

## 樹状細胞由来細胞株を用いて増幅した WT1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)のINF- $\gamma$ 産生能の検討

山田 峻也<sup>1)</sup>・後藤 若奈<sup>1)</sup>・小川 彩空<sup>1)</sup>・増子 正義<sup>2)</sup>・小林 果歩<sup>1)</sup>・柴崎 康彦<sup>2)</sup>  
内山 孝由<sup>3)</sup>・瀧澤 惇<sup>2)</sup>・曾根 博仁<sup>2)</sup>・高橋 益廣<sup>1)</sup>・成田美和子<sup>1)</sup>

Key words : WT1, 細胞傷害性T細胞(CTL), 細胞内インターフェロン $\gamma$ , PMDC11

**要旨** 免疫チェックポイント阻害薬の臨床的効果により, 抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が抗腫瘍作用において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。腫瘍に対するCTLの臨床効果を予測する解析のためには, 個別のヒトCTLの簡便なクローン性の増幅方法の開発が必要である。我々は, MLPC法と強力な抗原提示能を有する樹状細胞株PMDC11を用いてWT1特異的CTLのクローン性増幅を試みた。数個のCTLから4週間の培養によって増幅した細胞群にはWT1特異的INF- $\gamma$ 産生が確認された。この抗原特異的CTLの簡便で効率的な増幅方法は, 免疫チェックポイント阻害因子, T細胞受容体(TCR)や腫瘍特異的表面抗原の解析に応用可能と思われた。

### 緒言

難治性・進行性腫瘍に対する抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体などの免疫チェックポイント阻害薬の臨床導入が, 本邦においても2015年より開始され, 劇的な効果が得られる症例が確認されている。「腫瘍細胞がT細胞に攻撃され易くする」というこの治療法は, がん治療におけるブレイクスルーと称されている<sup>1)</sup>。また, この臨床効果によって, 腫瘍細胞に対する細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)が, 抗腫瘍反応に重要な役割を果たしていることが改めて確認された<sup>2,3)</sup>。

次の課題は, 免疫チェックポイント因子の機能とその阻害機序に関するさらなる解析, 腫瘍細胞を最も有効に攻撃できるT細胞受容体(T cell receptor: TCR)を有するCTLの同定と増幅, さらに最も機能的な人工CTLを作製することである。人工CTLについては, 既にCAR(Chimeric Antigen Receptor)-T細胞や腫瘍抗原を特異的に認識すると考えられている一種類のTCRを遺伝子導入して強制発現させたT細胞などが開発され

始めており, 臨床研究も始まっている<sup>4,5)</sup>。これらの人工CTLの開発においても, ヒト体内で実際に誘導されているCTLの機能を十分に解析することが必要であるが, 個々の腫瘍抗原に特異的なCTLは末梢血リンパ球の0.1%以下と極めて少なく, *in vitro*で増幅する技術の開発が求められている。

WT1は腫瘍特異的抗原の中でも多くの腫瘍に発現しているタンパクであり, HLA-A\*24:02腫瘍例に対してCTLの活性化と増幅を目的としたWT1ペプチド(CYTWNQMNL)ワクチン治療が行われている。本研究室では新潟大学医歯学総合病院血液内科との共同研究として, WT1ペプチドワクチンを投与された臨床例について, WT1特異的CTLの動態の解析と臨床効果を解析し報告している<sup>6)</sup>。本研究では, ワクチンによって誘導・活性化されたWT1特異的CTLが, 抗原を強く提示させるfeeder細胞に樹状細胞由来の細胞株PMDC11<sup>7,8)</sup>を用いることによって増幅可能か否かについての検討を行った。

CTLの抗腫瘍作用の解析方法としては, 培養上清中のサイトカイン測定や混合培養による細胞傷害活性解

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 血液内科

3) 新潟薬科大学薬学部 病態生理学

平成29年3月3日受理

析が代表的である。サイトカイン測定や細胞傷害活性測定は、CTLを純化しない場合には他の免疫細胞の影響を受ける可能性が高いが、FACSを用いたマルチカラー解析で細胞内INF- $\gamma$ 産生を測定することにより、一つの抗原のみ認識するCTLを限定して抽出しその細胞傷害活性を計測できる。しかし、数個のヒトCTLをin vitroで増幅した後、このCTL細胞に限定した抗原特異的細胞内INF- $\gamma$ 産生能を解析した報告は認められない。そこで、CTL増幅培養法によって増殖した細胞の特異的抗腫瘍反応を、細胞内のINF- $\gamma$ を染色する方法で判定可能か否かについても検討した。

## 材料と方法

### 混合リンパ球ペプチド培養

#### (Mixed Lymphocyte Peptide Culture:MLPC)

新潟大学倫理委員会の承認および説明と同意を得てWT1ペプチドワクチンを施行されたHLA\*A24:02陽性例の末梢血を採取し、2500 rpm, 20分の遠心により血漿を分離した。血漿にトロンピン(ミドリ十字, 大阪)を終濃度5 U/mlとなるように加え37°Cで1時間以上反応させた後、2500 rpm, 20分の遠心により血清を分離し、自己血清として以下の培養に用いた。Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)を用いて単核球分離を行い、 $3 \times 10^5$ 個/wellとなるように、penicillin / streptomycin (Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)を加えたRPMI1640培養液(Life Technologies, CA, USA)に浮遊させ、5%自己血清HLA-A\*24:02拘束性改変型WT1(modified WT1 : mWT1, 以下WT1と表す)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96well U-bottomプレートに敷き込んで培養を開始した。3日後にIL-2(シオノギ製薬, 大阪)を終濃度50 U/mlとなるように加えた5%自己血清加RPMI1640培養液を100  $\mu$ l加え、その後も2-3日毎に上清を交換し培養を継続した。

### PMDC11の培養

MLPCによって増幅されたことが確認されたsingle cell由来のCTLをさらに増幅させるために、抗原提示細胞との共培養を行った。HLA-A\*24:02陽性の抗原提示細胞としてPMDC11を用いた。PMDC11は、白血病性形質細胞様樹状細胞から本研究室において樹立された細胞株PMDC05に抗原提示に必要な共通刺激因子であるCD80を強制発現させた細胞である。このPMDC11をWT1抗原再刺激に用いるため培養を行い抗

原提示関連分子であるCD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)の発現を確認した。

### PMDC11を用いたWT1特異的CTLの誘導

培養開始後14日目のフローサイトメトリーを用いたWT1/MHC-tetramer解析にてWT1/MHC-tetramer+細胞の増幅が確認された5 wellの細胞を用いて再刺激培養を行った。5wellの細胞を集め $3.0 \times 10^5$ 個/wellずつ48穴プレートに播種した。WT1ペプチドをパルスしたPMDC11とWT1ペプチドパルスしないPMDC11単独を抗原再刺激用のfeeder細胞として使用した。WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup> wellの細胞は、WT1ペプチドをパルスしたPMDC11で刺激する群、WT1ペプチドをパルスしていないPMDC11で刺激する群および単独培養する群の3群に分けた。PMDC11は30Gyの $\gamma$ 線照射後に、 $1.5 \times 10^5$ /wellの細胞密度でtetramer陽性well細胞と共培養した。3日後にIL-2 50U/ml, IL-7(R&D Systems, Minneapolis, MN) 10ng/ml, IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 10ng/mlを添加した5%自己血清加RPMI1640培養液を加え、最終培養液量を1000  $\mu$ lとして培養した。PMDC11を用いた同様の抗原再刺激を1週間後に追加した。

### WT1/MHC-tetramer解析

MLPC後およびPMDC11を用いた共培養後のwell中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4°C, 20分間反応させ染色した。抗体としては、FITC標識IgG1 (BD Biosciences), CD8 (BioLegend, San Diego, CA, USA), PE標識IgG1(BD Biosciences, San Jose, CA, USA),改変型WT1/MHC-tetramer (CYTWNQMNL, 医学生物学研究所, 長野)を使用した。FACSCalibur(BD Biosciences)で測定し、データはCellQuest software(BD Biosciences)で解析した。明らかなWT1/MHC-tetramer陽性細胞集団がupper rightに検出されたwell および 微小な細胞集団であっても平均蛍光強度がupper leftの非CD8+細胞のそれに比して高いwellを、これまでの報告<sup>6)</sup>同様にMLPC陽性wellと判断した。

### 細胞内INF- $\gamma$ 産生能解析

まず、MLPCにてWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の増幅が確認されたwellについて、WT1ペプチド特異的なINF- $\gamma$ 産生の解析を行った。コントロールペプチドとしてはHLA-A\*24:02 拘束性のCMVpp65 ペプチド

(QYDPVAALF) (GenScript, Piscataway, NJ, USA) を使用した。

PMDC11との共培養開始から2週間後に、PMDC11とWT1ペプチドによる再刺激によってWT1ペプチド特異的細胞内INF- $\gamma$ 産生能が維持されているか否かを解析した。

PMDC11とWT1ペプチドによる再刺激細胞とコントロール細胞を、解析直前にWT1ペプチド添加群と非添加群に分けて検討した。Brefeldin A (和光純薬工業, 大阪) 10mg/mlとmWT1 ペプチド10 $\mu$ g/ml およびBrefeldin A 10mg/mlのみをそれぞれ添加し4時間培養し、PBSで洗浄後抗体染色した。抗体としては、PE-IgG 1, WT1/MHC-tetramer, PerCP/Cy5.5-IgG1 (BD Bioscience), PerCP/Cy5.5-CD8 (Biolegend) を使用した。染色後PBSで洗浄し、Fixation/Permeabilization Diluent と Fixation / Permeabilization Concentrate (eBioscience, San Diego, GA, USA) を3:1で混和したものを500 $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ C 40分間反応させた。wash buffer (eBioscience) で洗浄後にAPC標識IgG1 (Biolegend), IFN- $\gamma$  (BD Pharmingen) を使用し細胞内INF- $\gamma$ の抗体染色を行いFACSCaliburで測定した。データはCellQuest softwareで解析した。

## 結果

### MLPCによるmWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>細胞の検出

培養開始から2週間後のmWT1/MHC-tetramer解析では、20well中5wellでWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が増幅され検出され、陽性率は25%であった(図1)。この5wellの細胞を以降の共培養に用いた。

### PMDC11の表面形質

今回の共培養に使用したPMDC11は、CD40の発現は低いが、CD80, CD83およびCD86は十分に発現していることを確認した(図2)。

### PMDC11と共培養したmWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の数的変化

共培養開始から1週間後(培養開始3週間後)のWT1/MHC-tetramer解析では、3群それぞれにおいてWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出された。すべてのwellにおいてWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が増幅されていた。WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合は、WT1ペプチドをパルスしたPMDC11で刺激した群、WT1ペプチドをパルスしていないPMDC11で刺激した群、

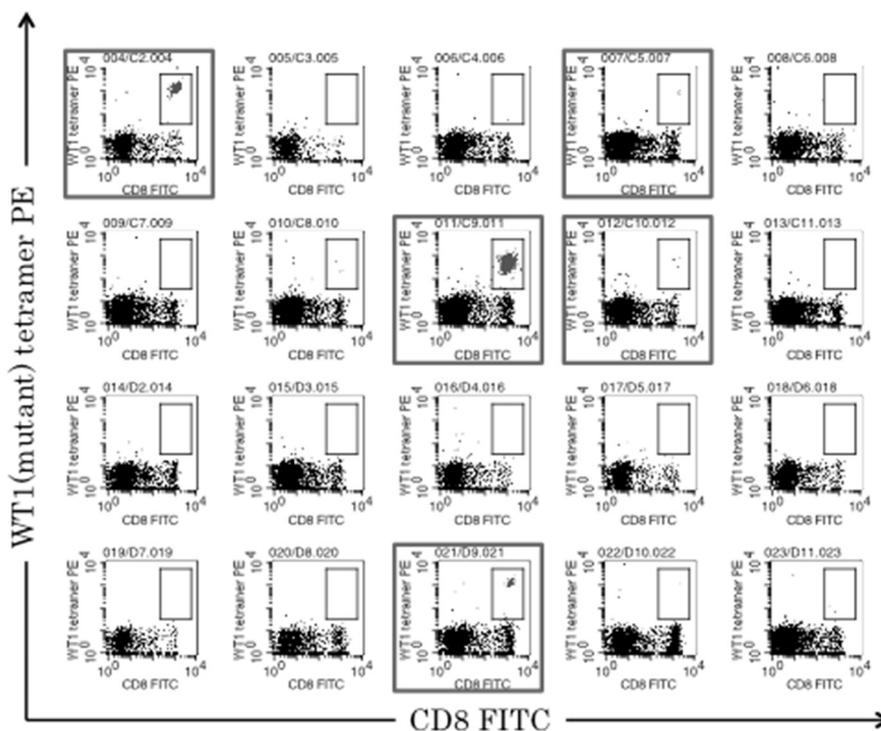


図1 MLPCを行った各wellのmWT1/MHC-tetramer解析の結果。枠で囲んだwellにおいて、一個のWT1-CTLが14日間の培養で増幅されたと判断したwellを枠で囲んでいる。このwellの細胞をPMDC11との共培養に用いた。

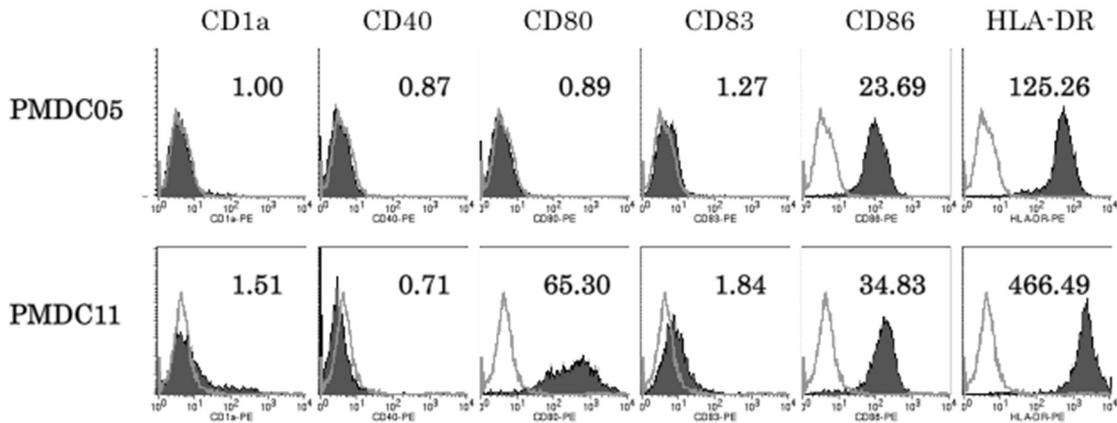


図2 PMDC05とCD80を遺伝子導入したPMDC11の抗原提示に関する表面形質. PMDC11ではCD80の十分な発現が確認された. 各パネル内の数値は, IgG1抗体 (緑線) をコントロールとした平均蛍光強度を示す.

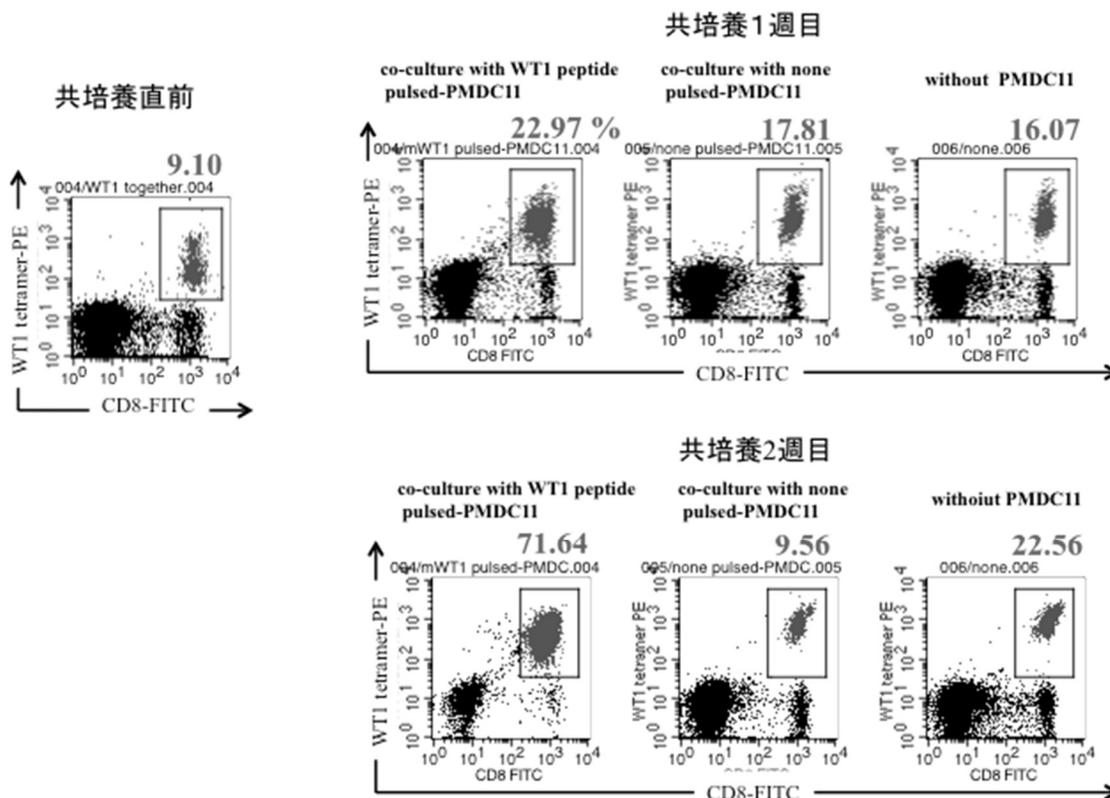


図3 左図はWT1/MHC-tetramer解析で陽性だった5wellの細胞を混合し共培養直前に再度WT1/MHC-tetramer解析を行った結果. 右図では, この細胞をPMDC11と共培養開始後の各3群におけるWT1/MHC-tetramer解析の結果を示す. 左よりPMDC11+WT1ペプチド, PMDC11のみ, PMDC11もWT1ペプチドも添加なしの培養細胞. 数値は総リンパ球中に占めるWT1/MHC-tetramer陽性細胞の割合 (%).

PMDC11なしで単独培養した群の順に多かった。同様に、共培養開始から2週間後(培養開始4週間後)のWT1/MHC-tetramer解析では、3群それぞれにおいてWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出された。そのうち、WT1ペプチドをパルスしたPMDC11で刺激した培養系では、前週よりWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が71.64%と大幅に増加していた。一方、WT1ペプチドをパルスしていないPMDC11刺激では、前週よりWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合は減少した。PMDC11なしの単独培養では、前週よりWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合が増加していた(図3)。

### INF- $\gamma$ 産生能

MLPC法によって増幅されたWT1特異的CTLには、WT1ペプチドに反応したINF- $\gamma$ 産生が認められたが、CMVpp65には反応せず、WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は、WT1特異的に細胞傷害活性を有するCTLであることが確認された(図4)。

WT1ペプチドをパルスしたPMDC11で再刺激、WT1ペプチドをパルスしていないPMDC11で再刺激、PMDC11との共培養なしの単独培養それぞれにおいて、共培養開始後2週目にも細胞内INF- $\gamma$ <sup>+</sup>WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出された。いずれの培養系においても、ペプチド刺激を加えなかったものではINF- $\gamma$ <sup>+</sup>WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は認められなかった。WT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞中の検出率は共培養においてWT1ペプチドをパルスしたPMDC11で刺激した系でCTL中0.65%(図5)、WT1ペプチドをパルスしていないPMDC11で刺激した群で17.11%(図6)PMDC11なしで単独培養した群で21.54%であった(図7)。

### 考察

CTLを用いた養子免疫療法は従来のがん治療法と比べて副作用が少ない点で注目されており、効果に関し

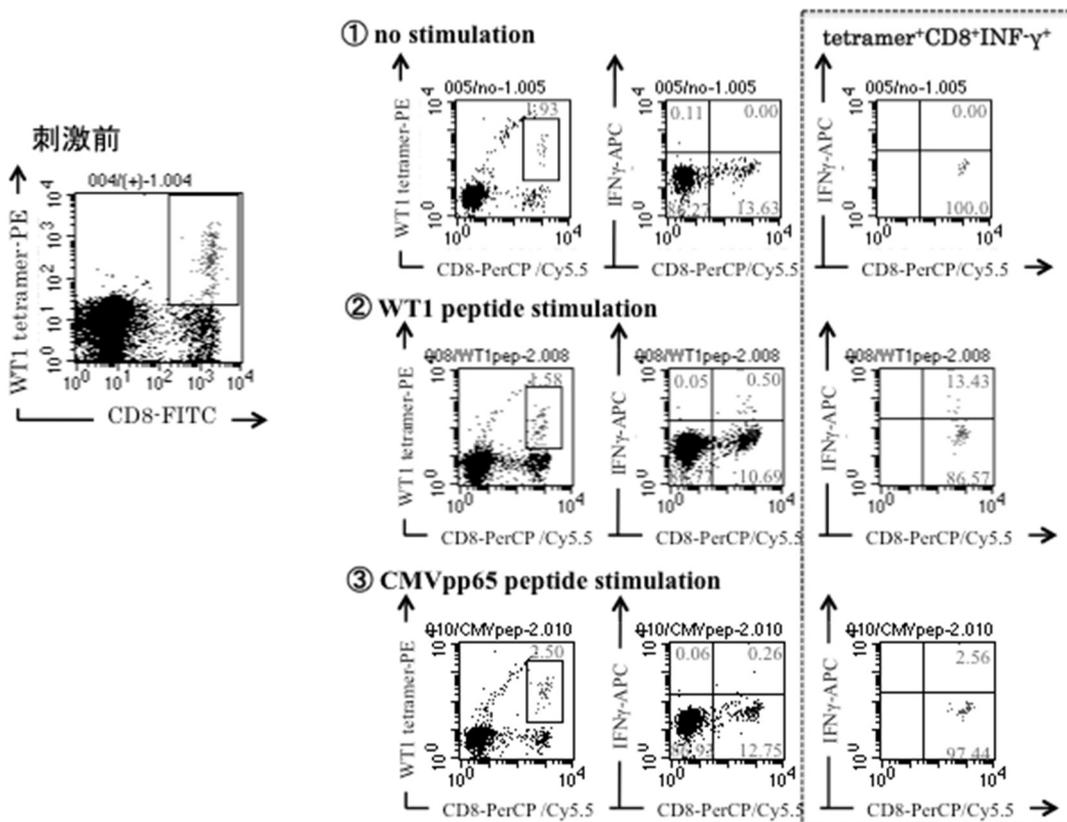


図4 MLPC法による培養後のWT1/MHC-tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の細胞内INF- $\gamma$ 産生能の解析結果。左図は刺激前のWT1/MHC-tetramer解析の結果である。①、②および③は、それぞれWT1ペプチドで再刺激していない細胞と再刺激した細胞およびCMVpp65ペプチドで再刺激した細胞のINF- $\gamma$ 産生能解析の結果である。WT1ペプチドで刺激した②においてWT1 tetramer陽性細胞中13.43%の細胞内INF- $\gamma$ の産生が認められた。

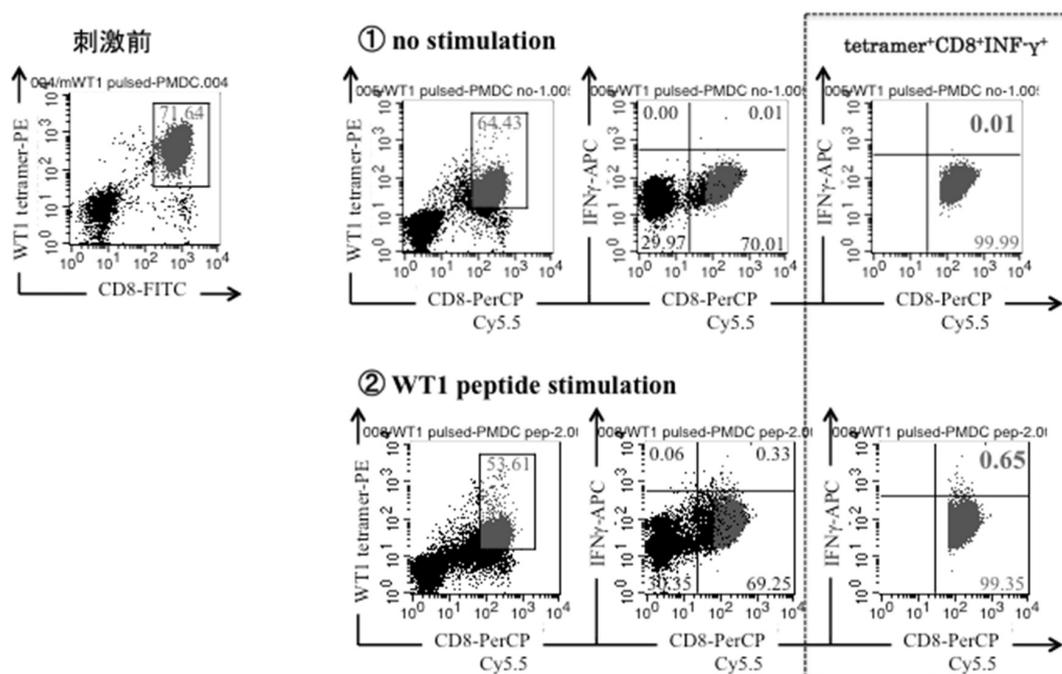


図5 共培養2週目のWT1ペプチドをパルスしたPMDC11で共培養した群における細胞内IFN- $\gamma$ 産生能の解析。左図は共培養開始直前のWT1/MHC-tetramer解析の結果である。右上図および右下図はそれぞれ細胞内IFN- $\gamma$ 染色の直前にWT1ペプチドで再刺激していない細胞と再刺激した細胞のIFN- $\gamma$ 産生能解析の結果である。ペプチドに反応した特異的細胞内IFN- $\gamma$ 陽性WT1/MHC-tetramer陽性細胞は0.65%であった。

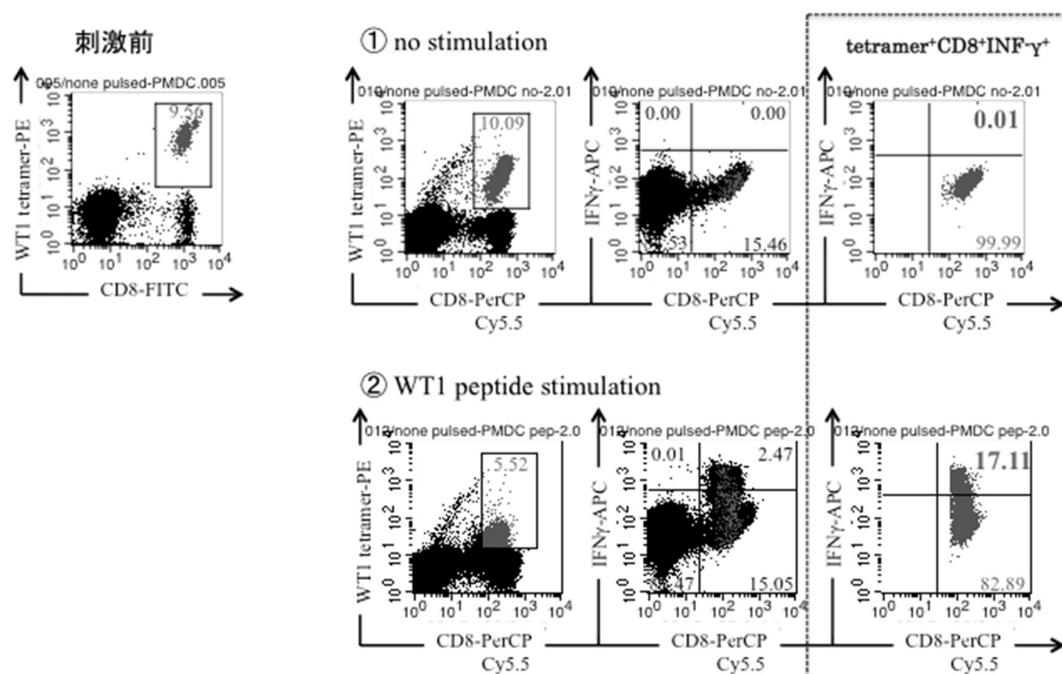


図6 共培養2週目のWT1ペプチドをパルスしていないPMDC11で共培養した群におけるIFN- $\gamma$ 産生能の解析。左図は共培養開始直前のWT1/MHC-tetramer解析の結果である。右上図および右下図はそれぞれ細胞内IFN- $\gamma$ 染色の直前にWT1ペプチドで再刺激していない細胞と再刺激した細胞のIFN- $\gamma$ 産生能解析の結果である。ペプチドに反応した特異的細胞内IFN- $\gamma$ 陽性WT1/MHC-tetramer陽性細胞は17.11%であった。

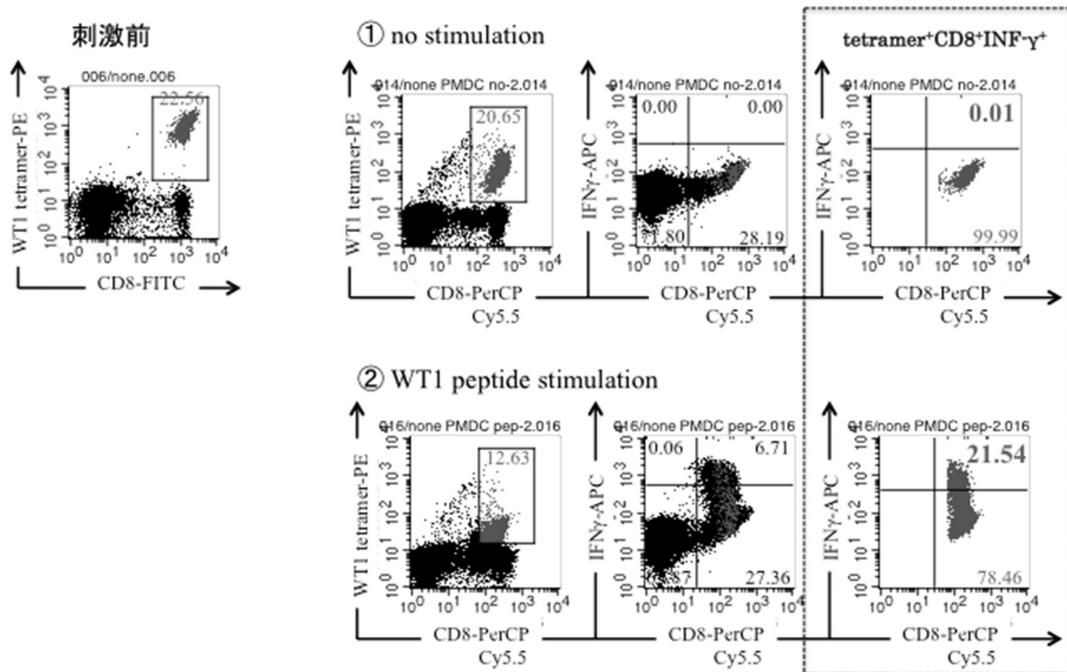


図7 共培養2週目のPMDC11との共培養を行わなかった群における細胞内INF- $\gamma$ 産生能の解析. 左図は共培養開始直前のWT1/MHC-tetramer解析の結果である. 右上図および右下図はそれぞれ細胞内INF- $\gamma$ 染色の直前にWT1ペプチドで再刺激していない細胞と再刺激した細胞のINF- $\gamma$ 産生能解析の結果である. ペプチドに反応した特異的細胞内INF- $\gamma$ 陽性WT1/MHC-tetramer陽性細胞は21.54%であった.

でも前立腺癌やメラノーマなどの腫瘍, Cytomegalovirus (CMV) やEpstein Barr virus (EBV) などのウイルス感染症に対して有効であるという報告が出されている。抗原ペプチドワクチン療法は, 感染症に対するワクチン療法と基本的には同じ理論で開発された。主にCD8<sup>+</sup>T細胞を増幅する方向で開始され, 造血器腫瘍のみならず固形腫瘍においても一定の効果が報告されてきた<sup>9)10)11)12)</sup>。しかし, 十分量のCTLを誘導できない症例も多く, 効果細胞を増幅し確保する事が臨床的には長年の課題であった。

CTLの抗原認識機能に関しては, 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は一種類と考えられてきた。最近, 複数のTCRが存在する可能性が示唆され始めている<sup>13)</sup>。MHCとTCR間における抗原情報伝達機構や, 腫瘍表面上の一種類のペプチドを認識するTCRを同定し細胞傷害活性との関連を検討することは, 人工CTLの開発やヒト腫瘍免疫の基礎研究においても重要な課題と思われる。

本検討では, MLPC法によってsingle cellから増幅させたCTLをさらに増幅させることを目的として, PMDC11をfeeder細胞として培養を継続した。PMDC11は本研

究室で樹立したHLA-A\*24:02陽性の形質細胞様樹状細胞性白血病由来細胞株PMDC05<sup>14)</sup>の改良株で, CD80の強い発現が維持されていることを確認した。

今回の検討例では, WT1ワクチン中止後8年半を経過してもWT1に特異的に反応するCTLが存在していた。また, HLA-A\*24:02拘束性のWT1ペプチド特異的CTLは, 2週間のMLPC法によって増幅され, さらにPMDC11との共培養を2週間継続することによって, 最終的にはCD8<sup>+</sup>細胞中71.64%まで増幅・純化可能であった。増幅したCTLの機能は, 4週目においてもサイトカイン非添加でBrefeldinとペプチド添加により細胞内INF- $\gamma$ 産生能として解析可能であった。しかし, このINF- $\gamma$ 産生能は, 細胞数としては最も増幅された培養系において陽性率が明らかに低下していた。TCRへの強い抗原刺激が活性化と細胞増殖は促したものの, 細胞疲弊を起こしたものと想定される。従って, 細胞傷害活性測定を目的とする場合には, 培養条件の改良が必要であることが明らかになった。

MLPC法とPMDC11を用いたCTLの増幅は, 採取血液量も少なく, feeder細胞に細胞株を用いている点で, 簡便な検査技術に利用可能と思われた。今後は培養期間やPMDC11の刺激方法などを工夫しつつ, この増幅

法を用いて、TCRの詳細な解析，細胞傷害活性の確認および免疫チェックポイント因子の発現の変化を検討したい。

## 引用文献

- 1) Gubin MM, Zhang X, Schreiber RD, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014; 515(7528): 577-81.
- 2) Hirayama M, Nishimura Y. The present status and future prospects of peptide-based cancer vaccines. *Int Immunol*. 2016; 28(7): 319-28.
- 3) Blank C, Kuball J, Mackensen A, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer*. 2006; 119(2): 317-27.
- 4) Singh N. Recent advances in engineered T cell therapies targeting B cell malignancies. *Discov Med*. 2016; 22(121): 215-20.
- 5) Geyer MB, Brentjens RJ. Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy*. 2016; 18(11): 1393-409.
- 6) 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.
- 7) Yamahira A, Narita M, Takahashi M, et al. Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. *Leuk Res*. 2012; 36(12): 1541-6.
- 8) Iwabuchi M, Narita M, Takahashi M, et al. Enhancement of the antigen-specific cytotoxic T lymphocyte-inducing ability in the PMDC11 leukemic plasmacytoid dendritic cell line via lentiviral vector-mediated transduction of the caTLR4 gene. *Mol Med Rep*. 2015;(2): 2443-50.
- 9) Holbrook E, Kohrt, Samuel Strober, et al. Donor immunization with WT1 peptide augments antileukemic activity after MHC-matched bone marrow transplantation. *Blood*. 2011; 118(19): 5319-29.
- 10) 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.
- 11) Oji Y, Hashimoto N, Sugiyama H, et al. Association of WT1 IgG antibody against WT1 peptide with prolonged survival in glioblastoma multiforme patients vaccinated with WT1 peptide. *Int J Cancer*. 2016; 139(6): 1391-1401.
- 12) Ohnami 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.
- 13) 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.
- 14) Narita M, Watanabe N, Takahashi M, et al. A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN-alpha by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naïve T cells. *Leuk Res*. 2009; 33(9): 1224-32.

## Antigen specific INF- $\gamma$ production of the amplified CTL using plasmacytoid dendritic cell line (PMDC11)

Syunya YAMADA<sup>1)</sup>, Wakana GOTO<sup>1)</sup>, Sara OGAWA<sup>1)</sup>, Masayoshi MASUKO<sup>2)</sup>,  
Kaho KOBAYASHI<sup>1)</sup>, Yasuhiko SHIBASAKI<sup>2)</sup>, Takayoshi UCHIYAMA<sup>3)</sup>,  
Jun TAKIZAWA<sup>2)</sup>, Hirohito SONE<sup>2)</sup>, Masuhiro TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Miwako NARITA<sup>1)</sup>

1) Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University

2) Department of Hematology, Niigata University Medical and Dental Hospital

3) Department of Pathophysiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

*Key words* : WT-1, antigen specific CTL, INF- $\gamma$ , PMDC 11

**Abstract** It is becoming clear that antigen-specific cytotoxic T cells (CTLs) play an important role in anti-tumor immune system due to the recent confirmation of clinical effects of immune-checkpoint inhibitors. We tried to amplify efficiently WT1 specific oligoclonal CTLs from the peripheral blood of the case treated with WT1 peptide vaccine using dendritic cell line PMDC 11 which was established in our laboratory. Antigen - specific IFN -  $\gamma$  - producing ability was confirmed in the amplified WT1- specific CTLs. This result means that the antigen - specific CTLs amplified by PMDC 11 maintain cytotoxic ability against to tumor specific antigen. This method of amplifying antigen-specific CTLs using MLPC and PMDC 11 will lead to application of CTL to clinical application and TCR and surface antigen analysis.

Accepted : 2017.3.3