

腫瘍免疫担当細胞の解明と新しい免疫療法の開発

新潟大学大学院保健学研究科保健学専攻
検査技術科学分野博士後期課程

B12C501E 内山 孝由
(指導：高橋益廣教授、成田美和子准教授)

Investigation of anti-tumor immunological cells and Development of
novel immunotherapies

Takayoshi Uchiyama

Division of the medical technology, Graduate school of health sciences,
Niigata University
Niigata, Japan

(Directed by Prof. Masuhiro Takahashi
and Associate Prof. Miwako Narita)

目次

第 1 章 緒論.....	5
第 2 章 分子標的治療薬ダサチニブのリンパ球サブセットに対する直接作用の検討... 8	8
1 緒言	8
2 材料と方法	9
2.1 末梢血単核球(PBMC)の分離.....	9
2.2 細胞培養	9
2.3 フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析	9
2.4 細胞傷害性試験(NK 活性測定).....	10
2.5 統計解析	10
3 結果	10
3.1 $\gamma\delta$ T 細胞培養系を用いた $\gamma\delta$ T 細胞および NK 細胞増加に対するダサチニブ影響10	10
3.2 LAK 培養系を用いた NK 細胞増加に対するダサチニブの影響	11
3.3 ダサチニブの NK 活性に対する影響.....	11
4 考察	11
5 図と図の説明	14
第 3 章 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導と誘導 CTL のメモリー T 細胞サブセッ トの解析	19
1 緒言	19
2 材料と方法	20
2.1 細胞培養	20
2.2 末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell ;PBMC) の分離	20
2.3 サイトカインとペプチド.....	21
2.4 フローサイトメトリー(FACS)解析	21
2.5 混合リンパ球ペプチド培養法 (Mixed Lymphocyte Peptide Culture: MLPC).....	21
2.6 サラカチニブのメモリー細胞サブセットに対する効果.....	21
2.7 PMDC 刺激培養法(抗原特異的 CTL 誘導).....	21
2.7 細胞傷害性試験	22
2.8 統計解析	22
3 結果	23
3.1 MLPC 法で培養した CD8 陽性細胞中のメモリー T 細胞サブセット	23
3.2 MLPC 法で培養した細胞の抗原特異的細胞傷害性と MHC 拘束性	23
3.3 セントラルメモリー T 細胞誘導におけるサラカチニブの効果	23
3.4 PMDC 刺激培養法による抗原特異的 CTL 誘導と誘導 CTL のメモリー細胞サブセ	

ツトの解析	24
3.5 MLPC 法または PMDC 刺激培養法で誘導した CTL 中のセントラルメモリーT 細胞の比較.....	24
4 考察	24
5 図と図の説明.....	28
第4章 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の T 細胞受容体β鎖可変領域レパトワの解析 ...	39
1 緒言	39
2 方法	40
2.1 末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell ;PBMC) の分離	40
2.2 サイトカインとペプチド.....	40
2.3 混合リンパ球ペプチド培養法 (mixed lymphocyte peptide culture: MLPC).....	40
2.4 フローサイトメトリーによる解析.....	41
2.5 TCR Vβレパトワ解析	41
3 結果	41
3.1 健常人末梢血単核球 (PBMC) の TCR Vβレパトワ解析.....	41
3.2 MLPC 法で誘導した WT1 特異的 CTL を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析.....	42
3.3 MLPC 法で誘導した CMVpp65 特異的 CTL を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析	42
4 考察	42
5 図と図の説明.....	44
第5章 白血病性形質細胞様樹状細胞株由来エクソゾームの同定とそれを用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導.....	52
1 緒言	52
2 材料と方法	53
2.1 細胞培養	53
2.2 末梢血単核球(PBMC)の分離	53
2.3 エクソゾームの抽出.....	53
2.4 PMDC 細胞の表面形質の解析	54
2.5 エクソゾームの同定(図 1).....	54
2.6 CD8 陽性 T 細胞の純化	54
2.7 エクソゾーム刺激培養法.....	54
2.8 テトラマー解析	55
2.9 細胞傷害性試験	55
3 結果	56
3.1 PMDC 細胞の表面形質解析.....	56

3.2 PMDC 細胞由来エクソゾームの同定	56
3.3 PMDC 細胞由来エクソゾーム刺激による CTL 誘導	56
4 考察	57
5 図と図の説明	59
第 6 章 参考文献	67
謝辞	79

第 1 章 緒論

われわれの周囲の環境には膨大なウイルスや細菌が存在しており、われわれは常に外来抗原に暴露している。これら外来抗原が生体内に進入すると、生体にとって重篤な危害を及ぼすことになる。しかし、われわれは、ウイルスなどに感染しても短期間で治癒したり、重篤な症状を引き起こすことも殆どなく生活している。

生体における免疫システムの機能は、生体にとって危害となる異物を排除し、生体の正常な営みを守ることである。ヒトの免疫システムには自然免疫と獲得免疫が存在する。自然免疫は、元来備わっている異物に対する抵抗性であり、マクロファージや好中球が異物を取り込み・処理することで成立し、即効的であるが、免疫学的特異性はない。一方、獲得免疫は、抗原刺激に反応して、それに対応するリンパ球の増加や抗体産生により抗原を除去し、同じ抗原に対する備えとして記憶リンパ球を残す機構であり、免疫学的特異性があり、T細胞やB細胞が主要な構成細胞である。獲得免疫は、抗原排除において抗体が働く液性免疫と免疫担当細胞により抗原排除が行われる細胞性免疫に分けられる。

生体内において、がん化した細胞に対して、われわれの有する免疫システムが作用し、いち早くがん化細胞を排除するという免疫学的監視機構という概念がある⁽¹⁾。そのような免疫学的監視機構を担当する免疫担当細胞には、直接的な細胞傷害活性により腫瘍細胞を除去するエフェクター細胞である細胞傷害性 T 細胞(CTL)、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞やそれらエフェクター細胞をサイトカイン刺激により活性化するヘルパーT細胞、さらに腫瘍細胞を貪食する顆粒球やマクロファージや樹状細胞(DC)、抗体を産生してマクロファージの細胞傷害や補体による細胞融解をもたらす B 細胞がある^(2,3)。このように多くの細胞により監視されているにもかかわらず、腫瘍は免疫システムの監視から逃れ増殖する。この免疫システムからの逃避は、腫瘍抗原の発現低下/消失、major histocompatibility complex (MHC) 分子の発現低下/消失による腫瘍抗原提示の低下⁽⁴⁾、腫瘍細胞による腫瘍増殖因子(tumor growth factor: TGF)- β 、血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF), IL-8, IL-10 等の抑制性サイトカインの分泌⁽⁵⁾、さらに制御性 T 細胞による抗腫瘍免疫の抑制⁽⁶⁾があげられる。腫瘍細胞を生体の持つ免疫システムから逃避させず、腫瘍の発生や進展を防止するためには、腫瘍細胞に対する免疫応答を高めることが効果的であると考えられる。

現在行われているがんの治療法は、外科的手術・放射線治療・化学療法が主体である。近年、免疫担当細胞のうち CTL、NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞や DC を用いた細胞免疫療法が注目されている。

化学療法の進展に貢献したのが、分子標的治療薬の開発である。分子標的治療薬は、腫瘍細胞の発現している特定の分子にのみ作用するため、抗がん剤などを用いた化学療法に比して副作用が少ない。近年、抗 CD20 抗体のリツキシマブ⁽⁷⁾、抗 VEGF 抗体ベバシズマブ⁽⁸⁾、抗上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor:EGFR)抗体のセツキシマブ⁽⁹⁾などを標的分子として作用する薬剤が開発され、承認されてきた。

イマチニブは、慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML)の治療を飛躍的に進めた分子標的治療薬である。9番と22番染色体の相互転座により生じるチロシンキナーゼ BCR/ABL を特異的に阻害する。慢性期症例の9割、さらに急性転化期症例の約3割を完全寛解にもたらした。しかし、イマチニブ抵抗性の CML 症例も報告されている^(10, 11)。そこで、イマチニブ抵抗性 CML 治療を目的に開発された新しい分子標的治療薬が、第二世代チロシンキナーゼ阻害薬・ダサチニブである⁽¹²⁾。

近年、ダサチニブ治療例において CML またはフィラデルフィア染色体(Ph)陽性急性リンパ芽球性白血病(ALL)の約半数の症例で見られた主にNK細胞から成る大型顆粒リンパ球(LGL)の増加は、良好な治療予後の兆候であることが報告され、このような症例では、 $\gamma\delta$ T細胞受容体の再構成を示す細胞のクローナルな増殖を示すことが多いという報告がある^(13, 14)。そこで、効果的な免疫療法開発のために、ダサチニブ治療例におけるNK細胞増加の機序の解明を目的とした。

細胞免疫療法は、生体外で増幅させたエフェクター細胞を生体内に戻す養子細胞免疫療法と生体内でのエフェクター細胞を活性化させるペプチド療法やDC療法がある。

CTLを利用した養子細胞免疫療法による治療は、Epstein Barr virus (EBV)関連腫瘍や転移性 melanoma の治療で良い成績を収めており、我々も腫瘍抗原特異的な CTL を誘導する新たな方法についての検討を行っている⁽¹⁵⁾。これまで、様々な方法で腫瘍抗原特異的 CTL の誘導が行われているが、治療に適用できる十分量の CTL を確実に培養する方法の確立が期待されている。

免疫記憶細胞は防御免疫において重要な構成要素である。CD8陽性T細胞には、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、エフェクターT細胞が存在している^(16, 17)。マウスにおける検討においては、メモリーT細胞分画(特にセントラルメモリーT細胞)を多く含む CTL を用いた養子細胞免疫療法の優位性が報告されている⁽¹⁸⁾。そこで、*in vitro*において誘導した抗原特異的 CTL のメモリーT細胞サブセットを明らかにすることにより、より効果的な CTL 誘導法を開発することを目的とした。

当研究室ではウィルムス腫瘍遺伝子(WT1)ペプチドワクチン療法施行例および健常コントロール例における WT1 特異的 CTL のモニタリングを長期に渡り行ってきた。そして、混合リンパ球ペプチド培養(MLPC)法を用いることで、体内に存在する1個の CTL を増幅して精密に解析し、この方法が CTL 頻度測定及び機能解析において有効であることを報告してきた⁽¹⁹⁾。そこで、より効果的な CTL 細胞免疫療法を確立するため

に、MLPC法を用いて、体内で増幅されたCTLにクローン性があるか否か、また、同一のT細胞受容体(TCR)を用いて抗原ペプチドを認識しているか否かを明らかにすることを目的とした。

DCは、抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC) の中でナイーブT細胞を活性化できる唯一のAPCであり、強力な抗原提示能を持った細胞である⁽²⁰⁾。我々の研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株(PMDC05)は、抗原提示能⁽²¹⁾とCTL誘導能を有しているので、養子細胞免疫療法へ応用可能なAPCとなりうると考えられる⁽¹⁵⁾。さらに、CD80遺伝子を導入したPMDC05であるPMDC11は、より高い抗原提示能を持つことが示されている⁽²²⁾。

エクソゾームは、直径30~100nmの大きさの小胞であり、様々な細胞により分泌される。DCに代表されるAPC由来エクソゾームは、MHCクラスIやII複合体やCD86などの抗原提示関連タンパク質を抱負に含むことから、APC由来エクソゾームによる免疫調節能に関する研究が行われてきた。マウスにおけるDC由来エクソゾームを用いた検討において、マウスDC由来エクソゾームがT細胞依存的に抗腫瘍効果を促進するという報告がなされている⁽²³⁾。そこで、PMDC05およびPMDC11細胞が分泌するエクソゾームを同定すると共に、そのエクソゾームを用いた抗原特異的CTL誘導能の有無を明らかにすることを目的とした。

第2章 分子標的治療薬ダサチニブのリンパ球サブセットに対する直接作用の検討

1 緒言

慢性骨髄性白血病(CML)は、骨髄増殖性疾患の1つである。9番染色体と22番染色体の間の相互転座によりフィラデルフィア染色体(Ph)が形成される。Ph染色体には、転座の結果できた *bcr/abl* 融合遺伝子が存在する。この融合遺伝子からできるタンパク質が強いチロシンキナーゼ活性を持ち、このキナーゼ活性が白血病細胞の自律的な増殖能に関与していることが知られている。このように CML 細胞の増殖能に関与する分子基盤が明らかにされたことにより、BCR/ABL チロシンキナーゼをターゲットとした分子標的治療薬が開発された。

第一世代チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブは、BCR/ABL チロシンキナーゼに対する分子標的治療薬であり、CML の治療において高い効果を示してきた⁽²⁴⁻²⁶⁾が、イマチニブ抵抗性の CML 症例も報告されている^(10, 11)。イマチニブ抵抗性は、BCR/ABL チロシンキナーゼのキナーゼ活性中心の点変異によりイマチニブが活性中心に結合できなくなった結果による^(27, 28)。イマチニブ抵抗性 CML 治療を目的に開発された新しい分子標的治療薬が、第二世代チロシンキナーゼ阻害薬・ダサチニブである⁽¹²⁾。*in vitro* における検討で、ダサチニブはイマチニブに比べて 325 倍の ABL キナーゼ阻害効果があることや SRC キナーゼファミリーに対しても阻害効果があることが報告されている^(29, 30)。ダサチニブの治療により、大多数の症例において細胞遺伝的完全寛解がもたらされ、高い無病生存率が得られている。

近年、ダサチニブ治療例において CML または Ph 陽性急性リンパ芽球性白血病(ALL)の約半数の症例で見られた大型顆粒リンパ球(LGL)の増加は、良好な治療予後の兆候であることが報告されている⁽¹³⁾。LGL とは、健常成人の末梢血単核球中の 10%~15% を占めており、その内 85%程度がナチュラルキラー(NK)細胞であり、残りが CD8 陽性 T 細胞から成る⁽³¹⁾。そして、ダサチニブ治療 CML 症例 や Ph 陽性 ALL 症例において増加していた LGL は主に NK 細胞から成る事が報告されている^(13, 14)。この増加した LGL はモノクローナルまたはオリゴクローナル TCR $\gamma\delta$ 遺伝子の再構成を持つ事が報告されている⁽³²⁾。ダサチニブ治療によって CMV が再活性し LGL を増加させるという報告もされている⁽³³⁾。また、NK 細胞の細胞傷害活性を健常なドナーと LGL 増加が認められたドナーとで比較すると、LGL 増加が認められたドナーにおいて細胞傷害活性が増強しており、またダサチニブ治療を受けたドナーはダサチニブ治療を受けていないドナーよりも NK 細胞の細胞傷害活性が増強されていると報告している⁽³⁴⁾。

本研究では、ダサチニブ投与による LGL の増加や、ダサチニブ治療を受けた CML 症例のリンパ球増加で予後が良好であった背景を解明するために、リンフォカイン活性

化キラー(LAK)細胞培養系および $\gamma\delta$ T細胞培養系におけるNK細胞の増殖および細胞傷害活性(NK活性)に対するダサチニブの直接作用を明らかにすることを目的とした。

2 材料と方法

2.1 末梢血単核球(PBMC)の分離

健康成人に対して十分な説明を行った後、末梢血を採取した。採取した血液に 100 IU/ml penicillin / 100 μ g/ml streptomycin (Life technologies Corporation, Carlsbad, CA)添加 Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 培地(Life technologies Corporation)から成る RPMI-1640 培地を加え、十分に混和後、Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)の上に静かに重層し、800 \times gで30分間遠心を行った。遠心後、interfaceの単核球を別の新しい試験管に移し、RPMI-1640培地を加えて混和し、300gで10分間遠心を行った。この後上清を取り除き、再びRPMI-1640培地を加え混和後、200gで10分間遠心を行った。上清を取り除いたあと10%Fetal bovine serum (FBS)加RPMI-1640培地で浮遊し、トリパンブルー色素排除試験法により生細胞数を求めた。

2.2 細胞培養

ダサチニブのリンパ球サブセットに対する影響に関する検討においては、終細胞濃度 5×10^5 /mlとなるようにPBMCに各濃度のダサチニブ(Bristol-Meyers Squibb, New York, NY, USA)を加えて培養した。 $\gamma\delta$ T細胞培養系は、50 IU/ml IL-2(donated by Shionogi Pharmaceutical Co. Osaka, Japan)および1 μ Mのゾレドロン酸(ZA: donated by Novartis Pharmaceutical Co., Basel, Switzerland)添加RPMI-1640培地(FBS添加)で4日間培養した。一方、LAK細胞培養系は、500 IU/ml IL-2添加RPMI-1640培地(FBS添加)で7日間培養した。

また、ダサチニブのNK活性に対する影響に関する検討においては、 $\gamma\delta$ T細胞およびLAK細胞培養系共に以前報告された方法で行った^(35,36)。すなわち、終細胞濃度 1×10^6 /mlで7日間、上述のIL-2またはZA濃度条件で培養したPBMCを用いた。

2.3 フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析

培養後の細胞をそれぞれチューブに回収し400 \times gで5分間遠心させた後、上清を取り除き培養細胞を得た。培養細胞にFc γ レセプター(Fc γ R)ブロック試薬を加えて4 $^{\circ}$ C、10分間反応させ、各染色抗体を20分間染色した。使用した抗体はFITC標識IgG1, CD3, $\gamma\delta$ T, CD8, V γ 9 (BD Biosciences, San Jose, CA), PE標識抗体IgG1, CD3, CD4, CD56, V δ 2 (BD Biosciences), PerCP標識抗体IgG1, CD3 (BD Biosciences)であった。染色後、2 mlのPhosphate buffered saline (PBS)を加え、400 \times gで5分間遠心し、上清除去後、細胞を100 μ lのPBSに浮遊した。細胞をFACS Calibur (BD Biosciences)で測定し、Cell Quest pro

software (BD Biosciences)で解析した。

2.4 細胞傷害性試験(NK 活性測定)

NK 活性の測定は、以前報告された方法を一部改変して行った⁽¹⁹⁾。すなわち、ダサチニブ (0 nM, 25 nM)添加培養 PBMC をエフェクター細胞とし、ターゲット細胞にはエレクトロポレーション法により EGFP を遺伝子導入した白血病細胞株 K562 を用いた。それぞれの細胞は、回収後、十分洗浄し、フェノールレッド(PR)非添加 RPMI-1640 培地(FBS 加)に浮遊した。K562 を 1×10^5 /ml に調整し、100 μ l ずつポリスチレンチューブに加えた。次に、エフェクター細胞をエフェクター:ターゲット(E:T)を図に示した比率になるようポリスチレンチューブに加え、チューブ内の全液量が 200 μ l に成るように PR 非添加 RPMI-1640 培地を加えた。その後、500rpm, 5 分間遠心し、37°C, 5%CO₂ の条件で 4 時間インキュベートした。インキュベート後、各チューブに 7-アミノアクチノマイシン D(7AAD, SIGUMA-ALDRICH, St. Louis, MO)1 μ l を加え混和し、暗所で 15 分間静置した後、フローサイトメトリーで解析した。GFP 陽性かつ 7AA 陰性の細胞を生細胞とした。解析は 1 本につき 120 秒ずつ行い、実験はすべて triplicate で行った。細胞傷害活性は以下のように算出した。

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

2.5 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism software (GraphPad Prism Inc. San Diego, CA)を用いて行い、統計的差はスチューデント t 検定により評価した。p<0.05 を統計的に有意な差有りと評価した。

3 結果

3.1 $\gamma\delta$ T 細胞培養系を用いた $\gamma\delta$ T 細胞および NK 細胞増加に対するダサチニブ影響

ダサチニブ治療例において NK 細胞を主体とする LGL の増加とクローナルな $\gamma\delta$ T 細胞の増加が観察されたので、 $\gamma\delta$ T 細胞培養系を用いて、ダサチニブの $\gamma\delta$ T 細胞と NK 細胞増加に対する影響を調べた。同時に、NK 細胞(CD3 陰性 CD56 陽性)や $\gamma\delta$ T 細胞(CD3 陽性 $\gamma\delta$ TCR 陽性)以外の腫瘍免疫担当細胞に対するダサチニブの影響も調べた。 $\gamma\delta$ T 細胞培養系において、NK 細胞の実数比はダサチニブ濃度 2~25 nM において濃度依存的

増加を示し、それは有意な増加であった(図 1, 3a)。 $\gamma\delta$ T は、ダサチニブ濃度 5 nM 以上において実数比の増加は観察されたが、各濃度間の有意差はなかった。また、 $V\gamma 9V\delta 2$ T($V\gamma 9$ 陽性 $V\delta 2$ 陽性)や $V\gamma 9$ T(CD3 陽性 $V\gamma 9$ 陽性)細胞は NK 細胞のように 25 nM でピークとなる濃度依存的増加をするようであったが、そこに有意な差はなかった(図 1)。NK/T 細胞(CD3 陽性 CD56 陽性)、細胞傷害性 T 細胞(CD3 陽性 CD8 陽性)、ヘルパー T 細胞(CD3 陽性 CD4 陽性)、 $V\delta 2$ T 細胞(CD3 陽性 $V\delta 2$ 陽性)はダサチニブの濃度を変化させても実数比の変化は見られなかった(図 1)。

3.2 LAK 培養系を用いた NK 細胞増加に対するダサチニブの影響

次に、LAK 細胞培養系を用いて、ダサチニブの NK 細胞増加に対する影響を調べた。同時に、NK 細胞以外の腫瘍免疫担当細胞に対するダサチニブの影響も調べた。LAK 培養系においても $\gamma\delta$ T 細胞培養系を用いた場合と同様に、NK 細胞実数比のダサチニブ濃度依存的増加を示し、それは有意な増加であった(図 2, 3b)。 $\gamma\delta$ T 細胞、NK/T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、ヘルパー T 細胞はダサチニブの濃度を変化させても実数比の有意な変化は見られなかった(図 2)。

3.3 ダサチニブの NK 活性に対する影響

これまでの検討で、 $\gamma\delta$ T 細胞培養系と LAK 細胞培養系において、ダサチニブ添加により培養細胞中の NK 細胞の実数が増加することが分かった。そこで、それぞれの培養系で培養した NK 細胞を含む培養細胞の NK 活性に対する影響について検討した。その結果、 $\gamma\delta$ T 細胞培養系においても、LAK 細胞培養系においても、ダサチニブを添加することにより NK 細胞を含む培養細胞の K562 に対する NK 活性が増強していた(図 4, 5)。

4 考察

ダサチニブはイマチニブ抵抗性の CML および Ph 陽性 ALL の治療のために承認された第二世代チロシンキナーゼ阻害薬である⁽¹²⁾。ダサチニブは様々なイマチニブ耐性変異のある BCR-ABL チロシンキナーゼに対して効果がある。ダサチニブは、Src キナーゼファミリーである Src, Lck, Hck, Fyn, Yes, Fgr, Blk, Lyn そして Frk を阻害し、受容体チロシンキナーゼである c-kit, platelet-derived growth factor receptors (PDGFR) α と β , discoidin domain receptor-1, c-Fms や ephrin 受容体も阻害する。ダサチニブの標的分子は免疫細胞を含む様々な細胞での増殖及び分化に関連している⁽³⁷⁾。in vitro で臨床と同程度の濃度のダサチニブ添加により、Src キナーゼファミリーの Lck が阻害されるために、T 細胞の増殖・活性化・サイトカイン産生が抑制されてしまうという報告がある⁽³⁸⁾。

さらに、*in vivo*においてもダサチニブは、T細胞の応答を阻害する⁽³⁹⁾。抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による脱顆粒応答がダサチニブ濃度依存性に阻害される。CD4 陽性 T 細胞は、CD8 陽性 T 細胞に比しダサチニブへの感受性が強く、ナイーブ T 細胞はメモリー T 細胞比してダサチニブに対する感受性が強い。 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化もまたダサチニブにより阻害される⁽⁴⁰⁾。ダサチニブがウイルスや白血病抗原に特異的な CD8 陽性 T 細胞による INF- γ とグランザイム B の産生を抑制し、さらにその増殖も阻害することが報告されている⁽⁴¹⁾。現在使用されている BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害薬は 3 つあるが、イマチニブは NK 細胞の細胞傷害性やサイトカイン産生を阻害しなかった。ニロチニブは NK 活性に影響はなかったが、高濃度で使用したところ NK 細胞による INF- γ 産生を抑制し、ダサチニブでは低濃度でも NK 活性および INF- γ 産生を共に抑制すると報告されている⁽⁴²⁾。*in vitro*における NK 活性の測定で、ダサチニブは濃度依存性に NK 活性を阻害するが、ダサチニブ添加培養された NK 細胞を洗浄すると NK 活性が復活するという報告もある⁽⁴³⁾。

しかし、今回の我々の研究ではダサチニブ添加培養した PBMC は NK 細胞の活性が増強されていた。BCR/ABL は NKG2Dligand の MIC/A と MIC/B の表面発現を直接高めるが、BCR/ABL 阻害剤では NKG2Dligand の減少を引き起こす事が報告されている⁽⁴⁴⁾。その結果、BCR/ABL が発現している標的細胞に対してダサチニブによる NK 細胞活性の低下が引き起こされる⁽⁴²⁾。さらに、BCR/ABL に death-inducing receptor である DR4 と DR5 の発現が調節されており、BCR/ABL がイマチニブやダサチニブにより阻害を受けると DR4 と DR5 の発現が抑制されると言う報告がある⁽⁴⁵⁾。つまり、MIC/A や MIC/B と DR4 や DR5 の発現が減少しターゲットの NK 細胞に対する感受性が低下する結果、NK 活性が低下していると考えられていたが、本検討では NK 活性のアッセイ系にダサチニブを添加していなかったため、NK 活性が低下しなかったと考えられる。

ダサチニブの薬物動態とダサチニブ治療症例でのリンパ球数との関連性の報告によれば、ダサチニブの経口投与後 1~2 時間で血中リンパ球、特に NK 細胞、NK/T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞が急激に増加し、投与後 12 時間で投与前のレベルに戻っていた⁽⁴⁶⁾。このように免疫反応に対するチロシンキナーゼ阻害薬の影響に関する研究結果が様々であることは、チロシンキナーゼ阻害薬の濃度と暴露期間、細胞培養法、用いたサイトカインの違い、試験評価前に細胞をどの程度洗浄したかなど、異なる実験条件によって起こる可能性が考えられる。

近年、臍帯血細胞を用いて、ダサチニブ添加培養を行うと NK 細胞が増殖するという報告がなされた⁽⁴⁷⁾。さらに、ポリクローナルな NK 細胞を用いた *ex vivo* の検討において、NK 活性を測定するアッセイ系からダサチニブを除去すると、事前にダサチニブ処理された NK 細胞の NK 活性は影響を受けないと言う報告がある⁽⁴⁶⁾。本検討においても、NK 活性のアッセイ系にはダサチニブは添加されておらず、アッセイ前に十分に

洗浄したので、NK 細胞が増加していたダサチニブ添加培養した細胞で NK 活性が増強していたと考える。本研究において、ダサチニブ治療を受けた CML 患者に置けるリンパ球増加症は、少なくとも部分的にダサチニブの NK 細胞に対する直接的な刺激作用に基づくことが示唆された。

5 図と図の説明

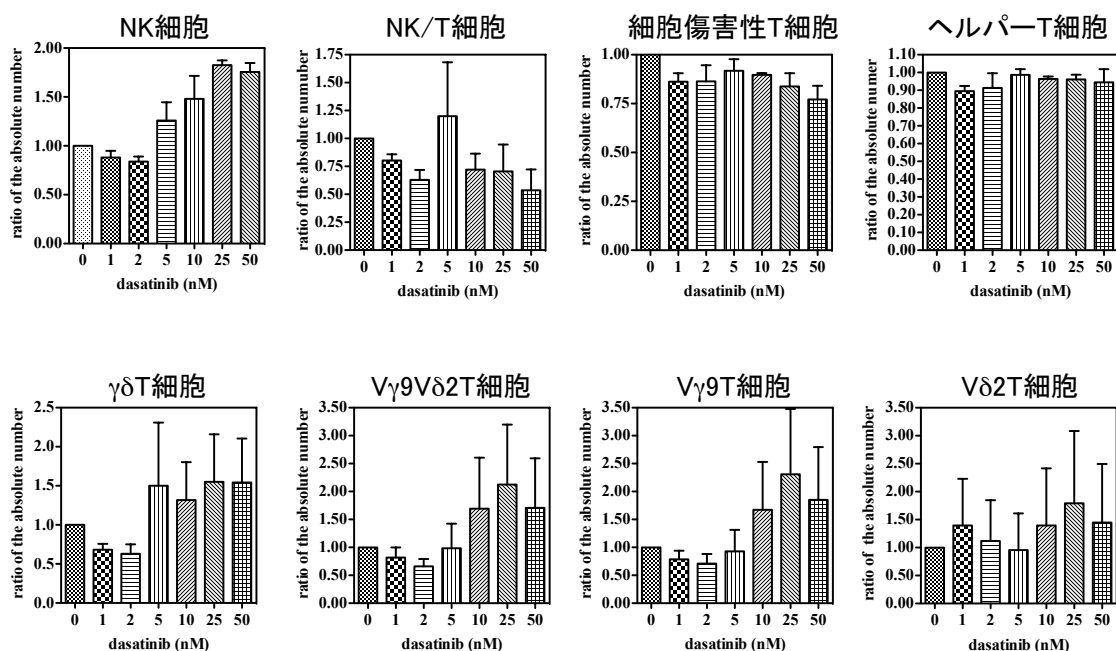


図 1 $\gamma\delta$ T 細胞培養系におけるダサチニブのリンパ球サブセットに及ぼす影響 (n=3)

$\gamma\delta$ T 細胞培養系での NK 細胞(CD3 陰性 CD56 陽性)、NK/T 細胞(CD3 陽性 CD56 陽性)、細胞傷害性 T 細胞(CD3 陽性 CD8 陽性)、ヘルパー T 細胞(CD3 陽性 CD4 陽性)、 $\gamma\delta$ T 細胞(CD3 陽性 TCRgd 陽性)、V γ 9V δ 2T 細胞(V γ 9 陽性 V δ 2 陽性)、V γ 9 T 細胞(CD3 陽性 V γ 9 陽性)、V δ 2 T 細胞(CD3 陽性 V δ 2 陽性)の実数の比を示す。

培養 4 日後のダサチニブ非添加培養細胞における各リンパ球サブセットの絶対数を 1 として、各濃度のダサチニブ添加培養細胞中の各リンパ球サブセットの絶対数の比で表した。3 人の健常人 PBMC を用いた検討の mean \pm SEM である。

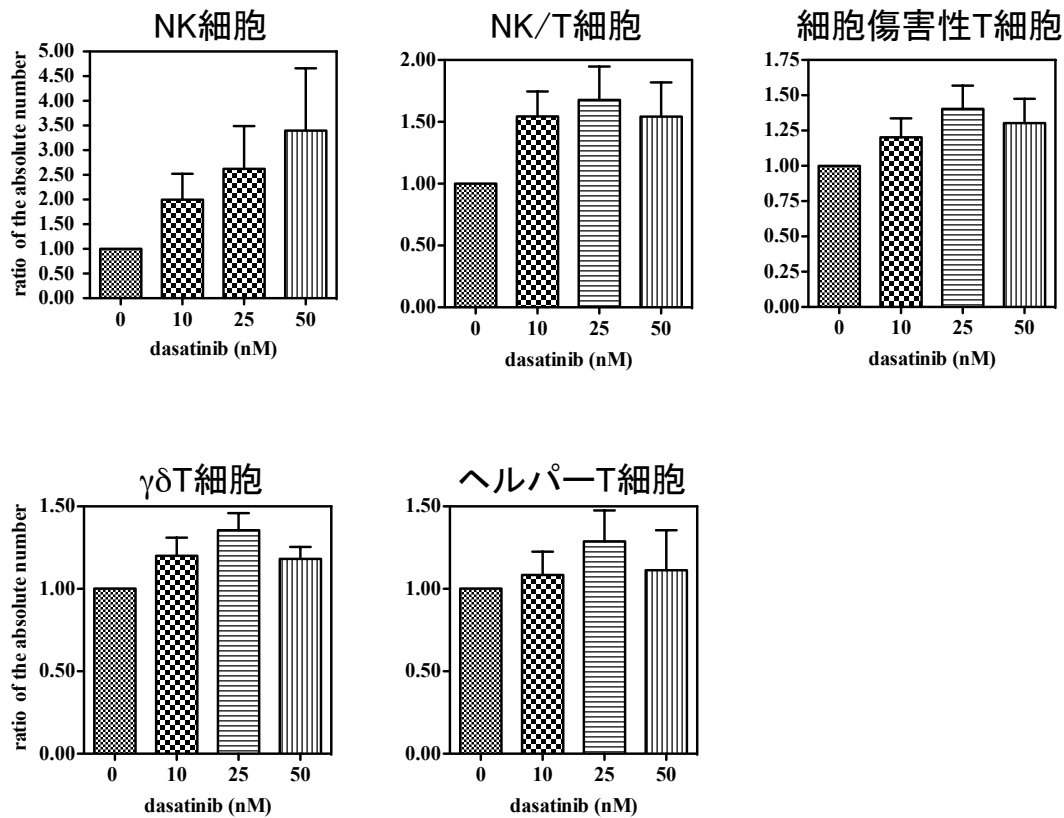


図 2 LAK 細胞培養系におけるダサチニブのリンパ球サブセットに及ぼす影響 (n=7)

LAK 細胞培養系での NK 細胞(CD3 陰性 CD56 陽性)、NK/T 細胞(CD3 陽性 CD56 陽性)、細胞傷害性 T 細胞(CD3 陽性 CD8 陽性)、ヘルパー T 細胞(CD3 陽性 CD4 陽性)、 $\gamma\delta$ T 細胞(CD3 陽性 TCR $\gamma\delta$ 陽性)の実数の比を示す。培養 7 日後のダサチニブ非添加培養細胞における各リンパ球サブセットの絶対数を 1 として、各濃度のダサチニブ添加培養細胞中の各リンパ球サブセットの絶対数の比で表した。7 人の健常人 PBMC を用いた検討の mean \pm SEM である。

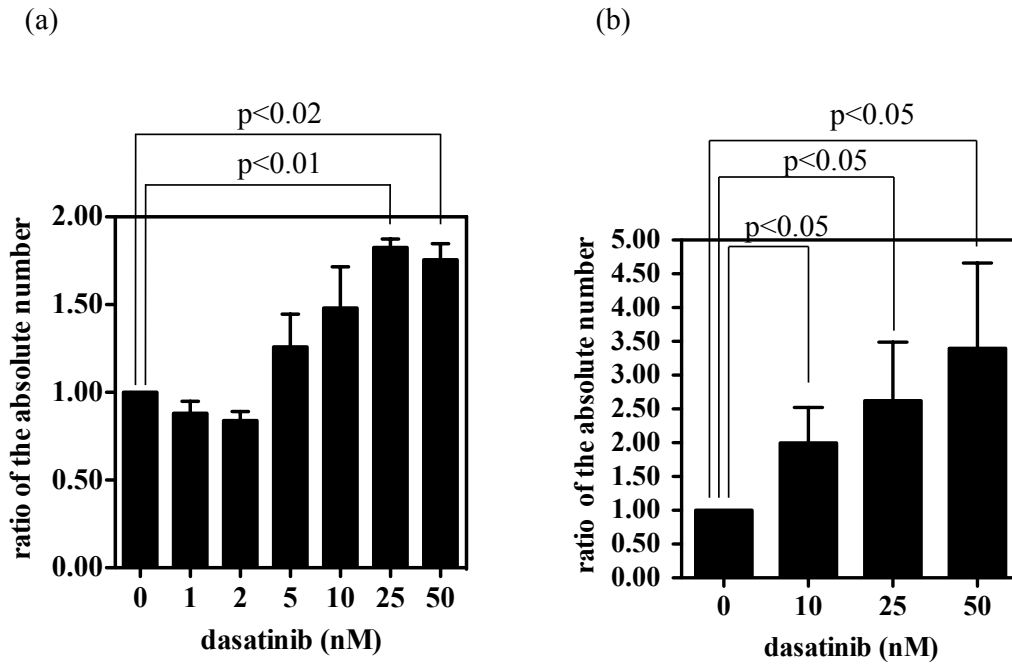


図3 $\gamma\delta$ T細胞培養系およびLAK細胞培養系におけるダサチニブのNK細胞に及ぼす影響

(a) $\gamma\delta$ T細胞培養系でのNK細胞(CD3陰性CD56陽性)、の実数の比を示す。培養4日後のダサチニブ非添加培養細胞に比して、25および50 nMダサチニブ添加培養細胞中のNK細胞の絶対数は、有意に増加していた。3人の健常人PBMCを用いた検討のmean \pm SEMである。

(b) LAK細胞培養系でのNK細胞(CD3陰性CD56陽性)、の実数の比を示す。培養7日後のダサチニブ非添加培養細胞に比して、10, 25および50 nMダサチニブ添加培養細胞中のNK細胞の絶対数は、有意に増加していた。7人の健常人PBMCを用いた検討の平均 \pm SEMである。

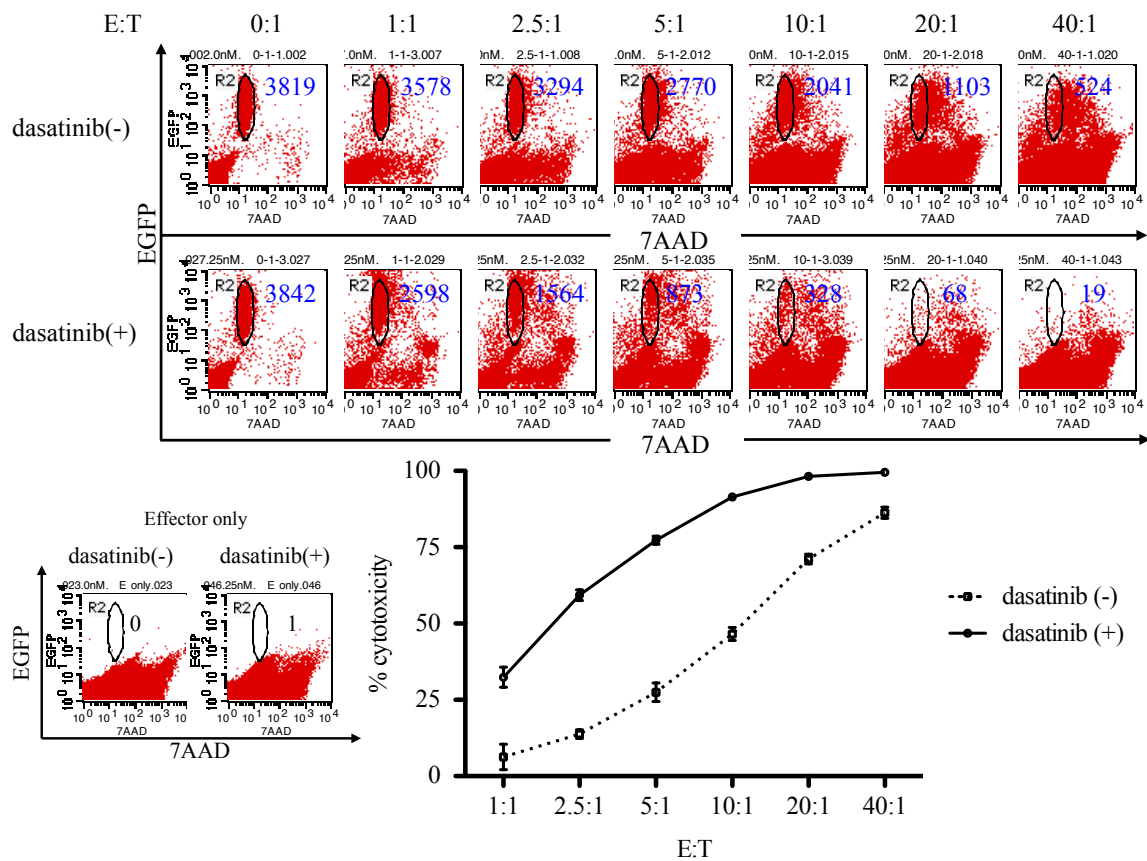


図 4 ダサチニブの $\gamma\delta$ T 細胞培養系で培養した NK 細胞を含む培養細胞の K562 に対する NK 活性への影響

健康人 PBMC を $\gamma\delta$ T 細胞培養系で 7 日間培養した。25 nM ダサチニブ添加または非添加培養した PBMC をエフェクター細胞とし、EGFP 遺伝子を導入した K562 細胞をターゲット細胞として NK 活性を測定した。3 回行った検討の代表例。グラフの実線がダサチニブ添加、破線がダサチニブ非添加を表す。

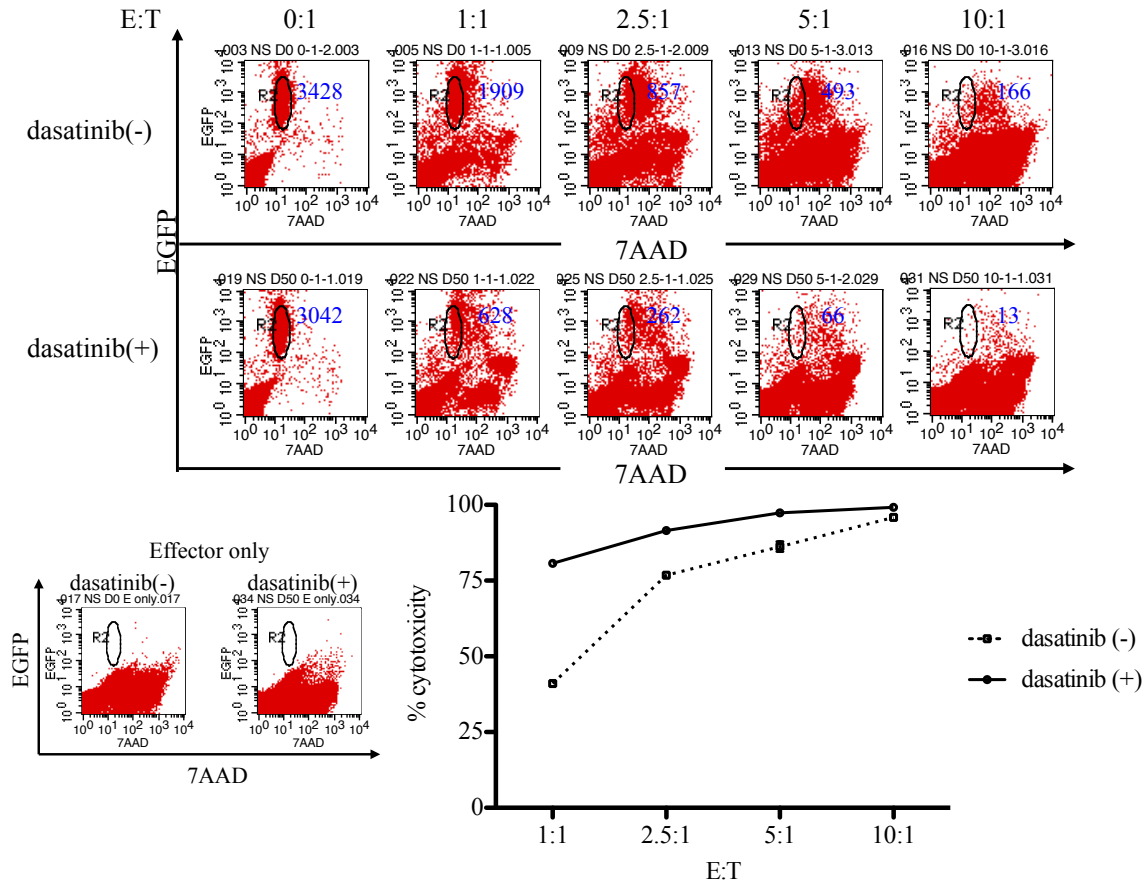


図 5 ダサチニブの LAK 細胞培養系で培養した NK 細胞を含む培養細胞の K562 に対する NK 活性への影響

健常人 PBMC を LAK 細胞培養系で 7 日間培養した。25 nM ダサチニブ添加または非添加培養した PBMC をエフェクター細胞とし、EGFP 遺伝子を導入した K562 細胞をターゲット細胞として NK 活性を測定した。3 回行った検討の代表例。グラフの実線がダサチニブ添加、破線がダサチニブ非添加を表す。

第3章 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導と誘導 CTL のメモリー T 細胞サブセットの解析

1 緒言

ヒトの免疫系には自然免疫と獲得免疫が存在する。自然免疫は、元来備わっている‘非自己’に対する抵抗性であり、即効的であるが、免疫学的特異性はない。一方、獲得免疫は、抗原刺激に反応して、それに対応するリンパ球の増加や抗体産生により抗原を除去し、同じ抗原に対する備えとして記憶リンパ球を残す機構であり、免疫学的特異性がある。獲得免疫は、抗原排除において抗体が働く液性免疫と免疫担当細胞により抗原排除が行われる細胞性免疫に分けられる。CD8 陽性 T 細胞は、細胞性免疫においてウイルス感染細胞や腫瘍細胞の排除に重要な役割を担っている。

養子細胞免疫療法は、生体外で増殖させた免疫担当細胞を患者に輸注してウイルスや腫瘍細胞を生体内から除去するという方法である^(48, 49)。齧歯類を用いた研究では、抗原特異的 CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞(CTL)による養子細胞免疫療法がウイルス感染やガンに対して有効であり、ヒトにおいても、この養子細胞免疫療法の有効性に関する報告がなされて来ている⁽⁵⁰⁾。CTL を利用した養子細胞免疫療法による治療は、Epstein Barr virus (EBV)関連腫瘍や転移性 melanoma の治療で良い成績を収めており、我々も腫瘍抗原特異的な CTL を誘導する新たな方法についての検討を行っている⁽¹⁵⁾。これまで、様々な方法で腫瘍抗原特異的 CTL の誘導が行われているが、治療に適用できる十分量の CTL を確実に培養する方法の確立が期待されている。

免疫記憶細胞は防御免疫において重要な構成要素である。CD8 陽性 T 細胞には、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、エフェクター T 細胞が存在し、それぞれ独特な表現型と機能的な特徴を有している^(16, 17)。ナイーブ T 細胞の表現型は、 $CCR7^+CD27^+CD45RA^+$ であり、ナイーブ T 細胞が抗原刺激を受けると I 型インターフェロン(IFN)や IL-12 などサイトカインの補助を受けて、抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞の対数増殖期を経て、エフェクター T 細胞($CCR7^-CD27^-CD45RA^+$)へ分化する^(51, 52)。エフェクター T 細胞は、IFN- γ や腫瘍壊死因子(TNF)を大量に分泌するだけでなく、グランザイム B やパーフォリンを発現しており、獲得した細胞傷害活性により感染細胞や腫瘍細胞を排除する。感染細胞や腫瘍細胞排除後、大部分のエフェクター T 細胞はアポトーシスを起こして死滅し、残った 5~10%が CD8 陽性メモリー T 細胞となる。メモリー T 細胞は、 $CCR7^+CD27^+CD45RA^-$ の表現型のセントラルメモリー T 細胞と $CCR7^-CD27^-CD45RA^-$ の表現型のエフェクターメモリー T 細胞から成る。これらが 2 回目以降の抗原刺激に備えている。in vitro の検討において、CD8 陽性セントラルメモリー T と CD8 陽性エフェクターメモリー T 細胞は共に素早くサイトカインを産生し、細

胞傷害性を示すことがわかっている⁽⁵³⁾。マウスの Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) や *Listeria monocytogenes* (LM) の急性感染における T 細胞免疫モデルでは、セントラルメモリー T 細胞はエフェクターメモリー T 細胞より生体内における増殖能が強く、免疫応答でエフェクターメモリー T より長期的な強い免疫応答を示ことが報告されている⁽¹⁸⁾。

これまでのウイルス感染やマウスにおける抗腫瘍養子細胞免疫療法の研究から、メモリー T 細胞 (特にセントラルメモリー T 細胞) 分画を多く含む CTL を用いた養子細胞免疫療法の優位性が考えられる。そこで本検討で、我々は *in vitro* において抗原特異的 CTL を誘導し、その誘導 CTL の CD8 陽性メモリー T 細胞のサブセットを明らかにすることにより、より効率的で効果的な CTL 誘導法を開発することを目的とした。

2 材料と方法

2.1 細胞培養

PMDC11 は 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 添加 Iscov's Modified Dulbecco's Medium (IMDM: Life technologies Corporation, Carlsbad, CA) で培養を行った。また、constitutively active Toll-like receptor 4 (caTLR4) をレンチウイルスベクターにより PMDC11 に導入した caTLR4-PMDC11 は 10% FBS 添加 IMDM に終濃度 400 $\mu\text{g/ml}$ および 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように G418 と puromycin を加えて培養した。

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

健常成人に対して十分な説明の後、末梢血を採取した。採取した末梢血を 1,160 $\times g$ で 30 分間遠心し、血漿を分離した。血漿を新しい試験管に移し、終濃度 5 IU/ml のトロンビン (ミドリ十字、大阪) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間反応させた。その後、1,160 $\times g$ で 20 分間遠心分離し、血清を得た。

血漿分離後の残りの血球に分離した血漿と同量の 100 IU/ml penicillin / 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Life technologies Corporation) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (以下 RPMI1640 培地, Life technologies Corporation) を加え、十分に混和後、Lympho prep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) の上に静かに重層し、800 $\times g$ で 30 分間遠心を行った。遠心後、interface より PBMC を新しい試験管に移し、RPMI1640 培地を加えて混和し、300 $\times g$ で 10 分間遠心を行った。上精を除き、さらに RPMI1640 培地を再浮遊後、200 $\times g$ で 10 分間遠心を行った。この沈殿した PBMC を 5% 自己血清 (5% AS) 添加 RPMI1640 培地 (以下 5% AS 培地) で洗浄・浮遊し、トリパンブルー色素排除試験法によって生細胞数を求めた。

2.3 サイトカインとペプチド

IL-2 (シオノギ製薬、大坂), IL-7 (R&D systems Minneapolis, MN)、改変型 WT-1 ペプチド (WT1, CYTWNQMNL, Neo MPS, San Diego, CA)、CMVpp65 ペプチド (CMVpp65, QYDPVAALF, フナコシ,東京)を用いた。

2.4 フローサイトメトリー(FACS)解析

上述のように培養された細胞に Fc γ レセプターブロック試薬を加え 4°C、10 分間反応させ、各染色抗体で 4°C、20 分間染色した。使用した抗体および tetramer は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体: IgG1, CD8 (BD Biosciences, San Jose, CA)、Phycoerythrin (PE) 標識抗体: IgG1, CD8 (BD Biosciences), WT1 tetramer (HLA-A*2402 WT1 (mutant) tetramer -CYTWNQMNL-PE, 医学生物学研究所, 長野), CMVpp65 tetramer (HLA-A*2402 CMVpp65 -tetramer -QYDPVAALF-PE, 医学生物学研究所)、PE-Texas Red (ECD)標識抗体: CD45RA (Immunotech, Marseille, France)、Allophycocyanin (APC) 標識抗体: CD27 (Immunotech) である。染色後、Phosphate Buffered Saline (PBS) で 1 回洗浄し、FACSCalibur (BD Biosciences) で測定し、CellQuest pro (BD Biosciences)で解析した。

2.5 混合リンパ球ペプチド培養法 (Mixed Lymphocyte Peptide Culture: MLPC)

MLPC 法による培養は、以前報告された方法を用いた^(19, 54)。すなわち、分離し、生細胞数を得た PBMC を 5% AS 培地で 3×10^6 cells/ml に調整し、ペプチドを終濃度 10 μ g/ml (WT1 ペプチド) または 5 μ g/ml (CMVpp65 ペプチド)となるように加え、十分に混和した。PBMC とペプチドの混合液を 100 μ l ずつ 96-well U-bottom plate に播種した。3 日後に 50 IU/ml の IL-2 添加 5% AS 培地 (以下 MLPC 培地) を 100 μ l ずつ各 well に加えた。その後 2 日毎に半分の培地を新しい MLPC 培地と交換した。培養開始 2 週間目より WT1 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞および CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞を FACS 解析 (以下 tetramer 解析) した。

2.6 サラカチニブのメモリー細胞サブセットに対する効果

MLPC 法により培養された PBMC を 2 週間目に tetramer 解析を行った後、2 つの well に等分配し、1 つの well は MLPC 培地で培養を続け、もう一方の well は 0.3 μ M サラカチニブ (AZD0530, AstraZeneca, Wilmington, DE) 添加 MLPC 培地で培養を続けた。培養液は 2 日毎に新しい培養液に交換した。分配培養 1 週間目より WT1 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞および CD8 陽性メモリー T 細胞サブセットを FACS 解析した。

2.7 PMDC 刺激培養法(抗原特異的 CTL 誘導)

PMDC 細胞株を抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell :APC) とした抗原特異的 CTL 誘導法は、以前の報告を一部改変して行った^(15, 55)。すなわち、分離した PBMC より Anti-FITC microbeads MACS system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用

いて positive selection により純化 CD8 陽性 T 細胞を調整した。純化 CD8 陽性 T 細胞の純度は 90%以上であった。PMDC11 および caTLR4-PMDC11 は 1×10^6 cells/ml になるように、それぞれ IMDM または G418 および puromycine 添加 IMDM に浮遊した。その PMDC 細胞株浮遊液に CMVpp65 ペプチドを終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ となるように加え、37°C で 24 時間培養した。caTLR4-PMDC11 においては、caTLR4 の発現誘導の目的でペプチドと同時に終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ のドキシサイクリン (タカラバイオ株式会社, 大津, 滋賀) を添加した。その後、RPMI1640 培地で 3 回洗浄し、30 Gy の γ 線照射し、APC とした。そして、純化 CD8 陽性 T 細胞 (3×10^5 cells/well)、APC (1.5×10^5 cells/well) を 24-well plate で共培養した。培養液は、5% AS 培地を用いた。培養開始 3 日目に IL-2 (50 IU/ml), IL-7 (10 ng/ml) を加え、以後 2-3 日毎に半分の培地を新しい 50 IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, 5% AS 培地に交換した。培養 2 週間目より CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞およびメモリー T 細胞サブセットを FACS 解析した。また、APC による再刺激は毎週行った。

2.7 細胞傷害性試験

本検討においては、以前報告された方法を用いて行った⁽⁵⁶⁾。ターゲット細胞として EGFP 遺伝子を導入した K562 細胞と GFP 遺伝子を導入した T2A24 細胞を用いた。エフェクター細胞として MLPC 法で培養した CMVpp65 を含む培養細胞を用いた。ターゲット細胞はエフェクター細胞と共培養する前に、10% FBS 加 RPMI1640 培地中で CMVpp65 ペプチド (5 $\mu\text{g/ml}$) を 37°C・24 時間パルスした。ターゲット細胞およびエフェクター細胞を回収し、Phenol red (PR) 非含有 RPMI1640 培地 (PR(-)RPMI 培地、Life technologies Corporation) で 3 回洗浄し、10% FBS 加 PR(-)RPMI 培地に再浮遊した。ターゲット細胞をエフェクター細胞と 37°C で 4 時間共培養した後、死細胞を 7-アミノアクチノマイシン D (7-AAD, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO) で 15 分間室温・暗所において染色した。生細胞 (EGFP⁺7AAD⁻または GFP⁺7AAD⁻) をゲートし、2 分間フローサイトメトリーで測定し、生細胞ゲートに入った細胞を生細胞の絶対数とした。%細胞傷害性は以下の式により求めた。%細胞傷害性=[(ターゲット細胞のみの生細胞の絶対数)-(ターゲット細胞とエフェクター細胞を共培養した後の生細胞の絶対数)]/(ターゲット細胞のみの生細胞の絶対数)×100

2.8 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism software (GraphPad Prism Inc. San Diego, CA) を用いて行い、統計的差はスチューデント t 検定により評価した。 $p < 0.05$ を統計的に有意差有りと評価した。

3 結果

3.1 MLPC 法で培養した CD8 陽性細胞中のメモリーT 細胞サブセット

本研究において、まず MLPC 法で培養した CD8 陽性 T 細胞中のメモリーT 細胞サブセットの解析を行った。CD8 と CMVpp65 tetramer で染色し、リンパ球ゲートで展開した CD8 陽性細胞を CMVpp65 tetramer 陽性または CMVpp65 tetramer 陰性細胞でそれぞれ展開し、それぞれのメモリーT 細胞サブセットの解析を行った (図 1a)。CD8 陽性細胞におけるメモリーT 細胞サブセットは、CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性および陰性細胞に関わらず、セントラルメモリーT 細胞の割合が他のメモリーT 細胞サブセットに比べて圧倒的に高く、その傾向は培養開始 4 週間目まで続いていた (図 1b, c)。

3.2 MLPC 法で培養した細胞の抗原特異的細胞傷害性と MHC 拘束性

MLPC 法で培養した細胞が抗原特異的細胞傷害性を有するのか否かについて調べた。初めに、ターゲット細胞の T2A24 細胞に CMVpp65 ペプチドをパルスの有無による細胞傷害性を比較した。その結果、MLPC 法で培養された細胞は、ペプチドをパルスした T2A24 細胞に対する細胞傷害性が、ペプチドをパルスしていない細胞に比して、明らかに高かった (図 2)。

次に、ターゲット細胞にペプチドをパルスした T2A24 細胞と K562 細胞を用いて、同様の細胞傷害性試験を行った。CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞の陽性率が高かったウェルの細胞 (C5, C7)は、ペプチドをパルスした T2A24 細胞に対して強い細胞傷害性を示したが、K562 細胞に対しては殆ど示さなかった (図 3)。以上の結果から、誘導した CTL は MHC class I 拘束性の抗原特異的細胞傷害性を持つことが示された。

3.3 セントラルメモリーT 細胞誘導におけるサラカチニブの効果

本来、セントラルメモリーT 細胞は、メモリーT 細胞サブセットの中でも特に二次応答における強い増殖性を示し、細胞傷害活性も示すために、免疫記憶の主要な細胞と考えられている。そこで、MLPC 法で、より効率良くセントラルメモリーT 細胞の CTL を誘導出来ないかと考えた。Src kinase family 阻害剤であるサラカチニブがセントラルメモリーT 細胞を増殖させるという報告があった⁽⁵⁷⁾。本研究において MLPC 法で誘導した WT1 特異的 CTL を含む培養細胞の培養液にサラカチニブを添加することがセントラルメモリーT 細胞を主体とするメモリーT 細胞サブセットに影響があるか否かについての検討を行った。その結果、WT1 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞の割合においては、サラカチニブの添加の有無による有意な差は認められなかった (図 4)。WT1 tetramer

陽性または陰性に関わらず、CD8 陽性細胞中のメモリーT 細胞サブセットは、セントラルメモリーT 細胞を主とする細胞の増殖が見られたが、サラカチニブの影響は観察されなかった (図 5, 6)。

3.4 PMDC 刺激培養法による抗原特異的 CTL 誘導と誘導 CTL のメモリー細胞サブセットの解析

樹状細胞 (dendritic cell :DC) は、免疫応答においてナイーブ T 細胞を活性化する最も強力な APC である。当研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株 PMDC05 および PMDC05 に CD80 遺伝子を導入した PMDC11 は APC としての機能を有している^(15, 22)。そこで、PMDC 細胞を APC として用いて誘導した抗原特異的 CTL のメモリーT 細胞サブセットの解析を試みた。CMVpp65 tetramer 陽性または陰性に関わらず、誘導された CD8 陽性細胞の殆どがセントラルメモリーT 細胞であり、CD8 陽性細胞中のセントラルメモリーT 細胞の割合が培養 5 週目まで高く維持されており、絶対数が増加の増加が認められた (図 7 および 8)。

3.5 MLPC 法または PMDC 刺激培養法で誘導した CTL 中のセントラルメモリーT 細胞の比較

MLPC 法または PMDC 刺激培養法で誘導した CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞中のセントラルメモリーT 細胞の割合を比較したところ、PMDC 刺激培養法でのセントラルメモリーT 細胞の割合が MLPC 法に比べて増加していた (図 9)

4 考察

養子細胞免疫療法は、生体外で抗原を特異的に認識するように誘導・増殖 CTL を輸注し、CTL の強い細胞傷害活性を利用して標的とする抗原を有する細胞を排除させるという考えのもと行われてきた^(48, 58)。しかし、養子細胞免疫療法を含むガン免疫治療は、主に患者の免疫抑制機構の働きにより腫瘍の増殖を抑えることにしばしば失敗し、現在、その抑制機構の働きを乗り越えるための研究が進められている。長期に渡るマウスを用いた研究によってマウスにおける養子細胞免疫療法の技術向上はもたらされたが、未だ治療に適用できる大量な CTL 誘導法は確立されていない。

活性化した CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害活性を有する抗原特異的 CD8 陽性エフェクターT 細胞 (=CTL) に成熟し、パーフォリンやグランザイム B を分泌して標的抗原を有する細胞を殺傷し、除去する。免疫応答収束後、CTL の 90~95%は死滅し、残りが

CD8 陽性メモリーT 細胞として生体内で生き残る。脾臓など二次リンパ節には、CD8 陽性セントラルメモリーT 細胞が存在し、抗原刺激を受けると自己複製とエフェクターメモリーT 細胞になる。末梢組織には、CD8 陽性エフェクターメモリーT 細胞が存在し、エフェクターメモリーT 細胞は抗原刺激で素早くエフェクターT 細胞として細胞傷害活性を発現させる。B16 マウス melanoma 細胞を移植した C57BL/6 マウスに対し、melanoma/melanocyte 関連抗原 gp100 特異的 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス (Pmel-1 マウス) の脾臓細胞より誘導した CTL を輸注した結果、B16 マウス melanoma 細胞を移植部位に浸潤した CD8 陽性エフェクターT 細胞により必要十分な抗腫瘍免疫を確立できるという報告がされている^(59, 60)。しかし、その後の検討において、Pmel-1 マウスの脾臓細胞より CD8 陽性 T 細胞を誘導し、セントラルメモリーT, エフェクターメモリーT, エフェクターT 細胞をそれぞれ純化して行った研究において CD8 陽性メモリーT (セントラルメモリーT, エフェクターメモリーT) 細胞の方がエフェクターT 細胞より優れた抗腫瘍効果を持っていることが明らかにされている^(61, 62)。

本検討において、MLPC 法で誘導した CMVpp65 ペプチド特異的な CTL 中の CD8 陽性メモリーT 細胞サブセットの解析を行い、セントラルメモリーT 細胞が主に誘導されていた。さらに、抗原特異的な細胞傷害性試験の結果からも、誘導された CTL が強い抗原特異的な細胞傷害性を示すことが分かった。これは、誘導されたセントラルメモリーT 細胞を中心とする CTL が抗原を持つターゲット細胞と共培養することで、素早く活性化したからであると考えられる。

養子細胞免疫療法では、輸注の効果が長期持続することが好ましく、患者の血球を利用するため、患者への負担軽減の観点から一度の採血で効率良く CTL を誘導可能であることが求められる。効果の長期持続性は、セントラルメモリーT 細胞が主に二次リンパ組織に帰巢し、二次免疫応答において主要な反応を示すことから、セントラルメモリーT 細胞を多く含む細胞分画を輸注することが好ましいと考えられる。

化学療法薬は、多くの場合免疫抑制的に働くと言われている。しかし、その代表と言われていた rapamycin がメモリーT 細胞の機能を促進するという報告がある⁽⁶³⁾。最近では、Src キナーゼファミリー阻害剤であるサラカチニブが、Akt-mTOR (mammalian target of rapamycin) 系を阻害する結果、セントラルメモリーT 細胞の増殖と IFN- γ の産生を促進すると報告がされている⁽⁵⁷⁾。免疫反応では、抗原刺激を受けた CD8 陽性ナイーブ T 細胞はクローン性の対数増殖期を経て、エフェクターT 細胞となり、生体内から外来抗原が除去されるとアポトーシスを起こす収縮期 (contraction phase) へと入る。LCMV に感染したマウスを用いた検討において、感染直後の対数増殖期に rapamycin を投与すると CD8 陽性メモリーT 細胞の数が増加し、収縮期に rapamycin を投与した場合は、自己複製能と増殖能および抗原排除能の改善というメモリーT 細胞の質が改善されるという報告がある⁽⁶³⁾。さらに LCMV 感染マウスを用いた検討では、rapamycin

n を増殖期と収縮期両方で投与すると CD8 陽性メモリーT 細胞の数の著しい増加と細胞の質の改善が共に観察された。サラカチニブも、サラカチニブが本来持つ Src kinase family を阻害するのではなく、Akt-mTOR 系を阻害する結果、メモリーT 細胞を増殖させ、増殖期または収縮期に加えるとより CD8 陽性セントラルメモリーT 細胞の増殖と IFN- γ 産生を増強させる⁽⁵⁷⁾。このことから、本検討において、サラカチニブによるセントラルメモリーT 細胞分画の割合に与える影響は観察されなかったのは、サラカチニブを添加する時期に原因があったと考える。MLPC 法におけるサラカチニブの効果を引き出すには、培養液にサラカチニブを添加する時期を検討する必要があると考える。

ヒト樹状細胞は、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell: pDC) と骨髄系樹状細胞 (myeloid dendritic cell: mDC) に大別される。樹状細胞は、初期の免疫応答を誘導する最も強力な抗原提示細胞であり、抗原を T 細胞に提示し、T 細胞を活性化して、細胞性免疫応答を開始させる^(64, 65)。当研究室において樹立した PMDC05 は、pDC と mDC 双方の性質を併せ持つ細胞株である⁽²¹⁾。PMDC05 を用いて CTL を誘導可能であり、さらに PMDC05 に CD80 遺伝子を導入した PMDC11 は、抗原提示能において PMDC05 より優れていることが示されている^(15, 22)。PMDC05 および PMDC11 は、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激により、その抗原提示能を増強させる。LPS は Toll 様受容体 4 (Toll like receptor 4: TLR4) のリガンドであり、LPS 刺激により成熟した DC は抗原特異的 CTL 誘導能と制御性 T 細胞機能抑制能が増強されると言われている⁽⁶⁶⁾。当研究室では、constitutively active (ca)TLR4 を PMDC11 に導入した caTLR4-PMDC11 を作成し、LPS 刺激した PMDC11 と同等の抗原提示能を有することを示した⁽⁵⁶⁾。PMDC11 と caTLR4-PMDC11 を APC として CMVpp65 特異的 CTL を誘導し、その誘導 CTL の CD8 陽性メモリーT 細胞サブセットの解析を行った。PMDC 刺激培養法において CD8 陽性セントラルメモリーT 細胞を主なサブセットとする CTL を長期に渡り誘導することが可能であり、その誘導能が MLPC 法に比して高いことが示された。PMDC 刺激培養法で用いているサイトカインの IL-7 は、T 細胞の新生や成熟 T 細胞の増殖・恒常性維持に不可欠なサイトカインである。IL-7 受容体 α 鎖 (IL-7R α) の発現は、ナイーブとメモリーT 細胞は同程度であるが、エフェクターT 細胞においては減少していることが知られている。マウスを用いた検討において IL-7 シグナルは、メモリーT 細胞の数の増加には関与しないが、IL-7 シグナルを欠くとメモリーT 細胞として生き残る細胞が少ないことが報告されている⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾。PMDC 刺激培養法が MLPC 法より優れた CD8 陽性セントラルメモリーT 細胞を主体とする CTL 誘導能を示した理由の 1 つは、IL-7 添加により刺激後メモリーT 細胞として生き残った細胞が多かったからではないかと考える。このことより、PMDC 細胞株を利用した抗原特異的 CTL 誘導法は効率的でかつ効果的な抗原特異的 CTL を誘導する 1 つの方法である可能性が示唆された。

これまでの多くの研究において、誘導 CTL の CD8 陽性メモリーT 細胞サブセットの

解析は、十分に行われていなかった。近年、ヒト pDC 株である GEN を用いた CMVpp65 特異的 CTL 誘導の研究で、誘導 CTL は CD8 陽性セントラルメモリーT 細胞を主体とし、CMVpp65 を導入した EBV 細胞株を皮下移植したマウスに CTL を輸注すると EBV 関連腫瘍を退縮させるという報告がある。このことから、PMDC 細胞株を利用した抗原特異的 CTL 誘導法は効率的でかつ効果的な抗原特異的 CTL を誘導する 1 つの方法であることが示唆された。

5 図と図の説明

(a)

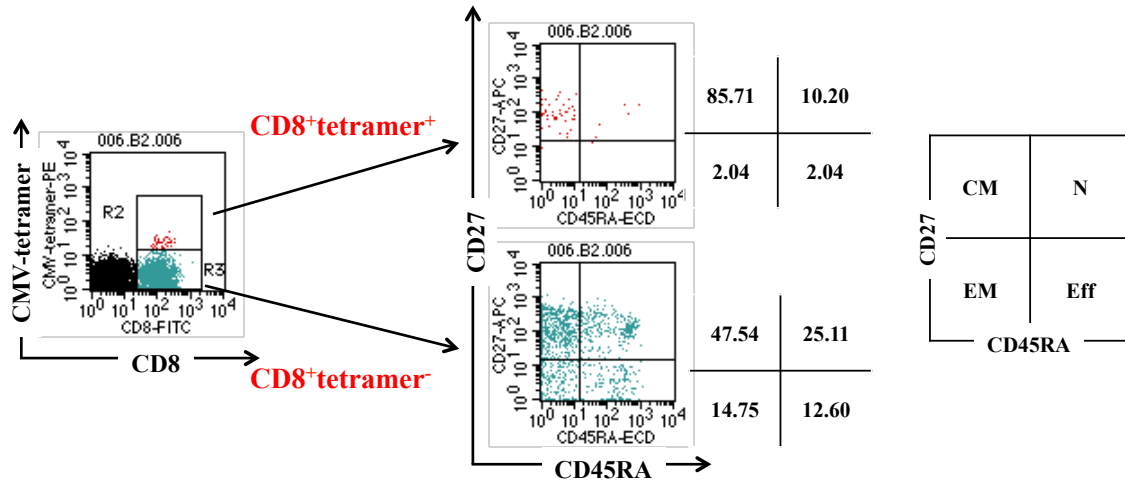


図 1 MLPC 法で誘導した CMVpp65 特異的 CTL の CD8 陽性メモリーT細胞サブセットの解析

(a) MLPC 法で誘導した CTL を CD8-FITC, CMVpp65-tetramer-PE, CD45RA-ECD, CD27-APC で染色し、CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性または CMVpp65 tetramer 陰性 CD8 陽性でゲートし、CD45RA-ECD と CD27-APC でそれぞれ展開し、CD8 陽性メモリーT細胞サブセットの割合を求めた。

CM:セントラルメモリーT細胞 EM:エフェクターメモリーT細胞 ナイーブ T細胞
エフェクターT細胞

(b) CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞(CTL)中の 2, 3, 4 週目の CD8 陽性メモリーT細胞の割合。

(c) CMVpp65 tetramer 陰性 CD8 陽性細胞中の 2, 3, 4 週目の CD8 陽性メモリーT細胞の割合。

(b)

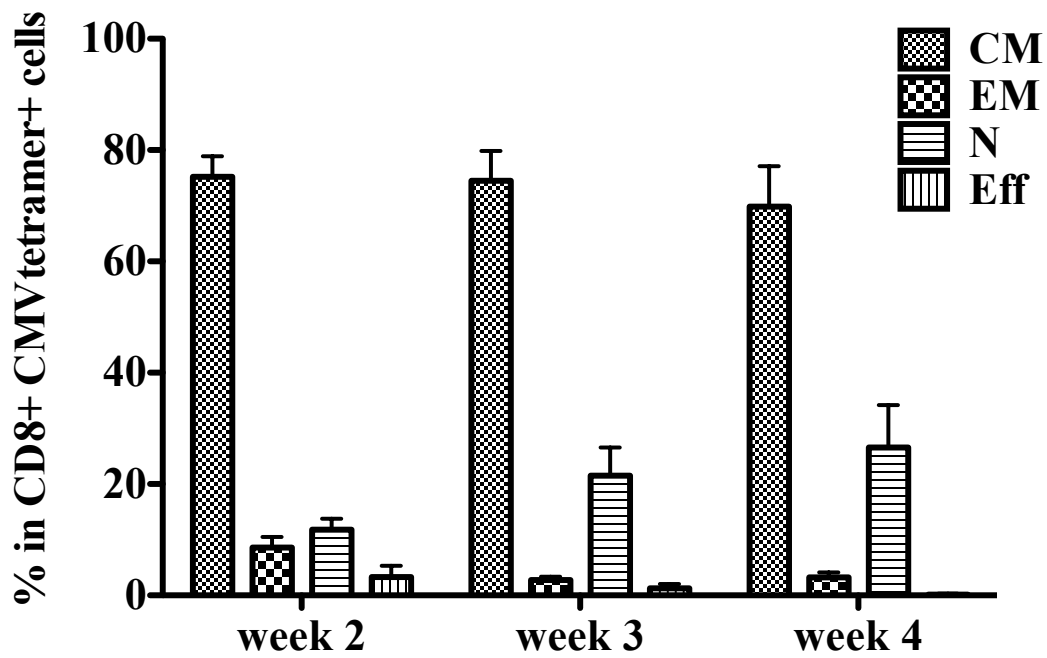


図 1 MLPC 法で誘導した CMVpp65 特異的 CTL の CD8 陽性メモリーT細胞サブセットの解析

(b) CMVpp65 tetramer 陽性 CD8 陽性細胞(CTL)中の 2, 3, 4 週目の CD8 陽性メモリーT細胞の割合。

(c)

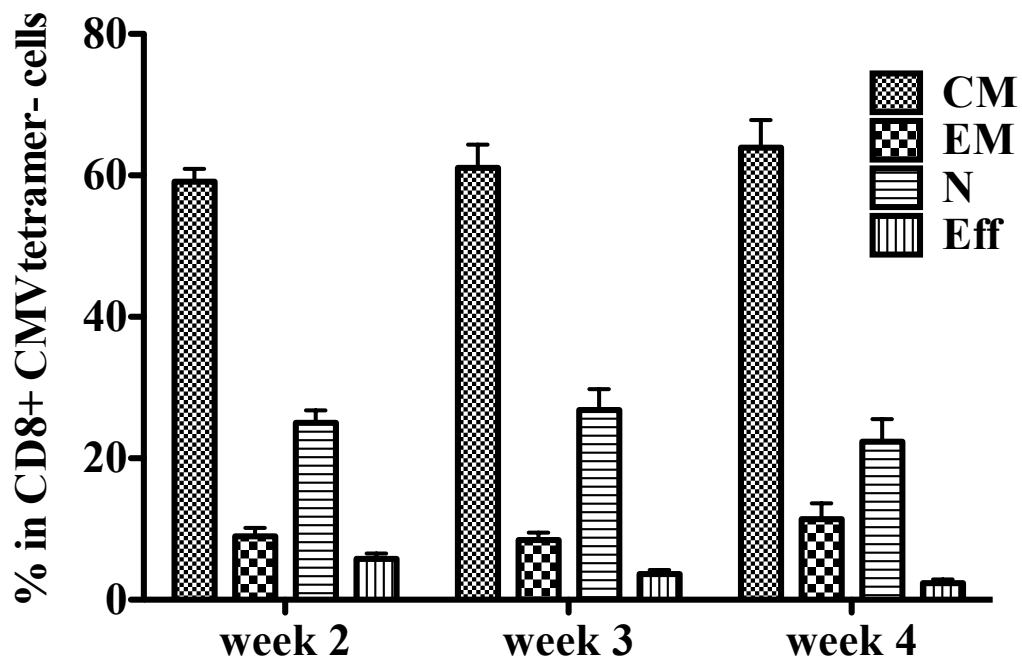


図 1 MLPC 法で誘導した CMVpp65 特異的 CTL の CD8 陽性メモリーT細胞サブセットの解析

(c) CMVpp65 tetamer 陰性 CD8 陽性細胞中の 2, 3, 4 週目の CD8 陽性メモリーT細胞の割合。

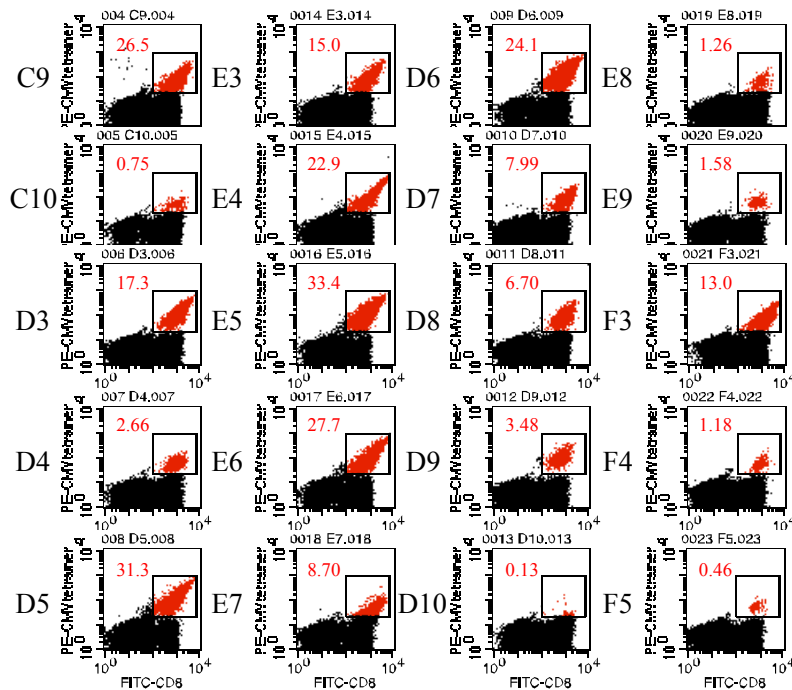
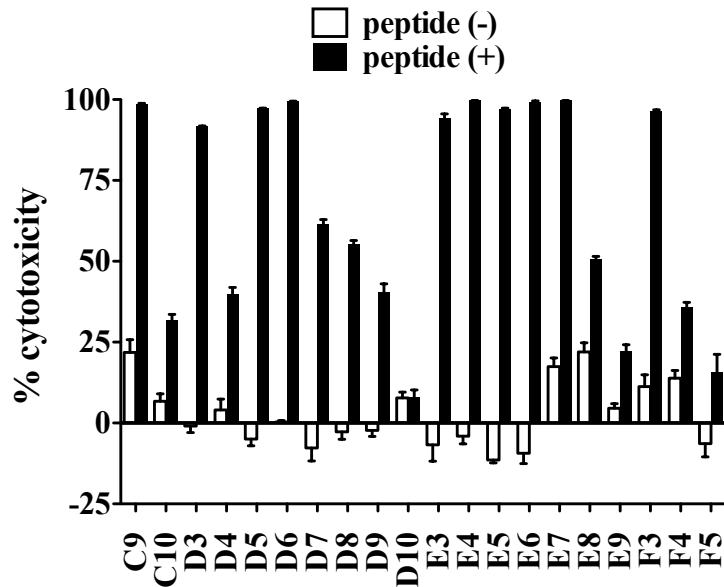


図 2 MLPC 法で誘導した誘導細胞の細胞傷害性試験における抗原特異性

CMVpp65 ペプチドをパルスした GFP-T2A24 細胞 (peptide(+)) とパルスしていない GFP-T2A24 細胞 (peptide(-)) をターゲット細胞とした細胞傷害性試験。白抜きの棒グラフがペプチドパルスしていないターゲット細胞・黒塗りの棒グラフがペプチドをパルスしたターゲット細胞。下は細胞傷害性試験で使用した各ウェルのエフェクター細胞の CMVpp65 tetramer 解析の結果。四角で囲まれたゲート内の赤い細胞集団が CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞。数字は、CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞の陽性率

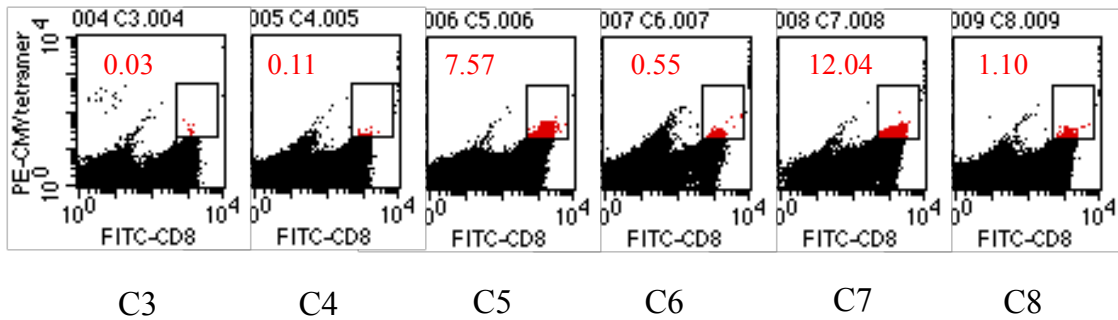
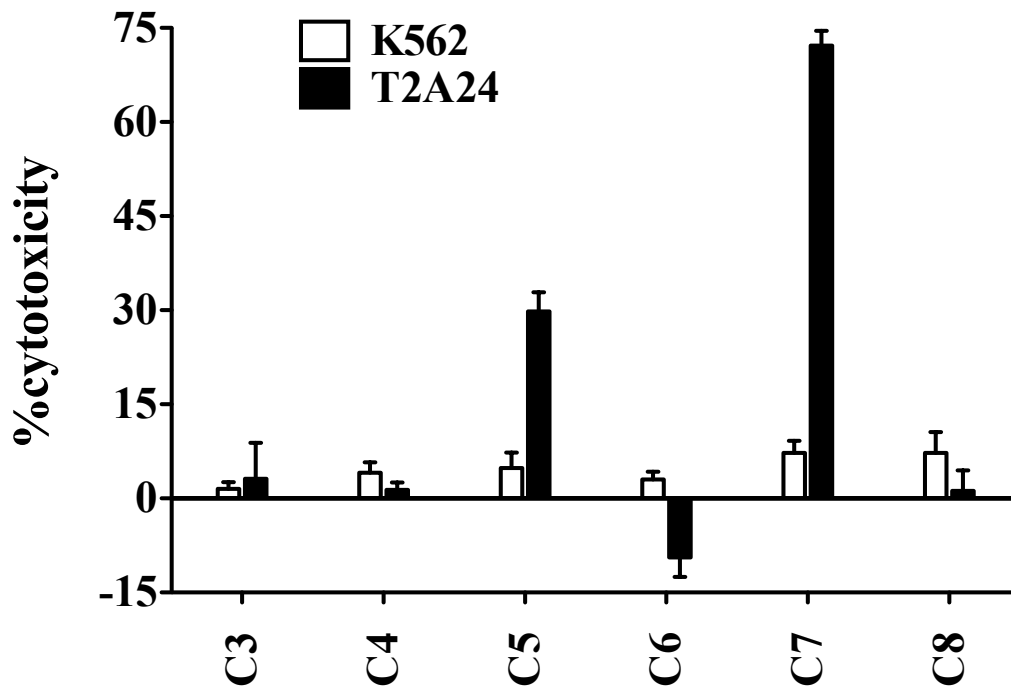


図 3 MLPC 法で誘導した誘導細胞の細胞傷害性試験における MHC 拘束性

CMVpp65 ペプチドをパルスした GFP-T2A24 細胞と EGFP-K562 細胞をターゲット細胞とした細胞傷害性試験。白抜きの棒グラフが EGFP-K562 細胞・黒塗りの棒グラフが GFP-T2A24 細胞。下は細胞傷害性試験で使用した各ウェルのエフェクター細胞の CMVpp65 tetramer 解析の結果。四角で囲まれたゲート内の赤い細胞集団が CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞。数字は、CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞の陽性率

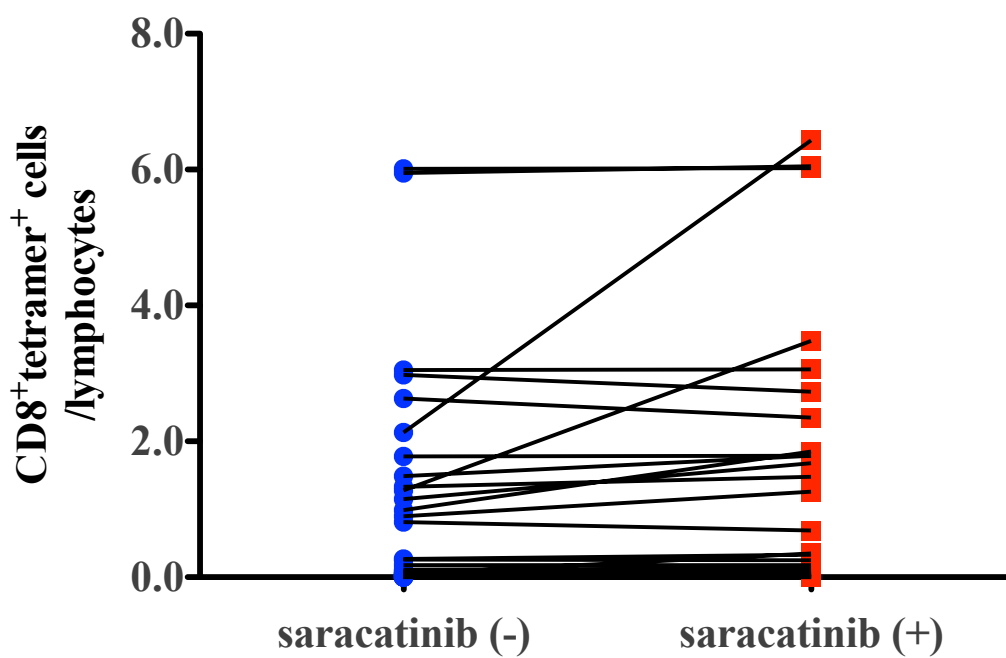


図 4 CTL 誘導におけるサラカチニブの WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞の陽性率に対する影響

MLPC 法で培養 2 週目に分割して、サラカチニブ添加・非添加培養した細胞中の WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞の陽性率を比較した。WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞の陽性率に影響はなかった。

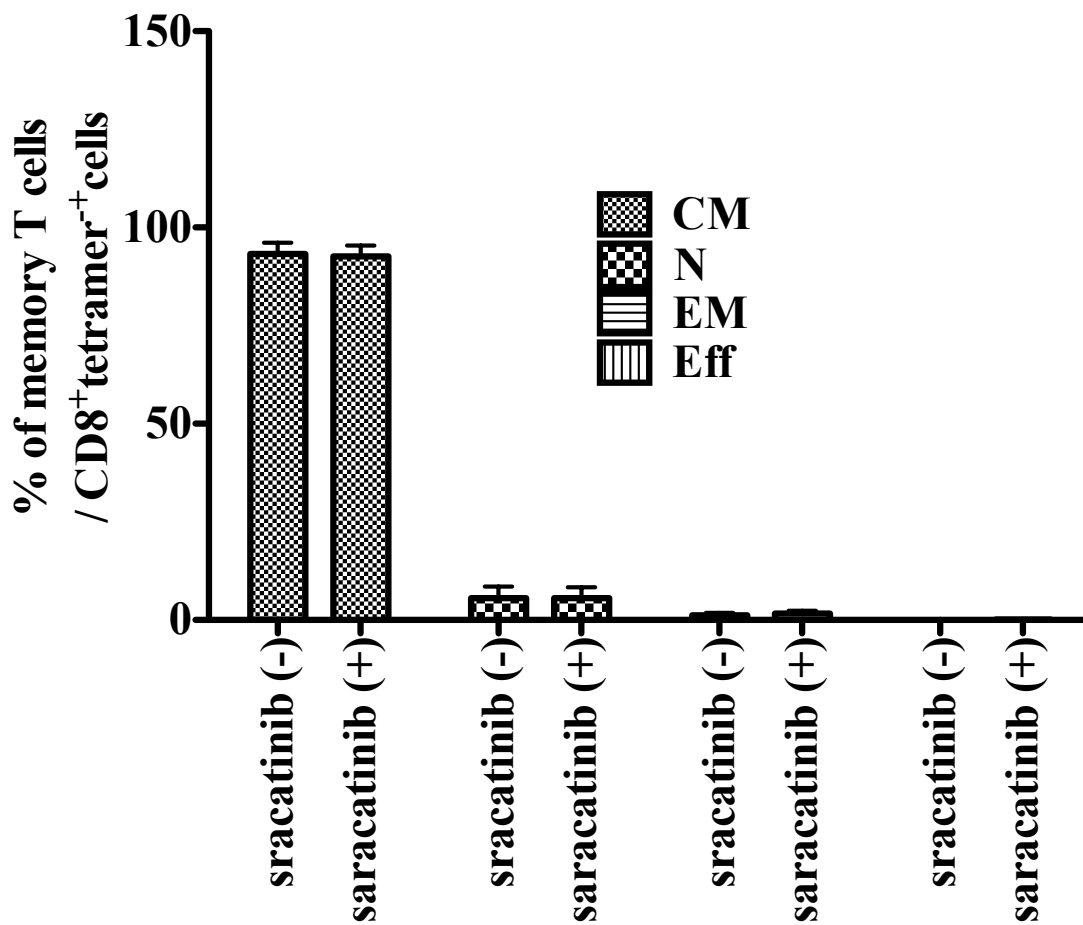


図 5 CTL 誘導におけるサラカチニブの WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞中のメモリーT細胞サブセットに対する影響

分割培養した培養細胞での WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞中の CD8 陽性メモリーT細胞サブセットの割合に対するサラカチニブの効果の比較。サラカチニブ添加の有無に関わらず、WT1 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞の主体は CD8 陽性セントラルメモリーT細胞であった。

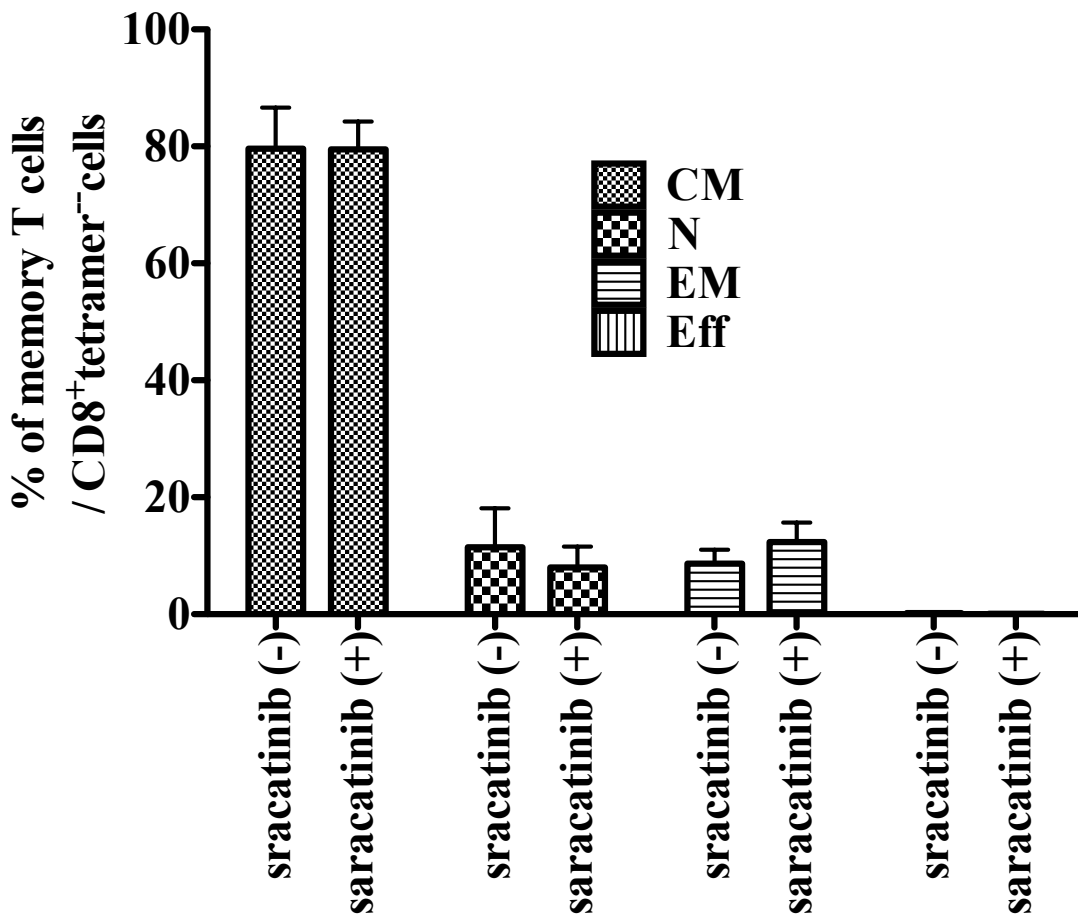
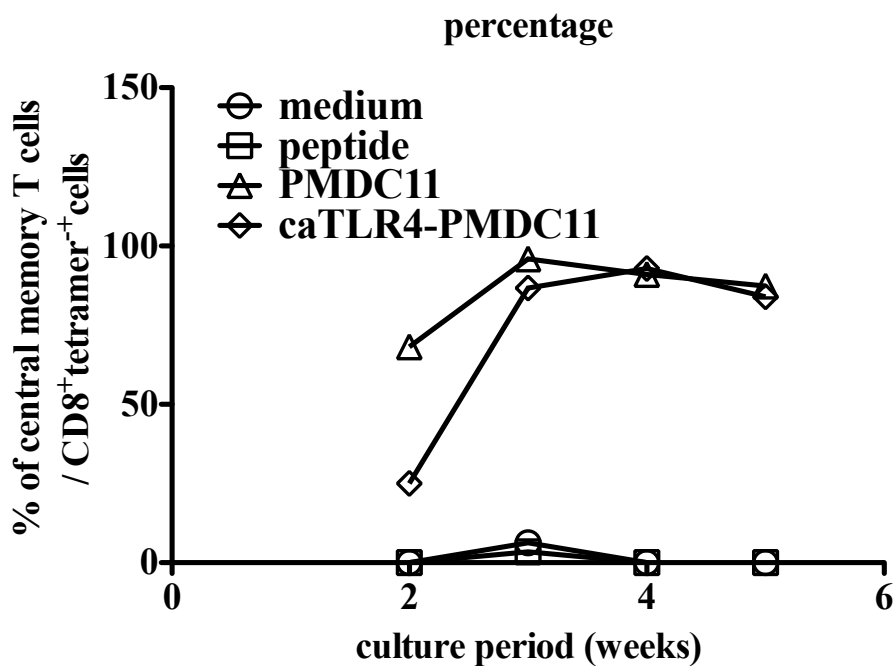


図 6 CTL 誘導におけるサラカチニブの WT1 tetamer 陰性 CD8 陽性細胞中のメモリー T 細胞サブセットに対する影響

分割培養した培養細胞での WT1 tetamer 陰性 CD8 陽性細胞中の CD8 陽性メモリー T 細胞サブセットの割合に対するサラカチニブの効果の比較。サラカチニブ添加の有無に関わらず、WT1 tetamer 陰性 CD8 陽性細胞の主体は CD8 陽性セントラルメモリー T 細胞であった。

(a)



(b)

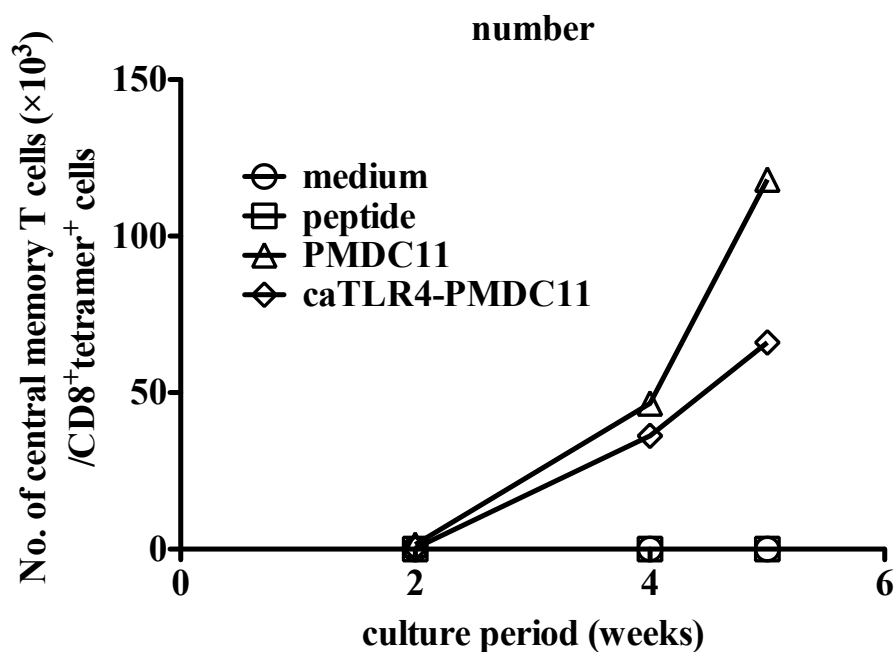
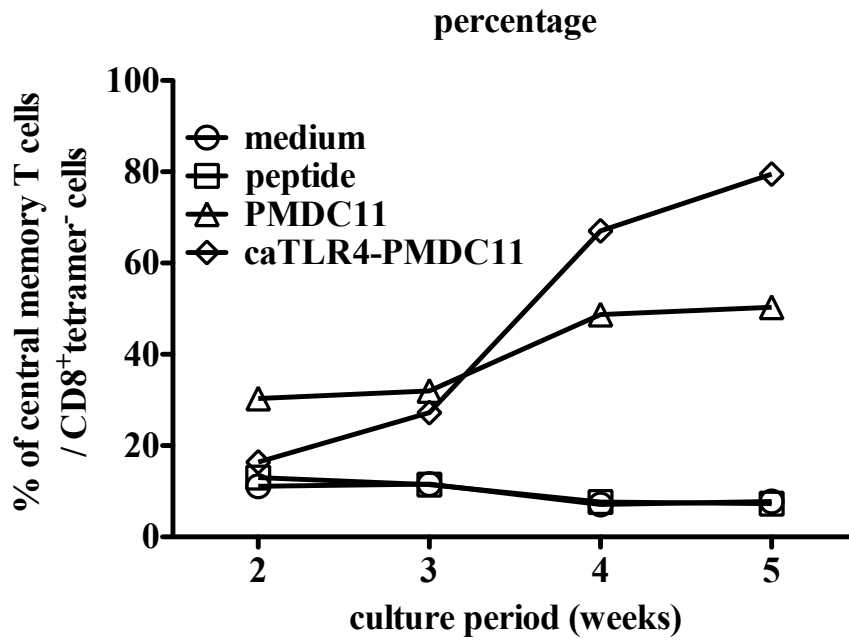


図7 PMDC 刺激培養法で誘導した CMVpp65 tetamer 陽性 CD8 陽性細胞中のメモリーT細胞サブセットの解析

PMDC 刺激培養法で培養した細胞の CMVpp65 tetamer 陽性細胞中の CD8 陽性メモリーT細胞の割合(a)と絶対数(b)の変化。

(a)



(b)

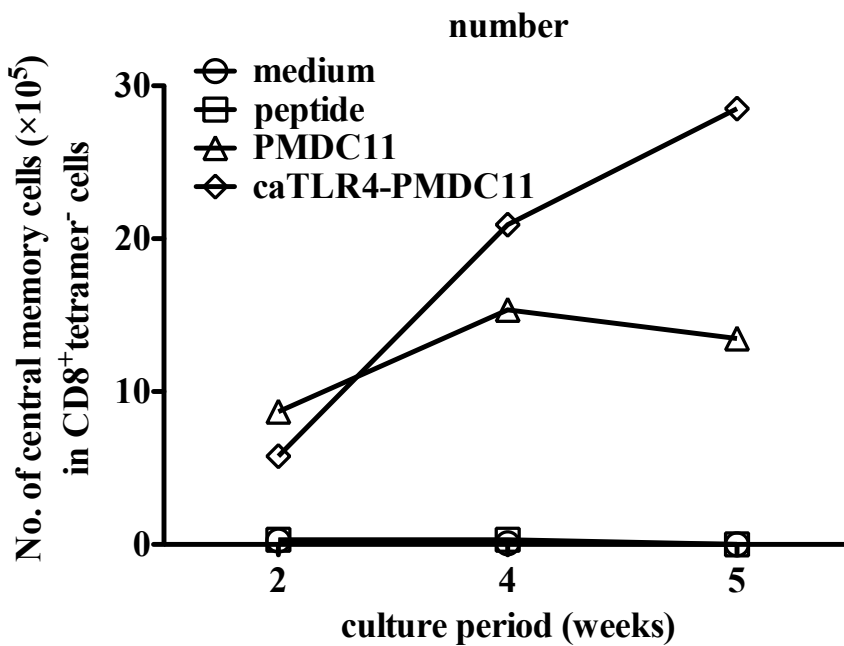


図 8 PMDC 刺激培養法で誘導した CMVpp65 tetamer 陰性 CD8 陽性細胞中のメモリー T 細胞サブセットの解析

PMDC 刺激培養法で培養した細胞の CMVpp65 tetamer 陰性細胞中の CD8 陽性メモリー T 細胞の割合(a)と絶対数(b)の変化。

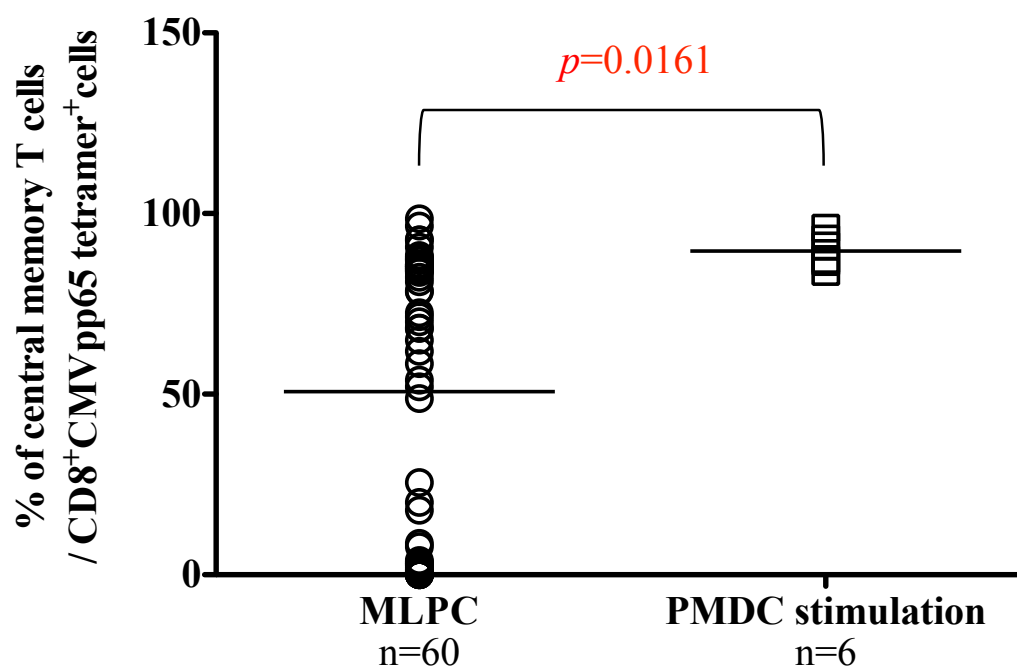


図9 MLPC法とPMDC刺激培養法で誘導されたCMVpp65 tetramer陽性CTL中のCD8陽性メモリーT細胞の割合の比較

PMDC刺激培養法においてCD8陽性セントラルメモリーT細胞の割合が、MLPC法に比して有意に増加していた。(p = 0.0161)

第4章 抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の T 細胞受容体β鎖可変領域レパトワの解析

1 緒言

人が暴露しうる膨大な数の外因性抗原に対する獲得免疫の応答能力は、B 細胞や T 細胞上に発現している受容体に高く依存している。T 細胞の場合、骨髄前駆細胞が胸腺に移動し、ナイーブ T 細胞へと分化する。ナイーブ T 細胞は、二次リンパ組織において抗原刺激を受ける免疫応答を促進することを助けるヘルパー T 細胞や非自己抗原を除去する働きを持つ細胞傷害性 T 細胞になる。末梢血中を流れる T 細胞上に発現している T 細胞受容体 (TCR) の主体は、 $\alpha\beta$ TCR であり、TCR によって主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラス I または II 上に提示された抗原ペプチドを認識する^(70, 71)。ポリペプチド鎖から成る $\alpha\beta$ TCR ヘテロダイマーは、いずれも可変部と定常部を持ち、2 本鎖の可変部で抗原および MHC 分子と結合する。β鎖の可変部は、variable (V), diversity (D), junctional (J) の遺伝子からなる。一方α鎖は、V と J 遺伝子からなっている。ヒトの TCRβ遺伝子座は、42 個の Vβ遺伝子断片、2 個の Dβ 遺伝子断片、そして 12 個の Jβ 遺伝子断片からなり、一方 TCRα遺伝子座は、43 個の Vα遺伝子断片と 58 個の Ja 遺伝子断片により構成されている⁽⁷²⁾。可変部のうち抗原ペプチドに対する特異性を決めているのが、7~23 のアミノ酸から成る 3 つの相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) である。CDR1 と CDR2 は、MHC と会合し、3 番目の CDR3 が抗原との結合に寄与していると考えられている⁽⁷²⁾。CDR3 の抗原認識部位は、V (D) J 遺伝子断片で起こる大規模な遺伝子再構成により形成され、さらに CDR3 の多様性は、TCRαにおいては V-J、一方 TCRβにおいては V-D-J 遺伝子断片の接合部におけるヌクレオチドの欠損や non-template encoded ヌクレオチドの挿入により生じる^(73, 74)。理論上、ヒトにおいては約 2×10^7 個の異なる TCR を持つ T 細胞が末梢血を流れると考えられている⁽⁷⁵⁾。

CD8 陽性 T 細胞は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の除去する役割を担っている^(76, 77)。CD8 陽性 T 細胞の活性化には、抗原提示細胞による抗原ペプチドの提示が必要である。これまでの研究において、様々な抗原由来ペプチドが同定され、ペプチドワクチン成分として利用されてきた。例えば、小児悪性腫瘍の原因遺伝子であるウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1) がある。WT1 ペプチドワクチン療法では、ペプチドワクチン投与例において WT1 特異的な細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞 (CTL) が誘導され、結果として白血病細胞の減少や固形腫瘍の退縮効果を示したことが報告されている^(78, 79)。さらに、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) では、その構造タンパク質である pp65 由来ペプチドにより MHC クラス I 拘束性 CTL の誘導例の報告もされている⁽⁸⁰⁾。

本研究室では、混合リンパ球ペプチド培養 (MLPC) 法を用いることで、体内に存在する 1 個の CTL を増幅して綿密に解析し、この方法が CTL 頻度測定および機能解析において有効であることを報告してきた^(19, 54)。

そこで本研究において、より効果的な免疫療法の確立のために、MLPC 法を用いて、体内で増幅された CTL にクローン性があるか否か、また、同一の TCR を用いて抗原ペプチドを認識しているか否かを明らかにすることを目的とした。

2 方法

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

健常成人、WT1 ペプチドワクチン投与健常人コントロール例または CML 例患者に対して十分な説明の後、末梢血を採取した。採取した末梢血を 1,160×g で 30 分間遠心し、血漿を分離した。血漿を新しい試験管に移し、終濃度 5 IU/ml のトロンビン (ミドリ十字、大阪) を加え、37℃で 24 時間反応させた。その後、1,160×g で 20 分間遠心分離し、血清を得た。

血漿分離後の残りの血球に分離した血漿と同量の 100 IU/ml penicillin / 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地(Life Technologies Corporation) を加え、十分に混和後、Lympho prep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) の上に静かに重層し、800×g で 30 分間遠心した。その後、中間層より PBMC を新しい試験管に移し、RPMI1640 を加えて混和し、300×g で 10 分間遠心を行った。上精を除き、さらに RPMI1640 を加えて混和後、200×g で 10 分間遠心を行った。この沈殿した PBMC を 5% 自己血清 (5% AS) 添加 RPMI1640 培地で洗浄・浮遊し、トリパンブルー色素排除試験法によって生細胞数を求めた。

2.2 サイトカインとペプチド

IL-2 (シオノギ製薬、大坂)、改変型 WT-1 ペプチド (WT1, CYTWNQMNL, Neo MPS, San Diego, CA)、CMVpp65 ペプチド (CMVpp65, QYDPVAALF, フナコシ, 東京) を用いた。

2.3 混合リンパ球ペプチド培養法 (mixed lymphocyte peptide culture: MLPC)

PBMC を 5% AS 添加 RPMI1640 で 3×10^6 cells/ml に調整し、ペプチド (WT1 または CMVpp65 ペプチド) を加え、十分に混和した。PBMC とペプチドの混合液を 100 µl ずつ 96-well U-bottom plate に、 3×10^5 cells/well でペプチド終濃度 10 µg/ml (WT1 ペプチド) または 5 µg/ml (CMVpp65 ペプチド) となるように播種した。3 日後に 50 U/ml の IL-2

添加 5% AS 加 RPMI1640 培地(MLPC 培地)を 100 ml ずつ各 well に加えた。その後 2 日毎に半分の培地を新しい MLPC 培地と交換した。培養開始 2 週間目より CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞および CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析 (tetramer 解析)した。

2.4 フローサイトメトリーによる解析

使用した抗体および tetramer は、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体: IgG1(BD Biosciences, San Jose, CA), CD8 (Biolegend, San Diego, CA, USA)、phycoerythrin (PE) 標識抗体: IgG1, CD8 (BD Biosciences), WT1 tetramer (HLA-A*2402 WT1 (mutant) tetramer – CYTWNQMNL-PE, 医学生物学研究所, 長野), CMVpp65 tetramer (HLA-A*24:02 CMVpp65 –tetramer –QYDPVAALF-PE, 医学生物学研究所) である。培養細胞を回収後、細胞に Fcγレセプターブロック試薬と各染色抗体を加え、4℃、20 分間染色した。染色後、phosphate buffered saline (PBS) で 1 回洗浄し、FACSCalibur (BD Biosciences) で測定し、CellQuest Pro (BD Biosciences) で解析した。

2.5 TCR Vβレパトワ解析

tetramer 解析の結果から、CD8 陽性 T 細胞中における CD8 陽性 tetramer 陽性細胞の割合が高かったウェルの細胞をさらに 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 つのウェルに合わせて播種し、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 CD8 陽性 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞について TCR Vβレパトワ解析を行った。解析には IOTest Beta Mark TCR Vβ Repertoire Kit (Beckman Coulter, Marseille, France) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。

3 結果

3.1 健常人末梢血単核球 (PBMC) の TCR Vβレパトワ解析

本検討において、まず健常人 PBMC の TCR Vβレパトワの解析を行った。培養前の健常人 PBMC の解析では、本検討で調べた 24 種類の TCR Vβ遺伝子が様々な割合で使用されていた (図 1a)。さらに、本検討で TCR Vβレパトワ解析を行った 4 人の健常人の PBMC において、24 種類全ての TCR Vβ遺伝子を様々な割合で使用していることが分かったが、それぞれの TCR Vβ遺伝子の使用頻度はそれぞれの健常人による相異が観察された (図 1b)。

3.2 MLPC 法で誘導した WT1 特異的 CTL を含む培養細胞の TCR V β レパトワ解析

次に、MLPC 法で培養した WT1 特異的 CTL (CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞) を含む培養 PBMC 中の CD8 陽性細胞上の TCR V β レパトワを解析した (図 2a)。本検討においては、増殖培養後に WT1 特異的 CTL が検出可能であった 7 ウェルの培養 PBMC を用いて TCR V β レパトワの解析をした (図 2b)。その結果、5/7 ウェル中の CD8 陽性細胞が単一の TCR V β の使用していた。また、2/7 ウェル中の CD8 陽性細胞は、それぞれ 2 種類および 3 種類の TCR V β の使用していることが観察された。TCR V β の使用頻度についてまとめたものが図 2c である (n=7)。7 ウェルの TCR V β レパトワ解析から、本検討で解析した細胞中の CD8 陽性細胞は、TCR V β 1 は 4/7 ウェル、TCR V β 13.6 は 2/7 ウェル、そして TCR V β 2, 3, 7.1, 8, または 18 はそれぞれ 1/7 ウェルで使用されていた。

3.3 MLPC 法で誘導した CMVpp65 特異的 CTL を含む培養細胞の TCR V β レパトワ解析

同様に、CMVpp65 特異的 CTL (CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞) を含む培養 PBMC 中の CD8 陽性細胞上に発現している TCR V β レパトワを解析した (図 3a)。TCR V β レパトワ解析には、増殖培養後に CMVpp65 特異的 CTL が検出可能であった 3 ウェルの培養 PBMC を用いた (図 3b)。その結果、1/3 ウェルで単一の TCR V β が使われていた。また、2/3 ウェルでは、2 種類の TCR V β の使用されていた。さらに 3 ウェルの解析で得られた TCR V β の使用についてまとめた結果、増幅した CMVpp65 特異的 CTL には TCR V β 1, 5.1, 13.1, 14, または 20 がそれぞれ使用されていた (図 3c)。

4 考察

これまで抗原特異的 CTL の TCR V β レパトワ解析に関する多くの報告がされている。これらの検討では、本検討同様に FACS を使用した検討や TCR V β 遺伝子ファミリー特異的なプライマーを用いた Polymerase Chain Reaction (PCR)による検討である。これらの多くは、ヒトにおける Epstein-Barr virus (EBV)や CMV 持続的な感染症のウイルス抗原に対して行われてきた⁽⁸¹⁾。近年では、健常人、急性骨髄性白血病 (AML) 患者、骨髄異形成症候群 (MDS) 患者、さらに担固形腫瘍患者の末梢血単核球中の 1 つの WT1 特異的 CTL 細胞を分離してきて、個々の WT1 特異的 CTL の TCR V β レパトワ解析が semi-nested PCR を用いて行われた^(82, 83)。これらの報告において、WT1 特異的 CTL は、WT1 の 1 つの抗原エピトープに対して、偏りはあるが、単一ではなく、異なる複数の TCR V β を使用していることが報告されており、本検討もこれを支持している。また、

健常人 PBMC から誘導・樹立した WT1 特異的 CTL 株は TCR V β 5.1 を持つことが示されている⁽⁸⁴⁾。本検討では、TCR V β 1 が最も高頻度に使用され、次いで TCR V β 13.6 の使用が確認されたが、TCR V β 5.1 の使用は認められなかった。今後より多くの WT1 特異的 CTL 上に発現している TCR レパトワ解析をさらに進める必要があると考える。WT1 ペプチドワクチン非投与健常人コントロールと AML 症例および MDS 症例間で共通して、WT1 特異的 CTL による TCR V β 5.1 使用頻度が高いが、AML 症例と MDS 症例間で比較すると TCR V β 1 を含む他の TCR V β も両症例共通で高い使用頻度を示すことが報告されている。

CMVpp65 特異的 CTL の TCR V β レパトワについての検討においても WT1 特異的 CTL と同様に oligoclonal な TCR V β レパトワの使用が示唆された。これまでの報告において HLA-A*24:02, -A*02:01 や -A*07:02 の CMVpp65 特異的 CTL の TCR V β レパトワの解析が行われ、異なる TCR V β を持つクローンの増殖が示唆されている。HLA-A*24:02 拘束性の CMVpp65 特異的 CTL は、TCR V β 6、V β 5.1、V β 3、V β 4、V β 7、V β 12 または V β 20 があげられている^(85, 86)。本検討と同一のものは TCR V β 5.1 と TCR V β 20 であった。これまでの報告によると CMVpp65 特異的 CTL は、いくつかの異なる TCR V β の使用が示されていることから、これまでの検討では報告が無く、本検討で検出された TCR V β 1、V β 13.1 または V β 14 も HLA-A*24:02 拘束性 CMVpp65 ペプチド特異的 CTL により使用されている TCR V β であることが示唆される。CMVpp65 特異的 CTL の TCR V β 解析についても、今後より多くの検討を行う必要があると考える。

これまで、抗原と抗体は 1 対 1 対応をしていると考えられてきた。しかし、本検討における HLA-A*24:02 拘束性抗原ペプチドを用いて誘導した抗原特異的 CTL の TCR V β レパトワ解析において、9 アミノ酸残基の HLA クラス I 拘束性抗原ペプチドを用いているにも関わらず、それを認識する TCR V β は単一でないことが明らかにされ、誘導された CTL はオリゴクローナルであることが示唆された。

近年では次世代シーケンサーを用いた網羅的な TCR レパトワの解析も行われている⁽⁸⁷⁾。これらの検討から同一の TCR V β であっても CDR3 のアミノ酸の長さが異なるなどの知見が得られている^(88, 89)。それゆえ、今後は WT1 特異的 CTL などについても次世代シーケンスなどを用いた CDR3 の詳細な解析を行うことで、より抗原特異的であり、より効果的な免疫療法の開発へ繋がると考える。

5 図と図の説明

(a)

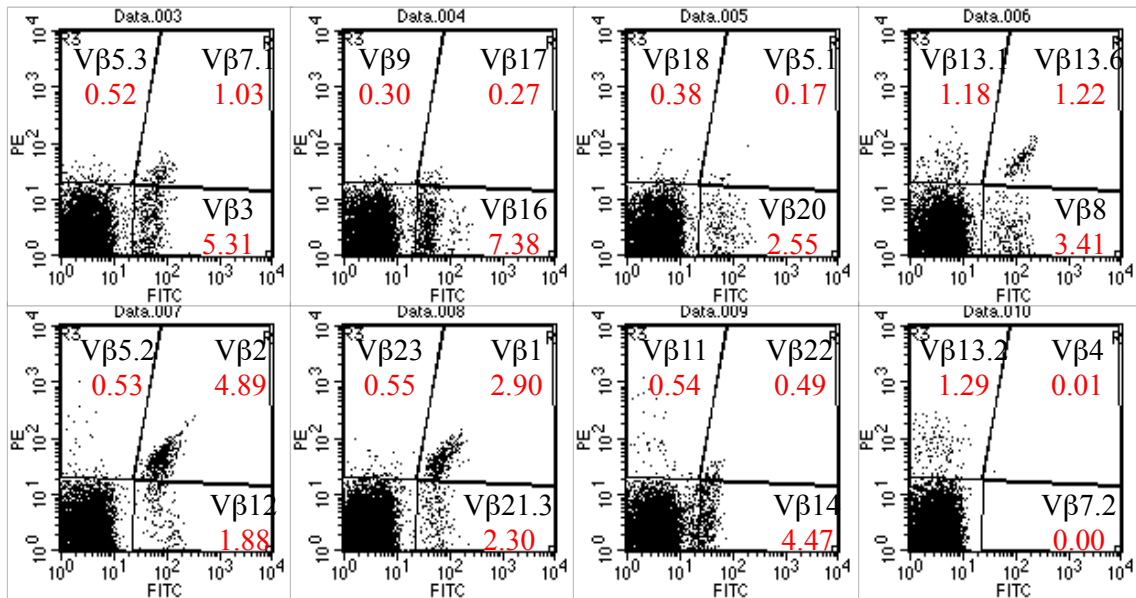


図 1. 培養前の健常人 PBMC の TCR V β レパトワ解析

(a) 健常人 PBMC の TCR V β レパトワ解析の代表例 (n=4)

(b) 4 人の PBMC の TCR V β レパトワ解析のまとめ健常人 (HD) PBMC において、24 種類全ての TCR V β 遺伝子を様々な割合で使用していたが、それぞれの TCR V β 遺伝子の使用頻度は個々の健常人により異なっていた。

(b)

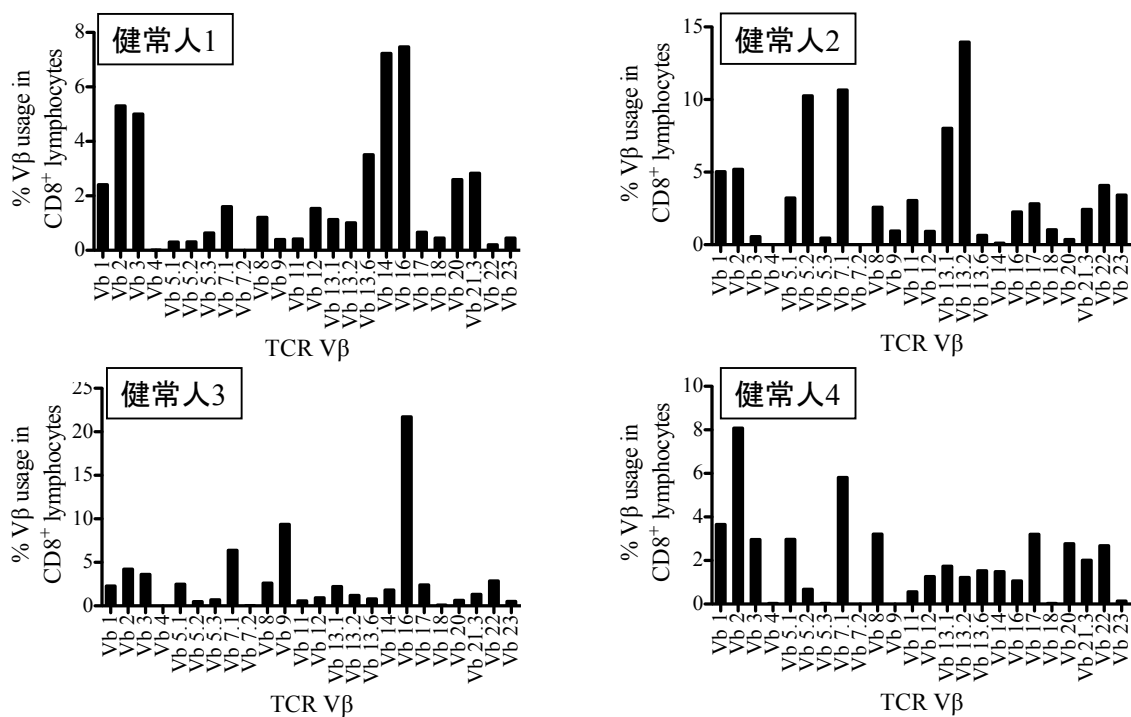


図 1. 培養前の健常人 PBMC の TCR Vβレパトワ解析

(b) 4人のPBMCのTCR Vβレパトワ解析のまとめ健常人PBMCにおいて、24種類全てのTCR Vβ遺伝子を様々な割合で使用していたが、それぞれのTCR Vβ遺伝子の使用頻度は個々の健常人により異なっていた。

(a)

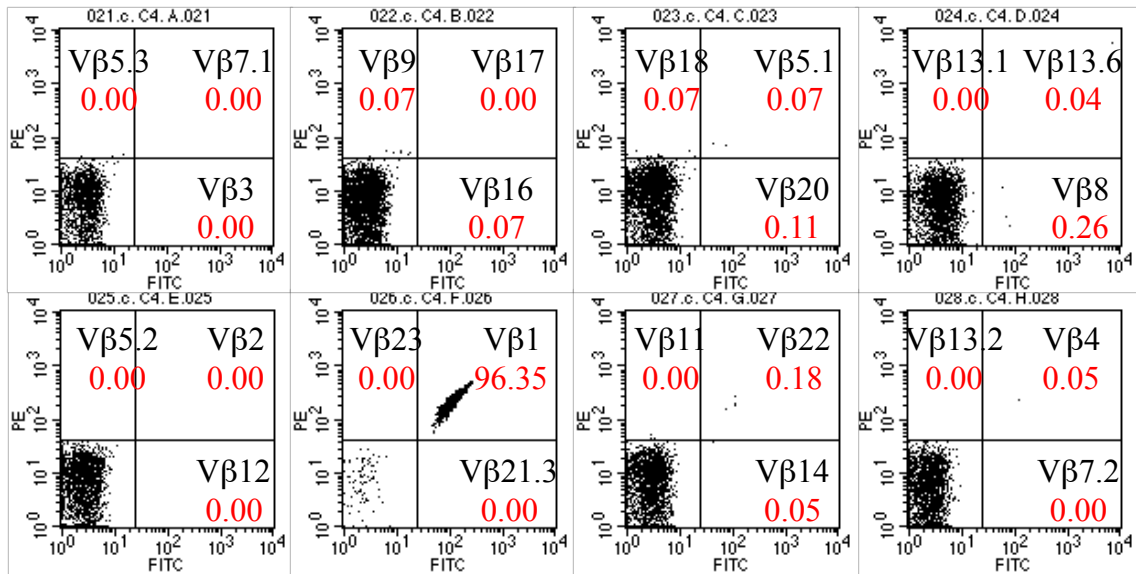


図 2. MLPC 法により誘導した CTL(CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性)を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(a) 高率に CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析の代表例 (7 ウェル)

(b) 検出可能な CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析と解析時の tetramer 解析結果 (7 ウェル)

(c) 検出可能な CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞を含む 7 ウェルの培養細胞における TCR Vβの使用分布

(b)

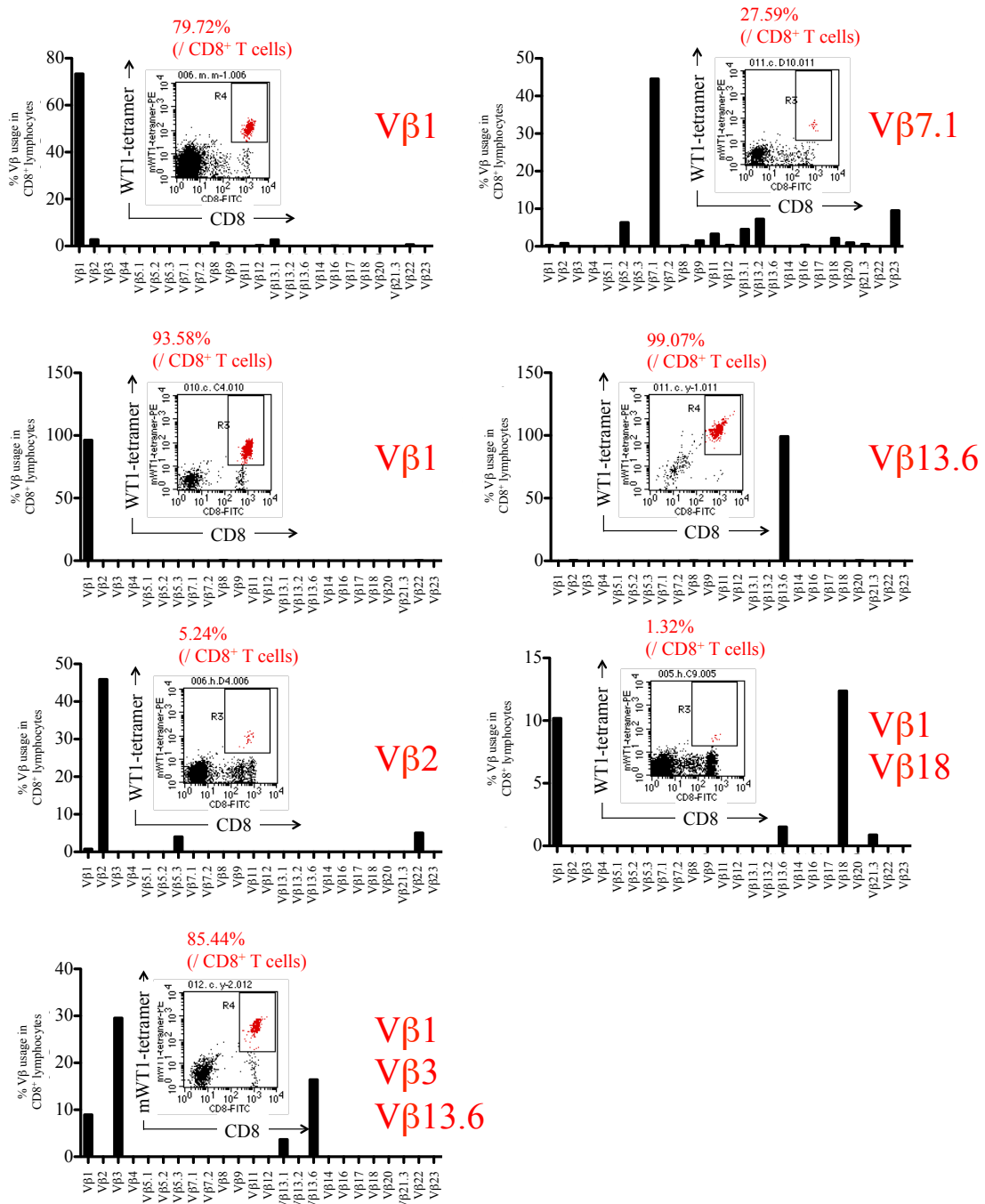


図 2. MLPC 法により誘導した CTL (CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性) を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(b) 検出可能な CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析と解析時の tetramer 解析結果 (7 ウェル)

(c)

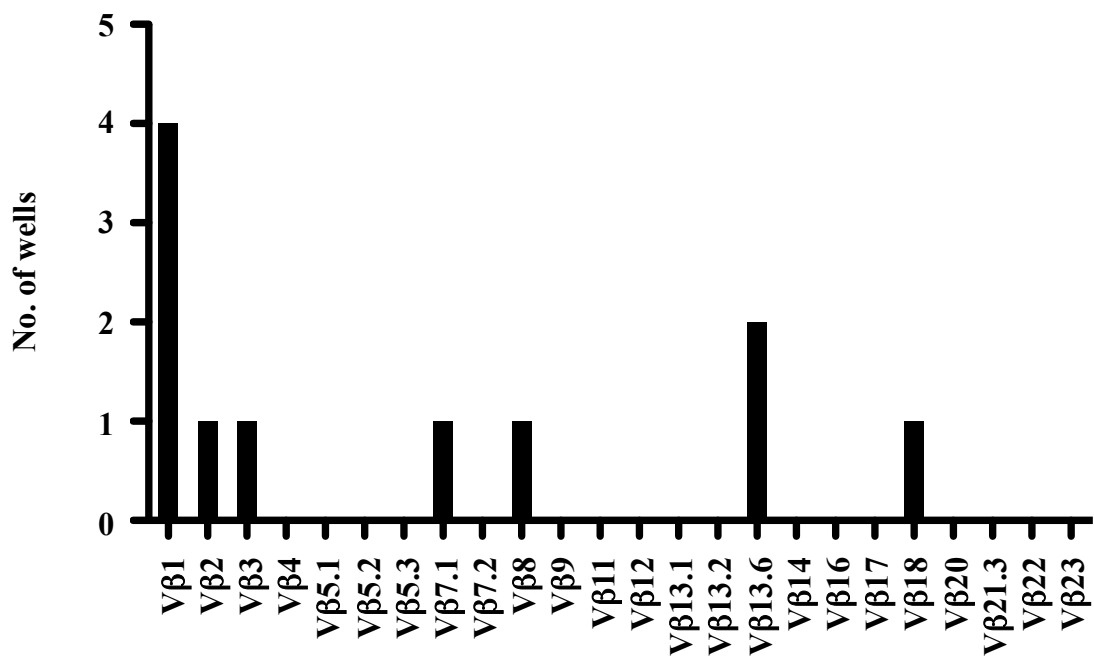


図 2. MLPC 法により誘導した CTL (CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性) を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(c) 検出可能な CD8 陽性 WT1 tetramer 陽性細胞を含む 7 ウェルの培養細胞における TCR Vβの使用分布

(a)

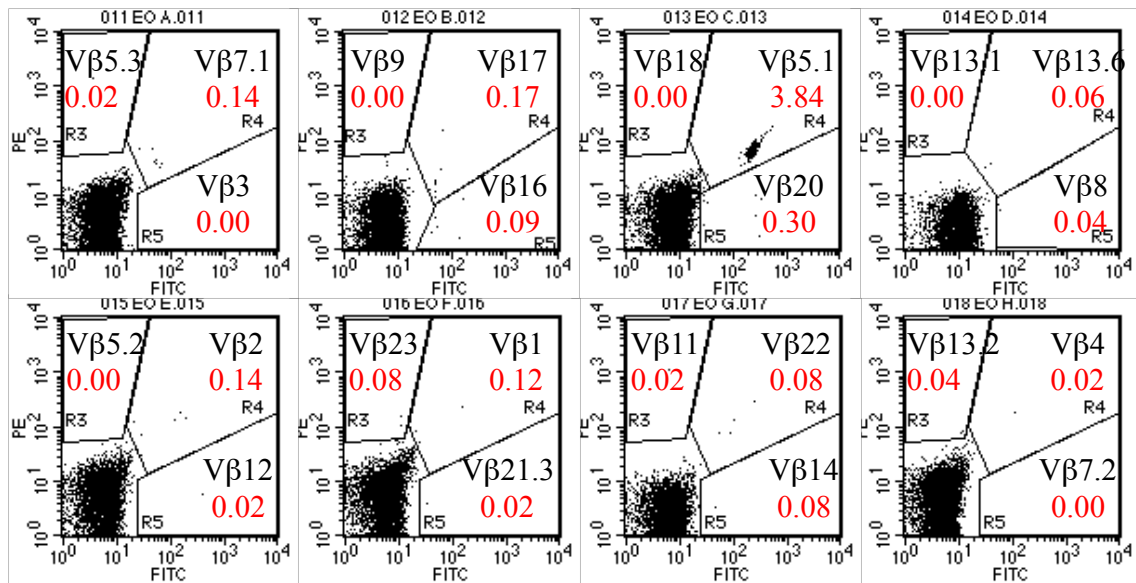


図 3 . MLPC 法により誘導した CTL (CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性) を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(a) 高率に CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析の代表例 (3 ウェル)

(b) 検出可能な CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析と解析時の tetramer 解析結果 (3 ウェル)

(c) 検出可能な CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む 3 ウェルの培養細胞における TCR Vβの使用分布

(b)

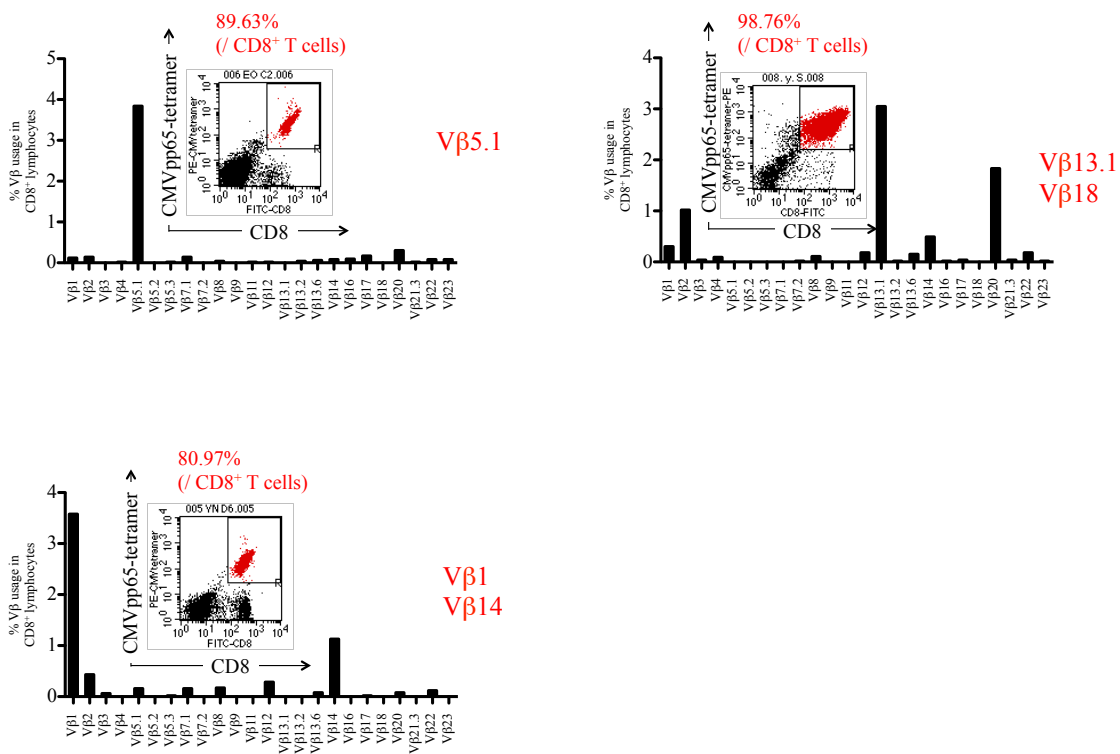


図 3 . MLPC 法により誘導した CTL (CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性)を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(b) 検出可能な CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析と解析時の tetramer 解析結果 (3 ウェル)

(c)

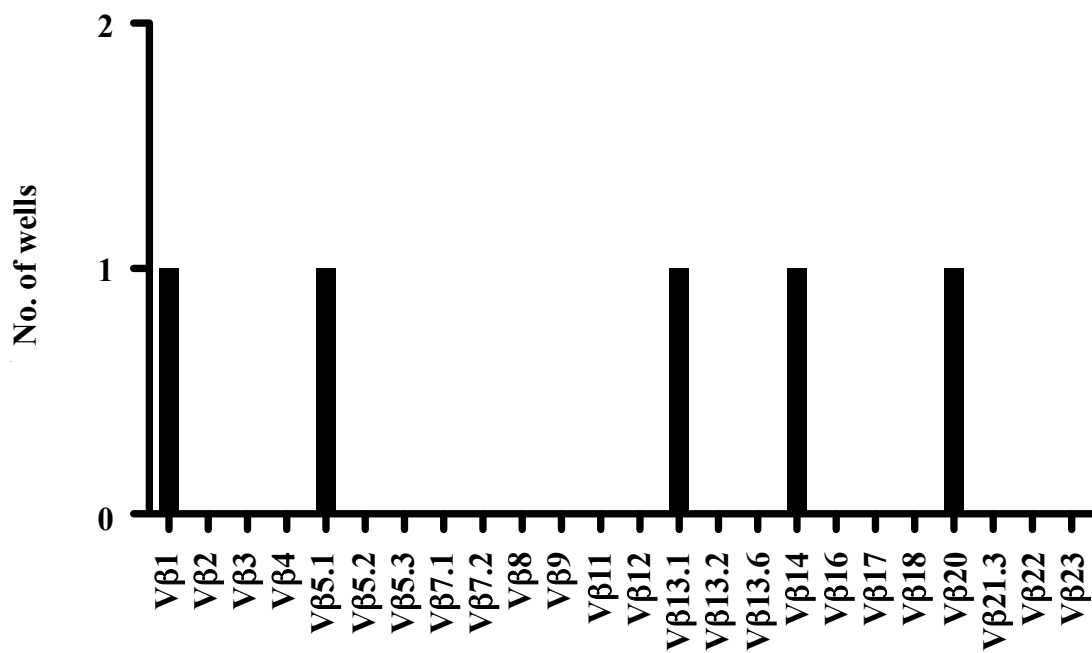


図 3 . MLPC 法により誘導した CTL (CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性) を含む培養細胞の TCR Vβレパトワ解析

(c) 検出可能な CD8 陽性 CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む 3 ウェルの培養細胞における TCR Vβの使用分布

第5章 白血病性形質細胞様樹状細胞株由来エクソゾームの同定とそれを用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導

1 緒言

樹状細胞 (dendritic cells: DC) は、抗原提示細胞 (antigen presenting cells: APC) の中でナイーブ T 細胞を活性化できる唯一の APC であり、強力な抗原提示能を持った細胞である⁽²⁰⁾。この強力な抗原提示能を利用して、生体外で抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes: CTL) を誘導し、患者に輸注するという養子細胞免疫療法は、有効で安全な治療法として期待が高まっている⁽⁹⁰⁾。しかし、通常 DC は患者自身の血液より誘導するため、治療に必要な十分量の細胞を確保することが患者の全身状態に左右されることもあり、養子細胞免疫療法の発展の障害となっている。近年、養子細胞免疫療法の問題点克服をめざして、人工抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cells: aAPC) を用いた CTL 誘導法による養子細胞免疫療法の研究・開発が進められている⁽⁹¹⁾。

我々の研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株 (PMDC05) は、抗原提示能⁽²¹⁾と CTL 誘導能を有している⁽¹⁵⁾ので、養子細胞免疫療法へ応用可能な APC となりうる⁽¹⁵⁾と考えられる。さらに、その誘導株である PMDC11 は PMDC05 より高い抗原提示能を持つことが示されている⁷⁾。

エクソゾームは、直径 30~100 nm の大きさで、その密度は 1.13 g/ml から 1.19 g/ml の細胞外分泌小胞である⁽⁹²⁻⁹⁴⁾。エクソゾームは、B 細胞・DC・脂肪細胞・T 細胞・血小板などの造血系細胞^(23, 95, 96)、小腸上皮に代表される上皮細胞⁽⁹⁷⁻¹⁰¹⁾、アストロサイトやニューロン⁽¹⁰²⁾など多様な細胞から分泌される。

エクソゾームは、エンドソーム系の多胞性エンドソーム (multivesicular bodies: MVBs) の中で生成される。エンドソーム系は、エンドサイトーシスにより取り込まれた物質を含む小胞、初期エンドソームおよび MVBs より形成されている。初期エンドソームは、細胞膜の近くに存在し、エンドサイトーシスにより取り込まれた物質を再び細胞膜上へリサイクルする^(103, 104)のか、または MVBs へ向かうのかを選別する場として機能する^(103, 104)。MVBs 内には、エンドソーム膜ごと内側へくびれて出来る腔内膜小胞 (intraluminal vesicles: ILVs) が多数存在している。ILVs へのタンパク質のソーティングやパッケージングは、モノユビキチン化やエンドソーム輸送選別複合体 (endosomal sorting complex required for transport: ESCRT) 機構・脂質ラフトとの結合・セラミドによる ILVs の形成⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾など様々な機序が関係している。その後、MVBs がリソソームと会合して内包するタンパク質などの分解がおこるか、細胞膜と融合して ILVs を細胞外へ放出する。この細胞外へ放出された ILVsこそエクソゾームである。近年、エクソゾーム構成タンパク質の分析が進み、その詳細が明らかになってきている^(109, 110)。主

要組織適合抗原 (major histocompatibility complex: MHC)クラス I および II 複合体や CD86 などの抗原提示関連タンパク質⁽²³⁾、CD63 や CD9 などのテトラスパニン⁽¹¹¹⁾、インテグリンや CD54 などの接着分子^(112, 113)、シグナル伝達分子⁽¹¹³⁾、抗アポトーシス分子⁽¹¹³⁾、アクチンやチューブリンなどの細胞骨格タンパク質⁽¹¹⁴⁾、アネキシンなどの細胞膜融合・輸送分子⁽¹¹⁵⁾、heat-shock protein 70 などのヒートショックタンパク質⁽¹¹¹⁾、エノラーゼなどの代謝酵素⁽¹¹⁴⁾がエクソゾームを構成するタンパク質として同定されている。B 細胞や DC に代表される APC 由来エクソゾームは MHC クラス I および II 複合体や CD86 などの抗原提示関連タンパク質を豊富に含むことから、APC 由来エクソゾームの免疫調節能に関する研究が行われてきた。*in vitro* において B 細胞由来エクソゾームが MHC class II 拘束性に CD4⁺T 細胞を活性化させるという報告がされた¹³⁾。強い抗原提示能を持つ DC 由来エクソゾーム (dex: dexosome) に関する研究において、マウス dex が T 細胞依存的に抗腫瘍効果を促進するという報告がなされている¹²⁾。

本検討は、PMDC 細胞由来エクソゾームを同定すると共に PMDC 細胞由来エクソゾームによる抗原特異的 CTL の誘導法の確立を目的として行った。

2 材料と方法

2.1 細胞培養

PMDC05 および PMDC11 は PMDC 培地中で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養を行った。PMDC 培地は、100 IU/ml penicillin / 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) および 10 %FBS 加 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM: Life Technologies Corporation) である。

2.2 末梢血単核球(PBMC)の分離

PBMC の分離は、以前報告がなされている方法を採用した⁽¹¹⁶⁾。すなわち、健常成人 (HLA-A*24:02 陽性) に対して十分な説明の後、末梢血を採取した。末梢血より Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) を用いて、比重遠心法により PBMC を得た。

2.3 エクソゾームの抽出

1×10⁶/ml に調整した PMDC 細胞の培養液に CMVpp65 ペプチド (終濃度 10 µg/ml : CMVpp65, QYDPVAALF, フナコシ, 東京) または改変型 WT-1 ペプチド (終濃度 10 µg/ml : WT1, CYTWNQMNL, Neo MPS, San Diego, CA) を加え、37°C・5%CO₂ において 24 時間培養した。培養後、細胞を回収し、500×g・室温・10 分間の遠心分離を行った。次に、上清を 2,000×g・4°C・10 分間の遠心分離を行った。遠心分離により得た上清を再び 2,000×g・4°C・10 分間の遠心分離し、エクソゾーム抽出に用いる細胞培養上清 1 ml

を得た。エクソゾームの抽出には、ExoQuick-TC Exosome Isolation Reagent (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) を用い、方法は製造元提供のプロトコルに従って行った。陰性コントロールとして、同量のペプチドを加えて、37°C・5%CO₂において24時間静置した PMDC 培地よりエクソゾームを抽出した。

2.4 PMDC 細胞の表面形質の解析

エクソゾーム抽出の際、培養上清を取り除いた後の細胞を用いて行った。細胞に Fcγ レセプター (FcγR) ブロック試薬を加え、5 ml ポリスチレンチューブ(FACS チューブ) に分注した。それぞれの FACS チューブに PE 標識抗 IgG1, CD54, CD80, HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), IgG2b, CD63, CD86 (Biolegend, San Diego, CA, USA), CD83 (Immunotech, Marseille, France) 抗体を加え、4 °C, 20 分間反応させた。その後 PBS で 1 回洗浄し、FACS Caliber (BD Biosciences) を用いて測定し、CellQuest Pro software (BD Biosciences) を用いて解析した(FACS 解析)。

2.5 エクソゾームの同定(図 1)

FITC 標識抗 HLA-DR 抗体 (BD Biosciences) と抗 FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) を FcγR ブロッキング試薬中でよく混和し、4°Cにおいて1時間反応させた。その後、ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝生理食塩水 (BSA-PBS) を用いて 2 回洗浄し、抗体-マイクロビーズ複合体を培養上清から抽出した膜小胞と FcγR ブロッキング試薬中で混和し、4°Cで24時間反応させた。BSA-PBS で2回洗浄後、抗体-マイクロビーズ-膜小胞複合体を PE 標識 IgG1、CD54、CD80 (BD Biosciences)、CD63、CD86 (Biolegend) で染色した。再び BSA-PBS で 2 度洗浄し、上清を除去した後、200 ml の BSA-PBS に沈殿を再浮遊し、FACS 解析を行った。

2.6 CD8 陽性 T 細胞の純化

CD8 陽性 T 細胞の純化は、以前の報告の如く行った⁶⁾。すなわち、健常成人、WT1 ペプチドワクチン投与健常人コントロール例 (全て HLA-A*24:02) の末梢血より分離した PBMC より Anti-FITC microbeads MACS system (Miltenyi Biotec) を用いて positive selection により純化 CD8 陽性 T 細胞を調整した。純化 CD8 陽性 T 細胞の純度は 95 % 以上であった。

2.7 エクソゾーム刺激培養法

PMDC 細胞由来エクソゾームは、CMVpp65 ペプチドパルス(終濃度 10 μg/ml) または WT1 ペプチドパルス (終濃度 10 μg/ml) した PMDC11 細胞培養上清より抽出し、5% AS 加 RPMI1640 培地に懸濁した。

純化 CD8 陽性 T 細胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/well) を 96-ウェル 丸底プレートに播種し、さらに PMDC 細胞由来エクソゾーム懸濁液を加えて培養した。培養開始 3 日目に IL-2 (終濃度 50 IU/ml)、IL-7 (終濃度 10 ng/ml) を加え、以後 2-3 日毎に半分の培地を新しい 50 IU/ml IL-2, 10 ng/ml IL-7, 5% AS 加 RPMI1640 培地 (以下 CTL 培地) に交換した。培養 2 週間目より WT1 または CMVpp65 テトラマー陽性細胞の増幅について FACS 解析を行った。また、PMDC 細胞由来エクソゾームによる再刺激は毎週行った。PMDC11 細胞由来エクソゾームは、2 回目以降の刺激より CTL 培地に再懸濁して用いた。

2.8 テトラマー解析

増幅した CTL の FACS による確認は、テトラマー解析により行った。使用した抗体およびテトラマーは、FITC 標識抗体: IgG1 (BD Biosciences), CD8 (TONBO biosciences, San Diego, CA, USA)、PE 標識抗体: IgG1, CD8 (BD Biosciences), WT1 テトラマー (HLA-A*2402 WT1 (mutant) tetramer -CYTWNQMNL-PE, 医学生物学研究所, 長野)、CMVpp65 テトラマー (HLA-A*2402 CMVpp65 -tetramer -QYDPVAALF-PE, 医学生物学研究所)、PerCP/Cy5.5 標識抗体: CD8 (Biolegend)、APC 標識抗体: PD-1 (Biolegend) である。培養細胞の一部をウェルから取り、その細胞を抗体およびテトラマーで染色した。染色後、FACS 解析をおこなった。

2.9 細胞傷害性試験

本検討においては、以前報告された方法を用いて行った⁽⁵⁶⁾。すなわち、ターゲット細胞は、CMV ペプチド 5 $\mu\text{g/ml}$ を添加または非添加で 24 時間培養した GFP 遺伝子導入 T2A24 細胞を回収し、フェノールレッド非添加 RPMI1640 培養液 (BD Biosciences) で 2 回洗浄した後に $1.0 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ に調整した。エフェクター細胞はエクソゾーム刺激培養法で培養した CD8 陽性細胞を用いた。エフェクター細胞は回収後、フェノールレッド非添加 RPMI1640 培養液で 2 回洗浄し、 $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ に調整した。5 ml ポリスチレンチューブ (BD Biosciences) にエフェクター細胞とターゲット細胞をそれぞれ 100 μl ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間共培養した。4 時間の共培養には 10 %FBS を加えたフェノールレッド非添加 RPMI1640 培養液を用いた。その後各チューブに 7AAD (SIGMA-ALDRICH) を 1 μl 加えて暗所で 15 分室温に置き、死細胞を染色した後、FACS 解析を行った。GFP⁺かつ 7AAD⁻の細胞を生細胞とした。解析は 1 本につき 120 秒ずつ行い、実験はすべて triplicate で行った。

3 結果

3.1 PMDC 細胞の表面形質解析

ペプチドを細胞培養液に加えて 24 時間培養後、エクソゾーム抽出用に培養上清を分離した後の細胞の表面形質を FACS で解析した (図 2)。PMDC11 細胞は、抗原提示関連分子である CD80, HLA-DR および CD86 の発現が高く、さらに CD54、テトラスパニンファミリーの CD63 そして CD83 を発現していた。一方、PMDC05 細胞は、抗原提示関連分子の HLA-DR と CD86 の高い発現が見られ、さらに PMDC11 同様 CD54、CD63、CD83 が発現していた。

3.2 PMDC 細胞由来エクソゾームの同定

次に PMDC 細胞培養上清よりエクソゾーム抽出キットを用いて抽出した抽出産物が PMDC 細胞由来エクソゾームであることを確認するために、HLA-DR の結合した磁気ビーズを用いて抽出したエクソゾームを捕らえ、さらに別の抗体 (CD54, CD63, CD80, CD86) でサンドウィッチし、それをフローサイトメトリー解析することで、エクソゾームであることを同定した (図 1)。

培養液に含まれる FBS にもエクソゾームは含まれるので、コントロールとして培養液のキットによる抽出物も本法によって捕捉されるのか否かを確認した (図 3)。この結果より、培養液の抽出物は、この磁気ビーズによる同定法ではエクソゾームの捕捉は認められなかった。つまり、PMDC 細胞由来エクソゾームの同定においては、FBS 由来エクソゾームは無視できると考えられた。PMDC 細胞由来エクソゾームの同定をした。エクソゾームマーカーとしては、CD9, CD54, CD63 などがある。PMDC 細胞の培養上清から抽出した HLA-DR 陽性膜小胞は、エクソゾームマーカーである CD63 が強陽性、CD54 が陽性であったことから、本法により PMDC 細胞の培養上清から抽出した HLA-DR 陽性膜小胞は、エクソゾームであることが確認された (図 3)。さらに、PMDC05 細胞由来エクソゾームは、CD80 が陰性であった (図 3)。

3.3 PMDC 細胞由来エクソゾーム刺激による CTL 誘導

抗原提示細胞である樹状細胞由来エクソゾームは、MHC クラス I やクラス II が豊富に含まれていることから、抗原提示能を有していると言われている。そこで、本検討において抽出した PMDC 細胞由来エクソゾームを用いて、CMVpp65 特異的 CTL の誘導を試みた (図 4)。すると、CMVpp65 ペプチドをパルスした PMDC11 細胞の培養上清より抽出したエクソゾームで刺激培養した CD8 陽性細胞において、CMVpp65 テトラマー陽性細胞が培養 3 週目より確認できた。加えて、ペプチドパルス PMDC11 由来エクソゾームで刺激培養した培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の割合は、培養期間中に 4 週目をピークに増加していた。細胞傷害試験では、ペプチドパルス

PMDC11 由来エクソゾームで刺激培養した CMVpp65 テトラマー陽性細胞を含む細胞をエフェクター細胞として使用した場合、ペプチドパルスシターゲット細胞に対する細胞傷害活性が他のどの場合よりも有意に高かった (図 5)。さらに、4 週間培養した CD8 陽性細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞は、99.46%が免疫応答の核となる T 細胞の活性化や増殖を負に制御する補助刺激受容体である programmed cell death-1 (PD-1) 陰性であった (図 6)。

同様に、WT1 ペプチドをパルスした PMDC11 細胞の培養上清より抽出した PMDC11 由来エクソゾームを用いて WT1 特異的 CTL の誘導が可能であった(図 7)。PMDC11 由来エクソゾームで刺激培養した CD8 陽性 T 細胞において、WT1 テトラマー陽性細胞が培養 1 週目より確認できた。培養細胞中の WT1 テトラマー陽性細胞の割合は、培養期間中に 1 から 2 週目にかけて増加していた。

4 考察

養子細胞免疫療法は、抗原特異的 CTL を生体外で増幅させ、患者に再び輸注する方法である。この方法は、T 細胞を活性化して輸注するので、輸注 T 細胞の標的細胞に対する十分な細胞傷害活性が期待でき、CTL により、標的とする腫瘍を退縮させるという考えのもと行われてきた。しかし、治療に用いる APC や CTL は自家 PBMC より調整するので、効果の期待できる質の高い APC や CTL を安定して十分量供給することは、患者の状態にも左右されるなどの理由で、困難である。

そこで、aAPC による養子細胞免疫療法の研究が進められている。これまで、非細胞性の aAPC としてリピッド⁽¹¹⁷⁾、生物分解性ポリマー⁽¹¹⁸⁾や磁気ビーズ⁽¹¹⁹⁾を用いた aAPC が開発された。細胞性の aAPC としては、ショウジョウバエ由来細胞株 (S2 細胞)、マウス由来線維芽細胞株やヒト由来白血病細胞株を利用した aAPC などある^(120, 121, 122)。aAPC は、患者の状態に関わらず、必要なときに十分量の APC を用意できるという利点がある。さらに、細胞性の aAPC は、T 細胞の活性化に不都合な抑制性シグナルを制御できるという利点がある。

これまで、白血病細胞から樹立した樹状細胞株は 3 株報告されている⁽¹²³⁾。当研究室で樹立した PMDC05、GEN2.2⁽¹²⁴⁾、CAL-1⁽¹²⁵⁾である。これら樹状細胞株は、細胞自身が高い抗原提示能を有しているので、細胞自身が APC として応用できるという点において、aAPC とは異なる。

当研究室にて樹立した PMDC05 細胞は、細胞の維持が簡便な細胞である。PMDC 細胞株は、日本人に高頻度で発現している HLA 遺伝子のうち HLA-A*24:02 および HLA-A*02:01 が陽性である。PMDC05 細胞に共刺激分子である CD80 遺伝子を導入して作製した PMDC11 は、PMDC05 より強い抗原提示能を持つ細胞株であることが報告されており、PMDC11 細胞は、必要十分量を安定供給可能であり、質の高い APC とし

て応用できる可能性を持つ細胞株であると考えられている。

抗原提示粒子としてのエクソゾームについても基礎および臨床研究が行われている。ペプチドパルスした DC 培養上清より抽出した dexosome を Marilyn マウスに投与すると抗原特異的ナイーブ CD4⁺T 細胞の活性化を誘導したという報告がある⁽¹²⁶⁾。臨床研究では、転移性悪性黒色腫患者や非小細胞性肺癌患者に対して MAGE3 ペプチドを直接ロードした dexosome や MAGE3 ペプチドをパルスした DC 培養上清より抽出した dexosome を投与する Phase I trial において、dexosome の安全性と有効性に関する検討が行われている^(127, 128)。さらに、進行性大腸がんに対する腹水由来エクソゾームを用いた Phase I trial も行われ、腹水由来エクソゾームの安全性と有効性が示され、エクソゾームを granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)と一緒に投与するとより効果的であることが報告されている⁽¹²⁹⁾。本検討においては、PMDC 細胞が培養上清中にエクソゾームを放出していることを HLA-DR-microbeads 複合体で捕捉した PMDC 細胞培養上清中に放出された粒子が、CD63 や CD54 などのエクソゾームマーカーが陽性であることにより確認した。つまり、PMDC 細胞は、細胞外へのエクソゾーム分泌能を明らかに有すると言える。

エクソゾームは、抗原特異的にナイーブ CD8 陽性 T 細胞を増幅させることができるという報告がある⁽¹³⁰⁾。本検討においても、ペプチドパルス PMDC11 細胞由来エクソゾームで刺激した CD8 陽性 T 細胞より CMVpp65 および WT1 特異的 CTL の誘導が確認された。また、CMVpp65 特異的 CTL 誘導においては、PMDC11 細胞由来エクソゾームの方が PMDC05 細胞由来エクソゾームに比べて、CTL の誘導効率や誘導 CTL の細胞傷害活性が優れていた。これまでの研究で、エクソゾームによる抗原提示の際に、CD54 と CD80 の共発現がエクソゾームの免疫原性を高めるということが明らかにされている⁽¹³⁰⁾。さらに、エクソゾームがナイーブ T 細胞を priming するには、CD54 と MHC クラス II 分子が必要であることがノックアウトマウスを用いた検討で示されている⁽¹³¹⁾。PMDC11 由来エクソゾームは、HLA-DR、CD54 および CD80 が共に陽性であり、さらに共刺激分子である CD86 も陽性であることから、十分な免疫原性を有しうるエクソゾームであり、それゆえ PMDC05 由来エクソゾームに比して高い CTL 誘導能と誘導 CTL の優れた細胞傷害活性が確認されたものと考えられる。

CTL を利用した養子細胞免疫療法は、Epstein Barr virus (EBV) 関連腫瘍や転移性 melanoma の治療で良い成績を収めている。さらに、stage III/IV melanoma 患者に対する臨床研究において、エクソゾームの輸注は毒性がないことが報告されている⁽¹³²⁾。それゆえ、PMDC11 細胞を用いた本検討により、PMDC11 細胞が単に養子細胞免疫療法のための APC として応用できるだけでなく、エクソゾームを用いた無細胞製剤によるワクチンの開発にも有用であると考えられた。

5 図と図の説明

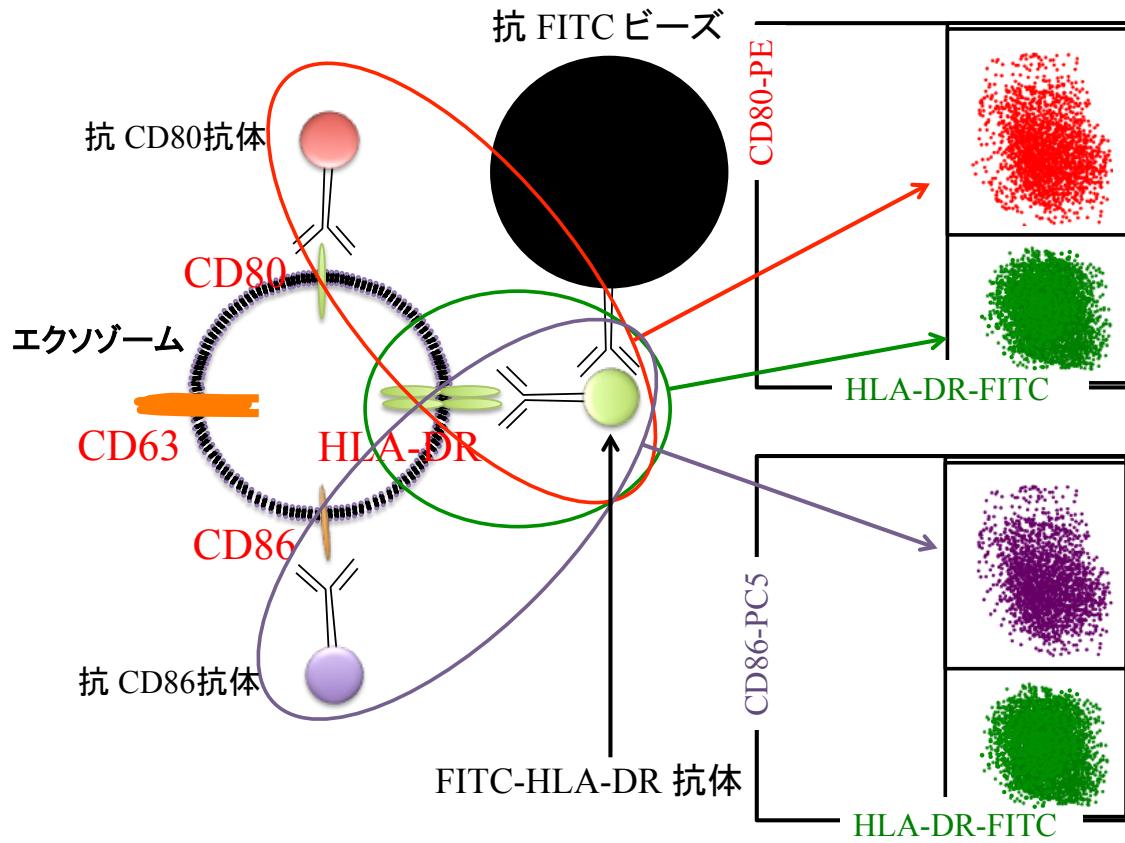


図 1 マイクロビーズを用いたエクソゾームの同定法

抗体-マイクロビーズ複合体と ExoQuick-TC™により培養上清より抽出した膜小胞を混合して、抗体-マイクロビーズ-膜小胞複合体を形成させる。そして、抗体-マイクロビーズ-膜小胞複合体と PE 標識した各種抗体を反応させることでエクソゾームを同定した。

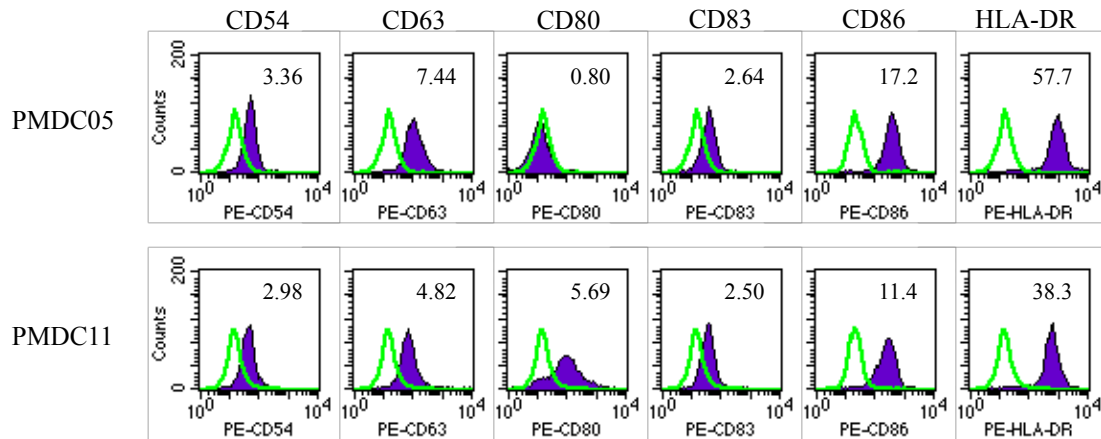


図 2. CMVpp65 ペプチドパルスした PMDC 細胞の表面抗原解析

PMDC 細胞は、CD86、HLA-DR、さらに、CD54 とテトラスパンファミリーの CD63、
 が陽性であった。さらに PMDC11 においては CD80 が陽性であった。数字は、平均蛍
 光強度を表す。

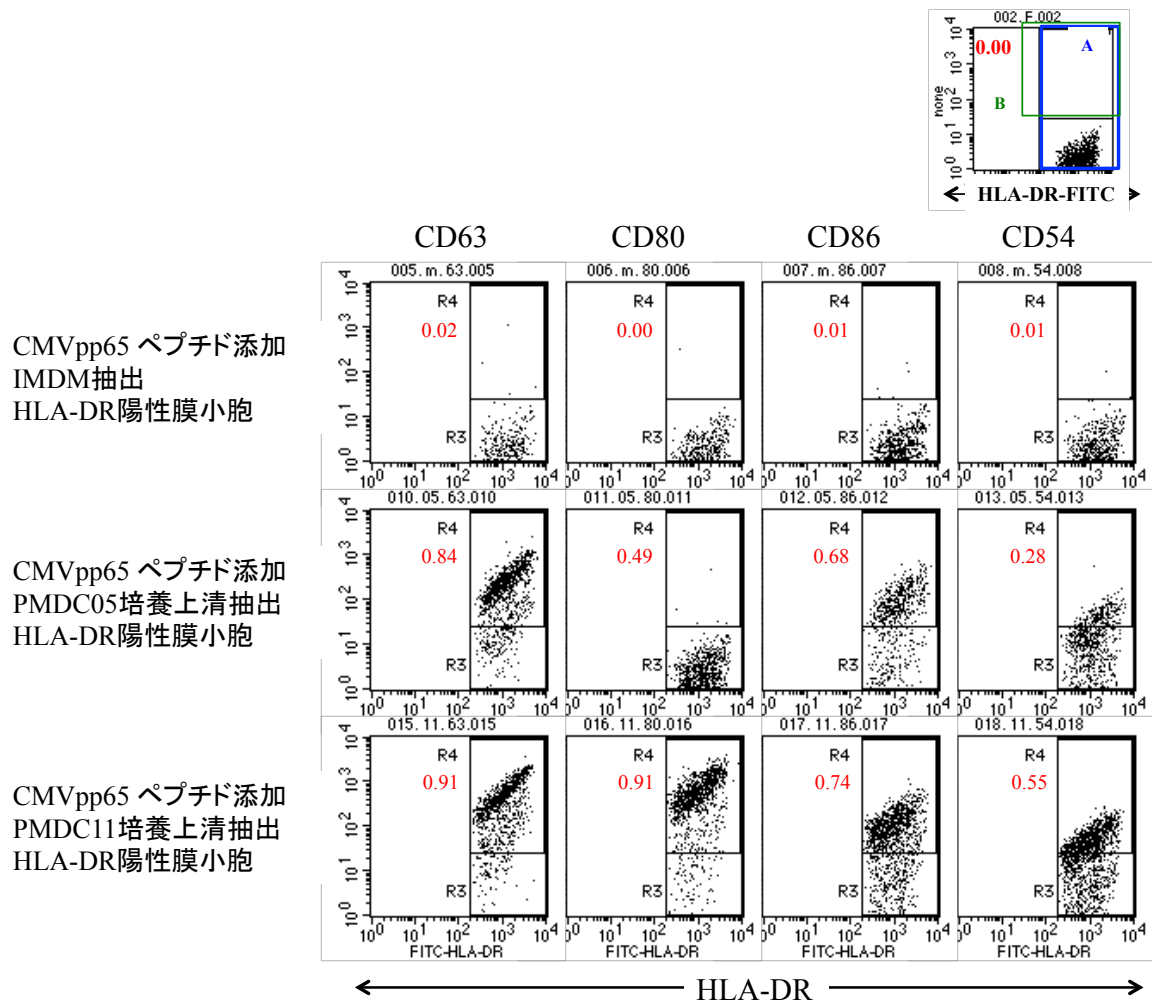


図 3. ExoQuick-TC により抽出したエクソソームのフローサイトメトリーによる同定と性状解析

図中の数字は、HLA-DR 陽性ビーズ(A)中のそれぞれの抗体の陽性率(B)である(B/A)。各モノクローナル抗体および磁気ビーズで反応させた HLA-DR 陽性膜小胞のフローサイトメトリー解析を示す。PMDC05 および PMDC11 由来 HLA-DR 陽性膜小胞は、エクソゾームマーカーの CD63 が陽性であったことから、この HLA-DR 陽性膜小胞が PMDC05 または PMDC11 細胞由来エクソゾームであることが確認された。

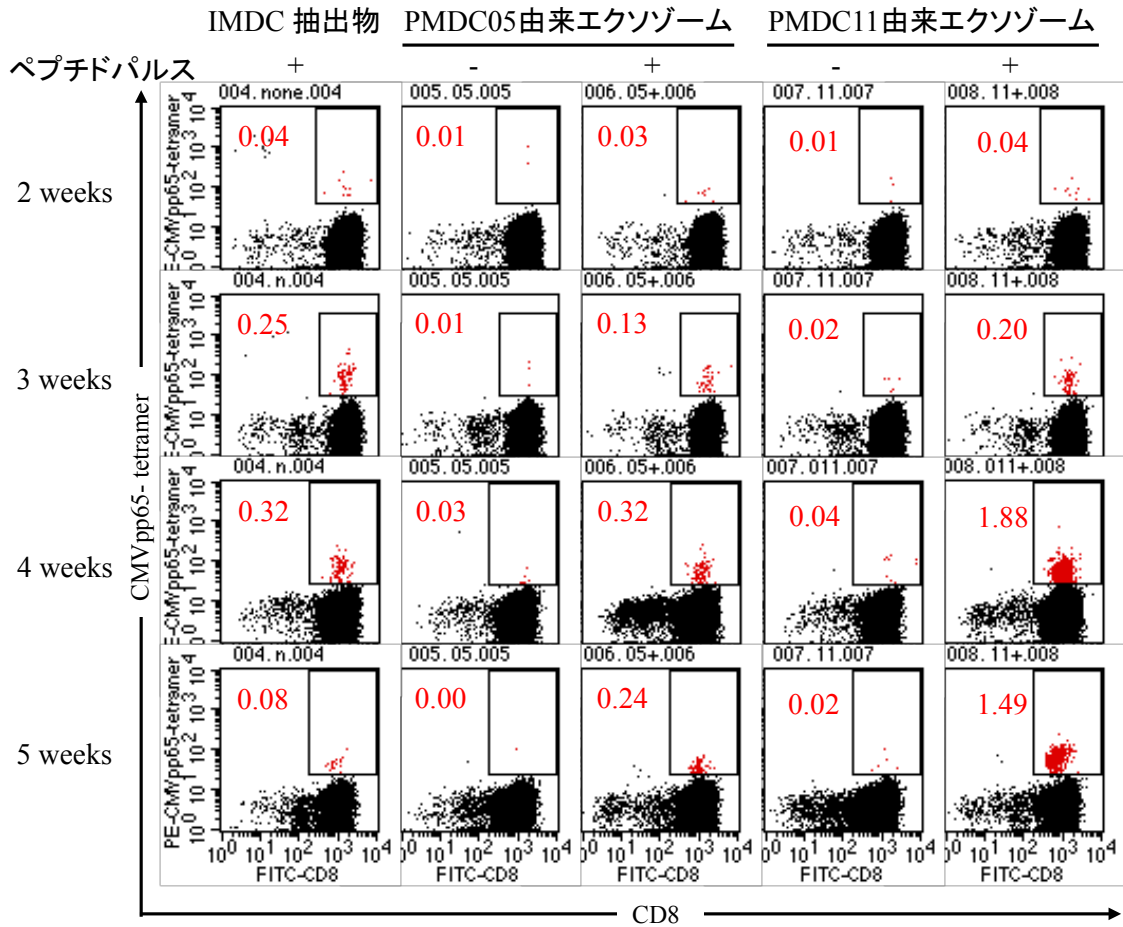
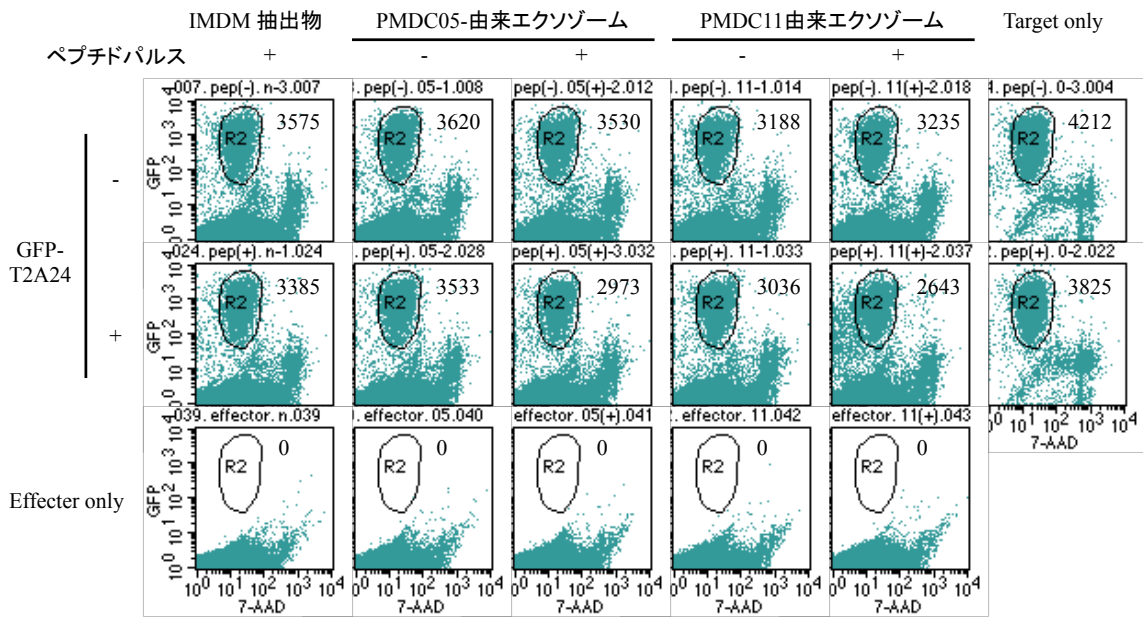


図 4 PMDC 細胞由来エクソゾーム刺激培養法による CMVpp65 特異的 CTL 誘導
 フローサイトメトリーのドットプロット解析。四角のゲート内の細胞が CMVpp65 テ
 トラマー陽性細胞であり、数字は培養細胞中の割合を表している。CMVpp65 ペプチド
 パルス PMDC11 由来エクソゾームで刺激した CD8 陽性 T 細胞からは、CMVpp65 特異
 的 CTL が誘導された。PMDC05 由来エクソゾームを用いたときは CMVpp65 特異的 CTL
 が誘導されなかった。

(a)



Effector : Target = 10:1

図 5. PMDC 細胞由来エクソゾーム刺激により刺激した CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む培養 CD8 陽性をエフェクター細胞として行った細胞傷害性試験

(a) 細胞傷害性試験のドットプロット解析例(E:T=10:1)

ペプチドパルスした PMDC11 由来エクソゾーム刺激により誘導された CMVpp65 特異的 CTL を含む細胞に有意な抗原特異的な細胞傷害性が見られた(* $p < 0.05$)。

(b) トリプレケートで行った細胞傷害性試験のグラフ(平均 \pm SEM) ペプチドパルスした PMDC11 由来エクソゾーム刺激により誘導された CMVpp65 特異的 CTL を含む細胞に有意な抗原特異的な細胞傷害性が見られた(* $p < 0.05$)。

(b)

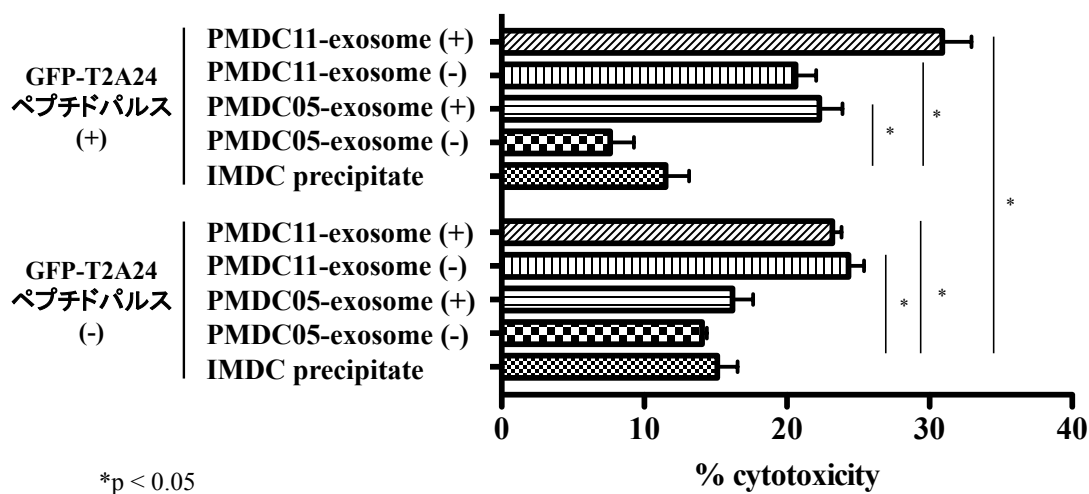


図 5. PMDC 細胞由来エクソゾーム刺激により刺激した CMVpp65 tetramer 陽性細胞を含む培養 CD8 陽性をエフェクター細胞として行った細胞傷害性試験

(b) トリプレケートで行った細胞傷害性試験のグラフ(平均±SEM) ペプチドパルスした PMDC11 由来エクソゾーム刺激により誘導された CMVpp65 特異的 CTL を含む細胞に有意な抗原特異的な細胞傷害性が見られた(*p<0.05)。

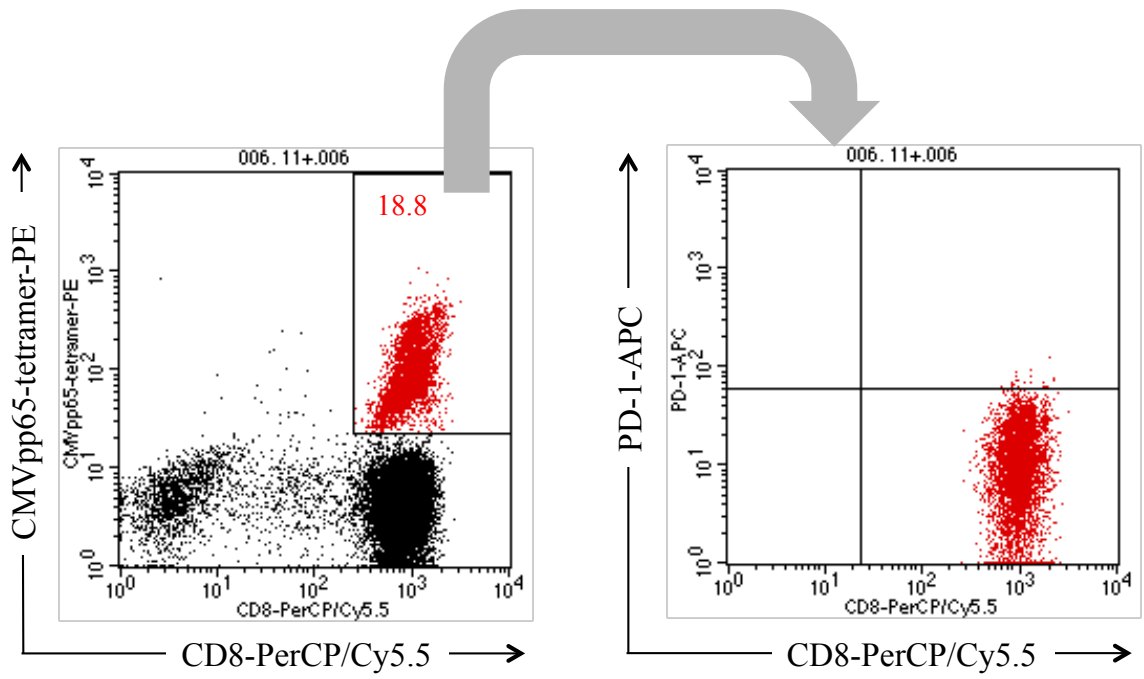


図 6. PMDC11 由来エクソゾーム刺激培養法により誘導した CMVpp65 特異的 CTL のバイアビリティの検討

CMVpp65 特異的 CTL は PD-1 陰性であり、そのバイアビリティは保たれていた。

PMDC11由来エクソゾーム

WT1ペプチドパルス

-

+

1週間目

2週間目

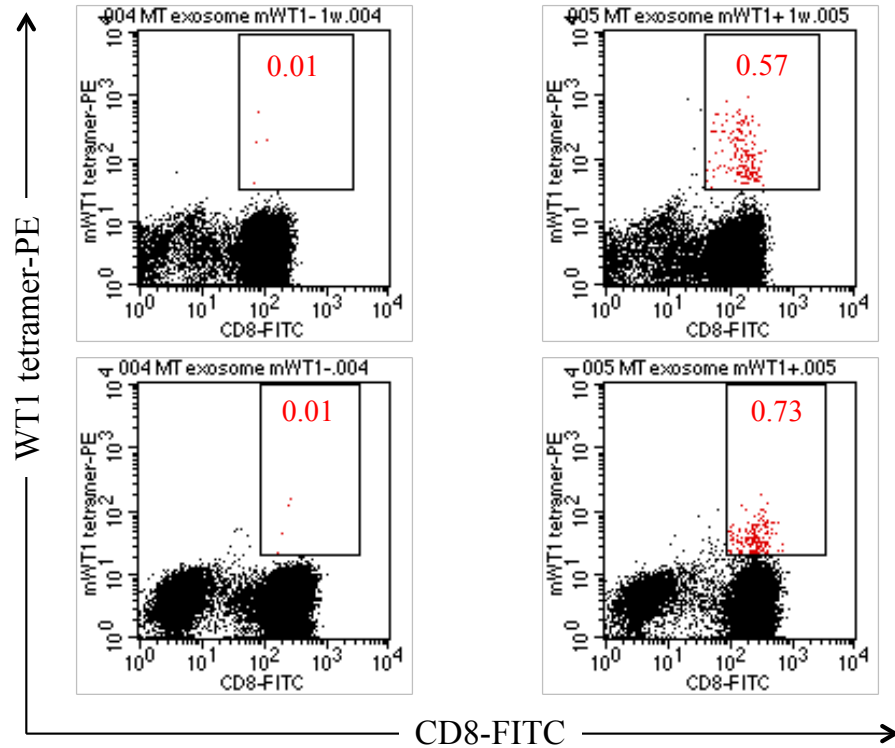


図 7. PMDC11 由来エクソゾーム刺激培養法による WT1 特異的 CTL 誘導

フローサイトメトリーのドットプロット解析。四角のゲート内の細胞が WT1 テトラマー陽性細胞であり、数字は培養細胞中の割合を表している。

第 6 章 参考文献

1. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. 1970;13:1-27. Epub 1970/01/01.
2. Cohen S, Cohen MC. Mechanisms of tumor immunity. An overview. *The American journal of pathology*. 1978;93(2):449-58. Epub 1978/11/01.
3. 矢田純一. 医系免疫学. 改訂 13 版 ed: 中外医学社; 2013. 779-809 p.
4. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology*. 2003;195(3):346-55. Epub 2003/04/22.
5. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Advances in immunology*. 2006;90:51-81. Epub 2006/05/30.
6. Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Current opinion in immunology*. 2006;18(2):220-5. Epub 2006/02/08.
7. Cang S, Mukhi N, Wang K, et al. Novel CD20 monoclonal antibodies for lymphoma therapy. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:64. Epub 2012/10/13.
8. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2335-42. Epub 2004/06/04.
9. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(14):1408-17. Epub 2009/04/03.
10. Hochhaus A, Druker B, Sawyers C, et al. Favorable long-term follow-up results over 6 years for response, survival, and safety with imatinib mesylate therapy in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha treatment. *Blood*. 2008;111(3):1039-43. Epub 2007/10/13.
11. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia*. 2008;22(6):1200-6. Epub 2008/04/11.
12. Shah NP, Tran C, Lee FY, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science (New York, NY)*. 2004;305(5682):399-401. Epub 2004/07/17.
13. Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, et al. Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009;23(8):1398-405. Epub 2009/03/20.

14. Lee SJ, Jung CW, Kim DY, et al. Retrospective multicenter study on the development of peripheral lymphocytosis following second-line dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *American journal of hematology*. 2011;86(4):346-50. Epub 2011/03/29.
15. Yamahira A, Narita M, Nakamura T, et al. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leukemia research*. 2011;35(6):793-9. Epub 2011/01/11.
16. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological reviews*. 2006;211:214-24. Epub 2006/07/11.
17. Sallusto F, Lenig D, Forster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-12. Epub 1999/10/28.
18. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology*. 2003;4(3):225-34. Epub 2003/02/04.
19. 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. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 2011;28(1):219-30. Epub 2010/01/29.
20. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52. Epub 1998/04/01.
21. Narita M, Watanabe N, Yamahira A, 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 naive T cells. *Leukemia research*. 2009;33(9):1224-32. Epub 2009/05/16.
22. Yamahira A, Narita M, Ishii K, et al. Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMD05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. *Leukemia research*. 2012;36(12):1541-6. Epub 2012/10/09.
23. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*. 1998;4(5):594-600. Epub 1998/05/19.
24. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1038-42. Epub 2001/04/05.

25. Copelan EA, McGuire EA. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 1995;85(5):1151-68. Epub 1995/03/01.
26. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;342(14):998-1006. Epub 2000/04/06.
27. Lamontanara AJ, Gencer EB, Kuzyk O, et al. Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1834(7):1449-59. Epub 2013/01/02.
28. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37. Epub 2006/03/09.
29. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer research*. 2005;65(11):4500-5. Epub 2005/06/03.
30. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(27):6658-61. Epub 2004/12/24.
31. Sokol L, Loughran TP, Jr. Large granular lymphocyte leukemia. *The oncologist*. 2006;11(3):263-73. Epub 2006/03/22.
32. Kreutzman A, Juvonen V, Kairisto V, et al. Mono/oligoclonal T and NK cells are common in chronic myeloid leukemia patients at diagnosis and expand during dasatinib therapy. *Blood*. 2010;116(5):772-82. Epub 2010/04/24.
33. Tanaka H, Nakashima S, Usuda M. Rapid and sustained increase of large granular lymphocytes and rare cytomegalovirus reactivation during dasatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients. *International journal of hematology*. 2012;96(3):308-19. Epub 2012/07/07.
34. Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, et al. Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009;94(1):135-9. Epub 2008/12/11.
35. Watanabe N, Narita M, Yokoyama A, et al. Type I IFN-mediated enhancement of anti-leukemic cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells

- by stimulation with zoledronate. *Cytotherapy*. 2006;8(2):118-29. Epub 2006/05/16.
36. Beckner SK, Maluish AE, Longo DL. Lymphokine-activated killer cells: culture conditions for the generation of maximal in vitro cytotoxicity in cells from normal donors. *Cancer research*. 1987;47(20):5504-8. Epub 1987/10/15.
 37. Montero JC, Seoane S, Ocana A, et al. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(17):5546-52. Epub 2011/06/15.
 38. Blake S, Hughes TP, Mayrhofer G, et al. The Src/ABL kinase inhibitor dasatinib (BMS-354825) inhibits function of normal human T-lymphocytes in vitro. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;127(3):330-9. Epub 2008/04/09.
 39. Schade AE, Schieven GL, Townsend R, et al. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood*. 2008;111(3):1366-77. Epub 2007/10/27.
 40. Weichsel R, Dix C, Wooldridge L, et al. Profound inhibition of antigen-specific T-cell effector functions by dasatinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(8):2484-91. Epub 2008/04/17.
 41. Fei F, Yu Y, Schmitt A, et al. Dasatinib exerts an immunosuppressive effect on CD8+ T cells specific for viral and leukemia antigens. *Experimental hematology*. 2008;36(10):1297-308. Epub 2008/07/16.
 42. Salih J, Hilpert J, Placke T, et al. The BCR/ABL-inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib differentially affect NK cell reactivity. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(9):2119-28. Epub 2010/02/10.
 43. Blake SJ, Bruce Lyons A, Fraser CK, et al. Dasatinib suppresses in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 2008;111(8):4415-6. Epub 2008/04/10.
 44. Boissel N, Rea D, Tieng V, et al. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(8):5108-16. Epub 2006/04/06.
 45. Kuroda I, Inukai T, Zhang X, et al. BCR-ABL regulates death receptor expression for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Oncogene*. 2013;32(13):1670-81. Epub 2012/06/06.
 46. Hassold N, Seystahl K, Kempf K, et al. Enhancement of natural killer cell effector functions against selected lymphoma and leukemia cell lines by dasatinib. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;131(6):E916-27. Epub 2012/03/16.

47. Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, et al. Dasatinib enhances the expansion of CD56+CD3- NK cells from cord blood. *Blood*. 2012;119(25):6175-6. Epub 2012/06/26.
48. Ho WY, Blattman JN, Dossett ML, et al. Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer cell*. 2003;3(5):431-7. Epub 2003/06/05.
49. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(9):666-75. Epub 2003/09/03.
50. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annual review of immunology*. 1995;13:545-86. Epub 1995/01/01.
51. Takata H, Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(7):4330-40. Epub 2006/09/20.
52. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(9):1407-18. Epub 1997/11/14.
53. Unsoeld H, Krautwald S, Voehringer D, et al. Cutting edge: CCR7+ and CCR7- memory T cells do not differ in immediate effector cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(2):638-41. Epub 2002/07/05.
54. 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. *International journal of medical sciences*. 2010;7(2):72-81. Epub 2010/04/30.
55. 中村岳史 成, 渡辺紀宏, 山平晶恵, 齊藤杏里, 杼木 希, 梶 昌美, 高橋益廣. 白血病性形質細胞様樹状細胞株(PMDC05)を用いた抗原特異的 CTL の誘導. *新潟大学医学部保健学科紀要*. 2010;9(3). Epub 71.
56. 岩瀨 南 成, 大岩恵理, 山平晶恵, 佐藤直哉, 内山孝由, 橋本誠雄, Bonehill A, Faure E, Bogan B, Kasahara N, 高橋益廣. レンチウイルスベクターを用いた caTLR4 遺伝子導入白血病性形質細胞様樹状細胞株(PMDC11)における抗原特異的 CTL 誘導能の増強. *新潟大学医学部保健学科紀要*. 2013;10(3). Epub 37.
57. Takai S, Sabzevari H, Farsaci B, et al. Distinct effects of saracatinib on memory CD8+ T cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(9):4323-33. Epub 2012/03/28.
58. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5594):850-4. Epub 2002/09/21.
59. Lou Y, Wang G, Lizee G, et al. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of

- adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer research*. 2004;64(18):6783-90. Epub 2004/09/18.
60. Palmer DC, Balasubramaniam S, Hanada K, et al. Vaccine-stimulated, adoptively transferred CD8⁺ T cells traffic indiscriminately and ubiquitously while mediating specific tumor destruction. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;173(12):7209-16. Epub 2004/12/09.
 61. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(27):9571-6. Epub 2005/06/28.
 62. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(6):1616-26. Epub 2005/06/03.
 63. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009;460(7251):108-12. Epub 2009/06/23.
 64. Steinman RM, Inaba K, Turley S, et al. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human immunology*. 1999;60(7):562-7. Epub 1999/07/30.
 65. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-8. Epub 2001/08/18.
 66. Salio M, Shepherd D, Dunbar PR, et al. Mature dendritic cells prime functionally superior melan-A-specific CD8⁺ lymphocytes as compared with nonprofessional APC. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;167(3):1188-97. Epub 2001/07/24.
 67. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology*. 2000;1(5):426-32. Epub 2001/03/23.
 68. Sun JC, Lehar SM, Bevan MJ. Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;177(7):4458-63. Epub 2006/09/20.
 69. Haring JS, Jing X, Bollenbacher-Reilly J, et al. Constitutive expression of IL-7 receptor alpha does not support increased expansion or prevent contraction of antigen-specific CD4 or CD8 T cells following *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;180(5):2855-62. Epub

- 2008/02/23.
70. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 2002;109 Suppl:S45-55. Epub 2002/05/02.
 71. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 1988;334(6181):395-402. Epub 1988/08/04.
 72. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology*. 2006;24:419-66. Epub 2006/03/23.
 73. Gellert M. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual review of biochemistry*. 2002;71:101-32. Epub 2002/06/05.
 74. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell*. 2004;116(2):299-311. Epub 2004/01/28.
 75. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, et al. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science (New York, NY)*. 1999;286(5441):958-61. Epub 1999/11/05.
 76. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Current opinion in immunology*. 1996;8(4):478-83. Epub 1996/08/01.
 77. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunology today*. 1996;17(5):217-24. Epub 1996/05/01.
 78. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(38):13885-90. Epub 2004/09/15.
 79. Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, et al. Clinical and immunologic responses to very low-dose vaccination with WT1 peptide (5 microg/body) in a patient with chronic myelomonocytic leukemia. *International journal of hematology*. 2007;85(5):426-9. Epub 2007/06/15.
 80. Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, et al. Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood*. 2001;98(6):1872-81. Epub 2001/09/06.
 81. Valmori D, Dutoit V, Lienard D, et al. Tetramer-guided analysis of TCR beta-chain usage reveals a large repertoire of melan-A-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(1):533-8. Epub 2000/06/22.

82. 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 science*. 2010;101(3):594-600. Epub 2010/02/06.
83. 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 science*. 2012;103(3):408-14. Epub 2011/12/01.
84. Watanabe K, Toji S, Ohtake 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. *Biomedical research (Tokyo, Japan)*. 2013;34(1):41-50. Epub 2013/02/23.
85. Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, et al. Single-cell T-cell receptor-beta analysis of HLA-A*2402-restricted CMV- pp65-specific cytotoxic T-cells in allogeneic hematopoietic SCT. *Bone marrow transplantation*. 2013. Epub 2013/08/13.
86. Akiyama Y, Tai S, Komiyama M, et al. Characterization of cytomegalovirus pp65-HLA-A24 peptide-specific CTL lines from metastatic melanoma patients. *Oncology reports*. 2009;22(1):185-91. Epub 2009/06/11.
87. Six A, Mariotti-Ferrandiz ME, Chacara W, et al. The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis. *Frontiers in immunology*. 2013;4:413. Epub 2013/12/19.
88. Kou ZC, Pühr JS, Rojas M, et al. T-Cell receptor Vbeta repertoire CDR3 length diversity differs within CD45RA and CD45RO T-cell subsets in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000;7(6):953-9. Epub 2000/11/04.
89. Dziubianau M, Hecht J, Kuchenbecker L, et al. TCR repertoire analysis by next generation sequencing allows complex differential diagnosis of T cell-related pathology. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(11):2842-54. Epub 2013/09/12.
90. Montagna D, Turin I, Schiavo R, et al. Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with ex vivo-generated autologous, cytotoxic T lymphocytes in patients with solid tumor. *Cytotherapy*. 2012;14(1):80-90. Epub 2011/09/29.
91. Turtle CJ, Riddell SR. Artificial antigen-presenting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2010;16(4):374-81. Epub 2010/08/10.

92. 成田美和子、高橋益廣. 樹状細胞由来エクソゾームによる抗原提示. 臨床免疫. 2002;37(2):133-7.
93. 高橋益廣、成田美和子. 樹状細胞由来エクソゾームを用いたがん免疫療法. 広田豊、原 宏 編 血液成分治療 医薬ジャーナル社 大坂. 2004(2004年10月25日):199-207.
94. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(8):569-79. Epub 2002/08/03.
95. Blanchard N, Lankar D, Faure F, et al. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;168(7):3235-41. Epub 2002/03/22.
96. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(3):1161-72. Epub 1996/03/01.
97. van Niel G, Heyman M. The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes: perspectives on their structure and function. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;283(2):G251-5. Epub 2002/07/18.
98. Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British journal of cancer*. 2005;92(2):305-11. Epub 2005/01/19.
99. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine*. 2001;7(3):297-303. Epub 2001/03/07.
100. Andre F, Scharz NE, Chaput N, et al. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*. 2002;20 Suppl 4:A28-31. Epub 2002/12/13.
101. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 2002;360(9329):295-305. Epub 2002/07/31.
102. Faure J, Lachenal G, Court M, et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(4):642-8. Epub 2006/02/01.
103. Scita G, Di Fiore PP. The endocytic matrix. *Nature*. 2010;463(7280):464-73. Epub 2010/01/30.
104. Piper RC, Lehner PJ. Endosomal transport via ubiquitination. *Trends in cell biology*. 2011;21(11):647-55. Epub 2011/10/01.
105. Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(3):195-201. Epub 2001/03/27.

106. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003;102(13):4336-44. Epub 2003/07/26.
107. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, NY)*. 2008;319(5867):1244-7. Epub 2008/03/01.
108. Vidal M, Mangeat P, Hoekstra D. Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of cell science*. 1997;110 (Pt 16):1867-77. Epub 1997/08/01.
109. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2008;9(6):871-81. Epub 2008/03/12.
110. Nikolich-Zugich J, Slifka MK, Messaoudi I. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(2):123-32. Epub 2004/03/26.
111. They C, Regnault A, Garin J, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology*. 1999;147(3):599-610. Epub 1999/11/05.
112. Clayton A, Court J, Navabi H, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 2001;247(1-2):163-74. Epub 2001/01/11.
113. They C, Boussac M, Veron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(12):7309-18. Epub 2001/06/08.
114. van Niel G, Raposo G, Candalh C, et al. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. 2001;121(2):337-49. Epub 2001/08/07.
115. Skokos D, Le Panse S, Villa I, et al. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001;166(2):868-76. Epub 2001/01/06.
116. Uchiyama T, Sato N, Narita M, et al. Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells in in vitro study. *Hematological oncology*. 2013;31(3):156-63. Epub 2012/10/31.
117. Zappasodi R, Di Nicola M, Carlo-Stella C, et al. The effect of artificial antigen-presenting cells with preclustered anti-CD28/-CD3/-LFA-1 monoclonal antibodies on the induction of ex vivo expansion of functional human antitumor T cells. *Haematologica*. 2008;93(10):1523-34. Epub 2008/08/30.
118. Steenblock ER, Fadel T, Labowsky M, et al. An artificial antigen-presenting cell with paracrine delivery of IL-2 impacts the magnitude and direction of the T cell response.

- The Journal of biological chemistry. 2011;286(40):34883-92. Epub 2011/08/19.
119. Jackson MR, Song ES, Yang Y, et al. Empty and peptide-containing conformers of class I major histocompatibility complex molecules expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(24):12117-21. Epub 1992/12/15.
 120. Mitchell MS, Darrah D, Yeung D, et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(4):1075-86. Epub 2002/02/15.
 121. Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(2):413-20. Epub 2009/09/24.
 122. Butler MO, Lee JS, Ansen S, et al. Long-lived antitumor CD8+ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(6):1857-67. Epub 2007/03/17.
 123. Drexler HG, Macleod RA. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of plasmacytoid dendritic cell leukemia. *Leukemia research*. 2009;33(9):1166-9. Epub 2009/05/09.
 124. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(1):248-55. Epub 2005/12/21.
 125. Maeda T, Murata K, Fukushima T, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *International journal of hematology*. 2005;81(2):148-54. Epub 2005/03/16.
 126. Thery C, Duban L, Segura E, et al. Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology*. 2002;3(12):1156-62. Epub 2002/11/12.
 127. Escudier B, Dorval T, Chaput N, et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*. 2005;3(1):10. Epub 2005/03/03.
 128. Morse MA, Garst J, Osada T, et al. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*. 2005;3(1):9. Epub 2005/02/23.

129. Dai S, Wei D, Wu Z, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(4):782-90. Epub 2008/03/26.
130. Hwang I, Shen X, Sprent J. Direct stimulation of naive T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: distinct roles for CD54 and B7 molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6670-5. Epub 2003/05/14.
131. Segura E, Nicco C, Lombard B, et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*. 2005;106(1):216-23. Epub 2005/03/26.
132. Chaput N, Scharz NE, Andre F, et al. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2003;532:215-21. Epub 2003/08/12.

謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた高橋益廣教授並びに成田美和子准教授、実験に協力して下さった血液腫瘍検査学研究室の山平晶恵博士、岩渕南さん、大岩恵理さん、西澤幹則さん、岩谷俊平さんおよび卒業研究生の皆様に心より感謝申し上げます。