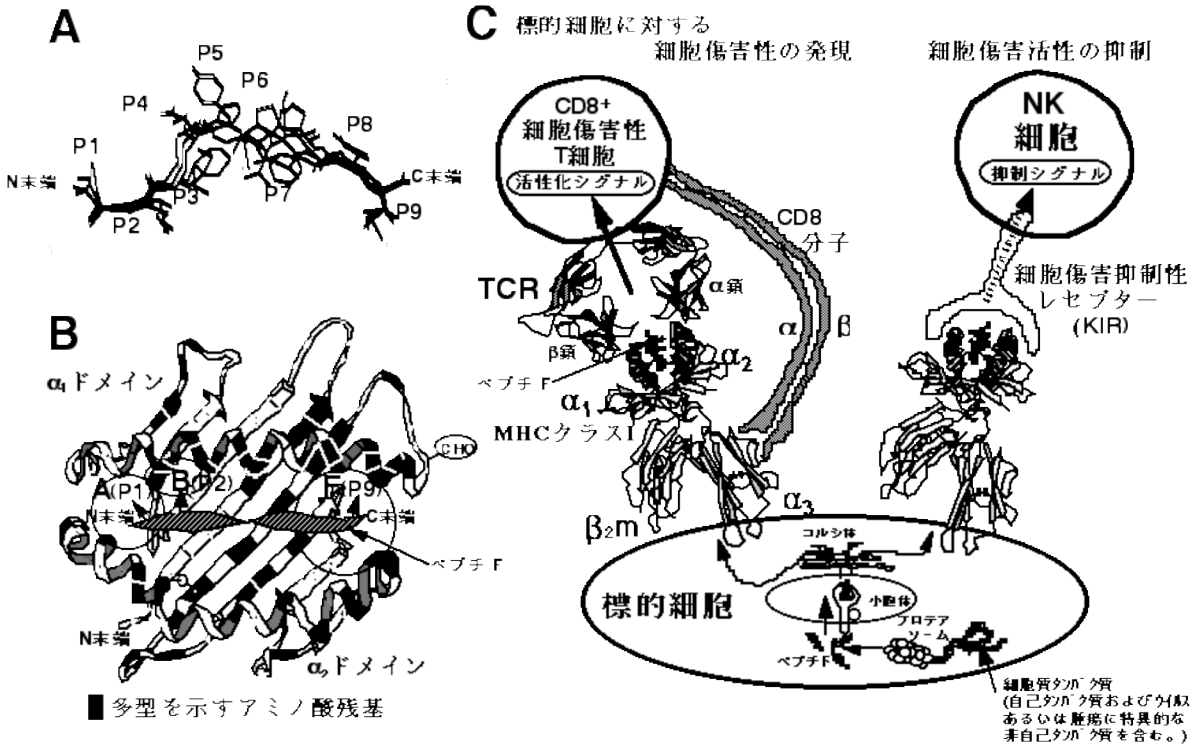

図 1. MHC クラスⅠ分子 による抗原ペプチドの CD8+ 細胞傷害性Ｔ細胞 (CTL)への提示

A. MHC クラス Ⅰ (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1~P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端)のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス Ⅰ のペプチド収容溝にある３つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基(P3~P7)の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス Ⅰ (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する２つのαヘリックス(右巻きラセン)構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、( ) 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス Ⅰ (ヒトの HLA クラス Ⅰ) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。C. MHC クラス Ⅰ により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。α1, α2, α3 および β 2m は、それぞれ MHC クラス Ⅰ の細胞外ドメインおよびβ2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター(killer-cell inhibitory receptor)を表す。

このペプチド収容溝には、A～F ポケットと呼ばれる 6 個のポケットが存在する。MHC クラス I 結合ペプチドは 9 個のアミノ酸（N 末端側より position-1(P1)～P9 と呼ばれる。）により構成されていることが多く、ペプチドは溝の両端からはみ出すことなく納まっている（図 1A, B）(7-10)。MHC クラス I 分子で多型を示すアミノ酸残基の多くは、分子の先端にあるペプチドを収容する溝を構成するα1 およびα2 ドメインに集中している。このような多型によりペプチド収容溝の形状が変化するため、MHC クラス I 分子に結合可能なペプチドの構造も MHC クラス I 分子ごとに、ペプチドのNあるいはC末端寄りのアミノ酸には一定の傾向（MHC クラス I 結合モチーフ）が認められる(10)。これらのアミノ酸の側鎖はペプチド収容溝の左端あるいは右端に位置する、それぞれA(P1)、B(P2)あるいはF(P9)ポケットに収容される（図 1B）(6, 11)。これらのポケットとカッコ内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性（親水性あるいは疎水性）および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドは MHC クラス I に結合する。MHC クラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖が TCR により認識される。この状況は特にアミノ酸の数が 10 個以上のペプチドで顕著である。

一方、CD4 分子を発現する T 細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞（antigen presenting cell; APC）に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインは B 細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T 細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして､細胞内の微生物の排除を促進する。抗原提示細胞は HLA クラス I 結合性ペプチドの提示のみならず、HLA クラス II 分子により提示される抗原のプロセッシングと提示という重要な機能を担っている。

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドは MIIC（MHC class II compartments）や CIIV（class II vesicles）と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い 10～30 数個（多くは 15 個前後）のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している(12, 13)。

図 2

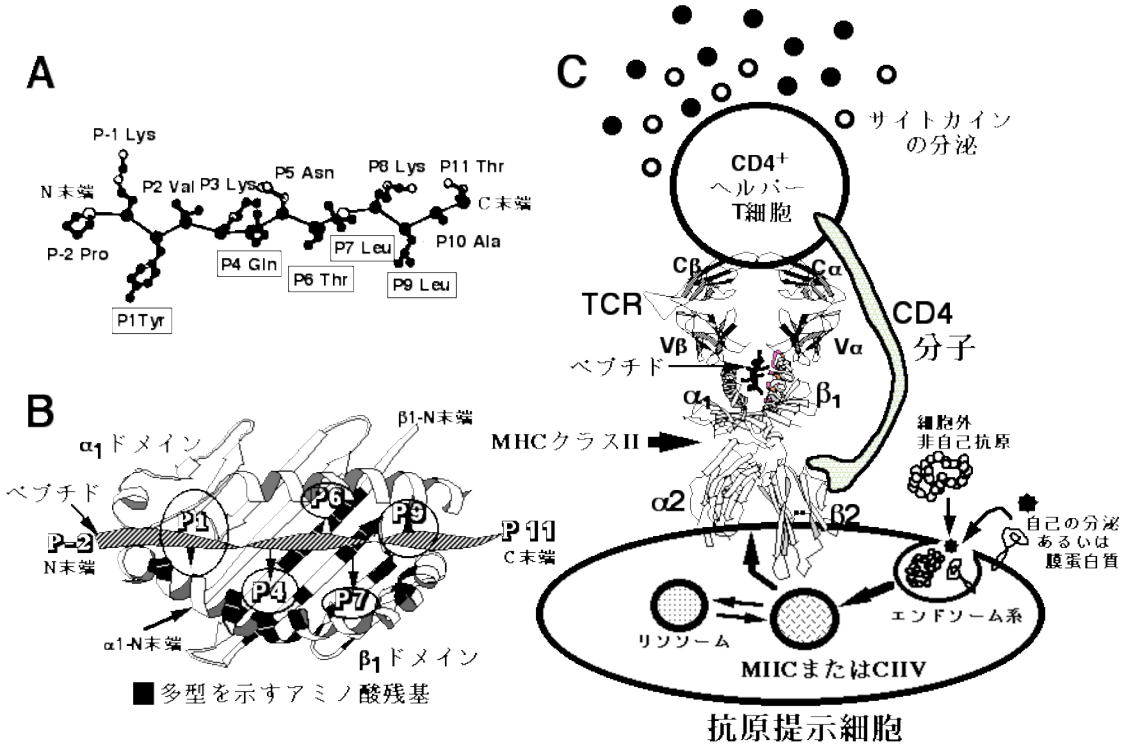

図 2. MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパーT 細胞への提示

A．MHC クラス II 分子 (HLA-DR1)により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子 のペプチド収容溝の５個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子は MHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子は MHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。B．HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上（ＴＣＲ側）より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な５個のアンカーアミノ酸残基（P1, P4, P6, P7 および P9）の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するするポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C．細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺T細胞に提示される様子を示す。α1,α2,β1 およびβ2 は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分のα,βは TCR のα鎖とβ鎖を、またＣとＶは定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の（通常 4 ～ 5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4 ～ 5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス II 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する(13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い（図 2A, B)。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジーの状態になるなどして免疫寛容（トレランス）の状態にあり、応答を示すことはない。しかし、細胞表面に数千～数万個発現している HLA クラス I 分子のうちの数個～数十個が非自己抗原由来のペプチドを結合していると、CTL はこれを認識して細胞傷害活性を発現する。いっぽう抗原提示細胞表面の HLA クラス II 分子のうち数十～数百個が非自己抗原をペプチドを結合すると、CD4 陽性ヘルパー T 細胞がこれを認識して免疫応答を開始する。

5-2）抗腫瘍免疫のあらまし

「悪性腫瘍に対して免疫系の応答は有効か」という疑問に対する、現時点での答えは以下のとおりであろう。腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)中に腫瘍に反応性のＴ細胞が多いこと、癌患者の末梢血に腫瘍抗原に対する免疫応答が検出されることなどから、免疫系は腫瘍と戦ってはいるが、腫瘍を排除するには至ってない。

従来の免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答のなかに抗腫瘍効果を期待したものであった。これに対し近年は、腫瘍に特異的な免疫応答をいかに増強するかが研究の焦点となっている。この分野では 1）HLA により提示される腫瘍拒絶抗原ならびにペプチドの同定、および 2）これを認識するＴ細胞の活性化方法の開発、が重要な問題となっている。近年の基礎免疫学の進歩により多くの腫瘍拒絶抗原が発見され、Ｔ細胞活性化のメカニズムも次第に明らかとなり、腫瘍免疫学は新しい局面を迎えつつある。

前述したように腫瘍拒絶抗原が細胞内でペプチドへと分解され HLA クラスⅠ分子により腫瘍細胞の表面に発現されると、主に CTL がこれを認識し腫瘍細胞を傷害する。ただし多くの腫瘍細胞は抗原を一度も認識したことのないナイーブＴ細胞の活性化に不可欠な CD80(B7-1)/CD86(B7-2)などの共刺激分子を発現しておらず、直接 CTL を活性化することは出来ない。図 3 に示したように CD80/86 分子を発現する最もすぐれた抗原提示細胞である樹状細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパーＴ細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブＴ細胞が活性化されてエフェクターＴ細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくても T 細胞レセプター（TCR）が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、Ｔ細胞はこれを認識して免疫応答を示す(14)。この際に CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパーＴ細胞は IL-2, IFN-γ, TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、Ｔ細胞、Ｂ細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する（図 3)。活性化されたＢ細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

図 3

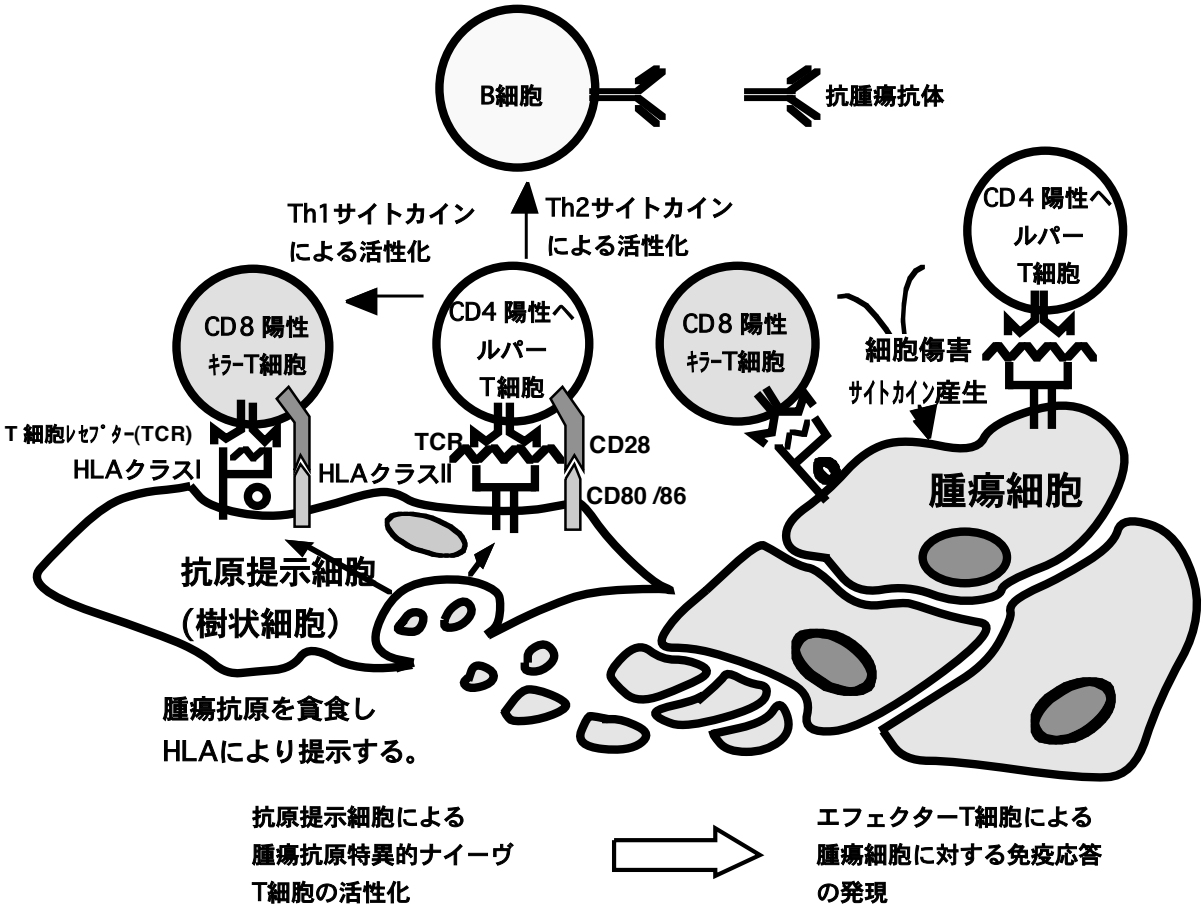

図 3．樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

腫瘍細胞それ自体は、ナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80/86 などの分子を発現していないことが多い。腫瘍抗原を貪食した樹状細胞は、これらをペプチドに分解し、HLA クラス I あるいは HLA クラス II 分子と結合した形で細胞表面に提示する。この HLA とペプチドの複合体を CD8 陽性ナイーブキラーT 細胞あるいは CD4 陽性ナイーブヘルパーT 細胞が T 細胞レセプターを介して認識するとともに、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞上の CD80/86 分子と結合して活性化される。一旦活性化されたエフェクターT 細胞は CD80/86 を発現していない腫瘍細胞に対しても免疫応答を示すことができる。CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパーT 細胞は IL-2, IFN-γ, TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

5-3）樹状細胞と抗腫瘍免疫応答

樹状細胞（DC）は強力な抗原提示細胞であり、ナイーブな T 細胞を活性化できる唯一の細胞である。一方、DC は T 細胞を活性化するのみならず、状況に応じて積極的に免疫寛容を誘導することも報告されている(15, 16)。抗原を発現させた DC を生体内に投与することにより、当該抗原に特異的な T 細胞を効率良く活性化することが可能である。このため DC を用いた細胞療法は免疫療法、特に癌治療において有望な方法と考えられている。現在、癌抗原ペプチドをパルスした DC や癌抗原蛋白を発現させた DC を用いて、癌治療を行う臨床試験が多くの施設で行われている(17-20)。

Inaba らがマウス骨髄細胞から DC を誘導できることを報告(21)して以来、ヒトでは、臍帯血、骨髄 CD34 陽性細胞および末梢血 CD14 陽性細胞などが in vitro で DC を誘導するのに利用されている。現在このようにして誘導された DC が癌免疫療法に利用されている。我々は無限増殖能を有し、かつ複数の遺伝子の導入が可能である ES 細胞を DC の供給源として利用することを考えた。

5-4）ＥＳ細胞由来樹状細胞を用いた免疫制御療法の開発

近年、生体内において、主要な抗原提示細胞であるDC が、免疫応答を正または負の両方向へ制御する機能を有していることがわかっている。我々は、免疫応答の制御において中心的な働きを担っているDC の機能を遺伝的改変により修飾し、これを個体に投与することにより、個体の免疫応答を制御することができるのではないかと考えた。すなわち、遺伝子導入により特定の抗原と免疫応答を正または負へ制御する分子を同時に発現する樹状細胞を作製し、これを生体に移入することにより、免疫応答を抗原特異的に制御できるのではないかと考えた。また、近年、ES 細胞から血液細胞を含む種々の細胞系譜へ分化誘導を行う方法が報告されていることから、ES 細胞からDC への分化を誘導する方法を開発できないかと考え実験した。その結果、生理的に存在するDC と同等の機能を有するDCをES 細胞から作成する培養法を開発できた(22)。

前項でも述べたように、DC に遺伝子を導入する方法として電気穿孔法、リポフェクション、ウィルスベクターなどが使用されている。骨髄細胞由来DC や単球由来DC に遺伝子を導入するためには、ウイルスベクターが利用されるが、ウイルスの危険性や抗原性が問題となる。一方、ES 細胞の場合には電気穿孔法で容易にかつ効率よく、さらに複数の遺伝子を導入できる利点がある。このように遺伝子改変が容易なES 細胞の特色を生かして、マウス遺伝子改変ES-DC を樹立して、抗腫瘍免疫の誘導に応用できるのではないかと考え(図4)、その第一歩として、モデル抗原(OVA)を発現するES-DC をマウスに投与することにより、in vivo においてOVA 特異的なCTL を活性化し、OVA を発現する腫瘍細胞に対する拒絶効果が

得られることを確認している(23)。

図 4

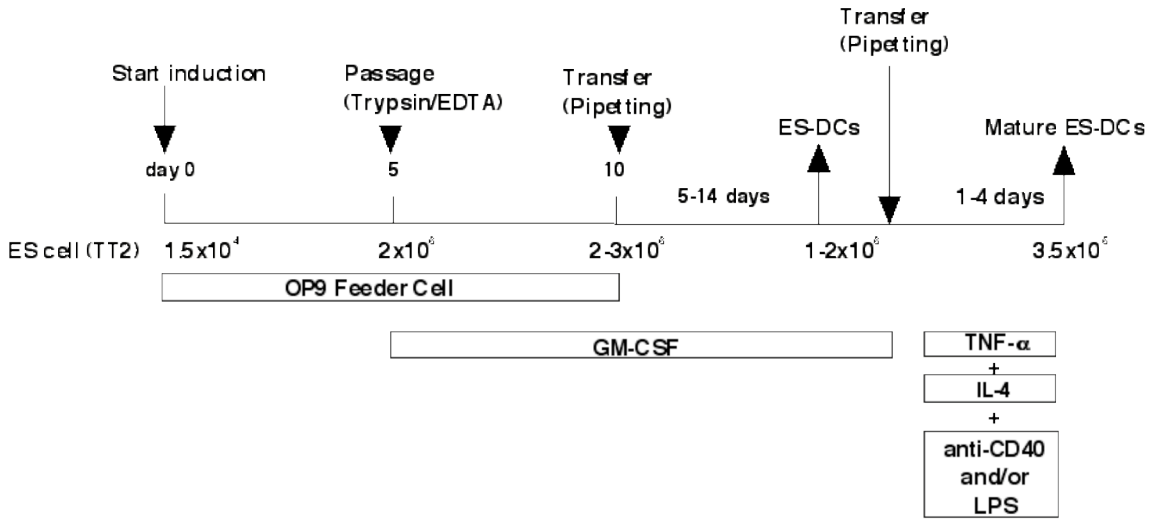

図 4. ES 細胞から樹状細胞を分化誘導するための in vitro 培養法

ES 細胞を骨髄ストロマ細胞（OP9）とともに 5 日間培養する。次に、分化した ES 細胞由来の細胞を回収し、さらに 5 日間 GM-CSF の存在下で OP9 とともに培養する。その後、細胞を GM-CSF の存在下にストロマ細胞非存在下の細菌培養用デッシュ中でさらに 7-10 日間培養を続けると、DC が出現する。得られた細胞を回収し、GM-CSF 非存在下に IL-4(10ng/ml), TNF-□(5ng/ml)に抗 CD40LmAb(10□g/ml)または IL-4, TNF-□に LPS(1□g/ml)を加え 2-3 日培養することにより、成熟 DC を得ることができる。

図 5

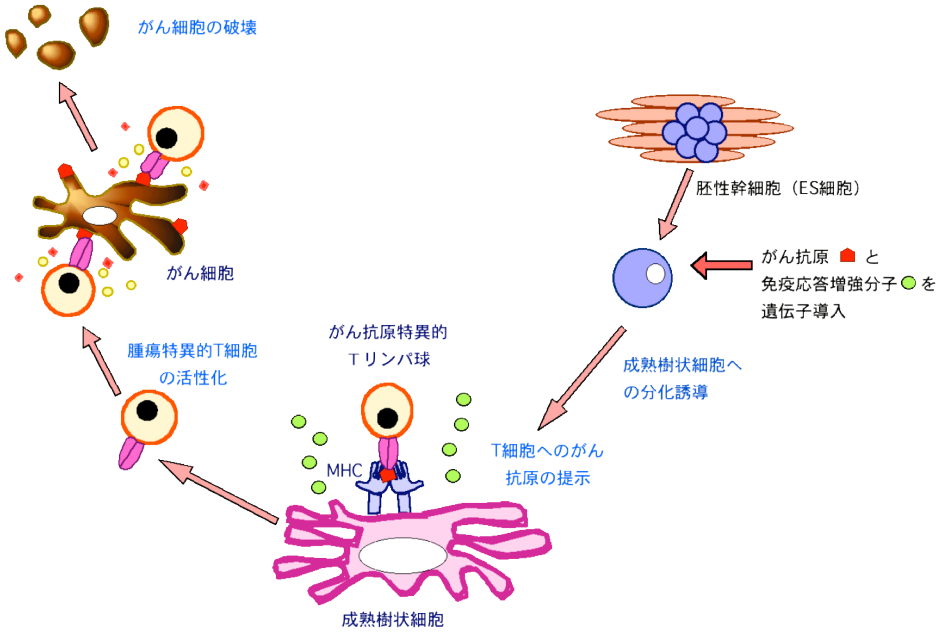

図 5. 遺伝子改変胚性幹（ES）細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強

図 6

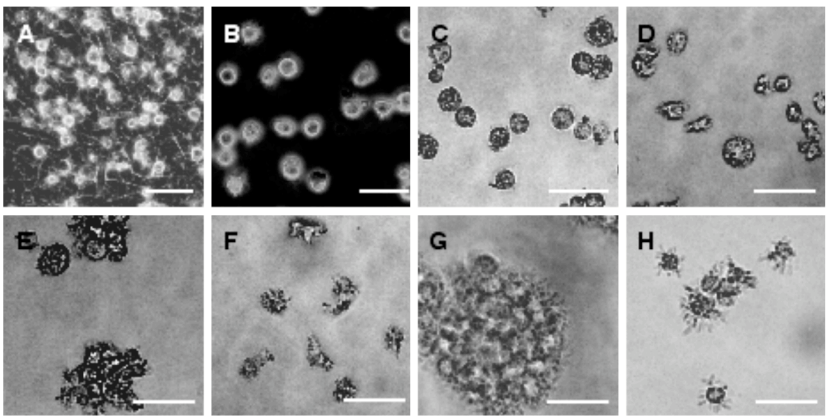

図 6. ES-DC の形態

培養開始から 8 日目（A）、12 日目（B- C）、17 日（D-E）、27 日目（F）の細胞を示す。培養から 24 日目に回収された細胞を 2 日間 IL-4、TNF-α と刺激性抗 CD40 抗体と培養したもの（G）、または IL-4、TNF-α と LPS と共に培養したもの（H）。スケールバーは 20□m。

5-5) Serine proteinase inhibitor 6 (SPI6) について

Serine proteinase inhibitor 6 (SPI6) は Human の Proteinase inhibitor 9 (PI-9)のマウスホモログ（68%の相同性を有する）で CTL や NK cell の細胞傷害性因子である、Granzyme B (GrB) の特異的な阻害分子である(24-26)。SPI6 は 374 アミノ酸からなる蛋白質で細胞質に局在しており、perforin によって細胞膜にあけられた孔から細胞内に侵入して来た GrB と結合して複合体を形成することによって GrB を不活性化する。PI-9 は CTL や NK 細胞といった GrB を産生するエフェクター細胞や樹状細胞、肥満細胞、あるいは、胎盤、精巣といった免疫系に隔離された組織に発現していることが報告されている(27, 28)。また、最近では PI-9,SPI6 は様々なヒト,マウスの癌細胞にも発現していることが報告されており、癌の免疫監視システムからの逃避機構に関わる分子としても考えられている(29-31)。このことから癌の予後増悪因子としても注目されている。

5-6) 本研究の目的

本研究は、レシピエントマウスと MHC class Ⅰを一部共有した、モデル抗原(OVA)を発現した（マウス）遺伝子改変 ES-DC を投与することにより、共有された MHC class Ⅰ拘束性の抗原特異的な CTL の誘導が可能であるか否かを検証することを目的とする。このようなセミアロジェニックな DC を投与した場合、レシピエントの免疫系によって投与した DC が即座に傷害されてしまうと、抗原特異的な CTL の誘導ができなくなることが予想される。これまでの報告によると、allo 細胞の排除は主に CTL によるものである。そこで、CTL の主な細胞傷害分子である Granzayme B の特異的な阻害分子である SPI6 の遺伝子も導入し、抗原と共発現させることにより、ES-DC の生存を延長させて抗原提示期間を長くすることにより、抗腫瘍免疫応答を高めるのに有用であるか否かを検討した。

6　実験方法

6-1）マウス

CBA,C57BL/6,およびBALB/cマウスはCLEAまたはCharles River Breeding Laboratoriesより購入し、SPF (specific pathogen free condition)環境にて飼育した。本研究に用いたES細胞TT2がCBA マウスとC57BL/6 マウスのF1マウスに由来するため、オスのCBAマウスとメスのC57BL/6マウスを交配させ、CBA x C57BL/6 F1マウス(CBF1)を作製した。また、オスのBALB/cマウスとメスのC57BL/6マウスを交配させ、BALB/cx C57BL/6F 1マウス（BBF1）を作製した。全ての実験は6-8週齢のマウスを使用した。

6-2）細胞

ES 細胞株であるTT2 はCBA×C57BL6/F1 (CBF1)胚由来のblastocyst(32)に由来し、ES 細胞からの樹状細胞への分化誘導は、すでに報告(22)した方法により施行した。また、pCAG-OVA-IP OVA発現ベクターをTT2に遺伝子導入して樹立された、遺伝子改変ES細胞クローン TT2-OVA(23)も同様にES-DCへ分化誘導した。GM-CSF 存在下で細菌培養用デッシュにて7日間培養して得られたES-DC 細胞を本研究にて用いた。OP9はM-CSFを欠損した骨髄ストロマ細胞(33)である。MO4はpAc-neo-OVAベクター(34)を遺伝子導入されたC57BL/6由来のB16メラノーマ細胞である(35)。

6-3）マウス骨髄細胞由来の樹状細胞(BM-DC)の作製

CBA×C57BL/6 (CBF1)マウス由来の骨髄細胞の DC (BM-DC)は、以前に報告した方法により誘導した(21, 33, 44)。OVA 由来の合成ペプチド(K^bに結合するペプチドである$OVA_{257-264}$, (SIINFEKL)を BM-DC と37℃、2時間培養することにより、合成ペプチドを BM-DC に負荷した。マウス個体への投与に際しては、これらのBM-DC には成熟刺激を与えなかった(21, 36)。

6-4）ペプチドとサイトカイン

K^bに結合するペプチドである$OVA_{257-264}$, (SIINFEKL) を自動ペプチド合成機(島津社製)を用いてF-MOC 法により合成し、HPLCにて精製した。組み替えヒトIL-2は株式会社味の素より供与を受けた。

6-5）マウス ES 細胞由来の樹状細胞(ES-DC)の作製

マウスES細胞(TT2細胞株、CBA×C57BL/6 (CBF1)マウス由来)から以下のようにしてDCを誘導した(図6)(22)。まず、ES細胞を骨髄ストロマ細胞（OP9）とともに5日間培養した。次に、分化したES細胞由来の細胞を回収し、さらに５日間GM-CSFの存在下でOP9とともに培養した。その後、細胞をGM-CSFの存在下にストロマ細胞非存在下の細菌培養用デッシュ中でさらに7-10日間培養を続けると、DC様の形態（図7）を有し、生理的なDCと同様の細胞表面分子（図8）を発現する細胞が出現する。以後の実験には、細菌培養用デッシュ中で7日間培養して得られたES-DCを使用した。また、ES-DC にはLPS やTNF-α などの成熟刺激は加えなかった。

6-6）in vivo における OVA 特異的 CTL の誘導と細胞傷害活性の測定

遺伝子改変を行ったES-DC、OVAペプチドを負荷したES-DC、OVAペプチドを負荷したBM-DC、または70℃で20分間熱処理を行ったOVAペプチドを負荷したBM-DCを7日毎に2回、マウスの腹腔内に投与した。2回目の投与から7日後に、マウスより脾臓を摘出した。脾臓細胞は in vitroにてOVAペプチド(0.1□M),rhIL-2(100U/mL)存在下に5日間共培養した。得られた細胞を回収しエフェクター細胞とし、B57BL/6マウス由来の胸腺腫細胞株であるEL-4を標的細胞として、クロミウム放出試験によりOVA特異的CTLの細胞傷害活性を測定した(22)。

6-7）腫瘍増殖抑制実験

2×10^4 個または 3×10^4 個の遺伝子改変 ES-DC を、マウスの腹腔内に 7 日毎に 2 回投与した。2 回目の投与から 7 日後に、削毛したマウス背部右側に MO4 を皮下移植した。腫瘍の大きさを 1 週間に 2 回測定し、同時にマウスの生存率を観察した。腫瘍の大きさは、Tumor index(mm)=腫瘍長径 x 腫瘍短径の平方根として示した。

6-8）プラスミドの作製

マウス脾臓細胞の RNA を鋳型として RT-PCR を行い､SPI6 をコードする cDNA の断片を得た。プライマーは GAGACTCGAGCCCGCCGCCACCATGAATACTCTGTTCTGAAGGAAAT(forward)と GAGAGCGGCCGCGTGTCTTTATGGAGATGAGAACCT (reverse)を用いた。プライマーは、Kozak sequence(37)の下流に SPI6 cDNA が配置されるように設計した。PCR 産物は Promega 社の pGEM-T

easy ベクターに組み込み、塩基配列を確認した上で pCAGGS-IRES-neo-R ベクターに組み替えた。

6-9）OVA と SPI6 を共発現する ES-DC の作製

ES細胞株TT2に電気穿孔法によりpCAG-OVA-IPを遺伝子を導入し、puromycinにより薬剤選択を行って樹立されたES細胞クローン（ES-OVA)(22)にSPI6発現ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入されたES細胞はネオマイシン耐性遺伝子を有するPEF上で培養し、G418(500□g/ml)にて薬剤選択を行った。puromycin, G418に対して共に耐性を獲得したクローンを選別し、DCへ分化誘導した。各クローン由来のDCごとに細胞融解液を作製し、Western blot法にてSPI6の発現を比較した。最もSPI6の発現量の多いクローンを選別し、OVAとSPI6を共発現するESクローンとした。これらのクローンをDCへ分化させ、以後の実験に使用した。また、ES-DC にはLPS やTNF-α などの成熟刺激は加えなかった。

6－10）Western blot 解析

細胞ライセートは 150 mM NaCl、50 mM Tris、pH 7.4, 1% Nonidet P-40、1 mM sodium orthovanadate (和光)、1 mM EDTA にプロテアーゼインヒビターカクテルタブレット（アマシャム)を加えたライジングバッファーを用いて調整した。得られた細胞ライセートを 10%SDS-PAGE で展開した後、ニトロセルロースメンブレン（Bio-Rad）へ転写し、5% スキムミルク、0.2% Tween 20 TBS 溶液中にてオーバーナイトのブロッキングを行った。その後、一次抗体として、マウス抗ヒトPI-9 モノクローナル抗体（Alexis Biochemicals）およびマウス抗β-アクチンモノクローナル抗体（SIGMA)、二次抗体として HRP 標識ウサギ抗マウス Ig 抗体とニトロセルロースメンブレンを反応させた。シグナルは ECL detection kit(アマシャム)を用いて検出した。

6－11）統計学的解析

Two-tailed Student's t test を細胞傷害活性、腫瘍の増殖、各治療群間の有意差検定に使用した。$p<0.05$ の場合に、有意差ありと判定した。Kaplan-Meier の生存曲線は、Breslow-Gehan-Wilcoxon 試験を用いて有意差を判定した。統計解析は StatView 5.0(Abacus Concept 社製)を用いて行った。

7　実験結果

7-1）シンジェニックあるいはセミアロジェニックマウスへの ES-DC 腹腔内投与による OVA 抗原特異的な CTL の誘導

我々はマウス ES 細胞から DC を分化誘導する方法をすでに報告している。この ES-DC は BM-DC と同等の T 細胞を刺激する能力を持っている(22)。我々は CBA (H-2^k) x C57BL/6 (H-2^b) F1 マウスの embryo に由来する ES 細胞株 TT2（H-$2K^{k/b}$)にモデル抗原としてOVAを遺伝子導入し､DCへ分化誘導したES-DC-OVA（H-$2^{k/b}$）をセミアロジェニックな C57BL/6 (H-2^b)マウスへ腹腔内投与することにより、OVA 抗原特異的な CTL が誘導できるか否かを検討した。ES-DC-OVA（H-$2^{k/b}$）と C57BL/6 (H-2^b)は H-2^b ハプロタイプは共有するが、H-2^k ハプロタイプは共有しないセミアロジェニックな関係となる。

ES-DC-OVA,遺伝子改変を行っていない ES-DC(ES-DC-TT2）を、シンジェニックな(CBA x C57BL/6) F1 マウス（H-$2^{k/b}$）あるいはセミアロジェニックな C57BL/6 マウスへ 7 日毎に 2 回腹腔内投与し、2 回目の腹腔内投与のさらに 7 日後に脾細胞を回収した。脾細胞は K^b 拘束性 $OVA_{257-264}$ ペプチドと IL-2 存在下で 5 日間共培養し、OVA ペプチドを負荷した EL-4 に対する細胞傷害活性をクロミウム遊離試験により測定した。結果を図 7A,B に示す。（CBA x C57BL/6) F1 マウスあるいはセミアロジェニックな C57BL/6 マウスいずれにおいても、ES-DC-OVA を投与した場合、H-2^b 拘束性 OVA 特異的な CTL の誘導が見られたが、ES-DC-TT2 では見られなかった。

しかしながら、セミアロジェニックな C57BL/6 マウスにおいて H-2^b 拘束性の OVA 特異的な CTL の誘導が見られたのは、ES-DC-OVA が H-2^k 反応性の T 細胞に排除される前に、直接 OVA 特異的 CTL に抗原提示を行って活性化させたためではなく、H-2^k 反応性の T 細胞に攻撃されアポトーシスに陥った ES-DC-OVA に由来する OVA 蛋白を、レシピエント体内に存在する抗原提示細胞（APC）が貪食し、OVA 特異的 CTL に抗原提示した可能性も考えられる。

図 7

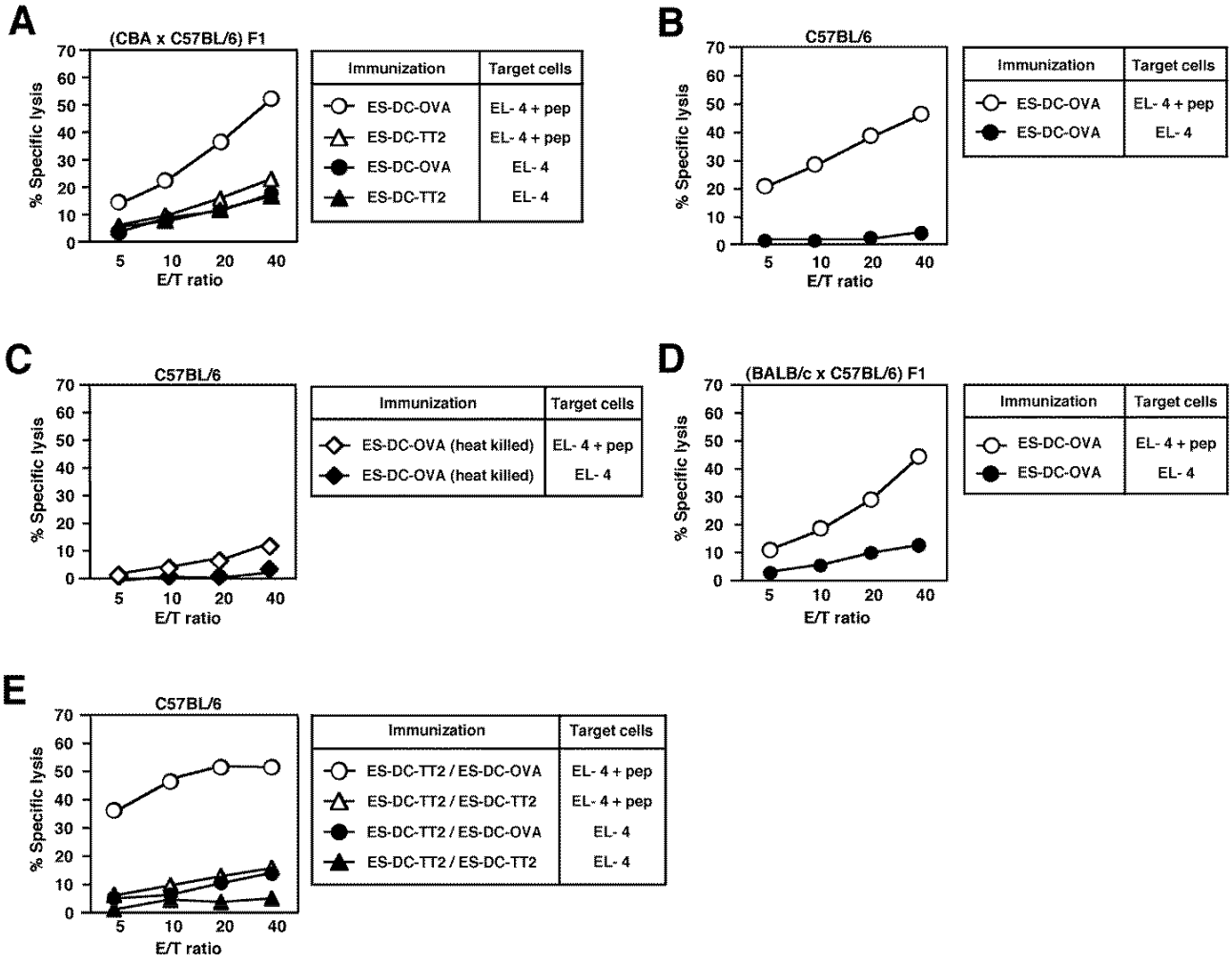

図 7．シンジェニックあるいはセミアロジェニックマウスへの ES-DC 腹腔内投与による OVA 抗原特異的な CTL の誘導

(CBA x C57BL/6) F1 (A)、C57BL/6 (B, C)、(BALB/c x C57BL/6) F1 (D) マウスに 7 日ごとに 2 回、 ES-DC-OVA あるいは ES-DC-TT2 を $1x10^5$ づつ腹腔内投与した。 (C)では ES-DC-OVA を投与する前に 70℃で 20 分熱処理を行った。 (E)では C57BL/6 マウスに初回は ES-DC-TT2 を、7 日後の 2 回目には ES-DC-OVA を投与した。免疫されたマウスの脾細胞は最後の免疫の 7 日後に回収し、$OVA_{257-264}$ ペプチド (0.1 μM)、IL-2(100U/mL) と 5 日間共培養した。得られた細胞が $OVA_{257-264}$ ペプチド (10 μM) を負荷した腫瘍細胞株 EL-4 に対する細胞傷害活性を比較した。

そこで、この可能性を検証するために、70℃で 20 分間熱処理した ES-DC-OVA を同様に C57BL/6 マウスへ投与して H-2^b 拘束性 OVA 特異的 CTL の誘導を検討したところ、熱処理した ES-DC-OVA は H-2^b 拘束性 OVA 特異的 CTL を誘導することができなかった。（図 7C）このことから、OVA 特異的 CTL の活性化は ES-DC-OVA による直接的な抗原提示によるものが主で、レシピエントマウス体内の APC によるクロスプレゼンテーションによるものに依存していないことが示された。従って、セミアロジェニックマウスに投与された抗原を発現する ES-DC は、アロ反応性 CTL に排除される前に抗原特異的に CTL を活性化していると考えられた。

さらに ES-DC-OVA を、（BALB/c x C57BL/6）F1 マウス(H-$2^{d/b}$）に投与して、同様に共有された H-2^b 拘束性 OVA 特異的 CTL の誘導を検討したところ、やはり CTL の誘導は可能であった。（図 1 D）

次に我々は、マウス体内でアロ反応性の CTL がすでに活性化している状況下でも、ES-DC-OVA を投与することによって OVA 特異的 CTL の誘導がか可能であるか否かを検討した。実験方法としては OVA を発現していない ES-DC-TT2 を C57BL/6 マウスへ投与し、7 日後に ES-DC-OVA を投与した。この状況下では初回の ES-DC-TT2 投与で H-2^k 拘束性 CTL が活性化されて、2 回目に投与した ES-DC-OVA が活性化された H-2^k 拘束性 CTL によって速やかに排除され、抗原提示がなされないことが想定される。2 回目の免疫から 7 日後に脾細胞を回収し、前出の方法と同様に H-2^b 拘束性 OVA 特異的 CTL の誘導を検討した。結果を図 7E に示す。すでに活性化しているアロ反応性 CTL の存在下においても、抗原を発現する ES-DC は抗原特異的な CTL を活性化することが可能であることが示された。

7-2）セミアロジェニックマウスにおける OVA を発現する腫瘍細胞に対する ES-DC-OVA による予防効果

次に我々は ES-DC-OVA をセミアロジェニックマウスに投与した後、OVA を発現する腫瘍を皮下移植して、誘導された OVA 特異的な CTL が腫瘍の増殖ならびにマウス個体の生存を延長させうるか否かを検討した。まず、ES-DC-OVA を(CBA x C57BL/6) F1 マウス、あるいは C57BL/6 マウスへ 7 日毎に 2 回腹腔内投与し、2 回目の投与から 1 週間後に MO4 (C57BL/6 マウス由来 OVA 遺伝子導入 B16 メラノーマ細胞株)を皮下移植した。図 8 A,B では ES-DC-OVA をシンジェニック(CBA x C57BL/6) F1 マウス（H-$2^{k/b}$）へ投与したところ、無治療群（RPMI-1640 のみ腹腔内投与）と比較して、MO4 の増殖抑制（$P>0.01$）ならびにマウスの生存期間の延長（$P>0.05$）が観察された。以上の結果は我々の先行論文において、すでに報告したとおりの結果であった(23)。そこで次にセミアロジェニック C57BL/6 マウス（H-2^b）へ ES-DC-OVA ならびに ES-DC-TT2 を投与したところ、同様に MO4 の増殖抑制（$P>0.01$）ならびにマウスの生存期間の延

長（P＞0.01）が認められた。（図８C,D）

図８

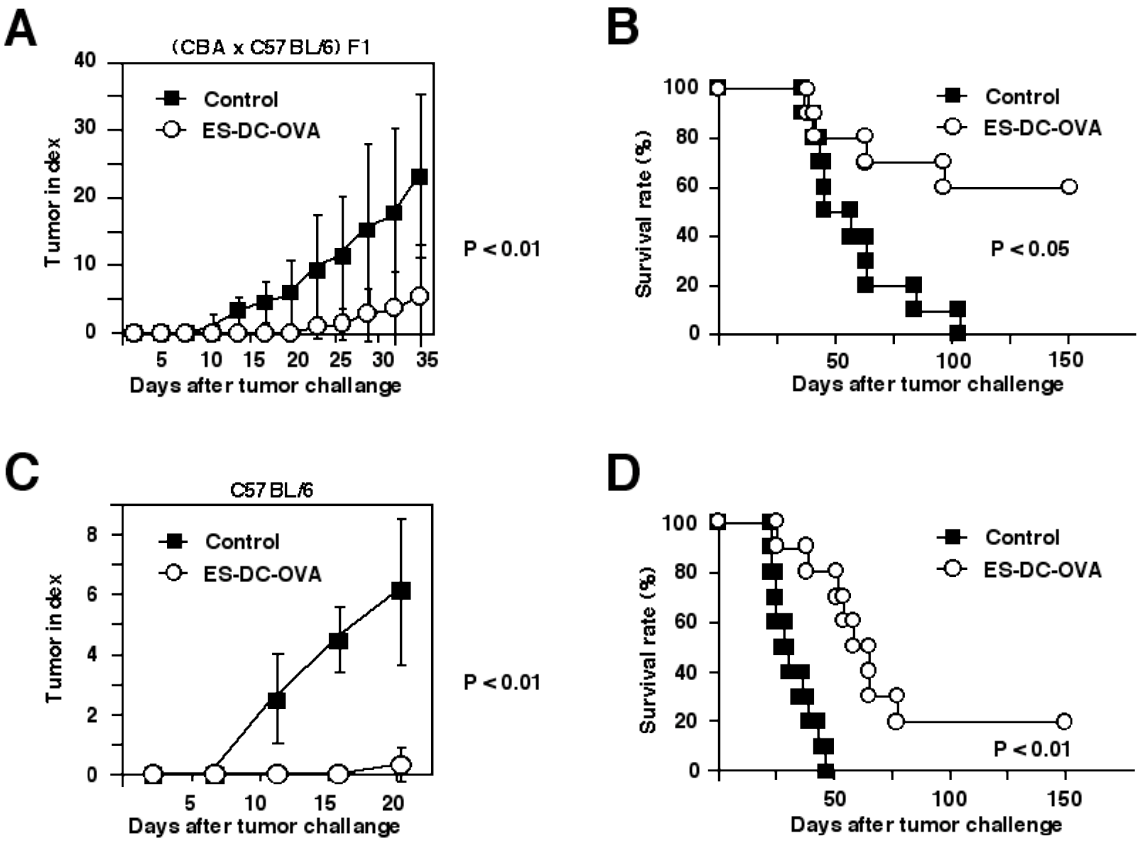

図８．セミアロジェニックマウスにおける OVA を発現する腫瘍細胞に対する ES-DC-OVA による予防効果

（CBA x C57BL/6）F1マウスにES-DC-OVA （２x10^4/マウス）あるいはRPMI-1640メディウムを7日毎に2回腹腔内投与し、2回目の投与の7日後にMO4腫瘍細胞（3x10^5/マウス）を剃毛した右背部に皮下移植した（A,B)。またC57BL/6マウスにはES-DC-OVA （３x10^4/マウス）あるいはRPMI-1640メディウムを7日毎に2回腹腔内投与し、2回目の投与の7日後にMO4腫瘍細胞（２x10^5/マウス）を剃毛した右背部に皮下移植した（C,D)。腫瘍を皮下移植した日を０日として１週間に2回、腫瘍径を測定し、腫瘍の増殖ならびにマウスの生存について観察した。腫瘍径は Tumor index（mm） =腫瘍長径 x 腫瘍短径の平方根で示す。マウスは各群10匹で実験を行った。

7-3）セミアロジェニックマウスにおいて抗原遺伝子を発現する遺伝子改変 ES-DC は、抗原ペプチドを負荷された BM-DC よりも効率良く抗原特異的 CTL を誘導する

抗原ペプチドを負荷した BM-DC を投与することによって、活性化された CTL がすでに存在しているマウスへ、異なる抗原ペプチドを負荷した BM-DC を投与しても、抗原特異的な CTL の誘導は、ほとんどみとめられないという報告があるが(38)、我々の ES-DC を用いた実験（図 7E）では、抗原特異的な CTL の誘導が認められた。その原因として、セミアロジェニックマウスへのペプチドを負荷した DC の腹腔内投与による抗原特異的な CTL の誘導能は、ES-DC の方が BM-DC よりも優れていることが考えられた。また一方で、抗原ペプチドを負荷した DC よりも遺伝子導入によって抗原蛋白を発現させた DC の方が、抗原特異的な CTL の誘導能が優れていることも考えられた。そこで抗原ペプチドを負荷した BM-DC と ES-DC をセミアロジェニックマウスへ投与することによる、抗原ペプチド特異的な CTL の誘導を比較検討した。

実験方法は(CBA x C57BL/6) F1 マウスの骨髄から採取した骨髄細胞から誘導した BM-DC と、遺伝子改変を行っていない ES-DC-TT2 に $OVA_{257-264}$ ペプチド(10 μM)を 2 時間負荷し、C57BL/6 マウスへ 7 日毎に 2 回腹腔内投与した。2 回目の投与の 7 日後に脾細胞を回収し、同様の方法で OVA 特異的 CTL の誘導を検討した。その結果、抗原ペプチドを負荷した BM-DC を投与した群では、ごく僅かな OVA 特異的 CTL の誘導が認めらたのに比べて、同様に抗原ペプチドを負荷した ES-DC を投与した群では、より強い CTL の誘導が認められた。（図 9A） この結果からセミアロジェニックなマウスにおいて、抗原ペプチドを負荷した ES-DC は BM-DC よりも CTL 誘導能が優れていることが示された。また、同じ ES-DC でも OVA ペプチドを負荷した ES-DC-TT2 は、OVA 抗原蛋白の全長をコードする遺伝子を導入された ES-DC-OVA よりも、セミアロジェニックマウスにおいて CTL 誘導能が劣っていた。（図 9B）これらのことから、遺伝子改変によって抗原遺伝子を発現する DC は、抗原ペプチドを負荷した DC よりも抗原特異的な CTL の誘導能が優れていることが示された。

以上より、ES-DC は BM-DC よりも、セミアロジェニックなマウス体内での抗原特異的な CTL 誘導能に優れていること、さらに、抗原をペプチドとして負荷するのではなく、遺伝子導入によって DC 自身に発現させることにより、より強い CTL 誘導効果が得られることが示された。

図 9

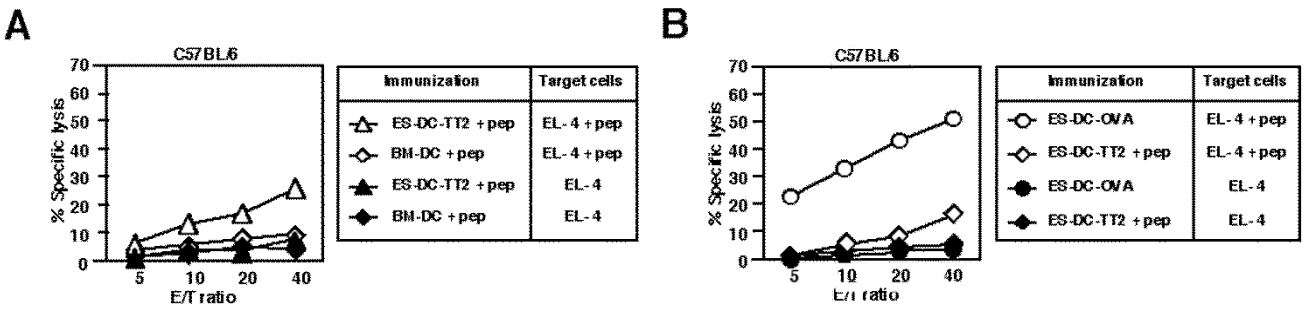

図 9．セミアロジェニックマウスにおける OVA ペプチドを負荷した DC と OVA を発現する ES-DC による OVA 特異的 CTL 誘導能の比較

BM-DC あるいは ES-DC-TT2（遺伝子導入を行っていないワイルドタイプの ES-DC）に $OVA_{257-264}$ ペプチド（10 μM）を 2 時間負荷した後、C57BL/6 マウスへ 1×10^5 個/マウス で腹腔内投与した。(A). ES-DC-OVA あるいは OVA ペプチドを負荷した ES-DC-TT2 を C57BL/6 マウスへ 1 x 10^5 個/マウスで腹腔内投与した。(B) DC の投与は 7 日毎に 2 回行い、2 回目の投与の 7 日後に脾細胞を回収した。OVA 特異的 CTL の誘導の評価は、図 7 の実験と同様である。

7-4）OVA と SPI6 を発現する ES-DC による抗原特異的 CTL 誘導能の増強

図 9A で示したように、セミアロジェニックマウスにおいて ES-DC は BM-DC よりも CTL への抗原提示能が優れていた。この機序として、ES-DC は BM-DC と比較して、CTL によるアロ細胞の排除に対して抵抗性であり、レシピエントマウスに投与された後に、より長期間に渡って抗原提示を行ったという可能性が考えられた。

SPI6 は、CTL の主要な細胞傷害活性分子である Granzyme B の特異的な阻害分子であり、DC における SPI6 発現の生理的な意義としては、DC が CTL に抗原提示を行っている間に、活性化された CTL による攻撃から逃れる働きがあると考えられている(39)。図 10A に示すように成熟化刺激を加えていない未熟な BM-DC には、ほとんど SPI6 は発現していないが、ES-DC では発現が認められる。このことから、セミアロジェニックマウスにおける ES-DC-OVA による OVA 特異的 CTL の誘導の優位性に関して、SPI6 の関与が示唆された。そこで、我々は ES-DC に OVA と SPI6 を共発現させることにより、アロ反応性 CTL による細胞傷害から防御されることにより、抗原提示できる期間を延長させて、さらに効率の良い抗原

特異的 CTL の誘導が可能であるか否かを検討した。まず、SPI6 遺伝子発現ベクターを作製し、OVA 遺伝子を導入した ES 細胞に遺伝子導入した。（図 10 B）

その後 in vitro にて DC へ分化誘導して ES-DC-OV/SP を作製した。（図 10 C）図 10A では、ES-DC-OVA と比較して ES-DC-OV/SP では SPI6 の発現が増強していることが確認できる。我々はこの ES-DC-OVA と ES-DC-OV/SP を用いて OVA 特異的 CTL の誘導能について比較検討を行った。実験はセミアロジェニックな関係にある C57BL/6 マウスへ ES-DC を 7 日毎に 2 回腹腔内投与して OVA 特異的 CTL 誘導の評価を行った。図 10D に結果を示す。ES-DC を 1×10^5 個ずつ投与したところ、OVA 特異的 CTL の誘導において ES-DC-OV/SP は ES-DC-OVA と同等、あるいは少し劣っていたが、より少ない数の ES-DC(3×10^4 ）を投与したところ､ES-DC-OV/SP は ES-DC-OVA と比較して OVA 特異的 CTL を、より誘導することができた。（図 10E）この結果から、少ない数の ES-DC を投与した時には 、投与した DC の生存期間が延長したことによって、より効率の良い OVA 特異的 CTL 誘導が可能であったと推測される。図 10E,D より、SPI6 を ES-DC に強発現させることによって OVA 特異的な CTL の誘導が増強されるが、その効果はより少ない数の ES-DC を投与した時に顕著になるものと考えられた。

図 10

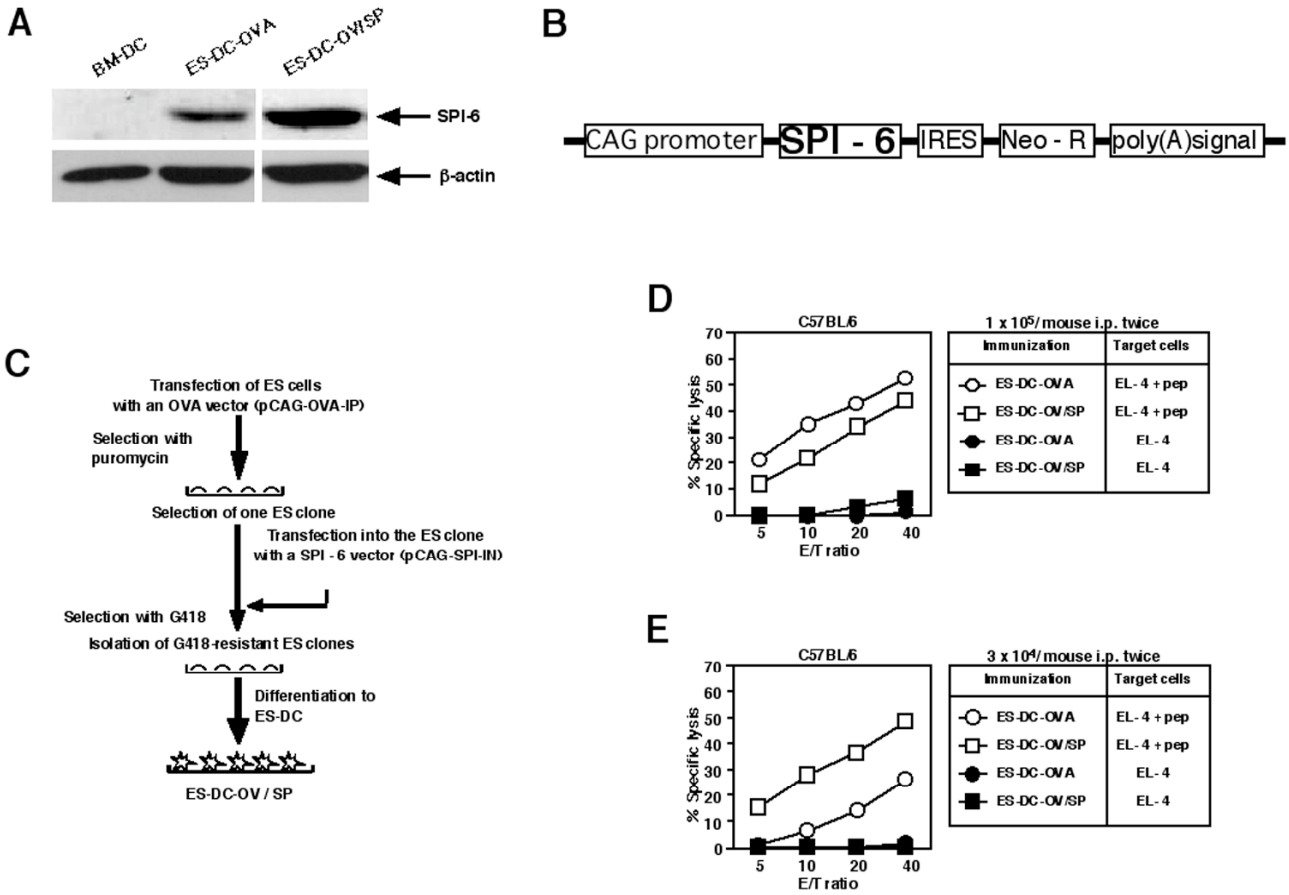

図 10. セミアロジェニックマウスにおける OVA と SPI6 を発現する

ES-DC による効率の良い OVA 特異的 CTL の誘導

（A）ウエスタンブロット解析による BM-DC,ES-DC-OVA,ES-DC-OV/SP における SPI6 の発現の比較。（B）SPI6 発現ベクターpCAG-SPI-IN の構造。（C）OVA,SPI6 を発現する ES-DC 作製法の概要。(D,E) ES-DC-OVA あるいは ES-DC-OV/SP を C57BL/6 マウスへ 1 x 10^5 個/マウスあるいはで 3 x 10^4 個/マウスで腹腔内投与した。ES-DC の投与は 7 日毎に 2 回行い、2 回目の投与の 7 日後に脾細胞を回収した。OVA 特異的 CTL の誘導の評価は、図 7 の実験と同様である。

8　考察

近年、分子生物学や免疫学の発展により、発現クローニング法、SEREX 法、または cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を用いて、数多くの腫瘍関連抗原が同定されている(40-44)。 一方でこれらの方法を用いて同定された抗原を用いて、免疫システムを活性化させ効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導する方法の開発が必須である。現在、腫瘍抗原由来の HLA 結合ペプチドを負荷した DC を用いた、抗腫瘍免疫療法の臨床治験が多くの施設で行われているが(45)、多くの場合で DC は患者から採取した末梢血単球から誘導したものが用いられている。 その際アフェレーシスを行うことによって DC の供給源となる十分な末梢血単球を得ることができるが、癌患者に対する負担は大きい。さらに患者個々に対する完全なオーダーメイド療法になるため、設備や培養などに多大なコストを費やす。

DC に腫瘍抗原を提示させる方法として、遺伝子導入により抗原蛋白を発現させる方法には、抗原ペプチドを DC に負荷する方法と比較して、いくつかの利点が考えられる。第一に、抗原蛋白をコードする遺伝子を導入することによって HLA、MHC に結合するエピトープペプチドを同定する必要がないことがあげられる。シングルエピトープペプチドを負荷した DC や、腫瘍組織の融解液と異なり、DC 内で合成される腫瘍抗原蛋白は自然にプロッセッシングされて様々なペプチド断片が産生され、HLA あるいは MHC に結合して形成された複合体が T 細胞受容体と会合することにより抗原提示が行われる。多くの場合、ヒト末梢血単球由来 DC への遺伝子導入にはアデノウイルスベクターが用いられているが、遺伝子の導入効率、安定した遺伝子発現、ウイルスベクター自体の抗原性に加えて、ウイルスベクターを使用する際の法的規制等が問題となる。我々が以前に行った報告(22, 23, 46, 47)や今回の実験結果より、無限増殖能を有する遺伝子改変 ES 細胞が CTL 誘導能を有する DC の供給源となることが示された。我々の方法ではプラスミド DNA を電気穿孔法を用いて遺伝子導入を行うため、ウイルスベクターを使用することなく遺伝子改変を行うことができる。さらに複数の遺伝子を導入することにより、より効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導できることも示された(23, 46)。

一方で ES-DC の臨床応用を考えた場合、ドナー（この場合投与される ES-DC）とレシピエント（治療を受ける患者）との間における HLA を始めとした、遺伝的背景の差異が問題となる。既に活性化された非自己抗原特異的 CTL が生体内に存在している場合には、当該非自己抗原を発現する BM-DC を投与することによって当該非自己抗原特異的 CTL を誘導しようとしても、DC は既に活性化されている抗原特異的 CTL の標的となり、CTL 誘導能は著しく減弱するとの報告もあり(38)、セミアロジェニックな APC による抗原特異的 CTL の誘導は難しいと考えられた。

また、MHC が不一致である APC をマウスに投与すると、レシピエントマウスのアロ反応性 CTL によって速やかに排除されることが報告されている(48)。しかしながら、今回の我々の実験結果では OVA を発現するマウス ES-DC の投与により、遺伝的背景が同じである(CBA x C57BL/6) F1 マウスはもとより、セミアロジェニックである C57BL/6 マウスまたは(BALB/c x C57BL/6) F1 マウスにおいても OVA 特異的な H-2K^{b} 拘束性 CTL を誘導することが可能であった（図 7）。さらに、OVA を発現する ES-DC を腹腔内投与された C57BL/6 マウスでは、皮下移植した OVA を発現する腫瘍細胞の増殖を、無治療群と比較して有意に抑制した(図 8)。これらの結果は ES-DC を用いることにより、腫瘍形成の予防が可能であることを示唆している。

図 9A では $OVA_{257-264}$ ペプチドを負荷した BM-DC と ES-DC とをセミアロジェニックな C57BL/6 マウスに投与しているが, ES-DC は $OVA_{257-264}$ ペプチド特異的な CTL の誘導能が BM-DC よりも優れていた。このことから、セミアロジェニックな環境下における抗原特異的 CTL の誘導能は、BM-DC よりも ES-DC の方が優れていることが証明された。また、ES-DC に OVA の遺伝子を導入した ES-DC-OVA は、OVA ペプチドを負荷した ES-DC よりも OVA 特異的 CTL 誘導能が高いことも明らかとなった(図 9B) 。従って、セミアロジェニックマウスにおける ES-DC-OVA による抗原特異的 CTL の効率の良い誘導は、 抗原遺伝子導入による抗原エピトープの提示によるものであるとも考えられる。

図 10 では ES-DC における SPI6 の発現は BM-DC よりも高かった。SPI6 は 、CTL の主要な細胞傷害性分子である Granzyme B の特異的な阻害分子である(24-26)。SPI6 は CTL、DC や肥満細胞といった細胞が免疫反応が起きている場で、Granzyme B によって引き起こされるアポトーシスから逃れるために発現していると考えられている(27, 28, 39, 49)。また、腫瘍抗原と SPI6 の DNA ワクチンを同時に投与することにより、抗原単独の時よりも抗原特異的な CTL の誘導能が増強するとの報告があるが、その原因として SPI6 の DNA ワクチンが APC に取り込まれ、APC が SPI6 を発現することにより、CTL による細胞傷害に対して抵抗性を獲得することによると述べられている(50)。従って、ES-DC における SPI6 の発現が BM-DC と比較してかなり高かったことが、セミアロジェニックマウスにおける OVA を発現する ES-DC の強力な抗原特異的 CTL 誘導能の一つの理由として考えられる。その可能性について検証するために我々は、OVA を遺伝子導入した ES 細胞に SPI6 の発現ベクターをさらに遺伝子導入して OVA と SPI6 をさらに強発現させた ES-DC-OV/SP を作製した。 ES-DC-OV/SP は ES-DC-OVA と比較して、より少ない数の ES-DC を投与した場合 (3 x 10^{4} /マウス)に OVA 特異的な CTL の誘導が優れていた。この結果は、遺伝子改変により SPI6 を強発現する ES-DC がセミアロジェニックマウスの体内に投与された後、アロ反応

性 CTL による細胞傷害に抵抗し、その生存期間が延長したことによって、OVA 特異的 CTL の誘導が増強したことを示すものと考えられる(図 10E)。

また、我々は、DC の生理的な生存期間を制御していると報告(51-53)されている、様々なアポトーシスシグナルの阻害分子である Bcl-2 ならびに Bcl-xL について、BM-DC ならびに ES-DC における蛋白発現を比較検討した。その結果、BM-DC も ES-DC にも Bcl-2,Bcl-xL は発現しており、ES-DC における発現量は BM-DC と比較して Bcl-2 は低く、Bcl-xL は高かった(データは示さず)。 このことから、Bcl-2 あるいは Bcl-xL の遺伝子を ES-DC に導入することにより、in vivo における抗原特異的 CTL の誘導能を増強することが可能かもしれない。

また、効率良く $CD8^+$ T 細胞を誘導するためには、$CD4^+$ ヘルパー T 細胞の存在が必要であることが知られている。$CD4^+$ ヘルパー T 細胞は、IL-2 や IFN-γ といった CTL を直接活性化するサイトカインを産生したり, CD40-CD40L の会合による DC の活性化 などを行って、間接的にも CTL を活性化する。腫瘍抗原を抗原提示している ES-DC は、セミアロジェニックなマウスへ投与された後、レシピエントマウス体内にいると考えられる大量のアロ反応性 $CD4^+$ ヘルパーT 細胞を MHC クラスⅡ分子を介して活性化し、その結果産生されたサイトカイン等が、腫瘍抗原特異的な CTL の誘導を増強している可能性も考えられる。従って、投与した ES-DC の MHC クラスⅠの不一致は、抗腫瘍免疫応答を減弱せるかもしれないが、MHC クラスⅡの不一致はむしろこれを増強している可能性も考えられる。

ES-DC の将来的な臨床応用実現に向けて、我々の研究室の千住らはカニクイザルおよびヒト ES 細胞に遺伝子導入を行い、樹状細胞に分化誘導する方法を確立した（投稿中)。HLA 遺伝子は多形に富んでいる一方で、いくつかの対立遺伝子座が各民族集団において高頻度に発現していることが知られており、多くの場合において患者といくつかの HLA 対立遺伝子座を共有するヒト ES 細胞が利用可能であると考えられる。例えば HLA-A*0201, A*0206, A*2402, A*2601 は、それぞれ日本人集団での遺伝子頻度が約 11%、10%、36%、10%である(54)。 このデータは日本人の 90%以上が HLA-A において、少なくともこれらの 4 個の対立遺伝子の 1 つを所有していることを示している。現在、数多くのヒト ES 細胞が樹立されているが、樹立された ES 細胞の HLA 対立遺伝子は、ES 細胞のドナーが属する民族集団において頻度が高いものであることが予想される。従って我々は、患者といくつかの HLA 対立遺伝子を共有するヒト ES 細胞を入手することが可能であると考えている。

最後に、我々の最終的な目的である、抗原を発現するヒト ES-DC ワクチンによる抗原特異的な免疫制御を実現する際に、PI9（SPI6 はヒト PI9 のマウスホモログである）を過剰発現させたセミアロジェニックヒト ES-DC を用いることにより、抗原特異的な CTL の誘導を増強する方法は有用であると考えられる。我々は、こ

の方法が ES-DC を利用した抗原特異的免疫療法の臨床応用への道を切り開くものと期待している。

9　結語

マウスにおいて MHC をレシピエントと一部共有するアロ ES-DC を用いて、共有された MHC に拘束されたモデル腫瘍抗原特異的 CTL を誘導することが可能であり、腫瘍増殖抑制ならびに生存期間の延長を誘導することが可能であった。さらに、Granzyme B の特異的な阻害分子である SPI6 を遺伝子導入することにより、その効果を増強することができた。近い将来、当教室で同定された腫瘍抗原を遺伝子導入した、ヒト ES-DC を用いた抗原特異的な樹状細胞療法が、がん患者に何らかの形で恩恵をもたらすことができればと期待している。

10　参考文献

1. Germain, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell*, 76: 287-299, 1994.
2. Berke, G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol*, 12: 735-773, 1994.
3. Lanier, L. L. and Phillips, J. H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today*, 17: 86-91, 1996.
4. York, I. A. and Rock, K. L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol*, 14: 369-396, 1996.
5. Heemels, M. T. and Ploegh, H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, 64: 463-491, 1995.
6. Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518, 1987.
7. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature*, 353: 326-329, 1991.
8. Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296, 1991.
9. Engelhard, V. H. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol*, 12: 181-207, 1994.
10. Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanoviic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41: 178-228, 1995.
11. Saper, M. A., Bjorkman, P. J., and Wiley, D. C. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 A resolution. *J Mol Biol*, 219: 277-319, 1991.
12. Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Chi, Y. I., Stauffacher, C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature*, 368: 711-718, 1994.
13. Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L.,

and Wiley, D. C. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, 368: 215-221, 1994.

14. Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. Bone marrow-derived cells present MHC class I-restricted tumour antigens in priming of antitumour immune responses. *Ciba Found Symp*, 187: 229-240; discussion 240-224, 1994.
15. Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, N., Mellman, I., and Steinman, R. M. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*, 188: 2163-2173, 1998.
16. Legge, K. L., Gregg, R. K., Maldonado-Lopez, R., Li, L., Caprio, J. C., Moser, M., and Zaghouani, H. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med*, 196: 217-227, 2002.
17. Smithers, M., O'Connell, K., MacFadyen, S., Chambers, M., Greenwood, K., Boyce, A., Abdul-Jabbar, I., Barker, K., Grimmett, K., Walpole, E., and Thomas, R. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol Immunother*, 52: 41-52, 2003.
18. Marten, A., Flieger, D., Renoth, S., Weineck, S., Albers, P., Compes, M., Schottker, B., Ziske, C., Engelhart, S., Hanfland, P., Krizek, L., Faber, C., von Ruecker, A., Muller, S., Sauerbruch, T., and Schmidt-Wolf, I. G. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol Immunother*, 51: 637-644, 2002.
19. Butterfield, L. H., Ribas, A., Dissette, V. B., Amarnani, S. N., Vu, H. T., Oseguera, D., Wang, H. J., Elashoff, R. M., McBride, W. H., Mukherji, B., Cochran, A. J., Glaspy, J. A., and Economou, J. S. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 9: 998-1008, 2003.
20. Stift, A., Friedl, J., Dubsky, P., Bachleitner-Hofmann, T., Schueller, G., Zontsich, T., Benkoe, T., Radelbauer, K., Brostjan, C., Jakesz, R., and Gnant, M. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol*, 21: 135-142, 2003.
21. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone

marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 176: 1693-1702, 1992.

22. Senju, S., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Masuda, M., Uemura, Y., Araki, K., Yamamura, K., and Nishimura, Y. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood*, 101: 3501-3508, 2003.
23. Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., Yoshitake, Y., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in vivo by embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. *J Immunol*, 172: 776-786, 2004.
24. Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A., and Bird, P. I. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol*, 18: 6387-6398, 1998.
25. Sun, J., Ooms, L., Bird, C. H., Sutton, V. R., Trapani, J. A., and Bird, P. I. A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *J Biol Chem*, 272: 15434-15441, 1997.
26. Medema, J. P., de Jong, J., Peltenburg, L. T., Verdegaal, E. M., Gorter, A., Bres, S. A., Franken, K. L., Hahne, M., Albar, J. P., Melief, C. J., and Offringa, R. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 11515-11520, 2001.
27. Bladergroen, B. A., Strik, M. C., Wolbink, A. M., Wouters, D., Broekhuizen, R., Kummer, J. A., and Hack, C. E. The granzyme B inhibitor proteinase inhibitor 9 (PI9) is expressed by human mast cells. *Eur J Immunol*, 35: 1175-1183, 2005.
28. Bladergroen, B. A., Strik, M. C., Bovenschen, N., van Berkum, O., Scheffer, G. L., Meijer, C. J., Hack, C. E., and Kummer, J. A. The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol*, 166: 3218-3225, 2001.
29. ten Berge, R. L., Oudejans, J. J., Ossenkoppele, G. J., and Meijer, C. J. ALK-negative systemic anaplastic large cell lymphoma: differential diagnostic and prognostic aspects--a review. *J Pathol*, 200: 4-15, 2003.
30. Muris, J. J., Meijer, C. J., Cillessen, S. A., Vos, W., Kummer, J. A., Bladergroen, B. A., Bogman, M. J., MacKenzie, M. A., Jiwa, N. M., Siegenbeek van Heukelom, L. H.,

Ossenkoppele, G. J., and Oudejans, J. J. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*, 18: 589-596, 2004.

31. Bladergroen, B. A., Meijer, C. J., ten Berge, R. L., Hack, C. E., Muris, J. J., Dukers, D. F., Chott, A., Kazama, Y., Oudejans, J. J., van Berkum, O., and Kummer, J. A. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood*, 99: 232-237, 2002.
32. Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem*, 214: 70-76, 1993.
33. Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Nishikawa, S. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol*, 22: 979-984, 1994.
34. Moore, M. W., Carbone, F. R., and Bevan, M. J. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54: 777-785, 1988.
35. Falo, L. D., Jr., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., and Rock, K. L. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat Med,* 1: 649-653, 1995.
36. Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*, 223: 77-92, 1999.
37. Kozak, M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8301-8305, 1990.
38. Hermans, I. F., Ritchie, D. S., Yang, J., Roberts, J. M., and Ronchese, F. CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol*, 164: 3095-3101, 2000.
39. Medema, J. P., Schuurhuis, D. H., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S. A., Laban, S., Toes, R. E., Toebes, M., Schumacher, T. N., Bladergroen, B. A., Ossendorp, F., Kummer, J. A., Melief, C. J., and Offringa, R. Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J Exp Med*, 194: 657-667, 2001.
40. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tureci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson,

B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old, L. J. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 1914-1918, 1997.

41. Boon, T., Coulie, P. G., and Van den Eynde, B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*, 18: 267-268, 1997.
42. Rosenberg, S. A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*, 10: 281-287, 1999.
43. Nakatsura, T., Kageshita, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Monji, M., Ikuta, Y., Senju, S., Ono, T., and Nishimura, Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res*, 10: 6612-6621, 2004.
44. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin Cancer Res*, 10: 6437-6448, 2004.
45. Cerundolo, V., Hermans, I. F., and Salio, M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol*, 5: 7-10, 2004.
46. Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Transfer of Embryonic Stem Cell-Derived Dendritic Cells Expressing Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide along with TRAIL or Programmed Death-1 Ligand. *J Immunol*, 174: 1888-1897, 2005.
47. Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res,* 66: 2414-2422, 2006.
48. Loyer, V., Fontaine, P., Pion, S., Hetu, F., Roy, D. C., and Perreault, C. The in vivo fate of APCs displaying minor H antigen and/or MHC differences is regulated by CTLs specific for immunodominant class I-associated epitopes. *J Immunol*, 163*:* 6462-6467, 1999.
49. Hirst, C. E., Buzza, M. S., Bird, C. H., Warren, H. S., Cameron, P. U., Zhang, M., Ashton-Rickardt, P. G., and Bird, P. I. The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector

cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency. *J Immunol*, 170: 805-815, 2003.

50. Kim, T. W., Hung, C. F., Boyd, D. A., He, L., Lin, C. T., Kaiserman, D., Bird, P. I., and Wu, T. C. Enhancement of DNA vaccine potency by coadministration of a tumor antigen gene and DNA encoding serine protease inhibitor-6. *Cancer Res*, 64: 400-405, 2004.
51. Nopora, A. and Brocker, T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol*, 169: 3006-3014, 2002.
52. Hou, W. S. and Van Parijs, L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol*, 5: 583-589, 2004.
53. Hon, H., Rucker, E. B., 3rd, Hennighausen, L., and Jacob, J. bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *J Immunol*, 173*:* 4425-4432, 2004.
54. Tanaka, H., Akaza, T., and Juji, T. Report of the Japanese Central Bone Marrow Data Center. *Clin Transpl* 139-144, 1996.