

# WT1ペプチドワクチン施行症例におけるWT1特異的細胞傷害性T細胞の 検出及びそのIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害活性の同定

大岩 恵理・成田美和子・岩谷 俊平・西澤 幹則  
内山 孝由・岩渕 南・高橋 益廣

**Key words** : WT1抗原, 細胞傷害性T細胞 (CTL), ペプチドワクチン, IFN- $\gamma$ , 細胞傷害活性

**要旨** 抗腫瘍免疫療法施行例における治療効果を判定するために, in vitroで培養された腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) が特異的に抗原を認識し, 細胞傷害機能を有するか調べることを目的とした。本検討では, in vivoに存在するWT1特異的CTLを混合リンパ球ペプチド培養 (mixed lymphocyte peptide culture; MLPC) によりin vitroで増幅し, WT1特異的CTLの機能解析を行った。in vitroで誘導されたWT1特異的CTLはWT1抗原特異的にIFN- $\gamma$ を合成し, 細胞傷害活性を有することが確認された。以上のことから, WT1ペプチドワクチン施行例の末梢血中にはIFN- $\gamma$ の産生能と細胞傷害活性を持つWT1特異的CTLが存在し, これらのCTLはさらなるWT1ペプチドワクチンにより増幅されると考えられた。

## 緒言

小児の腎芽細胞腫であるWilms腫瘍において発現が認められるWT1遺伝子は, 悪性造血器腫瘍及び種々の固形癌においても高い発現が報告されている。一方で, 健常人の組織や細胞でのWT1抗原の発現は限られている<sup>1)</sup>。このことからWT1抗原は抗腫瘍免疫療法の有望な標的とされ, 日本人のおよそ60%をカバーするHLA-A\*24:02 拘束性WT1タンパク由来CTLエピトープペプチド (WT1ペプチド) の同定が行われた<sup>2)</sup>。

MHC class I 分子上に提示されたWT1抗原は, MHC class I 拘束性にCD8陽性T細胞に認識され, 抗原を特異的に認識する細胞傷害性T細胞 (CTL) を誘導, 活性化させる。

WT1抗原特異的CTLを効果的に誘導するために, 免疫原性の高いエピトープの同定が行われ, 野生型WT1ペプチド (CMTWNQMNL) の改変が行われた。改変型WT1ペプチド (CYTWNQMNL) はHLA-A\*24:02分子との高い親和性を持ち, より効率的にWT1特異的CTLを誘導することが出来た。改変型WT1ペプチドにより誘導されたCTLは, 野生型WT1抗原を発現する白血病細胞をHLA-A\*24:02拘束性に認識し, 傷害した<sup>3)</sup>。

この改変型WT1ペプチドを用いたワクチン療法が現在臨床で行われ始めているが, 治療効果を判定するための経時的観察・免疫学的評価が重要である<sup>4)</sup>。しかし末梢血中に存在する腫瘍抗原特異的CTLの頻度は低く ( $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$ ), ウィルス抗原特異的CTLに比してその検出は困難であった。そのためWT1ペプチドワクチン施行症例の末梢血より単核球を分離し, WT1ペプチドを添加しプレートに播種・培養することで, in vitroで増幅させる試みが行われた<sup>5)</sup>。これにより腫瘍抗原特異的CTLの頻度を算出することが可能になったが, in vitroで誘導された腫瘍抗原特異的CTLの機能解析については, 未だ十分に検討されていなかった。

本研究においては, in vivoに存在するWT1特異的CTLを混合リンパ球ペプチド培養 (mixed lymphocyte peptide culture; MLPC) によりin vitroでWT1特異的CTLを誘導し, その細胞機能解析を行った。

## 材料と方法

### 末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)の分離

WT1ペプチドワクチン施行症例に対し, 十分な説

明及び同意を得た後に末梢血を採取した。

末梢血を $1,200\times g$  (小文字)で25分間遠心し、血漿を分離した。分離された血漿を試験管に移し、終濃度5U/mlのトロンビン(ミドリ十字, 大阪)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で2時間反応させた。その後、 $1,200\times g$ で20分間遠心分離し、血清を得た。

血漿分離後の血球に、分離した血漿と同量の100 U/ml penicillin, 及び $100\mu\text{g/ml}$  streptomycin(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)加Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640培地(Life Technologies Corporation)を加え、十分に混和後、Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)の上に静かに重層した。その後 $800\times g$ で30分間遠心し、中間層よりPBMNCを新しい試験管に回収した。この試験管にRPMI1640培地を加えて十分に混和し、 $300\times g$ で10分間遠心を行い、上清を除いた。再度RPMI1640培地を加えて十分に混和し、 $200\times g$ で10分間遠心を行った。上清除去後、沈殿しているPBMNCに5%自己血清(autologous serum; AS)添加RPMI1640培地を加え、洗浄・浮遊し、トリパンブルー色素排除試験法(trypsin blue dye-exclusion test SIGMA-ALDRICH)により生細胞をカウントした。

### サイトカイン及びペプチド

Interleukin-2 (IL-2:シオノギ製薬, 大阪), 改変型WT1ペプチド(mWT1: CYTWNQMNL, Neo MPS, San Diego, CA, USA)を用いた。

### フローサイトメトリーによる解析

培養細胞にFc $\gamma$ レセプターブロック試薬を加え $4^{\circ}\text{C}$ ,

10分間反応させ、各染色抗体で $4^{\circ}\text{C}$ , 20分間染色した。染色後、phosphate buffered saline(PBS)で $500\times g$ , 5分間遠心し、デカントにより上清を除去し(洗浄), PBS  $100\mu\text{l}$ に再浮遊させ、FACSCalibur(BD Biosciences)で測定し、CellQuest Pro (BD Biosciences)で解析した。

使用した抗体は、以下の通りである。

fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体: IgG1 (BD Biosciences), CD8 (BioLegend, San Diego, CA, USA), CD107a (医学生物学研究所, 長野), phycoerythrin (PE) 標識抗体: IgG1, CD8, IFN- $\gamma$  (BD Biosciences), mWT1/MHC tetramer (HLA-A\*24:02 WT1 mutant tetramer-CYTWNQMNL, 医学生物学研究所, 長野), PE-Cy5.5 (PC-5) 標識抗体: IgG1, CD8 (BECKMAN COULTER, Brea, CA, USA)

### 混合リンパ球ペプチド培養法 (mixed lymphocyte peptide culture; MLPC) (図1)

末梢血より分離したPBMNCを、細胞数 $3\times 10^6/\text{ml}$ , mutant WT1ペプチド $10\mu\text{g/ml}$ を5%自己血清加培養液(RPMI1640)に浮遊させ、 $100\mu\text{l/well}$ ずつ96穴プレートに播種した。 $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ , 湿潤状態で培養3日後、IL-2 50U/ml加5%自己血清加培養液 $100\mu\text{l/well}$ に加え、さらに3日後、各ウェルから上清を $100\mu\text{l}$ ずつ除き、新たにIL-2 50U/ml加5%自己血清加培養液 $100\mu\text{l/well}$ ずつ加える。これを2日毎に繰り返し培養開始2週目に細胞を回収して、各ウェルにおけるmWT1/major histocompatibility complex (MHC) tetramer $^+$ CD8 $^+$  T細胞をフローサイトメトリーで解析(tetramer解析)した。

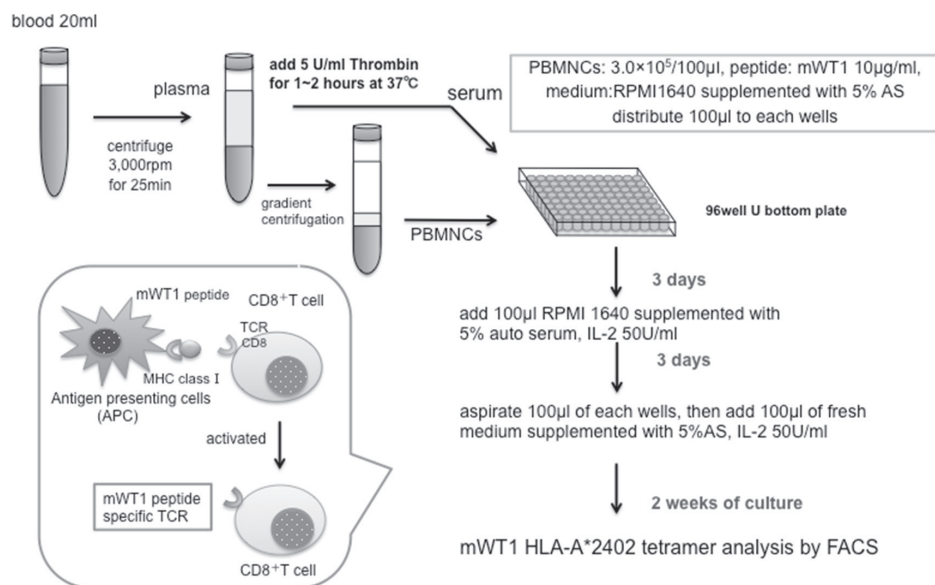


図1. 混合リンパ球ペプチド培養 (MLPC) 法

## WT1ペプチドワクチン施行症例におけるWT1特異的細胞傷害性T細胞の 検出及びそのIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害活性の同定

### 細胞内サイトカイン染色

MLPC後のtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞分画が多いウェルを集めて細胞内IFN- $\gamma$ 染色を行ったMLPC後の細胞をFBS非添加RPMI1640培地で1回洗浄後、5%AS RPMI1640培地を加え $1.0 \times 10^6$ /mlに調整し、200  $\mu$ lずつ5mlポリスチレンチューブ(BD Biosciences)に加えた。mWT1ペプチド10  $\mu$ g/ml又はPMA/CI; phorbol myristate acetate, calcium ionophore (50ng/ml PMA SIGMA-ALDRICH, 1  $\mu$ g/ml ionomycin SIGMA-ALDRICH)を加え再刺激し、4時間37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿潤状態で培養した。その後回収し、PBSで1回洗浄後に細胞表面を4℃、20分間染色した。表面染色後PBSで1回洗浄し、BD Cytotfix/Cytoperm(BD Biosciences)を50  $\mu$ lずつ加え、4℃、20分間固定・細胞膜透過を亢進させ、BD Perm/Wash buffer (BD Biosciences)で1回洗浄した。PE標識IFN- $\gamma$ で細胞内を4℃、20分間染色し、BD Perm/Wash bufferで1回洗浄した。BD Perm/Wash bufferを100  $\mu$ lずつ加えて懸濁し、FACS解析した。

### 脱顆粒試験

効果細胞にMLPC後のtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞分画が多いウェルを集めて脱顆粒試験を行った。標的細胞には自己B-LCL (自己リンパ芽球様細胞株; autologous B-lymphoblastoid cell line)を用いた。B-LCLはEBウィルスの培養上清を自己PBMNCに加えて感染すると、自己B細胞が増殖活性化・不死化することを利用して株化したものである。標的細胞にmWT1ペプチド10  $\mu$ g/mlを加え24時間37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿潤状態で培養した。その後回収し、FBS非添加RPMI1640培地で2回洗浄を行い $1.0 \times 10^5$ /mlに調整した。効果細胞はFBS非添加RPMI1640培地で1回洗浄を行った。効果細胞:標的細胞=10:1となるよう、効果細胞を $1.0 \times 10^6$ /mlに調整した。効果細胞及び標的細胞を調整する際、5%AS RPMI1640培地を用いた。5mlポリスチレンチューブ(BD Biosciences)に効果細胞と標的細胞をそれぞれ100  $\mu$ lずつ、脱顆粒マーカーであるFITC標識CD107a抗体 (医学生物学研究所, 長野)を2  $\mu$ lずつ加え、4時間共培養した。培養の際、エンドソームによるFITC標識CD107aの蛍光低下を防止するために、Monensin (医学生物学研究所)を2  $\mu$ lずつ加えた。培養後、PBSで1回洗浄し細胞表面をPC-5標識CD8, IgG1, PE標識tetramerを用いて4℃、20分間染色した。PBSで洗浄後、Cell suspension solution (医学生物学研究所)を200  $\mu$ lずつ加えて懸濁し、FACS解析した。

### 細胞傷害性試験

効果細胞にはMLPC後のtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞分画が多いウェルを用いた。標的細胞にはレンチウイルスベクターを用いてGFPを導入した、T2A24及び自己B-LCLを用いた。これら2種類の標的細胞にmWT1ペプチド10  $\mu$ g/mlを加え24時間37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿潤状態で培養した。その後回収し、フェノールレッド非添加RPMI1640培地で2回洗浄を行い $1.0 \times 10^5$ /mlに調整した。効果細胞はフェノールレッド非添加RPMI1640培地を用いて1回洗浄を行った。効果細胞:標的細胞=1:1, 2.5:1, 5:1となるよう、効果細胞を $1.0 \times 10^5$ /ml,  $2.5 \times 10^5$ /ml,  $5.0 \times 10^5$ /mlに調整した。効果細胞及び標的細胞を調整する際、10%FBS加フェノールレッド非添加RPMI1640培地を用いた。5mlポリスチレンチューブ(BD Biosciences)に効果細胞と標的細胞をそれぞれ100  $\mu$ lずつ加え、37℃、5%CO<sub>2</sub>、湿潤状態で4時間共培養した。20  $\mu$ g/ml 7AAD(7-amino-actinomycin.D; SIGMA-ALDRICH)で、15分間暗所で染色し、FACSで測定した。測定は120秒/チューブで測定し、実験はtriplicateで行った。細胞傷害活性は以下のように算出した。

細胞傷害活性 (%cytotoxicity) = (標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数 - 効果細胞と標的細胞の共培養チューブ中の標的生細胞数) / (標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数)  $\times$  100

### 結果

#### MLPCによるmWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞の検出(図2)

MLPC法で2週間培養した後に、mWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>解析をウェル毎に行った結果である (図1)。24ウェル中12ウェルにおいて、mWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞分画に細胞集塊が認められたウェルを陽性とした。

#### 細胞内サイトカイン染色 (図3)

ペプチド再刺激有無による、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞のIFN- $\gamma$ 合成能を比較した。mWT1ペプチドによる再刺激を行わなかった場合、mWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞分画全体で、細胞内IFN- $\gamma$ 染色は陰性であった。しかしmWT1ペプチドによる再刺激を行った場合、mWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞細分画の60%以上が細胞内IFN- $\gamma$ 陽性となった。

#### 脱顆粒試験 (図4)

標的細胞にペプチドパルスをしたものと、していないものを用いて脱顆粒試験を行った。ペプチドパルス



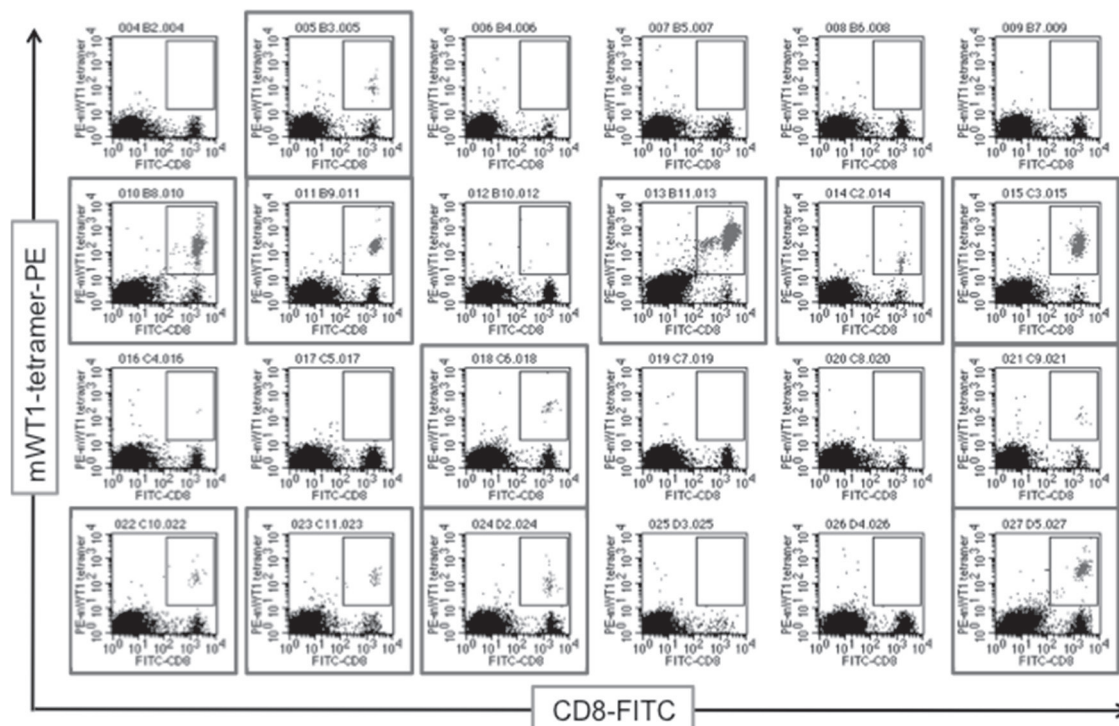


図2. MLPC法で2週間培養した後に、ウェル毎に行ったmWT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>解析。CD8-FITC, mWT1-tetramer-PEで染色し、陽性ウェルを枠で囲った。

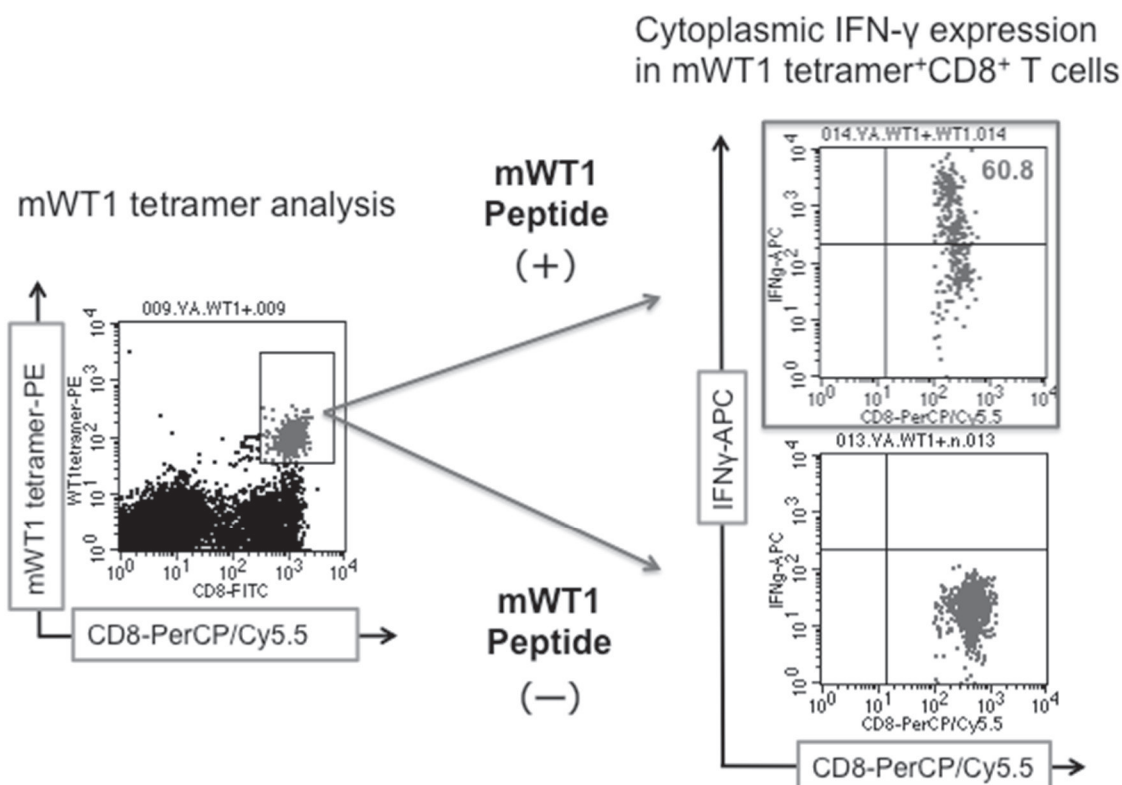


図3. 細胞内サイトカイン染色。MLPCにより得られたtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞にmWT1ペプチドで刺激を行った場合、細胞内IFN- $\gamma$ の合成が認められた。

WT1ペプチドワクチン施行症例におけるWT1特異的細胞傷害性T細胞の  
検出及びそのIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害活性の同定

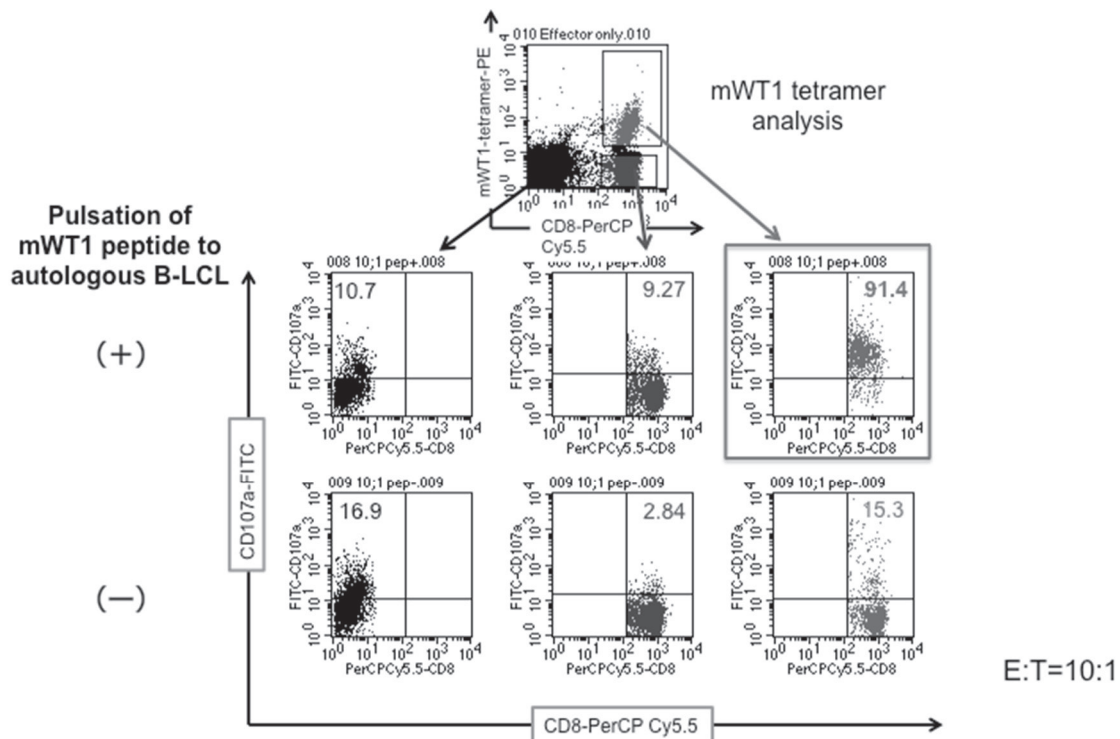


図4. MLPCにより得られたtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞による自己 B-LCLを標的細胞とした脱顆粒試験。mWT1ペプチドをパルスした自己B-LCLを用いた場合、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞は抗原特異的に脱顆粒を起こした。

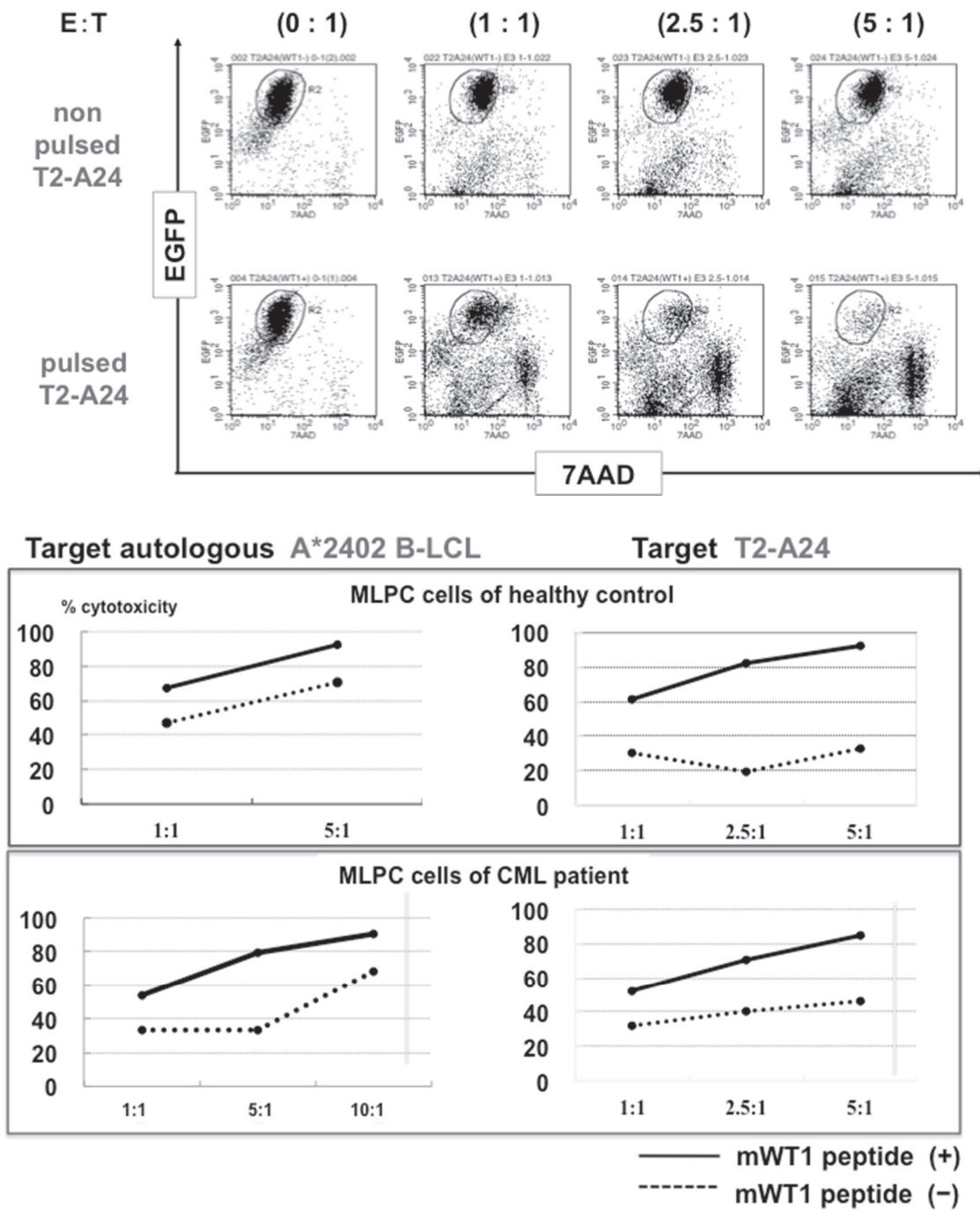


図5. MLPCにより得られたtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞を効果細胞, mWT1ペプチドをパルスしたT2-A24又は自己 B-LCL を標的細胞とした細胞傷害性試験。効果細胞:標的細胞 (E:T ratio) の割合が増える毎に細胞傷害活性が増加した。

## WT1ペプチドワクチン施行症例におけるWT1特異的細胞傷害性T細胞の 検出及びそのIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害活性の同定

を行った標的細胞を用いた場合、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中で16.9%、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中では9.27%、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中では91.4%がCD107a陽性となった。ペプチドパルスを行っていない標的細胞を用いた場合、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中で10.7%、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中では2.84%、tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞中では15.3%がCD107a陽性となった。

### 細胞傷害性試験（図5）

標的細胞にペプチドパルスをしたものと、していないものを用いて細胞傷害性試験を行った。CTLの障害によりアポトーシスを起こした標的細胞は、GFP蛍光強度が低下し7AADにより核が染色される。ペプチドパルス無しのT2A24又はB-LCL細胞を標的細胞として用いた場合に比べて、ペプチドパルスを行った標的細胞を用いた場合の細胞傷害活性が高かった。また、効果細胞：標的細胞（E:T ratio）の割合が増える毎に細胞傷害活性が増加していた。

### 考察と結論

抗腫瘍免疫療法が臨床で行われるようになった現在、その治療効果を評価する方法の確立が必要不可欠である。我々は、当研究室で確立したMLPC法を用いることで、腫瘍抗原特異的CTLを増幅し、末梢血中の頻度を算出することが可能であると報告してきた<sup>6,7)</sup>。

細胞内サイトカイン染色において検出されたIFN- $\gamma$ の合成は、CTLの機能を評価するための重要な指標である。IFN- $\gamma$ は主にTh1細胞やCTLにより産生される。Th2細胞活性を抑制し、MHC class I, MHC class II分子の発現を増強・促進させる機能を持つ。NK細胞やCTLの細胞傷害活性を高め、抗腫瘍免疫効果を増強させることが報告されている<sup>8-10)</sup>。従って細胞内IFN- $\gamma$ 合成の検出により、抗腫瘍免疫療法の治療効果を判定することが可能である。がん抗原特異的CTLのモニタリングに、この細胞内サイトカイン染色法が有用であるとする報告がある<sup>11)</sup>。細胞内サイトカイン染色法により、様々な細胞分画ごとの解析が可能となった。例えばIFN- $\gamma$ を合成している細胞がCD4陽性T細胞なのか或いはCD8陽性T細胞なのか、分画ごとの解析が可能である。しかしMLPC後に細胞内にIFN- $\gamma$ を合成した細胞が、実際に細胞外へIFN- $\gamma$ を放出することにより機能を果たしているかどうかを検討する必要がある。そこでElispot法やCytometric beads array法を用いて、IFN- $\gamma$ の定量を行い、MLPC後の細胞が抗原特異的に

IFN- $\gamma$ を産生・分泌することを確認出来た。(data not shown)

抗原特異的CTLが標的細胞を傷害する際、granzyme Bやperforinといった細胞傷害性顆粒を放出することが知られている。perforinを放出し標的細胞膜に孔を開け、granzyme Bを注入し、標的細胞にアポトーシスを起こさせる。これら細胞傷害性顆粒は顆粒膜に包まれ、細胞内を輸送され、顆粒膜と細胞膜表面が融合し、分泌される。この際一過性に細胞膜上に発現する抗原であるCD107a (lysosome-associated membrane protein 1: LAMP-1) を、CTLやNK細胞の脱顆粒のマーカーとして用いている<sup>12-16)</sup>。

本検討ではMLPC後のtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が、WT1ペプチドをパルスしたB-LCLで刺激した際にCD107a発現が陽性となり、抗原特異的に脱顆粒を起こすことを示した。さらに標的細胞としてT2-A24と自己B-LCLを用いたことにより、MLPC後のtetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞はMHC class I 拘束性を持ち、がん抗原を発現する自己細胞のアポトーシスを起こさせることを示した。以上のことから、mWT1ペプチドワクチン施行症例の末梢血中にはIFN- $\gamma$ 産生能・細胞傷害活性を持つmWT1特異的CTLが存在し、さらなるペプチドワクチンによりこのCTLは活性化・増幅しうることが示唆された。

## 引用文献

- 1) Haruo Sugiyama.  
Wilms' Tumor Gene *WT1*: Its Oncogenic Function and Clinical Application.  
Int J Hematol. 2001;73:177-187.
- 2) Akihiro Tsuboi, Yoshihiro Oka, Keiko Udaka et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A\*2402-binding residues.  
Cancer Immunol Immunother. 2002;51:11-12:614-20.
- 3) Oka Y, Tsuboi A, Oji Y. et al  
WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer.  
Curr Opin Immunol. 2008;20:211-20.
- 4) Watanabe K, Toji S, Otake J. et al  
Establishment of a stable T lymphoma cell line transduced with HLA-A\*24:02-restricted WT1-specific TCR genes and its application to antigen-specific immunomonitoring.  
Biomed Res. 2013;34:1:41-50.
- 5) Morita Y, Heike Y, Kawakami M. et al  
Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
Int J Cancer. 2006;119:6:1360-7.
- 6) 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.
- 7) Anri Saitoh, Miwako Narita, 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;28:219-230
- 8) Sandberg JK, Fast NM, Nixon DF. et al  
Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes.  
J Immunol. 2001;167:1:181-7.
- 9) Wilde S, Sommermeyer, Leisegang M. et al  
Human antitumor CD8+ T cells producing Th1 polycytokines show superior antigen sensitivity and tumor recognition.  
J Immunol. 2012;189:2:598-605.
- 10) Krug LM, Dao T, Andrew B. et al  
WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer.  
Cancer Immunol Immunother. 2010;10:1467-79.
- 11) Kakimi K, Isobe M, Uenaka A. et al  
A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen.  
Int J Cancer. 2011;129:12:2836-46.
- 12) Getachew Y, Stout-Delgado H, Bonnie C et al  
Granzyme C supports efficient CTL-mediated killing late in primary alloimmune responses.  
J Immunol. 2008;181:11:7810-7.
- 13) Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. et al  
CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity.  
J Immunol Methods. 2004;294:1-2:15-22.
- 14) Cohnen A, Chiang SC, Ana S. et al  
Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage.  
Blood. 2013;122:8:1411-8.
- 15) Aktas E, Kucuksezer UC, Sema B. et al  
Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity.  
Cell Immunol. 2009;254:2:149-54.
- 16) Betts MR, Brenchley JM, Price DA. et al  
Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation.  
J Immunol Methods. 2003;281:1-2:65-78.



WT1ペプチドワクチン施行症例におけるWT1特異的細胞傷害性T細胞の  
検出及びそのIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害活性の同定

## Identification of IFN- $\gamma$ production and cytotoxicity in WT1 tetramer+ T cells generated by mixed lymphocyte peptide culture in WT1 peptide immunized persons

Eri OIWA, Miwako NARITA, Shunpei IWAYA, Yoshinori NISHIZAWA  
Takayoshi UCHIYAMA, Minami IWABUCHI, Masuhiro TAKAHASHI

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

*Key words* : WT1, cytotoxic T lymphocyte (CTL), peptide vaccine, IFN- $\gamma$ , cytotoxicity

**Abstract** Although the frequencies of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in peripheral blood (PB) can be evaluated by mixed lymphocyte peptide culture (MLPC), the function of tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells induced by MLPC has not been studied extensively yet. Therefore, we aimed to explore the function of tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells generated by MLPC. We confirmed that population of tetramer positive cells in MLPC produced IFN- $\gamma$  by recall stimulation, using intracellular cytokine staining. This study showed that WT1 positive cells, which were induced by MLPC, have function of producing IFN- $\gamma$  and killing target cells. The present findings suggest that WT1 peptide immunized persons hold WT1 specific CTLs and IFN- $\gamma$  production and cytotoxicity in CTLs could be enhanced by further WT1 peptide vaccination.

Accepted : 2014.2.24