

白血病性形質細胞様樹状細胞株 (PMDC11) および
PMDC11 由来エクソソームを用いた
抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導

内山 孝由・成田美和子・岩谷 俊平
大岩 恵理・西澤 幹則・高橋 益廣
新潟大学大学院保健学研究科検査技術科学分野

橋本 誠雄
長岡赤十字病院血液内科

瀧澤 淳・曾根 博仁
新潟大学医歯学総合研究科血液・代謝・内分泌内科学

Noriyuki KASAHARA
カリフォルニア大学ロサンゼルス校医学部分子薬理学

**Induction of Antigen Specific Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs)
by Plasmacytoid Leukemic Cell Line (PMDC11)
or PMDC11 - derived Exosomes**

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

*Department of Medical Technology, Graduate School of Health Sciences,
Niigata University*

Shigeo HASHIMOTO

Division of Hematology, Nagaoka Red Cross Hospital

Jun TAKIZAWA and Hirohito SONE

*Department of Hematology, Endocrinology and Metabolism, Faculty of Medicine,
Niigata University*

Reprint requests to: Miwako NARITA
Laboratory of Hematology and Oncology
Graduate School of Health Sciences,
2-746 Asahimachi - dori, Chuou - ku,
Niigata 951 - 8518, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8518 新潟市中央区旭町通 2 - 746
新潟大学保健学研究科血液腫瘍検査学研究室
成田美和子

Noriyuki KASAHARA

Department of Molecular & Medical Pharmacology,
University of California, Los Angeles

要 旨

私たちは白血病性形質細胞様樹状細胞株 (PMDC05) を樹立し、この細胞株が抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導能を有することを報告してきた。さらに、CD80 遺伝子を導入した PMDC05 である PMDC11 の抗原提示能がさらに増強することも報告した。エクソソームは、多くの細胞により分泌される 30 ~ 100 nm の大きさの小粒子であり、抗原提示細胞 (APC) 由来エクソソームは主要組織適合抗原 (MHC) や抗原提示関連分子などを多く含んでいることが知られており、単球由来樹状細胞 (moDC) の分泌するエクソソーム (dexosome) が抗原提示能を有することが示され、これを用いた臨床研究も行われている。本研究では、PMDC11 細胞由来エクソソームを同定するとともに、PMDC11 細胞とそのエクソソームによる CTL 誘導について検討した。抗原ペプチドをパルスした PMDC11 細胞または moDC の培養上清から ExoQuick-TC を用いてエクソソームを抽出した。この抽出物がエクソソームであることを、磁気ビーズとフローサイトメトリーを用いて確認した。磁気ビーズで捕捉した抽出物は、HLA-DR, CD54, CD86, CD80, CD123 陽性であり、さらにエクソソームマーカーである CD63 (LAMP3) が陽性であることから、PMDC11 細胞はエクソソーム (PMDC11-dex) を放出することが確認された。次に、サイトメガロウイルス (CMV) pp65 ペプチドまたは改変型ウィルムス腫瘍遺伝子 (mWT1) ペプチドをパルスした PMDC11 細胞を用いて HLA-A* 24:02 健康人末梢血 CD8⁺T 細胞を刺激培養し、抗原特異的 CTL 誘導についてテトラマー解析を行った。PMDC11 細胞刺激培養において、抗原特異的 CTL の増幅が確認された。CMV pp65 ペプチドまたは mWT1 ペプチドをパルスした PMDC11 細胞培養上清より抽出した PMDC11-dex による刺激培養では、PMDC11-dex 添加培養系において抗原特異的 CTL の増幅が確認された。これらの結果より PMDC 細胞株はエクソソーム分泌能あり、PMDC11-dex は抗原特異的 CTL 誘導能を有することが示唆された。PMDC11 細胞は、細胞自体が CTL 養子免疫療法に応用できるのみならず、エクソソームを用いた無細胞系ワクチンの開発にも有用であると思われる。

キーワード：白血病性形質細胞様樹状細胞株, PMDC11, エクソソーム, サイトメガロウイルス, WT1, 細胞傷害性 T 細胞, テトラマー解析

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¹⁾。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²⁾。

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、養子免疫療法の発展の障害となっている。近年、養子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 誘導法による養子免疫療法の研究・開発が進められている³⁾⁴⁾。

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⁵⁾と CTL

誘導能を有しているため、養子免疫療法へ応用可能な APC となりうると思われる⁶⁾。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⁾。

エクソソームは、後期エンドソーム由来の直径 30 ~ 100 nm の大きさで、ショ糖密度勾配法によるとその密度は 1.13 g/ml から 1.19 g/ml の小胞である^{8) - 10)}。エクソソームは、B 細胞・DC・脂肪細胞・T 細胞・血小板などの造血系細胞^{11) - 13)}、小腸上皮に代表される上皮細胞^{14) - 18)}、アストロサイトやニューロン¹⁹⁾ など多様な細胞から分泌される。B 細胞や DC に代表される APC 由来エクソソームは、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 などの共刺激分子を豊富に含むことから、APC 由来エクソソ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 細胞由来エクソソームが 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 由来エクソソーム (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、PMDC11 細胞由来エクソソーム (PMDC11-dex) を同定すると共に PMDC11 細胞および PMDC11-dex 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。

材料と方法

1. 細胞培養

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、100U/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. 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²⁰⁾。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。

3. 単球由来樹状細胞の誘導

単球由来樹状細胞 (moDC) の誘導は、以前に報告された方法を改変して行った^{21) - 23)}。すなわち、PBMC を 3 時間培養して、浮遊細胞を除去した。付着細胞を 50 ng/ml granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF: Kirin Brewery, Maebashi, Japan) と 10 ng/ml IL-4 (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, USA) を加えた 10 % FBS 加 RPMI1640 培地 (Life technologies corporation) で 6 日間培養し、未熟樹状細胞を得た。そこにサイトメガロウイルス pp65 ペプチド (終濃度 10 μg/ml: CMVpp65, QYDPVAALF, フナコシ, 東京) とリポポリサッカライド (LPS, 終濃度 0.5 μg/ml: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加え、37 °C・5 % CO₂ において 24 時間培養し、成熟樹状細胞を得た。培養上清からエクソソームを抽出し、エクソソームの同定を行った。

4. エクソソームの抽出

1 × 10⁶/ml に調整した PMDC11 細胞の培養液に CMVpp65 ペプチド (終濃度 10 μg/ml: フナコシ) 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い、培養上清を得た。さらに 2 回の 2,000 × g・4 °C・10 分間の遠心を行うことにより培養上清から細胞片を取り除き、この上清 (1 ml) よりエクソソームを抽出した。エクソソームの抽出には、ExoQuick-TC™ Exosome Isolation Reagent (System Biosciences, Mountain View, CA, USA) を使い、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 培地よりエクソソームを抽出した。

moDC 培養上清からのエクソソーム抽出も同

様にエクソソーム抽出キットを用いて行った。

5. PMDC11細胞の表面形質の解析

エクソソーム抽出の際、培養上清を取り除いた後の細胞を用いて行った。細胞にFc γ R (Fc γ R) 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, CD9, CD54, CD80, CD123, 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 $^{\circ}$ C、20分間反応させた。その後PBSで1回洗浄し、フローサイトメトリー (FACS Calibur: BD Biosciences) を用いて細胞の抗原提示関連分子の発現を検出した。データをCellQuest Pro software (BD Biosciences) を用いて解析した。

6. エクソソームの同定

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Fc γ R ブロッキング試薬中でよく混和し、4 $^{\circ}$ Cにおいて1時間反応させた。その後、20 μ g/ml ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて2回洗浄し、抗体-マイクロビーズ複合体を抽出エクソソームとFc γ R ブロッキング試薬中で混和し、4 $^{\circ}$ Cで24時間反応させた。2回洗浄後、抗体-マイクロビーズ-エクソソーム複合体をPE 標識 CD9, CD54, CD63 または CD80 (BD Biosciences) およびPE/Cy5 標識 CD86 (Biolegend) または CD123 (BD Biosciences) で染色し、2度洗浄後、フローサイトメトリー解析を行った。

7. CD8 $^{+}$ T細胞の純化

CD8 $^{+}$ 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にFITC 標識抗 CD8 抗体 (FITC-CD8, BD Biosciences) を反応させ、十分洗浄した。その後、抗 FITC マイク

ロビーズと反応させ、さらに十分な洗浄を行った。抗体およびマイクロビーズに反応させたPBMCをMACS磁気細胞分離カラム (Miltenyi Biotec) を通すことで、CD8 $^{+}$ T細胞を純化した。純化した細胞は95%以上がCD8 $^{+}$ であった。

8. PMDC 刺激培養法

純化CD8 $^{+}$ T細胞は5%自己血清(AS)加RPMI1640培地に再浮遊した。PMDC11細胞は 1×10^6 cells/mlに調整し、改変型WT1ペプチド(終濃度10 μ g/ml: mWT1, CYTWNQMNL, NeoMPS, San Diego, CA) またはCMVpp65(終濃度5 μ g/ml)ペプチドを加えて、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。その後、RPMI1640培地で3回洗浄し、5%AS加RPMI1640培地に浮遊した。そして、再浮遊したPMDC11細胞を30 Gyの γ 線照射し、APCとした。

純化CD8 $^{+}$ 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。培養開始3日目にinterleukin-2(IL-2, 終濃度50 U/ml: シオノギ製薬, 大坂), interleukin-7(IL-7, 終濃度10 ng/ml: R&D Systems, Minneapolis, MN)を加え、以後2-3日毎に半分の培地を新しいCTL培地に交換した。CTL培地の組成は、IL-2(終濃度50 U/ml), IL-7(終濃度10 ng/ml), 5%AS加RPMI1640培地である。培養2週間目よりmWT1またはCMVpp65テトラマー陽性細胞の増幅についてフローサイトメトリー解析を行った。また、APCによる再刺激は毎週行った。PMDC11細胞で刺激する際の浮遊は、2回目の刺激以降CTL培地を用いた。

9. エクソソーム刺激培養法

PMDC11-dexは、CMVpp65ペプチドパルス(終濃度10 μ g/ml)またはmWT1ペプチドパルス(終濃度10 μ g/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 $^{+}$ T細胞(5×10^5 cells/well)を96-ウェル丸底プレートに播種し、さらにPMDC11-dex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 U/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 CTL 培地に交換した. 培養 1 または 2 週間目より mWT1 または CMVpp65 テトラマー陽性細胞の増幅についてフローサイトメトリー解析を行った. また, PMDC11-dex による再刺激は毎週行った. PMDC11-dex は, 2 回目の刺激より CTL 培地に再懸濁して用いた.

10. テトラマー解析

増幅した CTL のフローサイトメトリーによる確認は, 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 (Biolegend), PE 標識抗体: IgG1, CD8 (BD Biosciences), mWT1 テトラマー (HLA-A* 24:02 WT1 (mutant) tetramer-CYTWNQMNL-PE, 医学生物学研究所, 長野), CMVpp65 テトラマー (HLA-A* 24:02 CMVpp

65-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. 培養細胞を回収後, 細胞に Fc γ レセプターブロッカー試薬と各染色抗体を加え, 4 $^{\circ}$ C, 20 分間染色した. 染色後, PBS で 1 回洗浄し, FACS Calibur (BD Biosciences) で測定し, CellQuest Pro software (BD Biosciences) で解析した.

結 果

1. PMDC11 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, エクソソ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フローサイトメトリーで解析した (図 1). 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 と IL-3 受容体である CD123 を発現

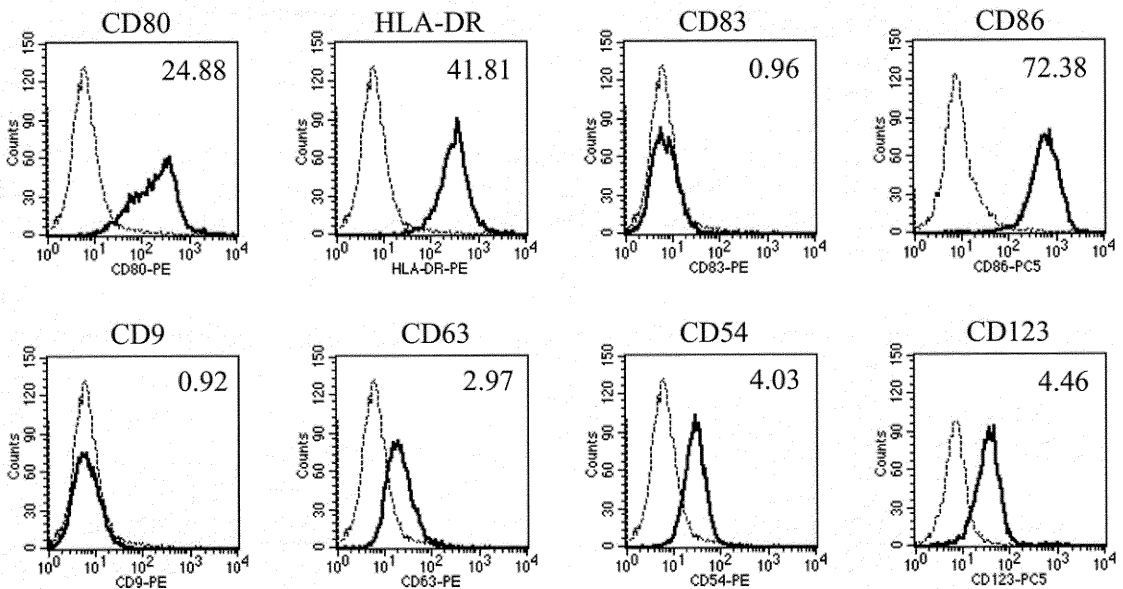


図 1 CMVpp65 ペプチドパルスした PMDC11 細胞の表面抗原解析

PMDC11 細胞は, CD80, CD86, HLA-DR, さらに, CD54 とテトラスパニンファミリーの CD63, IL-3 受容体の CD123 が陽性であった. 実線は, 各モノクローナル抗体で染色した細胞を解析したヒストグラムであり, 破線はアイソタイプコントロールである. 数字は, 平均蛍光強度を表す.

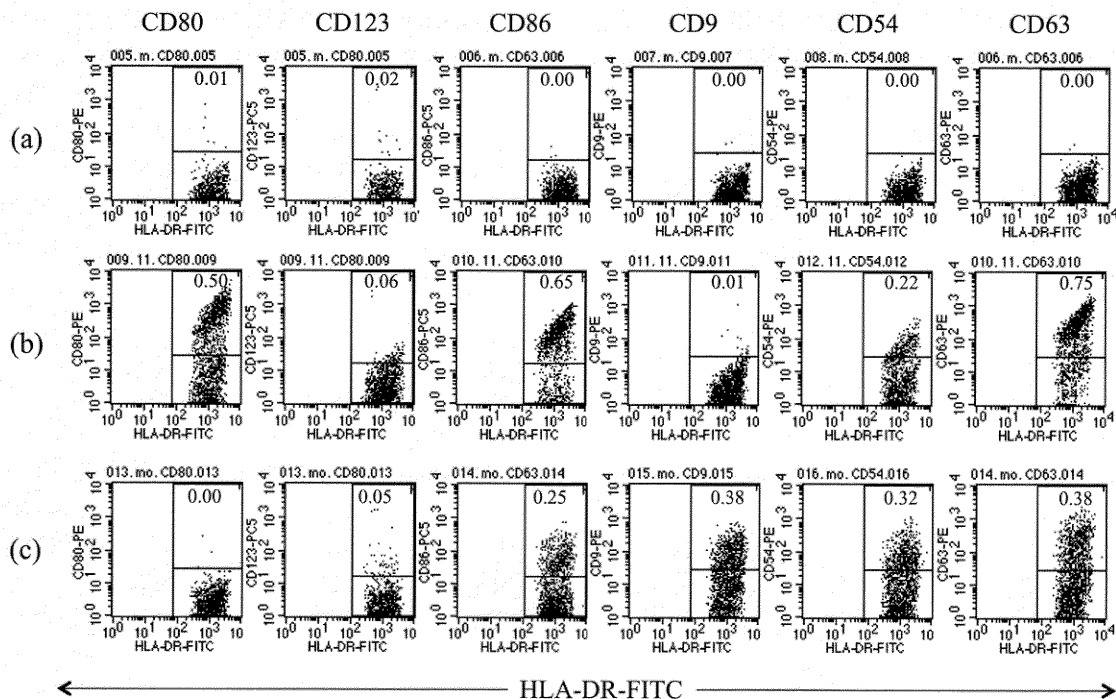


図2 ExoQuick-TCにより抽出したエクソソームの
フローサイトメトリーによる同定と性状解析

図中の数字は、HLA-DR陽性ビーズ中のそれぞれの抗体の陽性率である。

(a) IMDM 培地のみからエクソソーム抽出と同様な方法で抽出したコントロール

(b) PMDC11 細胞培養上清抽出物

(c) moDC 培養上清抽出物

(a), (b), (c) と各モノクローナル抗体および磁気ビーズで反応させたエクソソームのフローサイトメトリー解析を示す。PMDC11 および moDC 抽出物は、エクソソームマーカーの CD63 が陽性であったことから、この HLA-DR 陽性粒子が PMDC11-dex または moDC-dex であることが確認された。

していた。本検討では、エクソソームのマーカーとして知られるテトラスパニンファミリーの CD9 と CD63 についても検討した。PMDC11 細胞は、CD63 は陽性であった。

2. moDC-dex と PMDC11-dex の同定

次に moDC と PMDC11 細胞培養上清よりエクソソーム抽出キットを用いて抽出した抽出産物が moDC または PMDC11 細胞由来エクソソーム (以下それぞれ、moDC-dex または PMDC11-dex) 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産物を捕らえ、

さらに別の抗体 (CD9, CD54, CD63, CD80, CD86, CD123) 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、エクソソームであることを同定した (図2)。

培養液に含まれる FBS にもエクソソ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を本法によって捕捉を試みた (図2a)。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ソームの捕捉は認められなかった。つまり、moDC-dex や PMDC11-dex の同定においては、FBS 由来エクソソームは無視できると考えられた。そこで PMDC11-

dex と moDC-dex を本法で同定した (図 2b, c). dex マーカーとしては, CD9, CD54, CD63 などがあ
る¹²⁾²⁴⁾²⁵⁾. PMDC11 細胞の培養上清抽出物は, dex 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 PMDC11 細胞の培養上清抽出物より捕捉した粒子は, PMDC11-dex であることが確認された (図 2b). さらに, moDC の培養上清抽出物においてもエクソソームマーカーである CD9, CD54 と CD63 が陽性であったことから, 本法において捕捉した粒

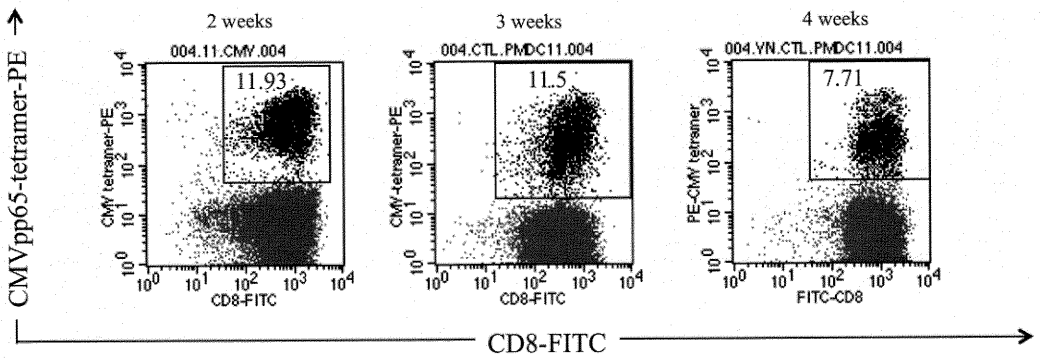
子も moDC-dex であることが同定された (図 2c).

3. PMDC11 細胞刺激培養法による CTL 誘導

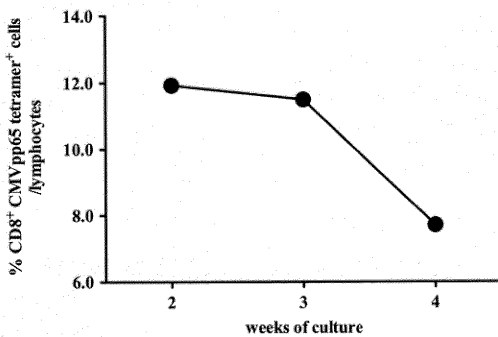
これまでの PMDC11 に関する検討において, PMDC11 は, 親株である PMDC05 より抗原提示能が増強することは確認されている⁷⁾. しかし, 抗原特異的 CTL の誘導は検討されていなかった
ので, PMDC11 細胞による抗原特異的 CTL の誘導能を検討した (図 3, 4).

まず, サイトメガロウイルスの構造タンパク質

(a)



(b)



(c)

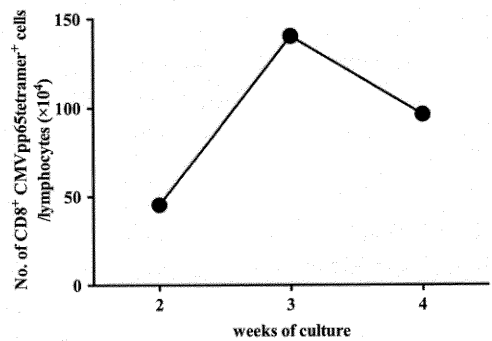
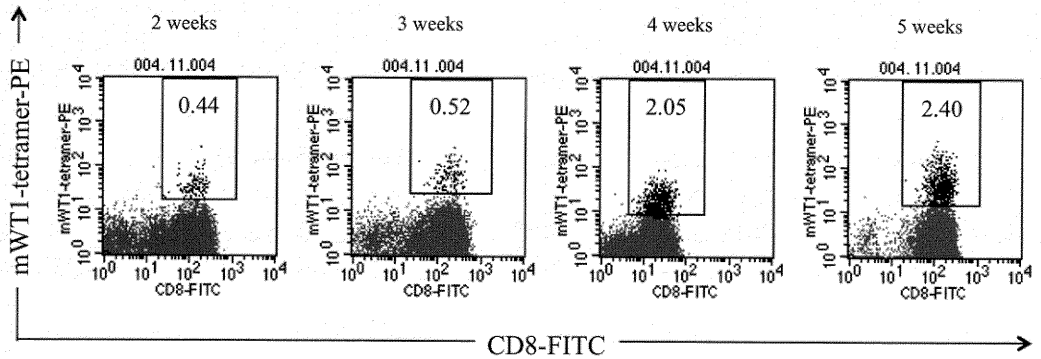


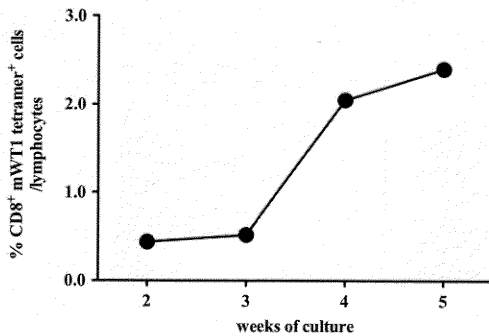
図3 PMDC11 細胞刺激培養法による CMVpp65 特異的 CTL の誘導

- (a) CMVpp65 テトラマー陽性細胞のフローサイトメトリー解析. 四角のゲート内の細胞が誘導された CMVpp65 テトラマー陽性細胞であり, 数字は培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の割合を表している.
- (b) 培養期間中の培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の割合の変化
- (c) 培養期間中の培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の実数の変化
- PMDC11 細胞刺激培養法により CMVpp65 特異的 CTL が誘導された.

(a)



(b)



(c)

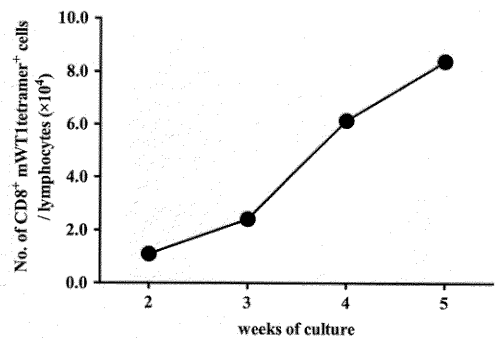


図4 PMDC11細胞刺激培養法によるmWT1特異的CTLの誘導

- (a) mWT1テトラマー陽性細胞のフローサイトメトリー解析. 四角のゲート内の細胞が誘導されたmWT1テトラマー陽性細胞であり, 数字は培養細胞中のmWT1テトラマー陽性細胞の割合を表している.
- (b) 培養期間中の培養細胞中のmWT1テトラマー陽性細胞の割合の変化
- (c) 培養期間中の培養細胞中のmWT1テトラマー陽性細胞の実数の変化
培養期間に応じて, 培養細胞中のmWT1テトラマー陽性細胞の割合と実数が増加していた.

であるCMVpp65特異的CTLの誘導を試みた(図3). 培養開始2から4週目にかけて, CMVpp65テトラマー陽性細胞が確認された(図3a). さらに, 培養細胞中のCMVpp65テトラマー陽性細胞の割合および実数共に増加していた(図3b, c).

次に, 多くの腫瘍で発現しているウィルス腫瘍遺伝子(WT1)特異的CTLを誘導した(図4). mWT1特異的CTLが2週目よりフローサイトメトリー解析で確認することができた(図4a). その割合および実数は, 2から5週目にかけて増加

していた(図4b, c).

この検討結果より, PMDC11細胞は, 抗原ペプチドをパルスすることで, ウィルス抗原だけでなく, 腫瘍関連抗原に対しても抗原特異的なCTLを数週間に渡って確実に誘導可能であることがわかった.

4. PMDC11-dex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ソームは, MHCクラスIやクラスIIが豊富に含まれて

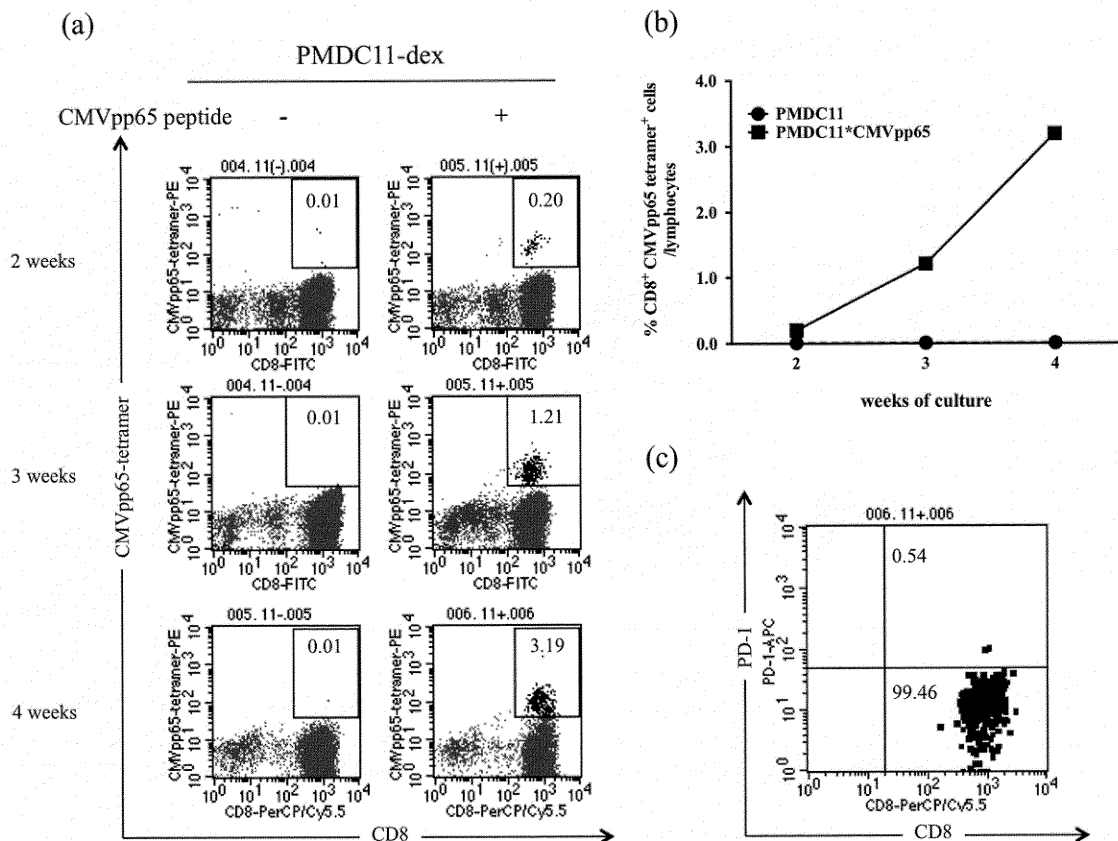


図5 PMDC11-dex 刺激培養法による CMVpp65 特異的 CTL 誘導

- (a) 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.
- (b) 培養期間中の培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の割合の変化
- (c) 培養 4 週目の CMVpp65 テトラマー陽性細胞を CD8 と PD-1 で展開したドットプロット解析. CMVpp65 ペプチドパルス PMDC11-dex で刺激した CD8⁺T 細胞からは, CMVpp65 特異的 CTL が誘導された. また, 誘導 CTL のほとんどが PD-1 陰性であり, 活性のある細胞であることが確認された.

いることから, 抗原提示能を有していると言われていいる. そこで, 本検討において抽出した PMDC11-dex を用いて, CMVpp65 特異的 CTL の誘導を試みた (図 5). 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 PMDC11-dex で刺激培養した CD8⁺T 細胞において, CMVpp65 テトラマー陽性細胞が培養 2 週目より確認できた (図 5a). 加えて, 培養細胞中の CMVpp65 テトラマー陽性細胞の割合は,

培養期間中に増加していた (図 5b). さらに, 培養 4 週目の 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 5c) この結果より, PMDC11-dex は抗原特異的 CTL 誘導能を有しており, さらに誘導された CTL は刺激により不活性化しておらず, 活性を維持しているということが示唆された.

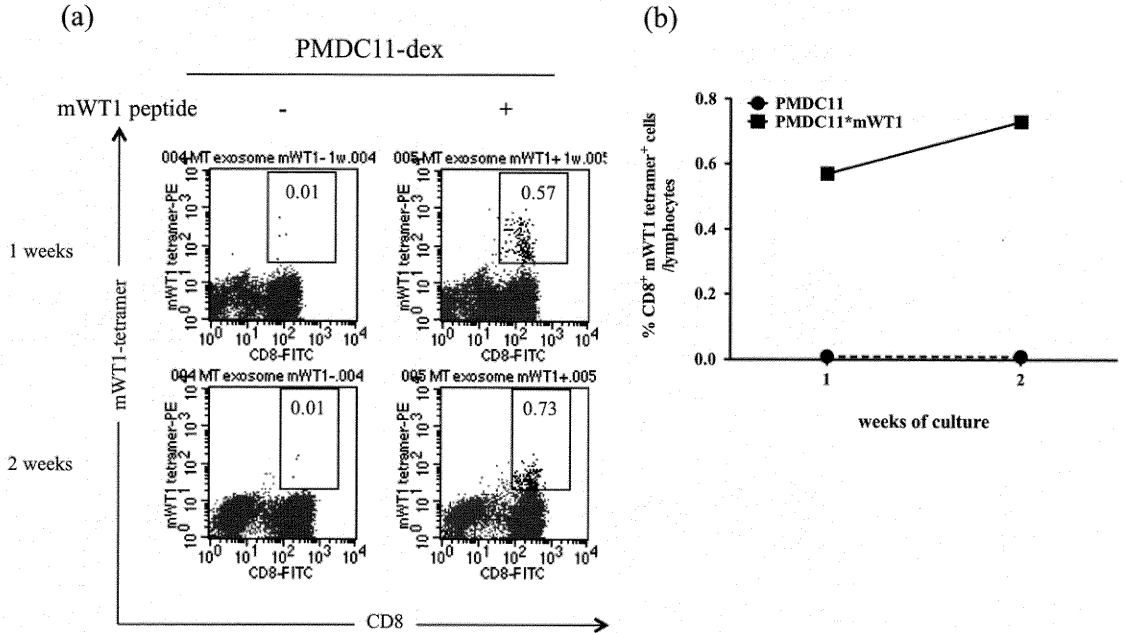


図6 PMDC11-dex 刺激培養法による mWT1 特異的 CTL 誘導

- (a) 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 mWT1 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。
- (b) 培養期間中の培養細胞中の mWT1 テトラマー陽性細胞の割合の変化
1 週目よりペプチドパルス PMDC11-dex で刺激した CD8⁺T 細胞からは、mWT1 特異的 CTL が誘導でき、その割合も増加していた。

同様に、mWT1 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-dex を用いて mWT1 特異的 CTL の誘導が可能であった (図 6)。PMDC11-dex で刺激培養した CD8⁺T 細胞において、mWT1 テトラマー陽性細胞が培養 1 週目より確認できた (図 6a)。培養細胞中の mWT1 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 (図 6b)。

考 察

養子免疫療法は、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^{26)–29)}。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³⁰⁾³¹⁾。

この問題点を克服するために、aAPC を用いる養子免疫療法の研究が進められている。aAPC には、リピッド³²⁾、生物分解性ポリマー³³⁾ や磁気ビーズ^{34)–36)} を用いた非細胞性の aAPC とショウジョウバエ由来細胞株 (S2 細胞)³⁷⁾、マウス由来線維芽細胞株 (NIH3T3 細胞)³⁸⁾³⁹⁾ やヒト由来白血病細胞株 (K562 細胞)⁴⁰⁾⁴¹⁾ を利用した aAPC などが開発されている。aAPC は、患者の状態に左右されず、いつでも十分量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⁴⁾。

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⁴²⁾。当研究室で樹立した PMDC05, GEN2.2⁴³⁾, CAL-1⁴⁴⁾ である。GEN2.2 を用いた CTL 誘導の研究は継続的に行われており、その結果が報告がされている⁴⁵⁾。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、細胞自身が APC として応用できる細胞である。

PMDC05 細胞は、培養にフィーダー細胞を必要とせず、非常に培養が簡便という特徴がある。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。PMDC11 は、親株である PMDC05 細胞に共刺激分子である CD80 遺伝子を導入して、より強い抗原提示能を持つように改変した細胞株である。これらのことより、PMDC11 細胞は、安定的に十分量を供給でき、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。さらに本研究において、PMDC 11 細胞を APC として利用し *in vitro* における CTL 誘導に効果的に応用できたことで、PMDC11 細胞の養子免疫療法における有用性が示されたと考えられる。

抗原提示粒子としてのエクソソ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⁴⁶⁾。さらに、転移性 melanoma 患者に対してペプチドパルスした dexosome を投与する検討や非小細胞性肺癌患者に 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⁴⁷⁾⁴⁸⁾。本検討においては、PMDC11 が培養上清中にエクソソームを放出していることをエクソソームマーカー CD63 の染色により確認した。これまでの研究で、エクソソームによる抗原提示の際に、CD54 と CD80 の共発現がエクソソ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⁴⁹⁾。そのことを考慮すると、PMDC11-dex は、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ソームであると考えられる。さらに、エクソソームは、抗原特異的にナイーブ CD8 + T 細胞を増幅させることができるという報告がある⁴⁹⁾。本検討においても、ペプチドパルスした PMDC 11-dex で刺激した CD8 + T 細胞より CMVpp65 および mWT1 特異的 CTL の誘導が確認された。さらに、その CTL は、活性の高い状態であることも確認された。以上より、PMDC11-dex は、直接的に質の高い CTL を誘導可能であることが示唆された。

結 論

CTL を利用した養子免疫療法は、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、エクソソームの輸注は毒性がないことが報告されている⁵⁰⁾。それゆえ、PMDC11 細胞を用いた本検討により、PMDC11 細胞が単に養子免疫療法のための APC として応用できるだけでなく、PMDC11-dex も非細胞性の抗原提示粒子として利用できる可能性が示された。

参 考 文 献

- 1) Banchereau J and Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245-252, 1998.
- 2) Montagna D, Turin I, Schiavo R, Montini E, Zaffaroni N, Villa R, Secondino S, Schiavetto I, Caliozna L, Locatelli F, Libri V, Pession A, Tonelli R, Maccario R, Siena S and Pedrazzoli P: Feasibility and safety of adoptive immunotherapy with ex vivo-generated autologous, cytotoxic T lymphocytes in patients with solid tumor. *Cytotherapy*. 14: 80-90, 2012.
- 3) Kim JV, Latouche JB, Riviere I and Sadelain M: The ABCs of artificial antigen presentation. *Nature biotechnology*. 22: 403-410, 2004.
- 4) Turtle CJ and Riddell SR: Artificial antigen - pre -

- senting cells for use in adoptive immunotherapy. *Cancer journal* (Sudbury, Mass). 16: 374 - 381, 2010.
- 5) Narita M, Watanabe N, Yamahira A, Hashimoto S, Tochiki N, Saitoh A, Kaji M, Nakamura T, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN- α by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naive T cells. *Leukemia research*. 33: 1224 - 1232, 2009.
 - 6) Yamahira A, Narita M, Nakamura T, Watanabe N, Kaji M, Taniguchi T, Hashimoto S, Furukawa T, Toba K, Aizawa Y, Kuzushima K and Takahashi M: Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leukemia research*. 35: 793 - 799, 2011.
 - 7) Yamahira A, Narita M, Ishii K, Jayathilake RM, Iwabuchi M, Satoh N, Uchiyama T, Taniguchi T, Hashimoto S, Kasahara N, Faure E, Bogan B, Takizawa J, Sone H and Takahashi M: Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. *Leukemia research*. 36: 1541 - 1546, 2012.
 - 8) 成田美和子, 高橋益廣: 樹状細胞由来エクソソームによる抗原提示. *臨床免疫*. 37: 133 - 137, 2002.
 - 9) 高橋益廣, 成田美和子: 樹状細胞由来エクソソ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年10月25日): 199 - 207, 2004.
 - 10) Thery C, Zitvogel L and Amigorena S: Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*. 2: 569 - 579, 2002.
 - 11) Blanchard N, Lankar D, Faure F, Regnault A, Dumont C, Raposo G and Hivroz C: TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950). 168: 3235 - 3241, 2002.
 - 12) Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi - Castagnoli P, Raposo G and Amigorena S: Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*. 4: 594 - 600, 1998.
 - 13) Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ and Geuze HJ: B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 183: 1161 - 1172, 1996.
 - 14) van Niel G and 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*. 283: G251 - 255, 2002.
 - 15) Taylor DD and Gercel-Taylor C: Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *British journal of cancer*. 92: 305 - 311, 2005.
 - 16) Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S and Zitvogel L: Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine*. 7: 297 - 303, 2001.
 - 17) Andre F, Scharzt NE, Chaput N, Flament C, Raposo G, Amigorena S, Angevin E and Zitvogel L: Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine*. 20 Suppl 4: A28 - 31, 2002.
 - 18) Andre F, Scharzt NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E and Zitvogel L: Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*. 360: 295 - 305, 2002.
 - 19) Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard - Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J and Sadoul R: Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*. 31: 642 - 648, 2006.
 - 20) Uchiyama T, Sato N, Narita M, Yamahira A,

- Iwabuchi M, Furukawa T, Sone H and Takahashi M: Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of natural killer cells in in vitro study. *Hematological oncology*. 31: 156 - 163, 2013.
- 21) Osman Y, Takahashi M, Zheng Z, Koike T, Toba K, Liu A, Furukawa T, Aoki S and Aizawa Y: Generation of bcr - abl specific cytotoxic T - lymphocytes by using dendritic cells pulsed with bcr - abl (b3a2) peptide: its applicability for donor leukocyte transfusions in marrow grafted CML patients. *Leukemia*. 13: 166 - 174, 1999.
- 22) Tochiki N, Narita M, Zheng Z, Lu C, Saitoh A, Watanabe N, Satoh N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: Induction of recipient cell - specific donor T - cell anergy by UV - C - irradiated recipient immature monocyte - derived dendritic cells. *Bone marrow transplantation*. 41: 1037 - 1045, 2008.
- 23) Narita M, Tochiki N, Saitoh A, Watanabe N, Kaji M, Satoh N, Yamahira A, Nakamura T, Masuko M, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y and Takahashi M: Induction of antigen - specific cytotoxic T lymphocytes by using monocyte - derived DCs transfected with in vitro - transcribed WT1 or SART1 mRNA. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 26: 429 - 436, 2009.
- 24) Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi - Castagnoli P, Raposo G and Amigorena S: Molecular characterization of dendritic cell - derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *The Journal of cell biology*. 147: 599 - 610, 1999.
- 25) Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O and Geuze HJ: Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B - lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 273: 20121 - 20127, 1998.
- 26) Ho WY, Blattman JN, Dossett ML, Yee C and Greenberg PD: Adoptive immunotherapy: engineering T cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. *Cancer cell*. 3: 431 - 437, 2003.
- 27) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers - Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE and Rosenberg SA: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with anti - tumor lymphocytes. *Science (New York, NY)*. 298: 850 - 854, 2002.
- 28) Dudley ME and Rosenberg SA: Adoptive - cell - transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature reviews Cancer*. 3: 666 - 675, 2003.
- 29) Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea - Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A and Rosenberg SA: Adoptive cell transfer therapy following non - myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23: 2346 - 2357, 2005.
- 30) Gabrilovich D: Mechanisms and functional significance of tumour - induced dendritic - cell defects. *Nature reviews Immunology*. 4: 941 - 952, 2004.
- 31) Gottfried E, Kreutz M and Mackensen A: Tumor - induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine & growth factor reviews*. 19: 65 - 77, 2008.
- 32) Zappasodi R, Di Nicola M, Carlo - Stella C, Mortarini R, Molla A, Vegetti C, Albani S, Anichini A and Gianni AM: 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*. 93: 1523 - 1534, 2008.
- 33) Steenblock ER, Fadel T, Labowsky M, Pober JS and Fahmy TM: 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*. 286: 34883 - 34892, 2011.
- 34) Cai Z, Brunmark A, Jackson MR, Loh D, Peterson PA and Sprent J: Transfected *Drosophila* cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8⁺ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 14736 - 14741, 1996.
- 35) Jackson MR, Song ES, Yang Y and Peterson PA: 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*. 89: 12117 - 12121, 1992.
- 36) Levine BL, Bernstein WB, Connors M, Craighead N, Lindsten T, Thompson CB and June CH: Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4⁺ T cells in the absence of exogenous feeder cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 159: 5921 - 5930, 1997.
- 37) Mitchell MS, Darrah D, Yeung D, Halpern S, Wallace A, Voland J, Jones V and Kan-Mitchell J: 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*. 20: 1075 - 1086, 2002.
- 38) Hasan AN, Kollen WJ, Trivedi D, Selvakumar A, Dupont B, Sadelain M and O'Reilly RJ: A panel of artificial APCs expressing prevalent HLA alleles permits generation of cytotoxic T cells specific for both dominant and subdominant viral epitopes for adoptive therapy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950). 183: 2837 - 2850, 2009.
- 39) Zhong XS, Matsushita M, Plotkin J, Riviere I and Sadelain M: 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*. 18: 413 - 420, 2010.
- 40) Butler MO, Lee JS, Ansen S, Neuberger D, Hodi FS, Murray AP, Drury L, Berezovskaya A, Mulligan RC, Nadler LM and Hirano N: 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*. 13: 1857 - 1867, 2007.
- 41) Butler MO, Friedlander P, Milstein MI, Mooney MM, Metzler G, Murray AP, Tanaka M, Berezovskaya A, Imataki O, Drury L, Brennan L, Flavin M, Neuberger D, Stevenson K, Lawrence D, Hodi FS, Velazquez EF, Jaklitsch MT, Russell SE, Mihm M, Nadler LM and Hirano N: Establishment of antitumor memory in humans using in vitro-educated CD8⁺ T cells. *Science translational medicine*. 3: 80ra34, 2011.
- 42) Drexler HG and Macleod RA: Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of plasmacytoid dendritic cell leukemia. *Leukemia research*. 33: 1166 - 1169, 2009.
- 43) Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP and Plumas J: Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950). 176: 248 - 255, 2006.
- 44) Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y and Kamihira S: A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *International journal of hematology*. 81: 148 - 154, 2005.
- 45) Asford C, Charles J, Leccia MT, Laurin D, Richard MJ, Chaperot L and Plumas J: A novel cancer vaccine strategy based on HLA-A*0201 matched allogeneic plasmacytoid dendritic cells. *PLoS one*. 5: e10458, 2010.
- 46) Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O and Amigorena S: Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exo-

- somes. *Nature immunology*. 3: 1156 - 1162, 2002.
- 47) Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E and Zitvogel L: Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived - exosomes: results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*. 3: 10, 2005.
- 48) Morse MA, Garst J, Osada T, Khan S, Hobeika A, Clay TM, Valente N, Shreeniwas R, Sutton MA, Delcayre A, Hsu DH, Le Pecq JB and Lyerly HK: A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non - small cell lung cancer. *Journal of translational medicine*. 3: 9, 2005.
- 49) Hwang I, Shen X and 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*. 100: 6670 - 6675, 2003.
- 50) Chaput N, Scharz NE, Andre F and Zitvogel L: Exosomes for immunotherapy of cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 532: 215 - 221, 2003.

(平成 26 年 5 月 22 日受付)