学位論文

Doctor's Thesis

論文名：　遺伝子改変 ES 細胞に由来する
樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導
(Anti-tumor immunity stimulated by dendritic cells derived from genetically modified embryonic stem cells)

著者名：　松吉　秀武　Hidetake　Matsuyoshi

指導教官名：　免疫識別学講座教授　西村　泰治

審査委員名：ウイルス制御分野担当教授　滝口　雅文
細胞病理学講座担当教授　竹屋　元裕
分子病理学講座担当教授　山本　哲郎
消化器内科学分野担当教授　佐々木　裕

2005 年 3 月

目次

目次..... 1
1　要旨 3
2　発表論文リスト 5
3　謝辞 7
4　略語一覧..... 8
5　研究の背景と目的..... 9
5－1）HLA 分子によるＴ細胞への抗原提示 9
図 1　MHC クラスⅠ分子による抗原ペプチドの $CD8^+$ 細胞傷害性Ｔ細胞(CTL)への提示..... 10
図 2　MHC クラスⅡ分子による抗原ペプチドの $CD4^+$ヘルパーＴ細胞への提示..... 12
5-2）抗腫瘍免疫のあらまし 14
図 3　樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化 15
5－3）樹状細胞と抗腫瘍免疫応答 16
図 4　遺伝子改変胚性幹（ES）細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強 17
表 1　樹状細胞への遺伝子導入方法の比較..... 18
5-4）樹状細胞とケモカイン..... 19
図 5　生体における樹状細胞とケモカインのネットワーク..... 20
表 2　遺伝子改変樹状細胞療法に適したケモカインとその標的細胞 21
5－5）本研究の目的 22
6　実験方法..... 23
6－1）マウス..... 23
6－2）使用した細胞 23
6－3）ペプチド、サイトカイン/ケモカイン、抗ケモカイン抗体 23
6－4）マウス ES 細胞由来の樹状細胞（E S-DC)の作製 24
図 6　ES 細胞から樹状細胞を分化誘導するための in vitro 培養法 25
図 7　ES-DC の形態 26
図 8　ES-DC と BM-DC の表面マーカー 27
6－5）ケモカイン遺伝子発現の cDNA アレイによる解析..... 28
6－6）プラスミドの作製..... 28
6－7）OVA とケモカインを共発現する ES-DC の作製 29
6－8）Ｔ細胞ハイブリドーマを用いた OVA ペプチド-K^b 複合体の検出..... 29
6－9）ES-DC の in vitro における生存 30
6－１０）in vitro における DC の遊走能の測定..... 30
6－１１）in vitro における OVA 特異的 CTL の誘導と細胞傷害活性..... 30
6－１２）in vivo における OVA 特異的 CTL の誘導..... 31
6－１３）腫瘍増殖抑制実験..... 31
6－１４）in vivo における $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞の除去..... 31

6－１５）腫瘍組織の組織学的解析 32
6－１６）統計学的解析 32
7　実験結果 33
7－1）ES-DC におけるケモカインの発現パターン 33
図 9　ES-DC と BM-DC におけるケモカイン遺伝子の発現 34
7－2）抗原タンパクと共にケモカインを発現させた ES-DC の作製 35
図 10　OVA と共にケモカインを発現する ES-DC の作製 36
図 11　遺伝子改変を行った ES-DC の OVA 特異的 T 細胞ハイブリドーマ
に対する刺激活性とケモカインの産生 37
図 12　遺伝子改変を行った ES-DC の表面マーカー 38
7－3）in vivo における ES-DC の遊走活性 39
図 13　in vivo における ES-DC の遊走能 40
7－4）in vitro および in vivo における遺伝子改変 ES-DC による
抗原特異的 CTL の誘導 41
図 14　遺伝子改変を行った ES-DC による OVA 特異的 CTL の誘導 42
7－5）OVA とケモカインを発現する ES-DC による効率よい
OVA 特異的 CTL の誘導 43
図１５　ES-DC-OVA/Mig を免疫したマウスにおける
OVA 特異的 CTL の誘導 44
図１６　OVA とケモカインを共発現させた ES-DC による OVA 特異的 CTL の誘導 45
7－6）OVA とケモカインを発現する ES-DC による腫瘍増殖抑制効果 46
図１７　OVA とケモカインを発現した ES-DC による腫瘍増殖抑制と
マウス生存期間の延長 48
7－7）ES-DC と SLC を同時に投与しても明らかな効果
は認められなかった 49
図１８　ES-DC-OVA と共に組み換えマウス SLC を投与しても
付加的効果はなかった 50
7－8）SLC は ES-DC の生存や in vitro での CTL 誘導には
影響を与えない 51
図１９　in vitro における ES-DC-OVA と ES-DC-OVA/SLC の
OVA 特異的 CTL 誘導能は同程度である 52
7－9）OVA 発現 ES-DC による MO4 に対する増殖抑制効果には
$CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞が関与している 53
図 20　遺伝子改変 ES-DC による抗腫瘍免疫の誘導における
$CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞の関与 54
図２１　腫瘍周囲への $CD4^+$T 細胞ならびに $CD8^+$T 細胞の浸潤 55
8　考察 56
9　おわりに 59
１０　参考文献 60

1　要旨

【背景】　近年、腫瘍拒絶に重要な役割を果たすT細胞が認識するヒト癌抗原が、分子として単離されつつある。免疫療法を成功されるためには、抗原に対する免疫応答を効果的に誘導することが一つの課題である。その際、生体内でのT細胞活性化に最も重要な抗原提示細胞である樹状細胞(DC)をいかにうまく機能させるかが問題となる。

【目的】我々はマウスES細胞をin vitroで、DCに分化させる方法を開発している。この方法を応用して、ES細胞の段階で遺伝子導入を行い、ES細胞由来の樹状細胞(ES-DC)に分化させ、遺伝子導入樹状細胞を効率良く作製するシステムを開発している。本研究はES-DCに抗原とケモカインを共発現させることにより、生体内に移入したES-DCの存在する局所へT細胞を遊走させ、抗原特異的抗腫瘍免疫を増強できるか否かを検証することを目的とする。

【方法】ES細胞に、T細胞を遊走させるケモカイン遺伝子(SLC, MigあるいはLymphotactin)とモデル抗原(卵白アルブミン: OVA)遺伝子を導入し、in vitroでES-DCに分化させた。OVAの発現は、OVAを$H\text{-}2K^b$拘束性に認識するT細胞ハイブリドーマに対する刺激活性により、ケモカインの発現はELISAにより確認した。OVAとケモカイン遺伝子を共発現したES-DCを腹腔内投与し、CTL誘導能および腫瘍増殖抑制効果を検討した。

【結果】3種類のケモカインを共発現するES-DCのいずれもが、OVAを単独に発現したES-DCよりもOVA特異的CTLを効率よく誘導した。その効果はSLCが最も大きく、続いてLymphotactin, Migの順に有効であった。腫瘍拒絶効果に関しては、OVAのみを発現したES-DCの前投与により、OVAを発現するB16メラノーマに対する腫瘍増殖抑制効果が観察された。さらにSLC遺伝子あるいはMig遺伝子を発現させると、その効果は増強したが、SLCの効果が最も大きかった。

【考察】抗原とケモカイン遺伝子を、共発現させたES-DCを使用することにより、抗原特異的抗腫瘍免疫の増強が可能であると考えられた。3種類のT細胞遊走活性を有するケモカインのうち、SLCを樹状細胞に発現させることが抗腫瘍免疫療法を行う上で、最も有効であると考えられた。

【結論】以上の結果は、本研究において遺伝子改変を行った ES 細胞由来の樹状細胞が、抗腫瘍免疫療法に利用できる可能性を示すものである。

Summary

Dendritic cell (DC)-based immunotherapy is regarded as a promising means for anti-cancer therapy. The efficiency of T cell-priming in vivo by transferred DCs should depend on their encounter with T cells. In the present study, we attempted to improve the capacity of DCs to prime T cells in vivo by genetic modification to express chemokine with T cell-attracting property. For genetic modification of DCs, we used a recently established method to generate dendritic cells from mouse embryonic stem (ES) cells. We generated double-transfectant DCs expressing a chemokine along with a model antigen, OVA, by sequential transfection of ES cells then inducing differentiation to DCs. We comparatively evaluated the effect of three kinds of chemokines; secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), monokine induced by IFN-γ (Mig) and lymphotactin (Lptn). All three types of double transfectant DCs primed OVA-specific CTLs in vivo more efficiently than did DCs expressing only OVA, and co-expression of SLC or Lptn was more effective than that of Mig. Immunization with DCs expressing OVA plus SLC or Mig provided protection from OVA-expressing tumor cells more potently than that with OVA only, and SLC was more effective than Mig. On the other hand, co-expression of Lptn gave no additive effect on protection from the tumor. Collectively, among the three chemokines, expression of SLC was the most effective in enhancing antigen-specific immune responses by transferred DCs in vivo. The findings provide useful information for the development of a potent DC-based cellular immunotherapy.

2　発表論文リスト

1. Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., Yoshitake, Y., Uemura, Y., and Nishimura, Y. Enhanced priming of antigen-specific CTLs in by vivo embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein: application to antitumor vaccination. ***Journal of Immunology*** 172: 776-786, 2004

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

3. Senju, S., Matsuyoshi, H, Hirata, S, and Nishimura, Y. Cellular vaccination with genetically modified dendritiv cells derived from mouse ES cells. **J.Invest. Dermatol.** 121: 1241, 2003

4. Senju, S., Hirata, S, Matsuyoshi, H., Masuda, M., Uemura, Y., Araki, K., Yamamura, K., and Nishimura, Y. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embyonic stem cells. ***Blood*** *101:* 3501-3508, 2003.

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

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

7. 松吉秀武, 千住覚, 西村泰治「ES 細胞由来の樹状細胞による免疫制御」, ***感染、炎症、免疫***, 医薬の門社（東京）, 34:122−129,2004.

8. 松吉秀武, 千住覚, 西村泰治「抗原とケモカインを共発現させた ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法」, ***臨床免疫***, 科学評論社（東京）, 42: 110−114, 2004

9. 松吉秀武, 千住覚, 門司幹男, 西村泰治 「HLA 不適合と拒絶反応」,
臨床免疫学（上), 日本臨床社（東京), (印刷中)

10. 松吉秀武, 千住覚, 門司幹男, 西村泰治 「臓器移植と主要組織適合抗原」,
日本医師会雑誌特別号「わかりやすい免疫疾患」, 南山堂（東京）,
(印刷中)

11. 松吉秀武, 渡利明彦, 佐藤裕司, 杉本卓矢, 牧嶋和見, 橋本洋「硬口蓋の巨大な鼻口蓋管嚢胞の 1 症例」,***耳鼻咽喉科・頭頚部外科***, 医学書院（東京）,70: 751-754, 1998.

3　謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染･免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授及に深く感謝いたします。またマウス GM-CSF を供与していただいた株式会社キリンビールに深く感謝いたします。

４　略語一覧

BLC; B-lymphocyte chemoattractant
BM-DC; bone marrow cell-derived dendritic cell
cDNA; complementary DNA
CFSE; carboxyfluorscein succinimidyl ester
CTL; cytotoxic T lymphocyte
DC; dendritic cell
DNA; deoxyribonucleic acid
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay
ES cell; embryonic stem cell
ES-DC; embryonic stem cell-derived dendritic cell
GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H&E; hematoxilin and eosin
HLA; human histocompatibility leukocyte antigens
IFN; interferon
Ig; immunoglobulin
IL; interleukin
i.p.; intraperitoneal injection
i.v.; intravenous injection
IRES; internal ribosomal entry site
LN; lymph node
Lptn; lymphotactin
MHC; major histocompatibility complex
Mig; monokine induced by γ-IFN
MLR; mixed lymphocyte reaction
mAb; monoclonal antibody
mRNA; messenger ribonucleic acid
neo-R; neomycin resistant
OVA; ovoalbumin
PEF; primary embryonic fibroblast
rm; recombinat mouse
RT-PCR; reverse transcription-PCR
SLC; secondary lymphoid tissue chemokine
TCR; T cell receptor
TNF; tumor necrosis factor

5　研究の背景と目的

5-1）HLA 分子による T 細胞への抗原提示

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

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

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

図 1

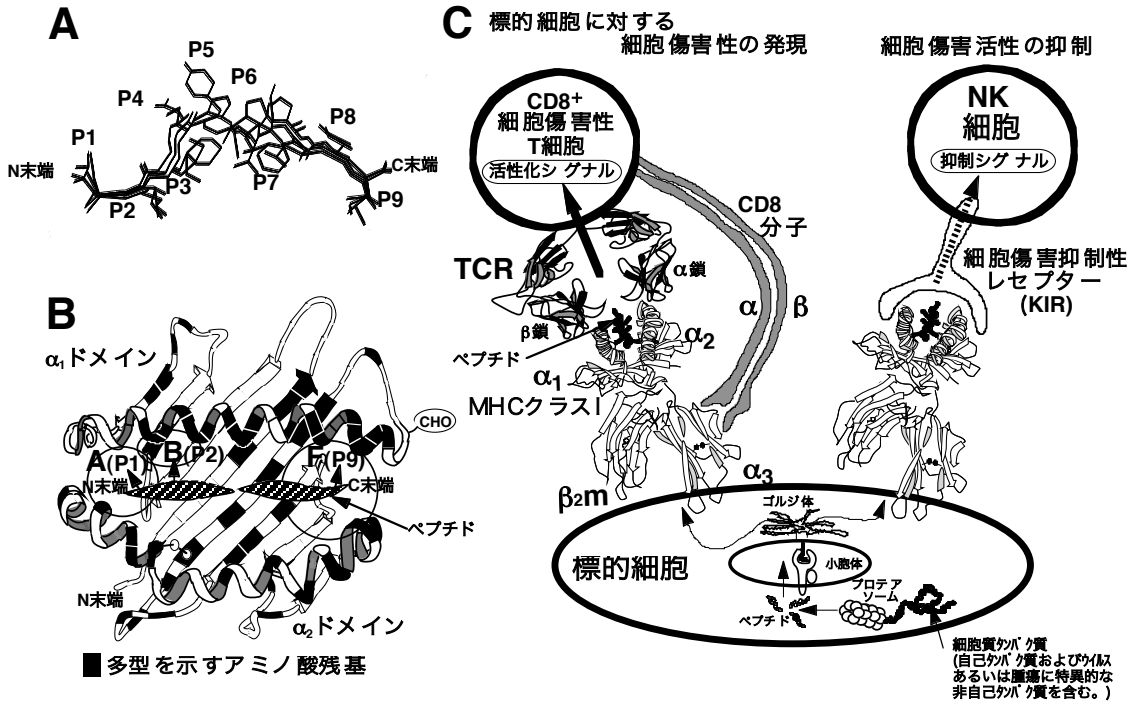

図 1. MHC クラス I 分子 による抗原ペプチドの CD8+ 細胞傷害性 T 細胞(CTL)への提示

A. MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1~P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端)のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基(P3~P7)の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの α ヘリックス(右巻きラセン)構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、( ) 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス I (ヒトの HLA クラス I)で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。C. MHC クラス I により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。α1, α2, α3 および β2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよびβ2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター(killer-cell inhibitory receptor)を表す。

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

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

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドは MIIC（MHC class II compartments）や CIIV（class II vesicles）と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC ク

図 2

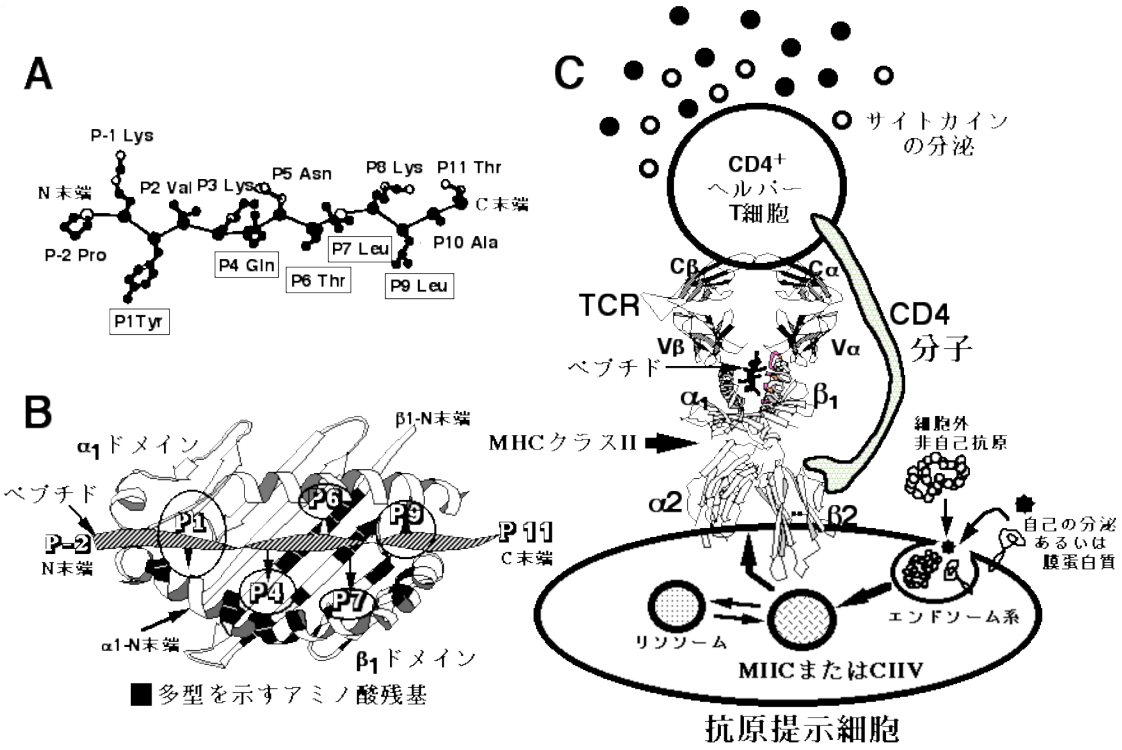

図 2.　MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパー T 細胞への提示

A．MHC クラス II 分子 (HLA-DR1)により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もＮ末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてＣ末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子 のペプチド収容溝の５個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子は MHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子は MHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。Ｂ．HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上（ＴＣＲ側）より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な５個のアンカーアミノ酸残基（P1, P4, P6, P7 および P9）の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するするポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。Ｃ．細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺Ｔ細胞に提示される様子を示す。$\alpha 1, \alpha 2, \beta 1$ および $\beta 2$ は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分の α, β は TCR の α 鎖と β 鎖を、またＣとＶは定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

ラス Ⅰ結合ペプチドと比較して長い 10～30 数個（多くは 15 個前後）のアミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している(12, 13)。MHC クラス Ⅰ ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス Ⅱ では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス Ⅰ と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、 1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス Ⅱ に向かう複数の（通常 4 ～ 5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス Ⅱ 上のペプチド収容溝に存在する 4 ～ 5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス Ⅱ 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス Ⅱ に結合する(13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1（P1）として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス Ⅱ 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い（図 2A, B)。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

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

5-2）抗腫瘍免疫のあらまし

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

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

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

図 3

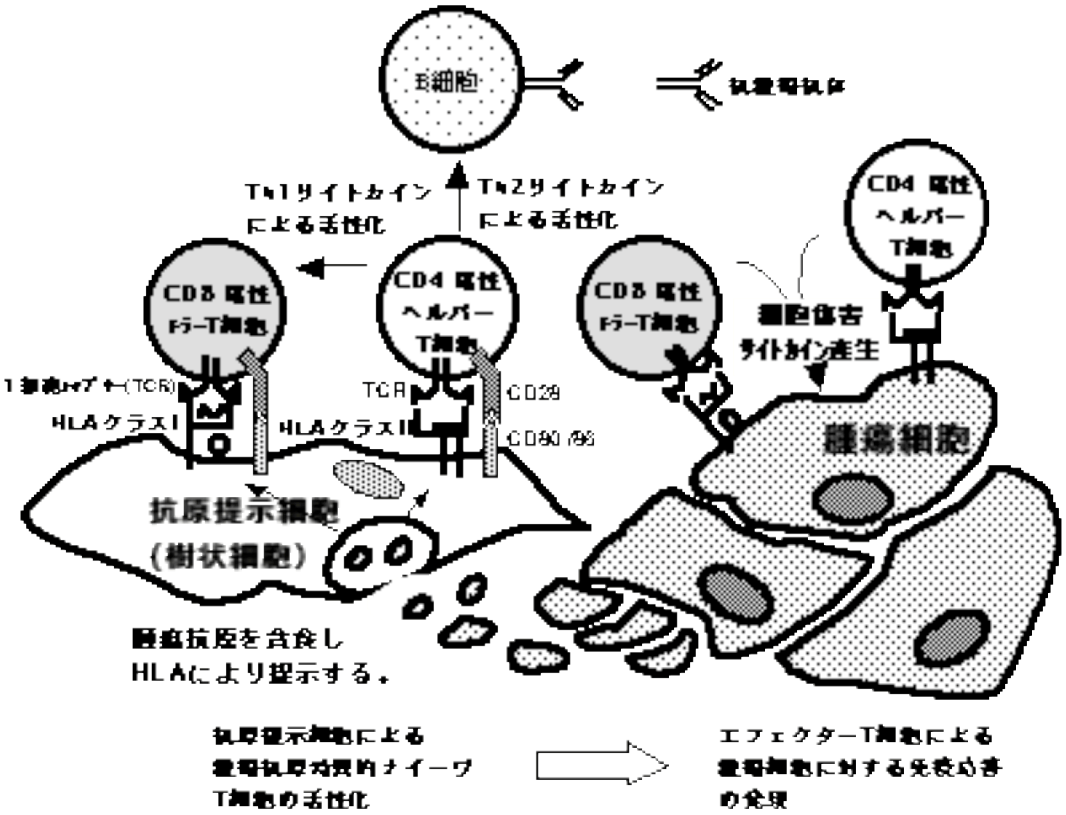

図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

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

5-3）樹状細胞と抗腫瘍免疫応答

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

Inaba らがマウス骨髄細胞から DC を誘導できることを報告(21)して以来、ヒトでは、臍帯血、骨髄 CD34 陽性細胞および末梢血 CD14 陽性細胞などが in vitro で DC を誘導するのに利用されている。現在このようにして誘導された DC が癌免疫療法に利用されている。我々は無限増殖能を有し、かつ複数の遺伝子の導入が可能である ES 細胞を DC の供給源として利用することを考えた。DC に遺伝子を導入する方法として電気穿孔法、リポフェクション、ウイルスベクターなどが使用されている(表１)。骨髄細胞由来 DC や単球由来 DC に遺伝子を導入するためには、ウイルスベクターが利用されるが、ウイルスの危険性や抗原性が問題となる。一方、ES 細胞の場合には電気穿孔法で容易にかつ効率よく、さらに複数の遺伝子を導入できる利点がある。このように遺伝子改変が容易な ES 細胞の特色を生かして、まずマウス遺伝子改変 ES-DC を樹立して、抗腫瘍免疫の誘導に応用できるか否かを検証した(図 4)。

図４

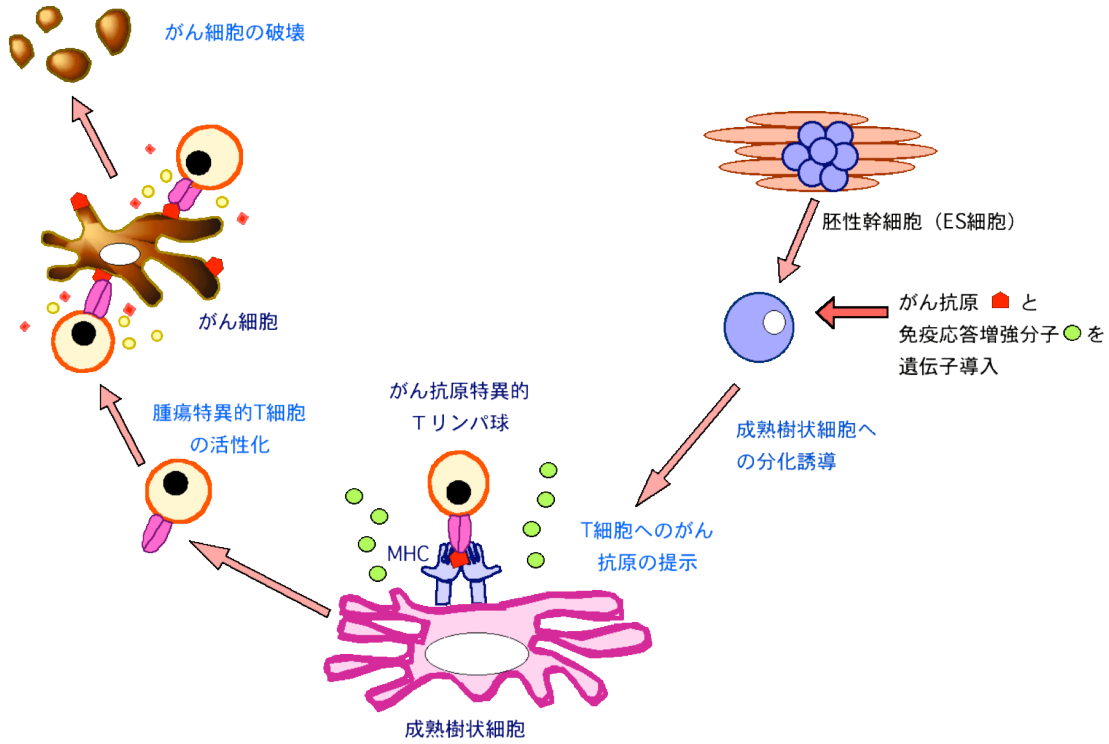

図４ 遺伝子改変胚性幹（ES）細胞から分化誘導させた樹状細胞を用いた腫瘍免疫の増強

表１

樹状細胞への遺伝子導入方法の比較

遺伝子導入法	レトロウイルス ベクター	アデノウイルス ベクター	電気穿孔法
標的細胞	血球幹細胞	未熟樹状細胞	ES細胞
遺伝子発現の 安定性	安定	一過性	安定
遺伝子導入効率	20 -85%	30 -95%	クローニング により100%
導入可能な 遺伝子数	1個	1個	1-3個

5-4）樹状細胞とケモカイン

体外から投与された DC による T 細胞の活性化には、DC がいかに効率よく T 細胞と出会うかに依存している。外来タンパクを皮下投与した場合、そのタンパクを取り込んだ皮膚のランゲルハンス細胞など、内因性の未熟な DC は GM-CSF, CpG, TNF-α, CD40L などの存在下に成熟 DC となり CCR7 の発現が増加する。この成熟した DC のうち約 25%が、SLC などのケモカインにより所属リンパ節の T 細胞領域に移動するとされている(22)（図 5)。リンパ節に移動した成熟 DC は補助刺激因子を高発現し、IL-12 などのサイトカインを産生して、抗原を効率よく T 細胞に提示する。抗原特異的に活性化された T 細胞は、IL-2 を産生するようになり増殖を開始する。さらに DC は CXCR5 を介して BCL を受容し、移動してきた B 細胞に対しても抗原を提示し、抗体産生にも関与している。これに対して DC を生体に投与した場合､T細胞が多く存在する所属リンパ節へ移行するDCは､その0.1-1%にすぎず(23-25)、大部分は投与された部位に留まると報告(26)されている。

したがって､DC が投与されたその周囲に T 細胞を遊走させることにより、T 細胞への抗原提示が効率良く行われるであろうと考えた。そこで ES-DC に T 細胞遊走活性を有するケモカインを発現させることにした。表 2 のように樹状細胞に遺伝子を発現させることにより、T 細胞と効率良く会合させることが可能であろうと考えられるケモカインが複数存在する。文献的には SLC （ Secondary lymphoid tissue chemokine ） あ る い は Lptn(lymphotactin)を骨髄由来樹状細胞に導入することにより、抗原提示を効率良く行わせることが可能であるという報告(27, 28)がある。本研究においてはこれに加えて活性化 T 細胞を遊走するとされる、Mig（Monokine induced by γ-interferon）遺伝子を導入することにした。Mig はマクロファージによって産生され、CXCR3 を受容体としている。この受容体を介して Th1 細胞と NK 細胞を遊走させる(29)。SLC は LN と脾臓の T 細胞領域や LN の高内皮細静脈にて産生されており、T 細胞、NK 細胞、B 細胞、DC に対する遊走活性を有している(30-32）。Lptn は活性化 T 細胞によって産生され、$CD4^+$T 細胞、$CD8^+$T 細胞と NK 細胞に対する遊走活性を有している(33, 34)。この効果はその受容体である XCR1 を介している。

図 5

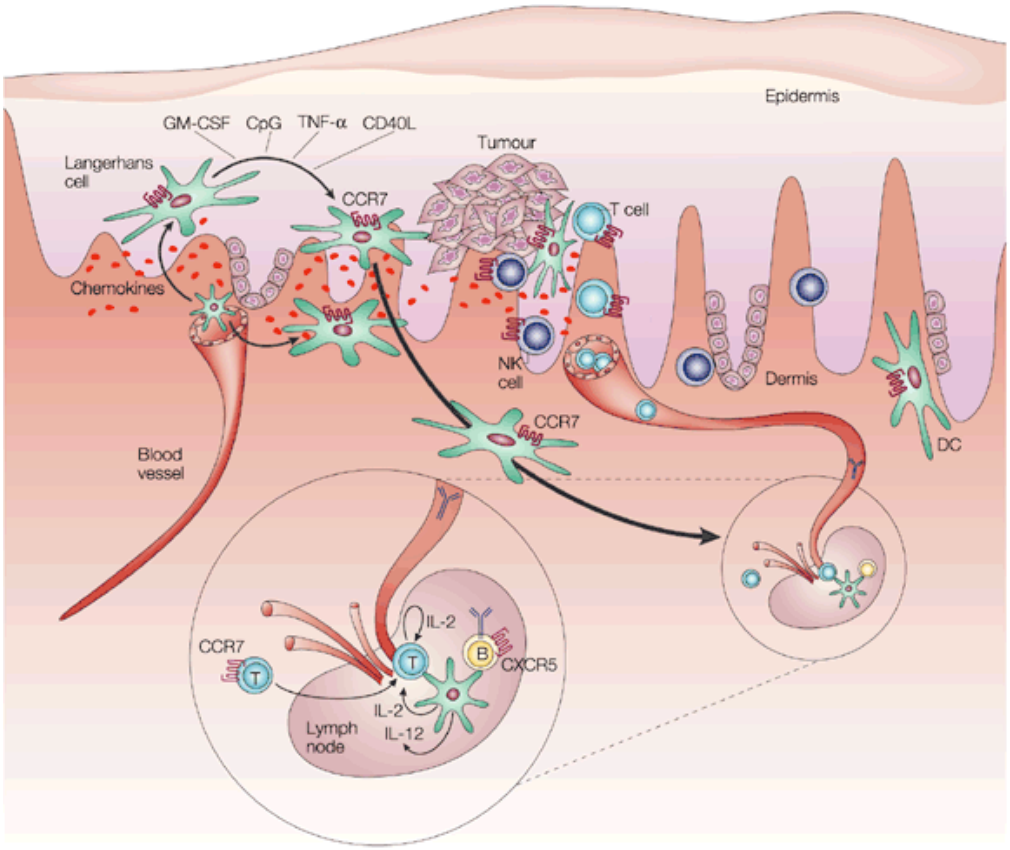

図 5 生体における樹状細胞とケモカインのネットワーク

(Nature reviews/immunology 2:175-184, 2002 より引用)

皮膚のランゲルハンス細胞などの内因性の未熟な DC は、GM-CSF, CpG, TNF-α, CD40L などの存在下に成熟 DC となり CCR7 の発現が増加する。成熟 DC は、SLC などのケモカインの作用により所属リンパ節の T 細胞領域に移動する。リンパ節に移動した成熟 DC は補助刺激因子を高発現し、IL-12 などのサイトカインを産生し、効率よく抗原を T 細胞に提示する。抗原特異的に活性化された T 細胞は IL-2 を産生し増殖する。さらに CXCR5 を介して BLC を受容し、移動してきた B 細胞に対しても DC は抗原を提示し、抗体産生を誘導する。

表 2

遺伝子改変樹状細胞療法に適したケモカインとその標的細胞

ケモカイン	DC	T細胞	NK細胞	B細胞
CCL2, CCL7	+	++	+	-
CCL5	+	+++	++	-
CCL19, CCL21(SLC)	+++	++	+	+
CCL20	++	+	-	+
CXCL9(Mig), CXCL10	-	+++	+++	-
CXCL12	++	+++	+++	++
CXCL15	-	-	-	+++
XCL1(Lptn)	-	++	++	-

＋の数が多い程、各種細胞に対する遊走活性が強いことを示す。

5-5）本研究の目的

本研究は、遺伝子改変が容易な ES 細胞の特色を生かして、モデル抗原(OVA)とケモカイン(SLC, Lptn, あるいは Mig)を共に発現したマウス遺伝子改変 ES-DC を樹立し、抗腫瘍免疫の誘導に応用できるか否かを検証することを目的とする。また遺伝子導入した 3 種類のケモカインのうち、どのケモカインが抗腫瘍免疫応答を高めるのに有用であるかを比較検討した。

6　実験方法

6-1）マウス

CBA と C57BL/6 マウスは CLEA または Charles River Breeding Laboratories より購入し、SPF (specific pathogen free condition)環境にて飼育された。本研究に用いた ES 細胞 TT2 が CBA マウスと C57BL6 マウスの F1 マウスに由来するため、オスの CBA マウスとメスの C57BL/6 マウスをかけ合わせ、CBA x C57BL6 F1 マウス(CBF1)を作製した。全ての実験は 6-8 週齢の CBF1 マウスを使用した。

6-2）使用した細胞

ES 細胞 cell line である TT2 は CBA x C57BL6 F1 マウス(CBF1)由来の blastocyst(35)であり、過去の報告(36)のように培養した。T 細胞ハイブリドーマである RF33.70 は K^b 拘束性に OVA ペプチドの 257-264 を認識し IL-2 を産生する細胞(37)であり、OP9 は M-CSF の欠損した骨髄ストロマ細胞(38)である。MO4 は pAc-neo-OVA ベクター(39)を遺伝子導入された C57BL/6 由来の B16 メラノーマ細胞である（40)。

6-3）ペプチド、サイトカイン/ケモカイン、抗ケモカイン抗体

K^b に結合するペプチドである $OVA_{257-264}$, SIINFEKL は自動ペプチド合成機(島津社製)を用いて F-MOC 法により合成し、HPLC にて精製した。組み換えマウス GM-CSF はキリンビール株式会社より供与を受けた。組み換えマウス SLC, Mig, Lptn は DAKO JAPAN より購入した。ヤギ抗マウス SLC 抗体とヤギ抗マウス Mig 抗体、ビオチン化ヤギ抗マウス SLC 抗体、ビオチン化ヤギ抗マウス Mig 抗体も DAKO JAPAN より購入した。ウサギ抗マウス Lptn 抗体は eBioscience より購入し、MiniBiotin-XX protein Labeling kit(Molecular Probe 社製)にてビオチン化した。

6-4）マウス ES 細胞由来の樹状細胞(ES-DC)の作製

マウス ES 細胞(TT2 細胞株、CBA×C57BL/6（CBF1)マウス由来)から以下のようにして DC を誘導した(図 6)（41)。まず、ES 細胞を骨髄ストロマ細胞（OP9）とともに 5 日間培養する。次に、分化した ES 細胞由来の細胞を回収し、さらに 5 日間 GM-CSF の存在下で OP9 とともに培養する。その後、細胞を GM-CSF の存在下にストロマ細胞非存在下の細菌培養用デッシュ中でさらに 7-10 日間培養を続けると、DC 様の形態（図 7）を有し、生理的な DC と同様の細胞表面分子（図 8）を発現する細胞が出現する。このようにして誘導した ES-DC は、マウスの骨髄細胞由来の DC（BM-DC)と同様の、一次混合リンパ球反応（MLR）刺激活性をもっていた。さらに蛋白抗原を取り込み、プロセシングした後に、I-A^b 拘束性に T 細胞に抗原を提示できた(41)。以後の実験には細菌培養用デッシュ中で 14 日間培養して得られた ES-DC を使用した。

図 6

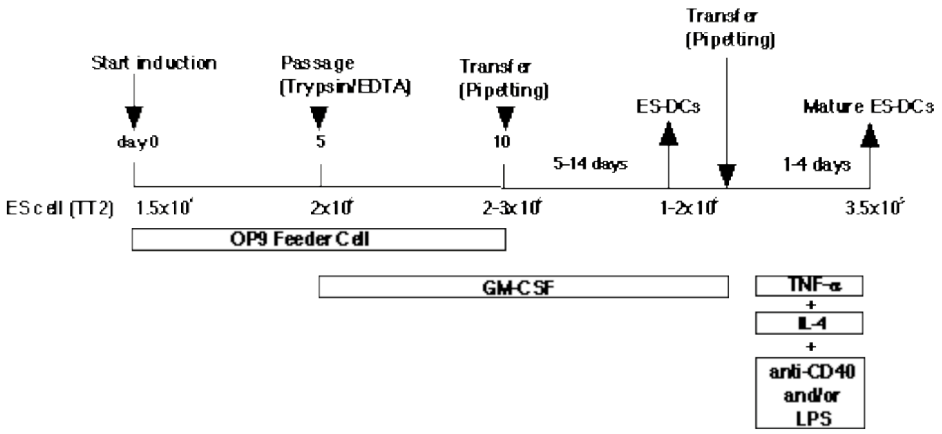

図 6　ES 細胞から樹状細胞を分化誘導するための in vitro 培養法

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

図 7

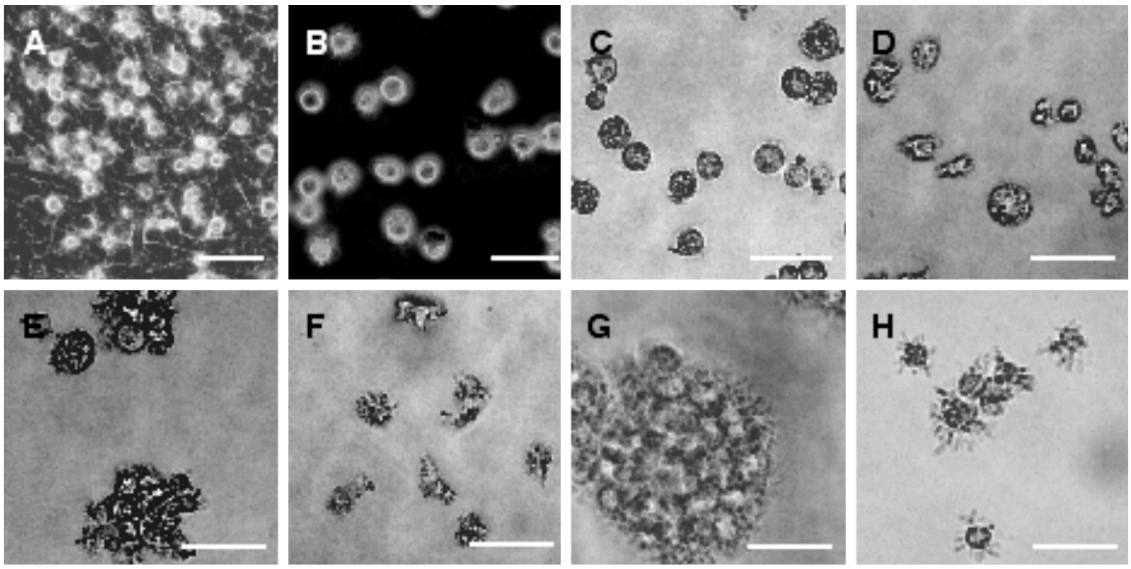

図 7　ES-DC の形態

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

図 8

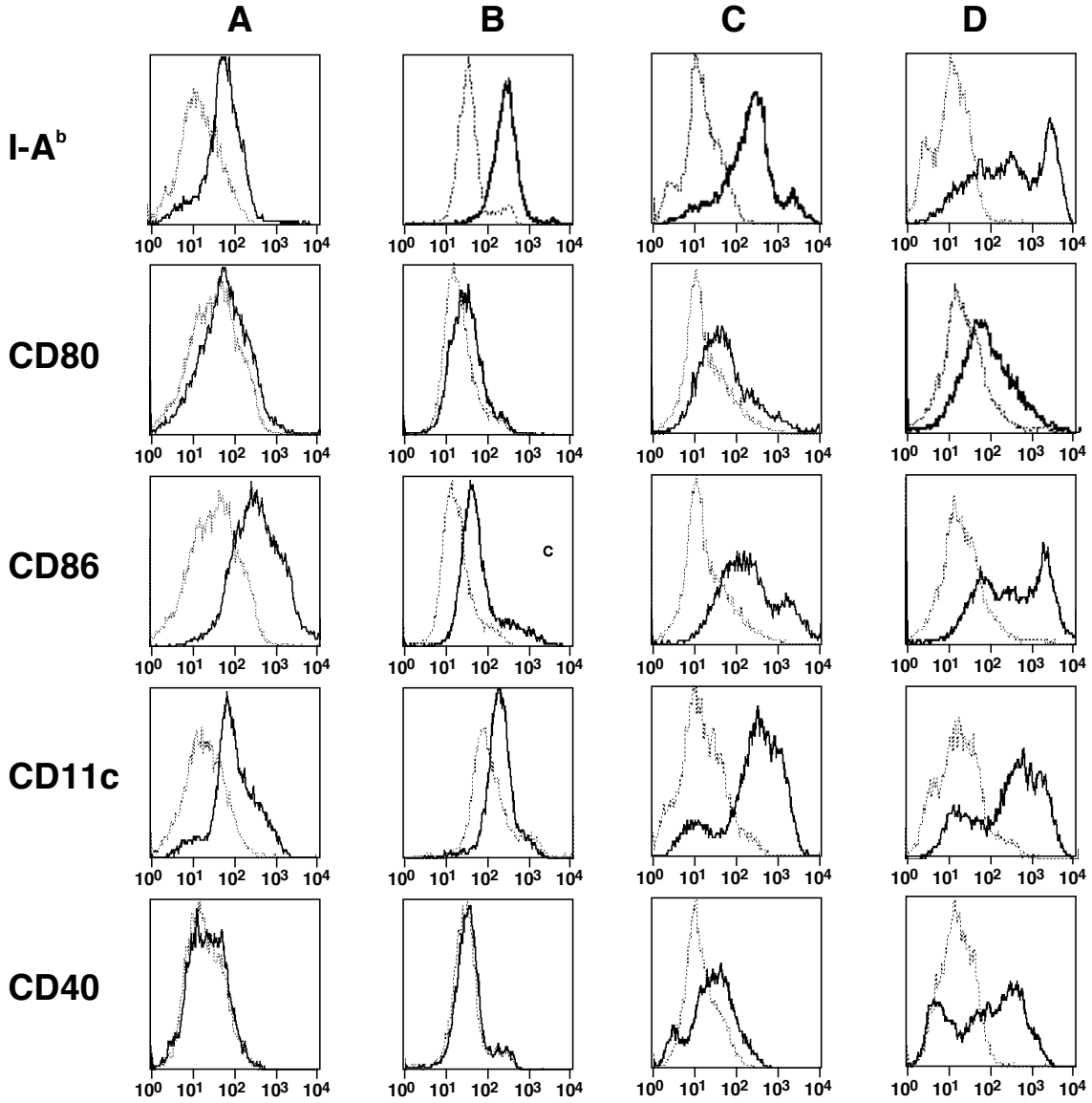

図 8　ES-DC と BM-DC の表面マーカー

培養開始から 17 日目（A)、26 日目（B）の ES-DC。マウス骨髄細胞を 10 日間 GM-CSF 存在下に培養した BM-DC（C)、さらに TNF-α(5ng/ml)を加え 20 時間培養した細胞（D)。太線は特異抗体にて染色したもの、破線はコントロール抗体（正常マウス IgG)にて染色したものを示す。

6-5）ケモカイン遺伝子発現の cDNA アレイによる解析

BM-DC は CBF1 マウスの骨髄細胞から過去の報告(42, 43)に基づいて作製した。Total RNA は骨髄細胞を細菌培養用デッシュ中で 12 日間培養して得られた BM-DC からと、同デッシュで 14 日間培養して得られた ES-DC から RNeasy mini kit(Qiagen, Studio City, CA)を用いて採取した。それぞれのサンプルの Total RNA(3μg)は Promega 社製の Moloney murine leukemiavirus reverse transctiptase を用いて[α-^{32}P]存在下に各 cDNA を合成した。得られた cDNA プローブは Super Array 社製の各種ケモカイン cDNA がスポットしてある GEArray メンブレンとハイブリダイズされた。ハイブリダイズされたプローブからの放射性シグナルの強度は富士フィルム社の BAS-2000 によって解析された。それぞれのケモカイン遺伝子発現のシグナルは同じメンブレン上のβ-アクチンからのシグナルにて標準化した。そして以下の arbitrary unit にて示した。Chemokine mRNA arbitrary units= (chemokine signal- back ground signal)/(β-actin signal- back ground signal) (44)。

6-6）プラスミドの作製

OVA をコードした cDNA 断片を、β-アクチンプロモーターと IRES-puromycin N-acetyltransferase を含む pCAG-IP(45) ベクターに組み込み、pCAG-OVA-IP ベクターを作製した。pCAGGS-IRES-neo-R ベクターを作製するために、IRES-neomycin-resistant(neo-R)を哺乳類での発現ベクターである pCAGGS(46)に組み込んだ。ケモカインタンパクをコードしている cDNA 断片は pCAGGS-IRES-neo-R ベクターに組み込んだ。SLC cDNA は RNA の供給源としてマウス脾臓細胞を用いて RT-PCR を行った。そのプライマーは、AACCCTCTAGCCCGCCGCCACCATGGCTCAGA GATGACTCT(forward)と AACCCGGATCCAGGCGGGCTACTACTGGGCTATCC(reverse)。Mig cDNA は RNA の供給源として IFN-γにて 24 時間刺激したマウス脾臓細胞を用いて RT-PCR を行った。そのプライマーは、AACCCTCTAGACCCGCCGCCACCATGAAGTCCGCTGTTCTTTTCC (forward)と AACCCGGATCCAGGGTGCTTGTTGGTAAAG (reverse)。Lptn cDNA は RNA の供給源として 24 時間 PMA と A23187 にて刺激した

マウス脾臓細胞を用いて RT-PCR を行った。そのプライマーは、AACCCTCTAGACCCGCCGCCACCATGAGACTTCTCCTCCTGAC (forward)と AACCCGGATCCCTGGAGGCTGTTACCCAGTC(reverse)。プライマーは Kozak sequence(47)の下流にケモカイン cDNA が配置されるように設計した。PCR 産物は Promega 社の pGEM-T easy ベクターに組み込み、塩基配列を確認した上で発現ベクターに組み込んだ。

6-7）OVA とケモカインを共発現する ES-DC の作製

OVA を遺伝子導入した ES 細胞クローンを得るために、TT2 ES 細胞に電気穿孔法により pCAG-OVA-IP を遺伝子を導入した。そして puromycin により薬剤選択を行った(41)。OVA が遺伝子導入された ES 細胞クローンは ES-DC へと分化誘導され、その RF33.70（OVA に反応する T 細胞ハイブリドーマ）に対する刺激活性に基づいて、OVA を最も発現しているクローン(ES-OVA)が決定された。この ES 細胞クローンに 3 種類のケモカイン発現ベクターのうちいずれか一つ、または pCAGGS-IRES-neo-R(mock)ベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入された ES 細胞は neo-R PEF 上で培養され、G418(500μg/ml)にて薬剤選択された。puromycin, G418 に対して共に耐性を獲得したクローンを各ケモカインごとに１２個選別し、DC へ分化誘導した。各クローン由来の DC ごとに細胞上清を回収し、ELISA にてケモカイン（SLC, Mig あるいは Lptn）の分泌量を測定した(48)。最もケモカインの分泌量の多いクローンを各ケモカインごとに選別し、OVA とケモカイン（SLC, Mig あるいは Lptn）を共発現する ES クローンとした。これらのクローンを DC へ分化させ、以後の実験に使用した。

6-8）T 細胞ハイブリドーマを用いた OVA ペプチド-K^b 複合体の検出

刺激細胞として様々な数の ES-DC を、96 穴の平底プレート中に反応細胞としての RF33.70(5 x 10^4 cells/well)と共に最終的 200μl/well になるように播種した。24 時間培養後、その上清 50μl を回収し、IL-2 依存性に増殖する CTLL-20(5 x 10^3 cells/100μl /well)と共培養した。16 時間後、[^{3}H]-thymidine(248MBq/mmol)を加えた(37.5KBq/well)。さらに 8 時間

培養し、CTLL-20 による[^{3}H]-thymidine の取り込み量をシンチレーションカウンターにて測定した。

6-9）ES-DC の in vitro における生存

細菌培養用デッシュ中にて 14 日培養した ES-DC を回収し、さらに新たな同デッシュ中にて培養した(1.2 x 10^5 cells/90 mm dish)。7 日後、細胞を回収しトリパンブルーにて染色し、生細胞を測定した。回収された細胞は propidium iodine(10μg/ml)にても染色され、フローサイトメーターにて死細胞数を定量した。

6-10）in vivo における DC の遊走能の測定

無血清培地中の 1μMCFSE (Molecular Probe 社製)にて DC(2 x 10^6)を 37℃で 10 分間ラベルした後、CBF1 マウスに腹腔内に投与した。40 時間後、脾臓の 5μm の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下または H&E 染色下にて DC を観察した。^{111}In にてラベルされた DC(1 x 10^6)はマウスの腹腔内に投与された。40 時間後に諸臓器は単離され、臓器別の放射能活性をガンマカウンターにて測定した(23, 26)。組織の 0.1g 中に、投与した放射能のうちどの程度含まれているかを測定し、各臓器ごとの放射能量をその重量にて補正した。

6-11）in vitro における OVA 特異的 CTL の誘導と細胞傷害活性

ES-DC(4 x 10^5/well)または BM-DC(4 x 10^5/well)を、未刺激の CBF1 マウスの脾臓細胞からナイロンウールカラムにて分離した T 細胞(2.5 x 10^6/well) と 24well プレートにて 10%FCS RPMI1640 中で培養した。ある実験では ES-DC を 70℃で 20 分間熱処理した。BM-DC は過去の報告(42)に基づき作製され、OVA ペプチド(10μM)を 4 時間パルスした。2 回 wash の後、刺激細胞として使用した。培養 5 日後、細胞を回収しエフェクター細胞とした。OVA ペプチドをパルスした EL-4 (H2-k^b)を標的細胞として、細胞傷害活性測定を測定した (41)。

6-12）in vivo における OVA 特異的 CTL の誘導

遺伝子改変を行った ES-DC(生きた状態または、前述の熱処理を行った状態)または OVA タンパク 50μg を 7 日毎に 2 回、マウスの腹腔内投与した。2 回目の投与から 7 日後に、マウスより脾臓を摘出した。脾臓細胞は vitro にて OVA ペプチド(0.1μM)存在下に 5 日間培養し、OVA 特異的 CTL 活性を前述のように測定した(41)。

6-13）腫瘍増殖抑制実験

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

6-14）in vivo における $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞の除去

マウスに 3×10^3 個の ES-DC-OVA/mock または ES-DC-OVA/SLC を 7 日毎に 2 回、腹腔内投与した。2 回目の投与から 7 日後に 3×10^6 個の MO4 を皮下移植した(Day0)。マウスは合計 6 回(Day-18, -15, -11, -8, -4, -1)、ハイブリドーマを腹腔内にて増殖させたヌードマウス由来の腹水(0.1ml/回)を腹腔内に投与した。ここで使用したモノクローナル抗体はラット抗マウス CD4(clone GK1.5)抗体とラット抗マウス CD8(clone 2.43)抗体である。ラット IgG(Sigma-Aldrich 社製、200μg/回)をコントロールとして使用した。モノクローナル抗体による T 細胞 subset の除去は脾臓細胞のフローサイトメトリーにより評価したところ、各モノクローナル抗体にて 90%以上の陽性細胞が除去されていた。腫瘍サイズの測定は腫瘍皮下移植から 15 日目に行った。結果は Tumor index+SD として示した。各群ともに 8 匹のマウスを用いて検討した。

6 －15）腫瘍組織の組織学的解析

腫瘍塊は摘出の後、Miles 社製の Tissue-Tek OCT コンパウンドに浸し、凍結させた。Cryostat を用いて 5μm の凍結切片を作製し、CD4 または CD8 特異的モノクローナル抗体(PharMingen 社製)と Nichirei 社製の N-histofine Simple Stain Mouse MAX PO を用いて免疫組織染色を行った。

6 －16）統計学的解析

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

7　実験結果

7－1）ES-DC におけるケモカインの発現パターン

我々はマウス ES 細胞から DC を分化誘導する方法を最近報告(41)しており、このES-DCはBM-DCと同等のT細胞を刺激する能力を持っている(41)。この研究を開始する前に ES-DC におけるケモカインの発現パターンを確認した。我々は cDNA マクロアレイハイブリダイゼーション解析により、ES-DC と BM-DC とのケモカイン mRNA の発現パターンを比較した。DC 由来のケモカインと T 細胞を遊走させるケモカインの発現を図 9 に示す。本解析により ES-DC と BM-DC での発現パターンは幾分か異なっていた。しかし、両者とも C10 を発現していたが、SLC, Lptn, Mig, stromal cell-derived factor 1αのような T 細胞を遊走させるケモカインの発現はわずかであった。我々はそこで T 細胞を遊走させるケモカイン(SLC, Lptn, Mig)を DC に発現させるような遺伝子改変をおこない in vivo に投与すれば、免疫応答を効果的に高めることができるのではないかと考えた。

図 9

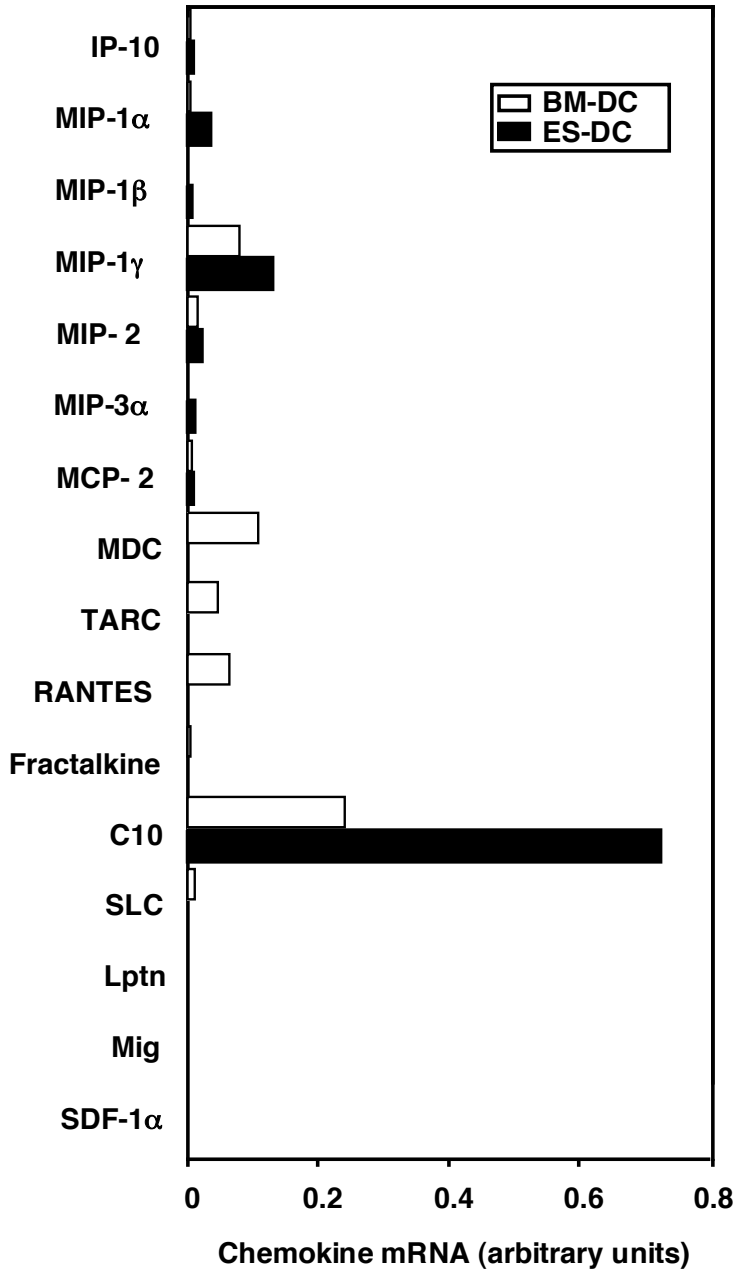

図 9　ES-DC と BM-DC におけるケモカイン遺伝子の発現

ES-DC と BM-DC から得られた cDNA を放射能でラベルし、ケモカイン遺伝子特異的な 44 個の cDNA がスポットしてあるナイロンメンブレンとハイブリダイズした。ハイブリダイズしたシグナルは同じメンブレン上のβ-アクチン由来のシグナルにて標準化した。DC の産生するケモカインとＴ細胞遊走活性をもつケモカインについてのデーターを示す。

7－2）抗原タンパクと共にケモカインを発現させた ES-DC の作製

β-アクチンプロモーターにより発現を調整され、IRES-drug-resistant marker gene を持つベクター（図１０A, B）を用いて、DC に分化誘導させた後も目的遺伝子を発現させることのできる遺伝子導入 ES 細胞クローンを作製することができた(41)。このシステムを用いて、まず DC に分化誘導させた後も OVA を高発現している ES 細胞クローンを作製した。引き続き OVA を高発現している ES 細胞クローン(ES-OVA)にケモカイン発現ベクターまたはmockベクターを遺伝子導入した。具体的には、3種類(SLC, Lptn, あるいは Mig)のうち一つのケモカインまたは neo-R 遺伝子のみ(mock)を遺伝子導入した ES クローンを選択し、これらから 4 種類の ES-DC(OVA とケモカインを発現した ES-DC または OVA のみを発現した ES-DC)を分化誘導した（図１０C)。これらを ES-DC-OVA/SLC, ES-DC-OVA/Lptn, ES-DC-OVA/Mig, ES-DC-OVA/mock と名付けた。つまりこの研究で使用した 2 つの遺伝子を導入した 4 種類の ES 細胞クローンは、全て OVA を遺伝子導入した同じ ES 細胞クローン由来である。

我々はこれら 4 種類の ES 細胞クローンから DC を作製することができた。そしてこれらの ES-DC の、K^b 拘束性に $OVA_{257-264}$ を認識する T 細胞ハイブリドーマである RF33.70 に対する刺激活性を比較した。図１１A に示すように、ES-DC-OVA/SLC, ES-DC-OVA/Lptn, ES-DC-OVA/Mig, ES-DC-OVA/mock, ES-DC-OVA(OVA のみを遺伝子導入した ES 細胞クローン由来の ES-DC)とも同程度に RF33.70 を刺激活性した。

本研究にて使用したケモカイン遺伝子を導入した 3 種類の ES-DC が培養上清中に産生したケモカインの量を図１１B-D に示した。遺伝子導入を行った ES 細胞と分化誘導を行った ES-DC は、その遺伝子導入を行ったケモカインを産生していた。またそのタンパク産生量は 3 種類とも同程度であった。ケモカインと OVA の遺伝子導入を行った ES-DC の形態と表面マーカーは、ES-DC-TT2(親株の TT2 ES 細胞由来の DC)のそれと同程度であった（図１２)。このことから、遺伝子導入によって本来 DC の持つ特徴に大きな変化が生じていることはないことが明らかとなった。

図 10

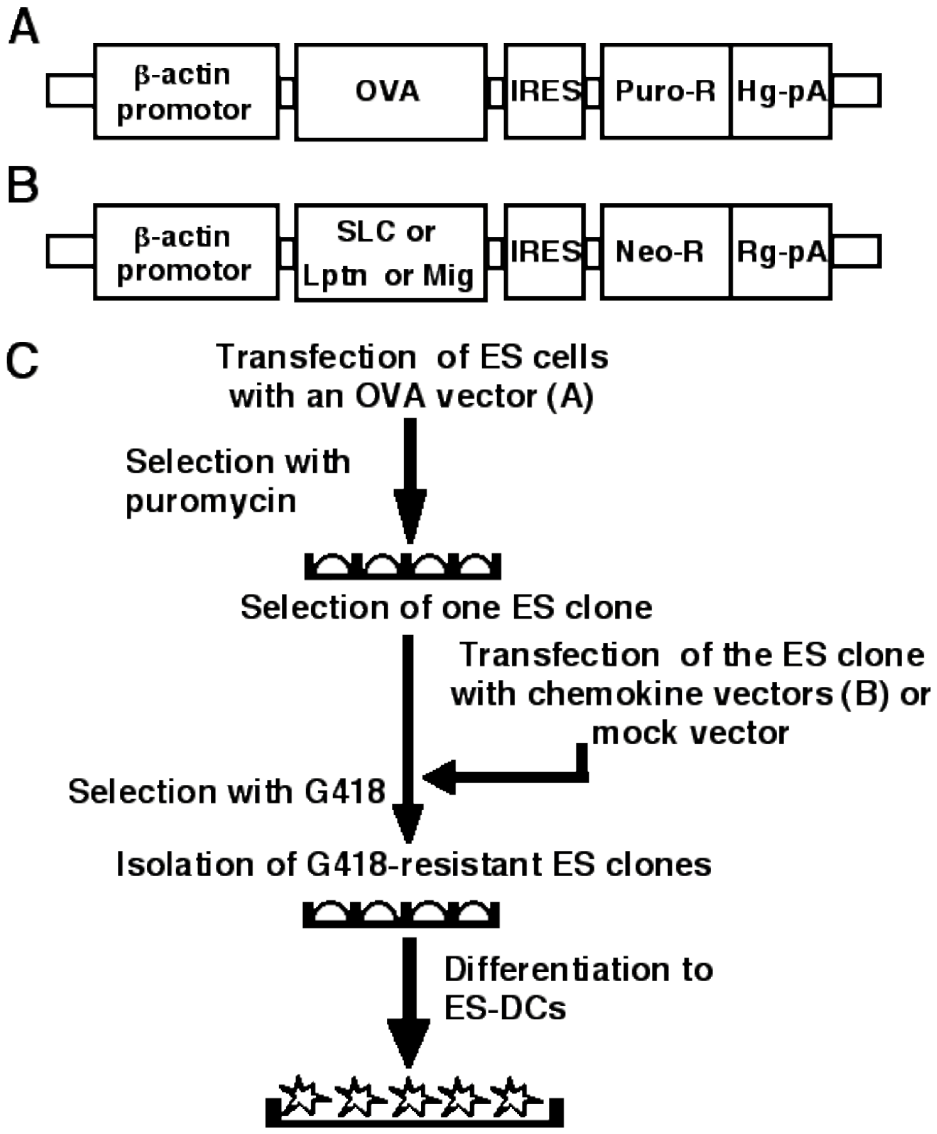

図 10　OVA と共にケモカインを発現する ES-DC の作製

pCAG-OVA-IP(OVA の発現ベクター) (A)と pCAGGS-chemokine-IRES-neo-R(ケモカインの発現ベクター) (B)の構造を示す。TT2 ES 細胞に pCAG-OVA-IP (A)をまず遺伝子導入した。puromycin 耐性の ES 細胞のコロニーを選別し、DC へと分化誘導した。RF33.70 に対する刺激活性を見て、OVA を最も発現しているクローンを選別した。このクローンに pCAGGS-chemokine-IRES-neo-R (B)または mock ベクターを遺伝子導入した。G418 耐性の ES 細胞のコロニーを選別して、DC へと分化誘導した。培養上清中の各ケモカイン濃度を ELISA にて測定し、ケモカイン高発現クローンを選別した。

図 11

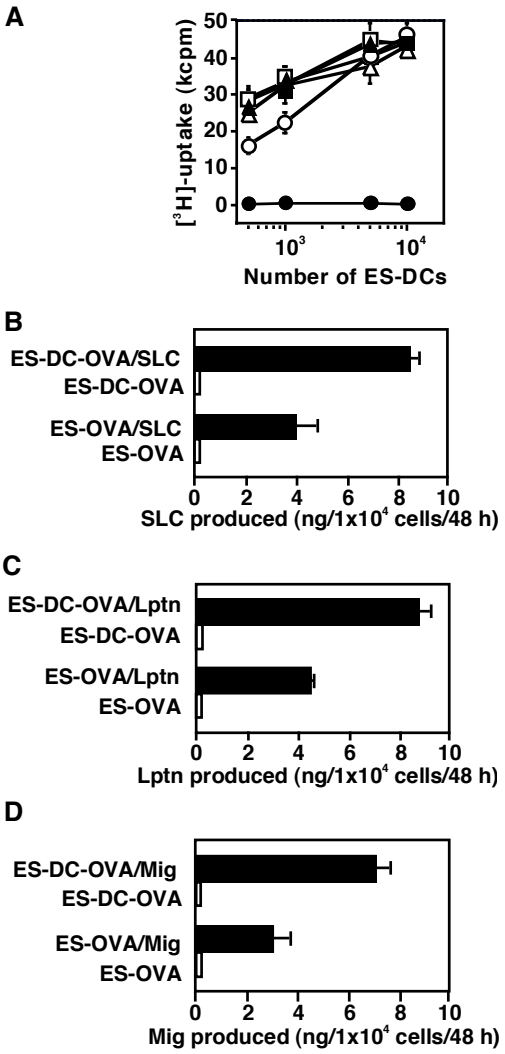

図 11　遺伝子改変を行った ES-DC の OVA 特異的 T 細胞ハイブリドーマに対する刺激活性とケモカインの産生

K^b 拘束性に $OVA_{257-264}$ を認識する T 細胞ハイブリドーマである RF33.70 に対する ES-DC の刺激活性を比較した（A)。ES-DC-OVA/SLC（▲），ES-DC-OVA/Lptn（△），ES-DC-OVA/Mig（○），ES-DC-OVA/mock（□），ES-DC-OVA(OVA のみを遺伝子導入した ES 細胞クローン由来の ES-DC)（■）とも同程度に効果的な RF33.70 を刺激活性を有していた。陰性対照である ES-DC-TT2（●）は刺激活性を示さなかった。ケモカイン遺伝子が導入された 3 種類の ES-DC による細胞上清中ケモカインの産生量を(B-D)に示した。ケモカイン遺伝子導入を行った ES 細胞と分化誘導を行った ES-DC は、ともに当該ケモカインを産生していた。またそのタンパク量は 3 種類とも同程度であった。

図 12

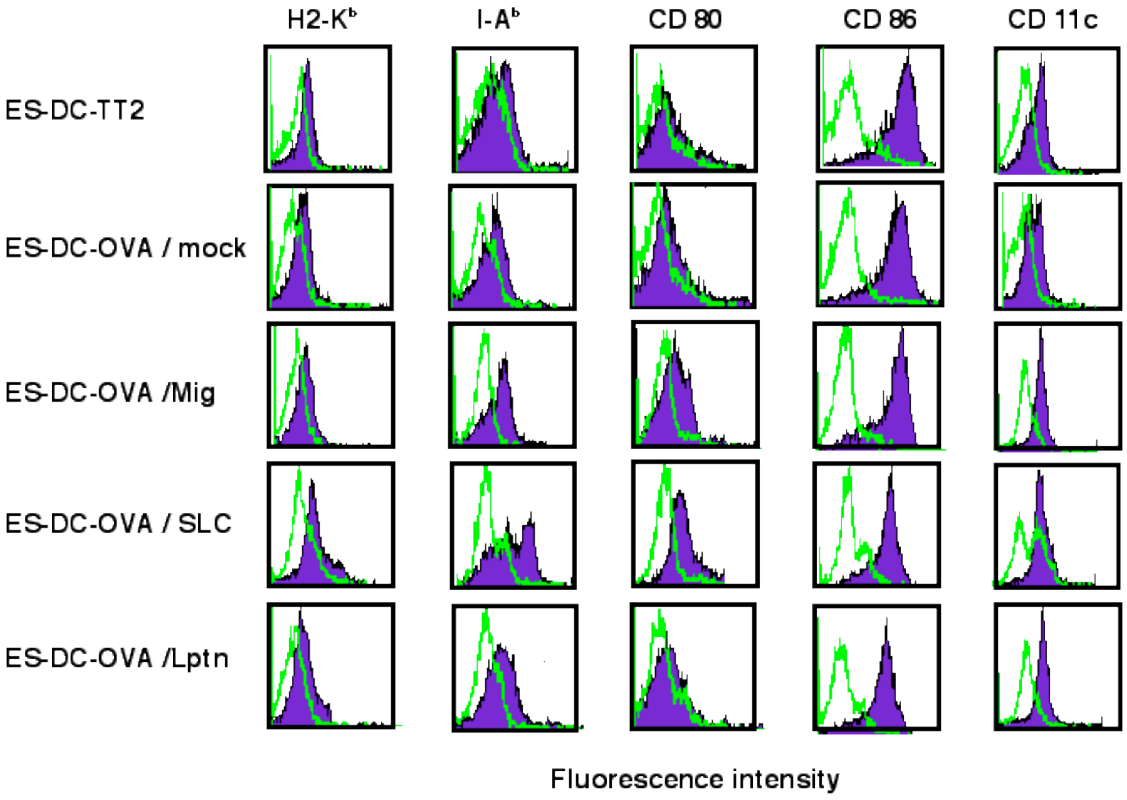

図 12　遺伝子改変を行った ES-DC の表面マーカー

ケモカインと OVA の遺伝子導入を行った ES-DC の表面マーカーは、ES-DC-OVA/SLC にて I-A^b の発現がやや高い傾向にあったが、その他の H2-K^b, CD80, CD86, CD11c の発現は ES-DC-TT2(親株の TT2 ES 細胞由来の DC)と同程度であった。

7－3）in vivo における ES-DC の遊走活性

in vivo における ES-DC の遊走能を調べるために、我々は腹腔内に投与された ES-DC が脾臓に遊走できるか否かを調べた。さらに ES-DC に SLC を発現させることにより、in vivo における ES-DC の遊走能に変化がでないかどうかを調べた。パネル A-F に示すように CFSE にてラベルされた ES-DC-OVA, ES-DC-OVA/SLC と BM-DC は同程度に脾臓に遊走し、大部分が白脾髄とその周辺部位に位置していた(図１３ B, D, F)。

さらに ^{111}In でラベルした DC を腹腔内に投与した後、どのような臓器に分布するかを調べた。パネル G に示してあるように腹腔内投与 40 時間後、ES-DC と BM-DC は共に脾臓と腸間膜 LN に集積していた。また ES-DC に発現させた SLC は、DC の遊走パターンに影響を与えなかった。

つまり ES-DC のリンパ組織への遊走能は BM-DC とほぼ同様であり、ES-DC-OVA/SLC によって分泌されている SLC は、そのリンパ組織への遊走能を障害することはなかった。

図 13

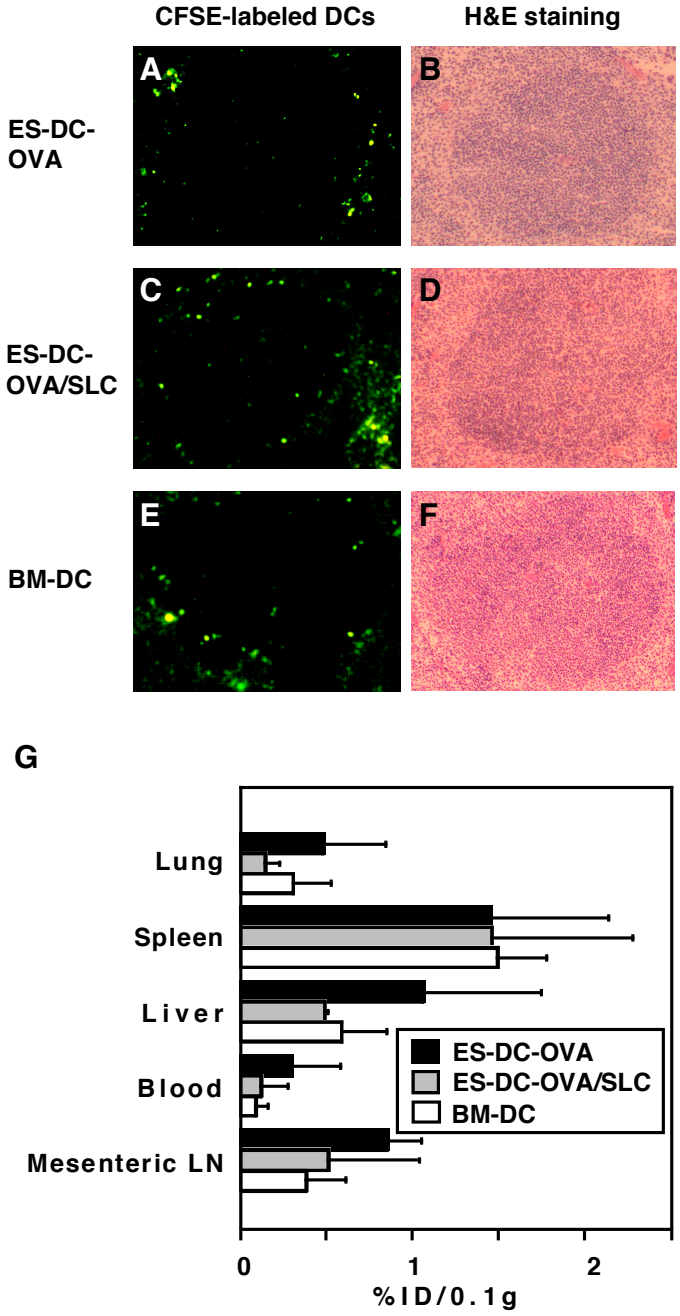

図 13　in vivo における ES-DC の遊走能

CFSE にてラベルされた ES-DC-OVA, ES-DC-OVA/SLC と BM-DC は同程度に脾臓に遊走（A-F）し、大部分が白脾髄とその周辺に位置していた（ B, D, F)。さらに ^{111}In でラベルした上記 DC を腹腔内に投与した。40 時間後、ES-DC と BM-DC は、共に脾臓と腸間膜 LN に主に集積していた。また ES-DC に発現させた SLC は、DC の遊走パターンに影響を与えなかった（G)。

7-4）in vitro および in vivo における遺伝子改変 ES-DC による抗原特異的 CTL の誘導

我々は ES-DC-OVA が in vitro にて OVA 特異的 CTL を誘導できるか否かを検討した。ES-DC-TT2, ES-DC-OVA, 熱処理をおこなった ES-DC-OVA, OVA ペプチドをパルスした BM-DC を、未刺激の CBF1 マウスの脾臓由来の T 細胞と共培養した。5 日後、細胞を回収して、OVA ペプチドを前もってパルスされた EL-4(H-2K^{b})を傷害できるかを調べることで、OVA 特異的 CTL 活性を評価した。図１４A に示す結果は、OVA 特異的 CTL が vitro にて健常 ES-DC-OVA では誘導されるが、ES-DC-TT2, OVA ペプチドパルス BM-DC,熱処理をおこなった ES-DC-OVA では誘導されなかった。OVA ペプチドをパルスした BM-DC は、IL-2 存在下のみにて OVA 特異的 CTL の誘導が可能であった。一方、IL-2 の有無に関わらず、ES-DC-OVA は OVA 特異的 CTL を誘導した。

次に in vivo において ES-DC-OVA が、OVA 特異的 CTL を誘導できるか否かを検討した。 ES-DC-OVA (2x10^{4} 個), 熱処理をおこなった ES-DC-OVA (2x10^{4}個), OVA タンパク(50μg)を 1 週間毎に 2 回 CBF1 マウスの腹腔内に投与した。免疫終了から 1 週間後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を OVA ペプチドの存在下に in vitro にて培養を行った。5 日後、細胞は回収され OVA ペプチドを前もってパルスされた EL-4(H-2K^{b})を傷害できるかを調べた。熱処理をおこなった ES-DC-OVA や OVA タンパクではなく、ES-DC-OVA にてマウスを免疫した場合のみ、OVA 特異的 CTL を vivo で誘導できた（図１４B)。以上より抗原遺伝子を発現する ES-DC を用いて、in vitro および in vivo において、抗原特異的な CTL を誘導できることが明らかとなった。CTL が熱処理をおこなった ES-DC-OVA や OVA タンパクによって誘導されなかったことを考慮すると、OVA タンパクを発現している ES-DC や OVA タンパクを貪食した内因性の DC が CTL 誘導の主要な役割を果たしている可能性はほとんどないと考えられた。

図 14

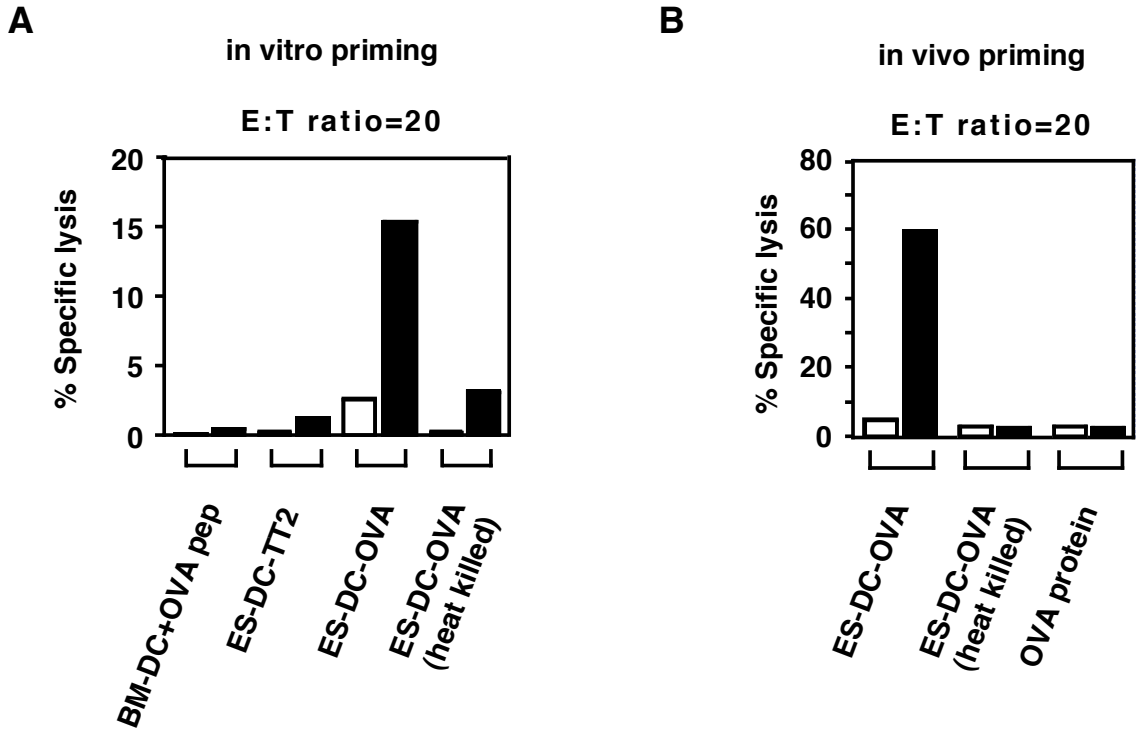

図 14　遺伝子改変を行った ES-DC による OVA 特異的 CTL の誘導

ES-DC-TT2, ES-DC-OVA, 熱処理をおこなった ES-DC-OVA, OVA ペプチドをパルスした BM-DC を、未刺激の CBF1 マウスの脾臓由来の T 細胞と共培養した。5 日後、細胞を回収し、OVA ペプチドを前もってパルスされた EL-4 を傷害できるか否かを調べ、OVA 特異的 CTL 活性を評価した。OVA ペプチドをパルスされていない EL-4 細胞（□）、ならびにパルスされた EL-4 細胞（■）に対する細胞傷害活性を示した。OVA 特異的 CTL は in vitro にて健常 ES-DC-OVA では誘導されるが、ES-DC-TT2, OVA ペプチドパルス BM-DC, 熱処理をおこなった ES-DC-OVA では誘導されなかった（A)。

次に in vivo において ES-DC-OVA が、OVA 特異的 CTL を誘導できるか否かを検討した。ES-DC-OVA (2x10^{4}個), 熱処理をおこなった ES-DC-OVA (2x10^{4}個), OVA タンパク(50μg)を 1 週間毎に 2 回 CBF1 マウスの腹腔内に投与した。免疫終了から 1 週間後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を OVA ペプチドの存在下に in vitro にて培養を行った。5 日後、細胞を回収して OVA ペプチドを前もってパルスされた EL-4 に対する細胞傷害活性を調べ、OVA 特異的 CTL 活性を評価した。ペプチドをパルスした EL-4（□）、あるいはペプチドをパルスされていない EL-4（■）に対する細胞傷害活性を示す。熱処理をおこなった ES-DC-OVA や OVA タンパクではなく、ES-DC-OVA にてマウスを免疫した場合にのみ、OVA 特異的 CTL を in vivo で誘導できた（B)。

7-5）OVA とケモカインを発現する ES-DC による効率よい OVA 特異的 CTL の誘導

我々は OVA と共に Mig を発現させるような遺伝子改変を行った ES-DC が in vivo において OVA 特異的な CTL の誘導ができるか否かを調べた。様々な数の ES-DC-OVA または ES-DC-OVA/Mig を 7 日ごとに 2 回マウスの腹腔内に投与した。2 回目の投与から 7 日後にマウスの脾臓は摘出して、OVA ペプチド存在下に in vitro にて培養した。5 日後に細胞を回収し、前もって OVA ペプチドをパルスされた EL-4 細胞に対する細胞傷害活性を測定した（図１５）。$5x10^4$ 個または $3x10^4$ 個の DC がマウスに投与された場合、OVA 特異的な CTL 活性は ES-DC-OVA を投与した場合、ES-DC-OVA/Mig を投与した場合とも同程度であった。対照的に $1x10^4$ 個の DC が 2 回投与された場合、ES-DC-OVA/Mig は ES-DC-OVA よりも効率良く CTL を誘導することができた。我々が報告(41)しているように、ES -DC-TT2 を $5x10^5$ 個で 2 回投与した場合でも、OVA 特異的 CTL が誘導されることななかった。

我々は、Mig の有効性が認められた比較的少量の DC を投与した条件にて、3 種類のケモカインについて in vivo での CTL 誘導にどのような効果を示すかを比較検討した。まず $5x10^3$ 個の DC をマウスに 2 回投与した場合、OVA を発現している全ての遺伝子改変 ES-DC は、何れも in vivo において OVA 特異的 CTL を誘導することができた。またケモカインを共発現させることにより、その効果は増強された（図１６A）。次に $3x10^3$ 個の DC を 2 回マウスに投与した場合、OVA のみを発現した ES-DC では OVA 特異的 CTL を誘導することができず、ケモカインと OVA を共に発現した ES-DC のみが CTL を誘導することができた（図１６B）。

このような結果は DC に抗原と共にケモカインを発現させることにより in vivo において DC の CTL を誘導する能力を高めることが可能であることを示している。また図１６の結果は DC に SLC または Lptn を共発現させることにより、Mig を発現させるよりも in vivo においてより効率よく CTL を誘導できることを示している。

図 15

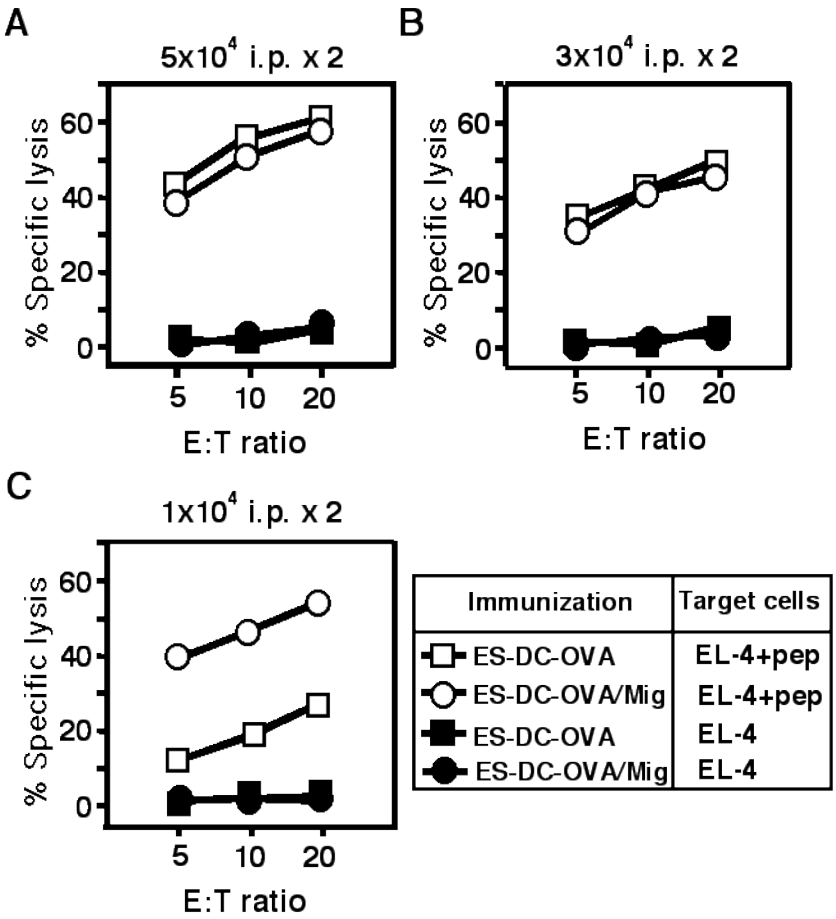

図１５　ES-DC-OVA/Mig を免疫したマウスにおける OVA 特異的 CTL の誘導

ES-DC-OVA または ES-DC-OVA/Mig を 7 日ごとに 2 回マウスの腹腔内に投与した。2 回目の投与から 7 日後にマウスの脾臓を摘出して、OVA ペプチド存在下に in vitro で培養した。5 日後に細胞を回収し、前もって OVA ペプチドをパルスされた EL-4 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。１回の投与あたり $5x10^4$ 個（A）または $3x10^4$ 個（A）の DC をマウスに投与した場合、OVA 特異的な CTL 活性は ES-DC-OVA を投与した場合、ES-DC-OVA/Mig を投与した場合とも同程度であった。対照的に $1x10^4$ 個（C）の DC を 2 回投与した場合、ES-DC-OVA/Mig は ES-DC-OVA よりも効率良く CTL を誘導することができた。

図 16

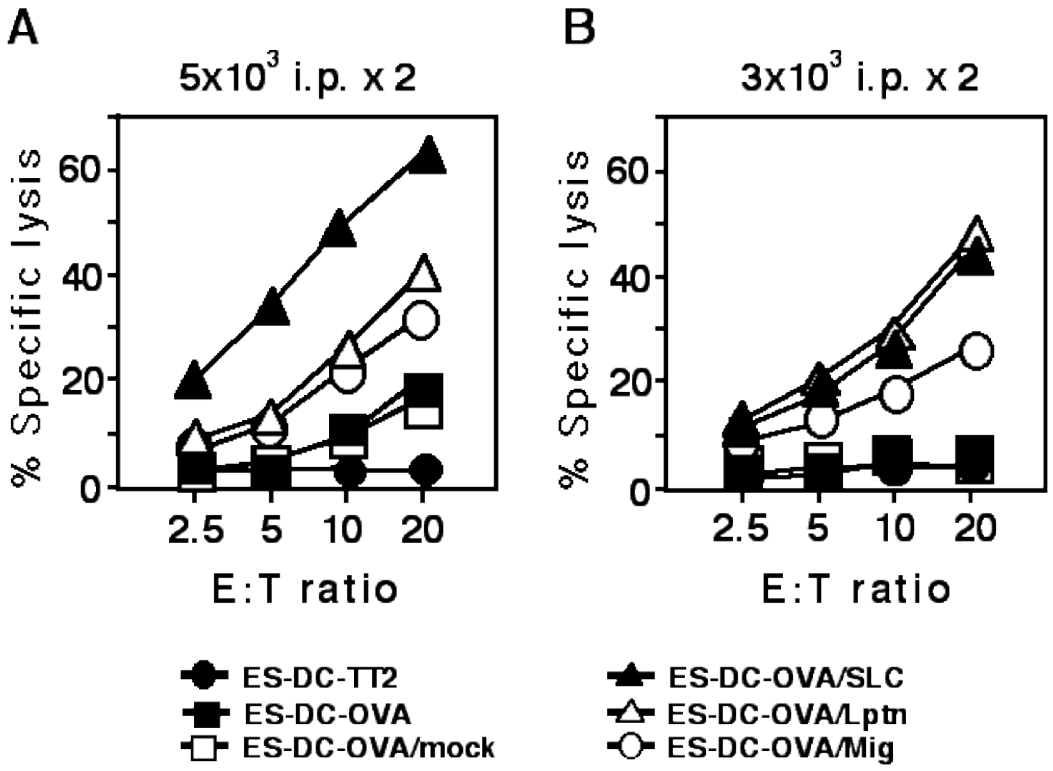

図１６　OVA とケモカインを共発現させた ES-DC による OVA 特異的 CTL の誘導

図に示す 6 種類の ES-DC（5x10^3 個）(A)または ES-DC（3x10^3 個）(B)を CBF1 マウスに 2 回免疫した。2 回目の免疫から 7 日後に脾臓細胞を回収し、IL-2 と OVA ペプチド存在下に 5 日間 in vitro にて培養した。得られた細胞が OVA ペプチドをパルスした標的細胞に対して示した細胞傷害活性を比較した。5x10^3 個の DC をマウスに 2 回投与した場合、OVA を発現している全ての遺伝子改変 ES-DC は、何れも in vivo において OVA 特異的 CTL を誘導することができた。またケモカインを共発現させることにより、その効果は増強した。次に 3x10^3 個の DC を 2 回マウスに投与した場合、OVA のみを発現した ES-DC では OVA 特異的 CTL を誘導することができず、ケモカインと OVA を共に発現した ES-DC のみ誘導することができた。さらに DC に SLC または Lptn を共発現させることにより、Mig を発現させるよりも in vivo においてより効率よく CTL を誘導できることを示している。

7-6）OVA とケモカインを発現する ES-DC による腫瘍増殖抑制効果

次に我々は、DC に OVA とケモカインを共発現させることにより、OVA を発現している腫瘍に対しての増殖抑制効果を高めることができるか否かを検証した。マウスを 7 日毎に 2 回、種々の ES-DC にて免疫した。2 回目の免疫から 7 日後にマウスの背部に $3x10^5$ 個の OVA を発現している B16 メラノーマである MO4 を皮下移植した。$3x10^3$ 個の ES-DC を免疫した場合、図１７A に示すように OVA のみを発現している ES-DC (ES-DC-OVA/mock) を免疫すると、ES-DC-TT2 を免疫した場合より有意に腫瘍の増殖を抑制した($P<0.01$)。なお、ES-DC-TT2 を免疫した場合、DC を投与しなかった場合と比較して何の効果も示さなかった（データーは示さず)。ES-DC-OVA/SLC を免疫すると、ES-DC-OVA/mock を免疫した場合より有意に腫瘍の増殖は抑制された($P<0.05$)。対照的に ES-DC-OVA/Mig または ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合の腫瘍増殖抑制効果は、ES-DC-OVA/mock による効果と同程度であった。図１７B に示すように、ES-DC-OVA/mock を免疫すると ES-DC-TT2 を免疫した場合と比較し、有意にマウスの生存率が延長された($P<0.05$)。ES-DC-OVA/SLC を免疫すると、さらに生存率を延長させることができたが、ES-DC-OVA/Mig または ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合は、ES-DC-OVA/mock と比較して付加的な効果は見られなかった。

$2x10^4$ 個の ES-DC を免疫した場合、図１７C に示すように OVA のみを発現している ES-DC (ES-DC-OVA/mock)を免疫すると、ES-DC-TT2 を免疫した場合より有意に腫瘍の増殖は抑制された($P<0.01$)。この条件下にて ES-DC-OVA/SLC または ES-DC-OVA/Mig を免疫すると、ES-DC-OVA/mock を免疫した場合より有意に腫瘍の増殖が抑制された($P<0.05$)。対照的に ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合の腫瘍増殖抑制効果は、ES-DC-OVA/mock による効果と同程度であった。図１７D に示すように、ES-DC-OVA/SLC を免疫すると ES-DC-OVA/mock を免疫した場合と比較して、有意にマウスの生存率が延長された($P<0.01$)。さらに ES-DC-OVA/Mig をて免疫した場合でも、ES-DC-OVA/SLC を免疫した場合ほどではないが、ES-DC-OVA/mock と比較して、有意に生存率を延長させることができた($P<0.05$)。ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合は、ES-DC-OVA/mock と同程度の生存率延長効果しか認められなかった。マウスを 2 回 $2x10^4$ 個の

ES-DC で免疫し、$3x10^6$ 個の MO4 を皮下移植した場合、3 種類のケモカインの中では ES-DC-OVA/SLC にて免疫した場合のみ ES-DC-OVA/mock と比較して、腫瘍増殖抑制およびマウス生存率延長効果が認められた(データーは示さず)。

まとめると ES-DC-OVA/SLC は、常に ES-DC-OVA/mock よりも有効であった。条件によっては ES-DC に Mig を発現させることにより、生存率を延長させることができた。我々が行った条件下では ES-DC-OVA/Lptn は ES-DC-OVA/mock 以上の効果を示すことはなかった。これらの結果は抗原タンパクと共に SLC を DC に発現させることが、抗原を発現している腫瘍に対する免疫応答を誘導することに関して最も有効であることを示すものである。

図 17

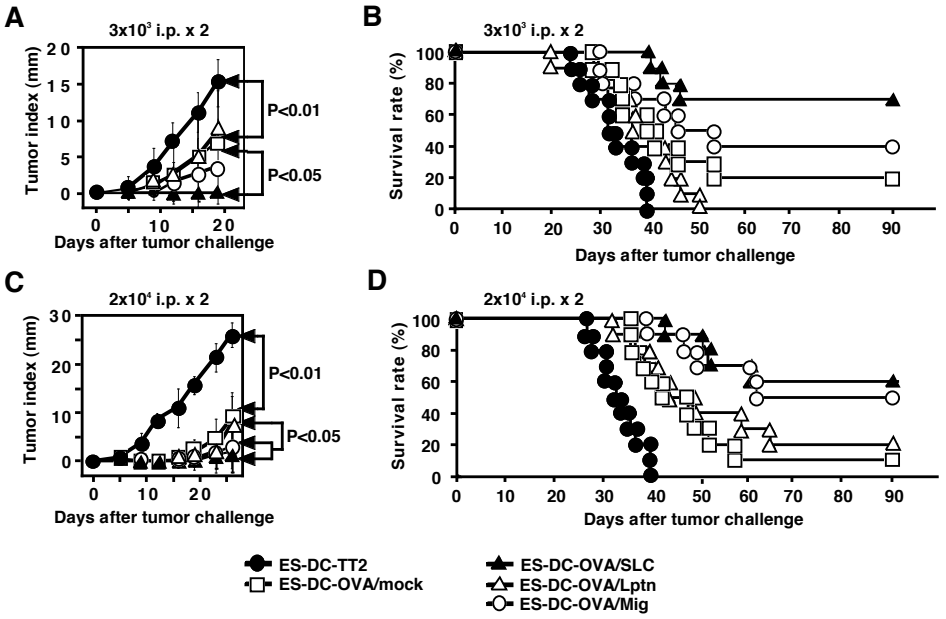

図１７　OVA とケモカインを発現した ES-DC による腫瘍増殖抑制とマウス生存期間の延長

マウスを 7 日毎に 2 回、種々の ES-DC にて免疫した。2 回目の免疫から 7 日後に $3x10^5$ 個の MO4 を皮下移植した。$3x10^3$ 個の ES-DC で免疫した場合、まず ES-DC-OVA/mock を免疫すると、ES-DC-TT2 より有意に腫瘍の増殖が抑制された(P<0.01)。ES-DC-OVA/SLC を免疫すると、ES-DC-OVA/mock より有意に腫瘍の増殖が抑制された(P<0.05)。対照的に ES-DC-OVA/Mig または ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合の腫瘍増殖抑制効果は ES-DC-OVA/mock による効果と同程度であった（A)。ES-DC-OVA/mock を免疫すると ES-DC-TT2 と比較し、有意にマウスの生存率が延長した(P<0.05)。ES-DC-OVA/SLC を免疫すると、さらに生存率を延長させることができた（B)。

$2x10^4$ 個の ES-DC で免疫した場合、ES-DC-OVA/mock を免疫すると、ES-DC-TT2 より有意に腫瘍の増殖は抑制された(P<0.01)。ES-DC-OVA/SLC または ES-DC-OVA/Mig を免疫すると、ES-DC-OVA/mock より有意に腫瘍増殖が抑制された(P<0.05)。対照的に ES-DC-OVA/Lptn を免疫した場合の腫瘍増殖抑制効果は ES-DC-OVA/mock による効果と同程度であった（C)。ES-DC-OVA/SLC を免疫すると ES-DC-OVA/mock と比較し、有意にマウスの生存率は延長した(P<0.01)。さらに ES-DC-OVA/Mig を免疫した場合でも、ES-DC-OVA/SLC を免疫した場合ほどではないが、ES-DC-OVA/mock と比較して、有意に生存率を延長させることができた(P<0.05)（D)。

7-7）ES-DC と SLC を同時に投与しても明らかな効果は認められなかった

既に述べたように、OVA と SLC を共発現させた ES-DC を投与することにより、OVA を発現した腫瘍に対して、その増殖抑制効果を増強できることが確認できた（図１７）。OVA を発現させた ES-DC と同時に組み換えマウス SLC を投与することによって、SLC の効果がみられるかどうかを調べた。このために $2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/SLC で免疫した場合と、$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock を腹腔内投与すると同時に組み換えマウス SLC(3μg)を腹腔内または静脈内投与した。投与された組み換えマウス SLC の量は in vivo に投与した後の ES-DC-OVA/SLC より作られる SLC の量より遥かに多い量である(図１８B)。ES-DC と $3x10^5$ 個の腫瘍細胞(MO4)の投与方法は、既に述べたスケジュールでおこなった。MO4 投与から 30 日後の腫瘍の大きさは図１８のようであった。組み換えマウス SLC を ES-DC-OVA/mock と共に投与(腹腔内または静脈内投与)した場合と、$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock 単独を投与した場合とで腫瘍の大きさは同程度であり、組み換えマウス SLC を共に投与しても効果がないことが分かった。対照的に ES-DC-OVA/SLC で免疫した場合、腫瘍の大きさは、組み換えマウス SLC を ES-DC-OVA/mock と共に投与（腹腔内または静脈内投与）した場合と $2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock 単独を投与した場合と比べ明らかに小さく、この結果は図１７と一致していた。

図 18

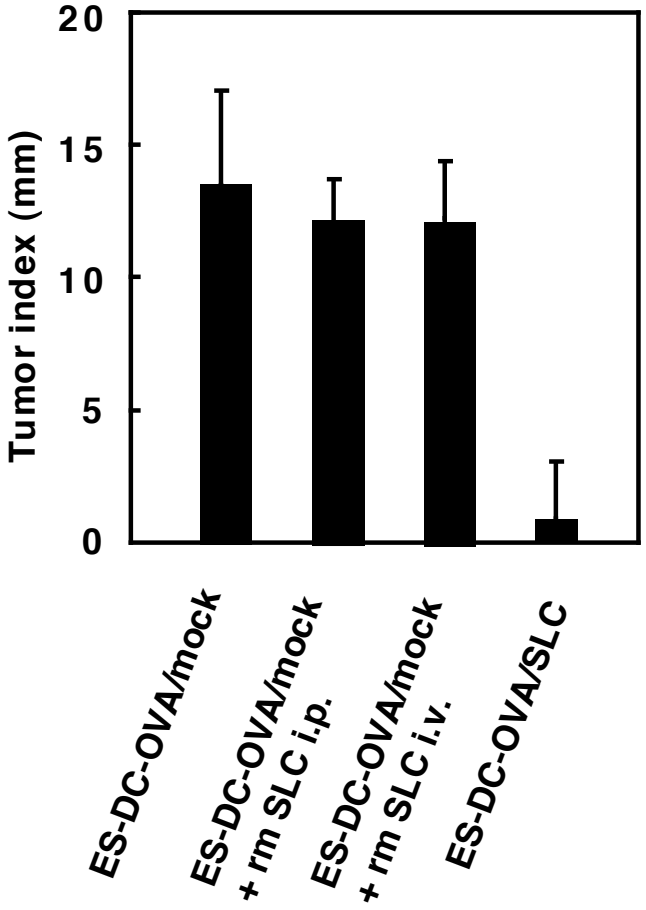

図１８　ES−DC−OVA と共に組み換えマウス SLC を投与しても付加的効果はなかった

$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/SLC で免疫した場合と、$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock を腹腔内投与すると同時に組み換えマウス(rm) SLC(3μg)を腹腔内または静脈内投与した。ES-DC と $3x10^5$ 個の腫瘍細胞(MO4)の投与方法は既に述べたスケジュールでおこなった。MO4 投与から 30 日後の腫瘍の大きさを示す。組み換えマウス SLC を ES-DC-OVA/mock と共に投与(腹腔内または静脈内投与)した場合と、$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock 単独を投与した場合とで腫瘍の大きさは同程度であり、組み換えマウス SLC を共に投与しても効果がないことが分かった。対照的に ES-DC-OVA/SLC で免疫した場合、腫瘍の大きさは、組み換えマウス SLC を ES-DC-OVA/mock と共に投与(腹腔内または静脈内投与)した場合と、$2x10^4$ 個の ES-DC-OVA/mock 単独を投与した場合と比べ明らかに小さかった。

7-8）SLC は ES-DC の生存や in vitro での CTL 誘導には影響を与えない

我々は SLC が in vitro にて DC の生存延長に影響を与えているかを検証した。ES-DC-OVA/mock と ES-DC-OVA/SLC を 7 日間細菌培養用デッシュ中にて培養した。別の ES-DC-OVA/mock は組み換えマウス SLC(300ng/ml)存在下に培養された。培養後に回収された ES-DC の数は、培養開始時の 77.8% (ES-DC-OVA/mock), 88.3% (ES-DC-OVA/SLC), 77.7% (ES-DC-OVA/mock に組み換えマウス SLC を加えた状態)であった。死細胞はどの状態でも回収した細胞のうち 1%以下であった。この結果は SLC が in vitro において DC の生存に影響を与えないことを示している。さらに ES-DC-OVA と ES-DC-OVA/SLC とでは in vitro での CTL 誘導能に差がないことを示している(図１９)。これらの結果は in vivo にて ES-DC-OVA/SLC を投与して確認された CTL 誘導能の増強は、SLC が ES-DC に直接影響を与えたことによるものではないと考えられた。

図 19

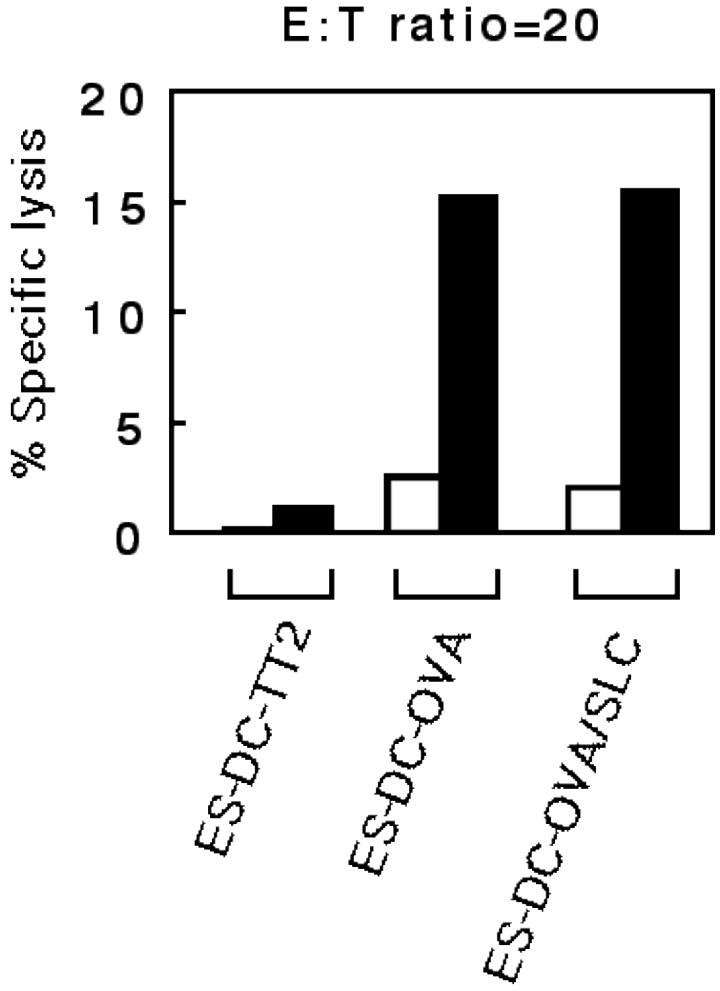

図１９　in vitro における ES-DC-OVA と ES-DC-OVA/SLC の OVA 特異的 CTL 誘導能は同程度である

ES-DC-TT2, ES-DC-OVA, ES-DC-OVA/SLC を、未刺激の CBF1 マウスの脾臓由来の T 細胞と共培養した。5 日後、細胞を回収して、OVA ペプチドを前もってパルスされた EL-4 を傷害できるかを調べ、OVA 特異的 CTL 活性を評価した。OVA ペプチドをパルスされていない EL-4 細胞（□)、あるいはにパルスされた EL-4 細胞（■）に対する細胞傷害活性を示した。OVA 特異的 CTL は ES-DC-OVA と ES-DC-OVA/SLC とでは同程度誘導されており、vitro での CTL 誘導能に差がないことが示された。

7-9）OVA 発現 ES-DC による MO4 に対する増殖抑制効果には、CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞が関与している

遺伝子改変 ES-DC による腫瘍増殖抑制効果における、CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞の役割を調べるために、我々は抗 CD4 あるいは抗 CD8 mAb をマウスに投与して体内の CD4$^+$T 細胞または CD8$^+$T 細胞を除去した。この処置によりマウス生体内の CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞は 90%以上が除去された(データーは示さず)。この処置を行いながら ES-DC-OVA/mock または ES-DC-OVA/SLC をマウスに免疫し、MO4 を皮下移植した。図２０に示すように、体内の CD4$^+$T 細胞または CD8$^+$T 細胞を除去すると ES-DC-OVA/mock と ES-DC-OVA/SLC 投与により誘導される腫瘍増殖抑制効果が解消された。生体内に存在している DC の一部には CD4 や CD8 が発現していると報告されているが、CD11c$^+$の脾臓由来 DC の数は、この mAb による処置によっても変化しなかった(データーは示さず)。このことは抗体処置による腫瘍増殖抑制効果の解消は T 細胞の除去による効果であり、マウス体内の DC に影響を与えたためではないことを示している。これらの結果は、SLC の共発現に関係なく OVA 発現 DC によって誘導された抗腫瘍免疫応答には、CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞が共に重要な役割を果たしていることを示している。

さらに ES-DC を免疫したマウスの皮下に移植した腫瘍への、リンパ球浸潤を免疫組織学的に検討した。図２１A-F のように ES-DC-OVA/SLC を免疫したマウスでの腫瘍の大きさは、ES-DC-OVA/mock や OVA を発現していない ES-DC (ES-DC-TT2)を免疫したマウスに比べて明らかに小さかった。OVA を発現した ES-DC、特に ES-DC-OVA/SLC を免疫したマウスでは腫瘍周囲に多くの炎症細胞の浸潤を認めた。主に浸潤した細胞は CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞であった(図２１G, H)。これらの結果も OVA と共に SLC を発現した ES-DC によって誘導された抗腫瘍効果は、CD4$^+$T 細胞と CD8$^+$T 細胞を介した効果であることを支持した。

図 20

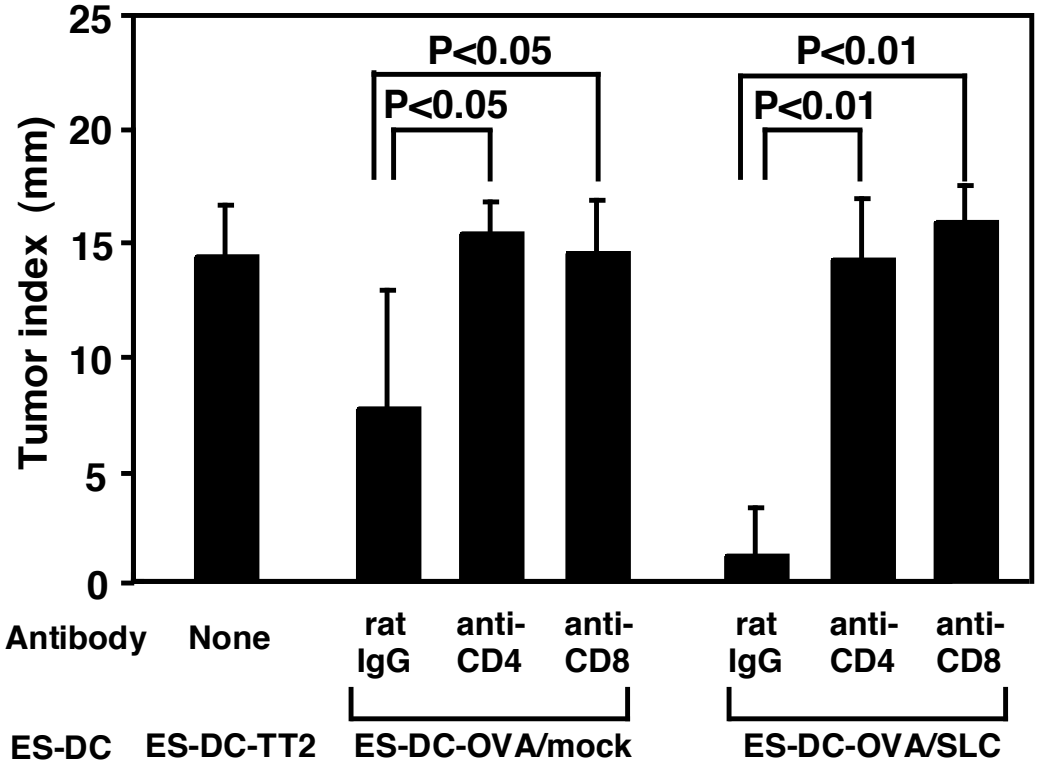

図２０　遺伝子改変 ES−DC による抗腫瘍免疫の誘導における CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の関与

抗 CD4mAb あるいは抗 CD8mAb を腹腔内投与して、マウス生体内の CD4⁺T 細胞あるいは CD8⁺T 細胞を除去した後に、ES−DC−TT2, ES−DC−OVA または ES−DC−OVA/SLC (2x10⁴ 個)を腹腔内に 2 回投与した。7 日後に OVA を発現した B16 メラノーマ細胞株を皮下移植し、15 日後に腫瘍径を測定した。体内での CD4⁺または CD8⁺T 細胞を除去すると ES−DC−OVA/mock と ES−DC−OVA/SLC による腫瘍増殖抑制効果が解消された。この結果は SLC の共発現に関係なく、OVA 発現 DC によって誘導された抗腫瘍免疫応答には CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞が共に重要な役割を果たしていることを示している。

図 21

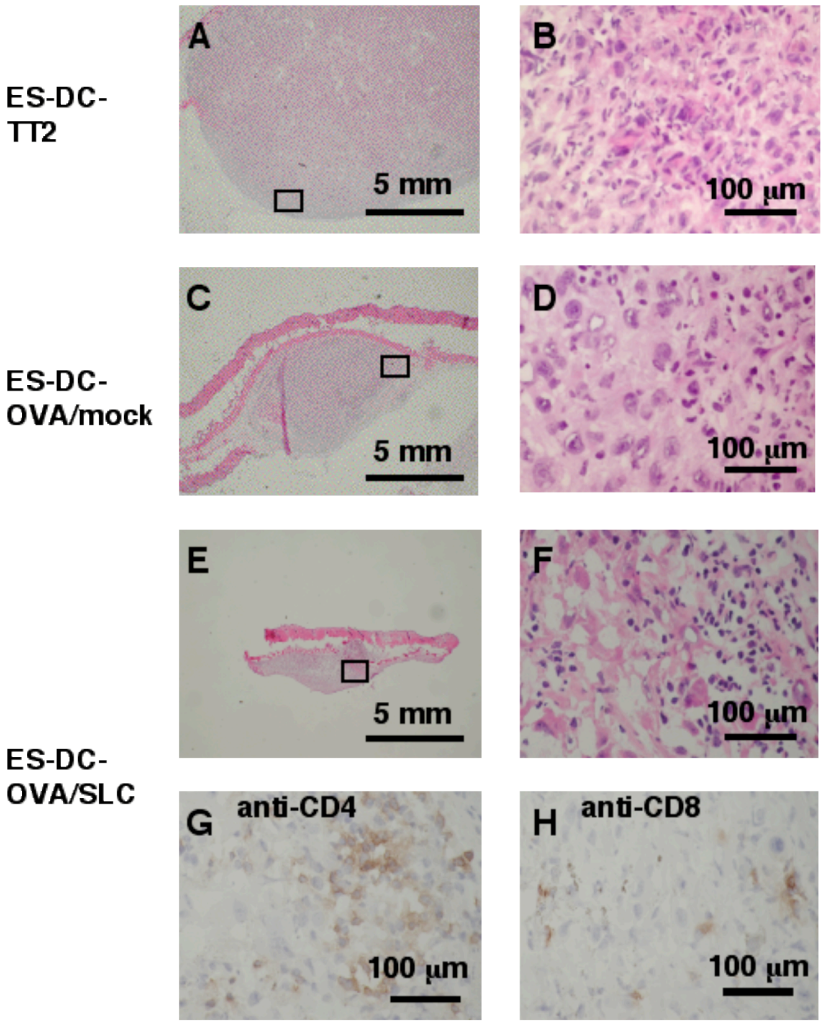

図２１　腫瘍周囲への CD4⁺T 細胞ならびに CD8⁺T 細胞の浸潤

マウスの腹腔内に ES-DC-TT2、ES-DC-OVA あるいは ES-DC-OVA/SLC をそれぞれ $2x10^4$ 個を 2 回投与した。2 回目の免疫から 1 週間後に OVA を発現した B16 メラノーマ細胞株を皮下移植した。12 日後に腫瘍を摘出し、H&E 染色（A-F）と抗 CD4 抗体（G）、あるいは抗 CD8 抗体（F）による免疫染色を行った。A-F のように ES-DC-OVA/SLC にて免疫したマウスの腫瘍の大きさは ES-DC-OVA/mock や ES-DC-TT2 にて免疫したマウスに比べ明らかに小さかった。OVA を発現した ES-DC、特に ES-DC-OVA/SLC にて免疫したマウスでは腫瘍周囲に多くの炎症細胞の浸潤を認めた。浸潤した細胞は、主に $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞であった(G, H)。

8　考察

本研究において、我々は T 細胞に対する遊走活性をもつケモカインを DC に発現させるような遺伝子改変をおこなった後に、in vivo に投与することにより、T 細胞の抗原感作を高めることを試みた。T 細胞を遊走させるケモカインの中から、我々は生理的な状態では DC から産生されない SLC、Lptn、Mig を選びだし、その効果を比較した。遺伝子改変を行うために、我々はマウス ES 細胞から DC を分化誘導する方法を使用した。OVA 発現ベクターを ES 細胞に遺伝子導入し、引き続きケモカイン発現ベクターにて遺伝子導入し、DC へと分化誘導した。このようにして OVA とケモカインを共に発現する DC を作製した。

ES-DC はリンパ組織への遊走能を有し(図１３)、その能力は BM-DC と同程度であった。OVA 発現 ES-DC は in vitro、in vivo において OVA 特異的 CTL を誘導できた(図１４)。BM-DC が in vitro にて抗原特異的 CTL を誘導するには CD40L からの刺激(49)や IL-2 を付加(我々の未発表データー)することが必要であるとされているが、OVA 発現 ES-DC は in vitro において IL-2 がなくても OVA 特異的 CTL を誘導できた。従って、抗原特異的 CTL を誘導する能力については、抗原を発現している ES-DC は BM-DC と比較しても決して劣ってはいないと考えれられた。最近、外来から投与された DC から内因性 DC への抗原やペプチド-MHC 複合体の受け渡しが報告されている(25, 50)。それゆえ我々のシステムにおいて、CTL 誘導のために内因性の DC もある程度役目を果たしていると考えられるが、熱処理をおこなった OVA 発現 ES-DC を in vivo に投与しても CTL を誘導できなかったという事実(図１４)に基づくと、我々のシステムにおける OVA 特異的 CTL 誘導は、主に投与された OVA 発現 ES-DC による直接的な効果に依存していると考えられる。

3 種類のケモカインの中では、OVA 発現腫瘍に対する腫瘍増殖抑制効果を誘導するためには SLC を DC に発現させることが最も効果的であることが明らかになった(図１７)。しかし DC の腹腔内投与と同時に、組み換えマウス SLC を静脈投与または腹腔内投与しても腫瘍の増殖抑制に対して付加的な効果を示さなかった(図１８)。さらに SLC は in vitro での DC の生存や CTL 誘導能には影響を与えなかった(図１９)。これらの結果は、in vivo に投与して観察された ES-DC-OVA/SLC の抗腫瘍免疫増強効果は、ES-DC に対する

SLC の効果ではなく、むしろ投与された ES-DC の場所へ T 細胞が遊走してきたためと考えられ、DC によるケモカイン産生の重要性を示唆している。

我々は in vivo に投与した OVA 発現 ES-DC によって誘導された抗腫瘍効果は、主に OVA に反応した $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞による効果であると考えている。この考えは、in vivo にて特異的 mAb で $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞を除去した場合に抗腫瘍効果が解消されたという結果によって支持される(図２０)。さらに免疫組織学的解析によると、ES-DC-OVA/SLC を免疫したマウスでの腫瘍組織に $CD4^+$T 細胞と $CD8^+$T 細胞が明らかに浸潤していることからも、この考え方は支持されうる(図２１)。B16 メラノーマや B16 メラノーマ由来の細胞を皮下移植した場合、$CD8^+$T 細胞を除去したときのみならず、$CD4^+$ T 細胞を除去したときにも抗腫瘍効果が解消されたことは、過去に報告されたデーターと一致している(51-53)。$CD4^+$ T 細胞は、$CD8^+$T 細胞の活性化を促進するばかりでなく、IFN-γ刺激により MHC classⅡを発現している B16 や MO4 を直接傷害した可能性も考えられる(52)。

DC に Lptn を発現させることにより、Mig よりも効率良く CTL を誘導することが可能であった。これに対して DC に Lptn を発現させても腫瘍の増殖抑制効果を高めることはできなかった。この結果は抗原ペプチドをパルスした BM-DC に Lptn を発現させることにより、腫瘍増殖抑制効果を増強したという Cao らの報告(28)とは一致しなかった。彼らの報告と我々の結果が異なった原因は、誘導された OVA 特異的な活性化 T 細胞が、投与された ES-DC-OVA/Lptn 周囲に集まったためではないかと考えた。Lptn はナイーブ T 細胞よりもメモリータイプや活性化した T 細胞を引き寄せると報告されている(54)。第一回目の DC 投与によって誘導された OVA 特異的 T 細胞が、第二回目に投与された Lptn を分泌する DC 周囲に特に引き寄せられたために、腫瘍(第二回目の DC 投与から 7 日後に皮下移植された)周囲に T 細胞が集まらなかったためではないかと我々は考えている。この推測を実験的に確認した訳ではないが、Lptn によってエフェクター/メモリーT 細胞が選択的に引き寄せられるということは、自己免疫疾患やアレルギー、移植片に対する拒絶反応の制御の治療を目的として、遺伝子改変 ES-DC による免疫応答の抑制をおこなう場合、Lptn を用いることが有用となるかもしれない。

SLC 遺伝子が導入された DC に、腫瘍細胞の溶解液を負荷して in vivo に投与することにより、強力な抗腫瘍免疫応答が誘導されることは既に報告されている(27)が、3 種類のケモカインの効果を比較した研究は、本研究が最初

である。我々は抗原タンパクと同時にケモカインを発現している DC を作製した。抗腫瘍免疫の誘導のためには、抗原遺伝子を導入した DC を用いた免疫療法がペプチドやタンパク、細胞溶解液などを負荷した DC よりも優れいてる。これは腫瘍特異抗原の全長をコードした遺伝子を DC に発現させることにより、特異的 CTL エピトープを同定する必要がないからである(55)。またペプチドや細胞溶解液を一時的に DC へパルスする方法と異なり、DC に腫瘍抗原を発現させることにより持続的に T 細胞に提示するための抗原が DC 内に供給されているのである。事実、本研究において遺伝子改変 ES-DC を比較的少ない数である $3x10^3$ 個を 2 回投与しただけでも、有意な CTL の誘導および腫瘍増殖抑制効果を示すことができた。数多くの腫瘍抗原が我々を含め多くの研究者によって同定されている(56-58)。我々は新しく同定された腫瘍抗原の抗腫瘍効果を評価するために、そのような抗原を発現する遺伝子改変 ES-DC を作製して、in vivo での実験に使用していく予定である。

DC へ遺伝子導入する方法として、電気穿孔法、lipofection、ウイルスベクターなどがある（表 1)。ウイルスベクターにより遺伝子導入を行った DC を用いた多くの臨床試験が現在進行している。しかし遺伝子導入方法については、遺伝子の導入効率、遺伝子発現の安定性、ウイルスベクター使用に関する大きな危険性や、その免疫原性などの多くの問題が存在している。これらの問題については改善されつつあるが (59,60)、より効率が良く、安全な方法の開発が必要とされている。ES 細胞に関しては効率良い遺伝子導入方法や遺伝子導入クローンの適切な単離方法が確立している。本研究において我々は puromycin 耐性遺伝子、または neomycin 耐性遺伝子をもつ 2 つの発現ベクターを用いて、2 つの遺伝子を導入した ES 細胞を作製した。複数の発現ベクターを用いて連続して、または同時に遺伝子導入を行うこと、または gene-trap 方法を用いることにより 3 つ以上の遺伝子導入が可能と考えられる(41, 61)。ES 細胞由来の細胞を生体内に移入することにより奇形種が形成されたことが報告(62)されているが､我々はこれまでに ES-DC をマウスに投与し 300 日以上経過をみているが明らかな異常は認めていない。我々は TT2 cells 以外の ES cell line (129 や C57BL/6 マウス由来の ES cell line)を用いて、我々の in vitro での DC への分化誘導方法を検証してみたが、いずれの細胞でも DC を誘導することは可能であった。我々は現在、今回行ったような免疫を活性化する方法と同様に、DC に抗原タンパクと共に免疫制御分子を発現させることにより、抗原特異的に免疫を抑制することを試みている。

最近ヒトの ES 細胞が樹立されている。今後は体細胞からの核移植のテクニック(63, 64)を応用すれば、遺伝的背景の異なるヒトに対しても、既存の ES 細胞株を利用して遺伝子改変 ES-DC の作製が可能となるであろう。最近ヒトやサルの ES 細胞から血球系細胞への分化誘導が報告されている(65, 66)。ヒト ES 細胞から DC への分化誘導も可能と考えられる。このような ES 細胞に関する技術をうまく用いることにより、遺伝子改変を行った ES-DC による免疫制御が自己免疫疾患、アレルギー疾患の治療、移植免疫、抗腫瘍免疫療法に適用されていくとことが期待される。

9　おわりに

我々の最終的な目標は、このような遺伝子改変 ES-DC を生体に投与し、抗原特異的な免疫制御を行うことにある。本研究では、DC に抗原とケモカイン、特に SLC を共に発現させることにより、抗原特異的な免疫増強が可能であることを示した。将来的には ES-DC システムを用いて抗原と共に免疫刺激性分子や免疫抑制因子、サイトカインなどの免疫調節分子を発現させることにより、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、移植臓器に対する拒絶反応、癌などの治療法の開発に応用できないかと考えている。

１０　参考文献

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

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

14. Huang, A. Y., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D., and Levitsky, H. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science, *264:* 961.

15. Inaba**,** K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R. M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med.*188:2163.

16. Legge, K. L., R. K. Gregg, R. Maldonado-Lopez, L. Li, J. C. Caprio, M. Moser and H. Zaghouani. 2002. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med.* 196: 217.

17. Smithers, M., K. O'Connell, S. MacFadyen, M. Chambers, K. Greenwood, A. Boyce, I. Abdul-Jabbar, K. Barker, K. Grimmett, E. Walpole, and R. Thomas. 2003. Clinical response after intradermal immature dendritic cell vaccination in metastatic melanoma is associated with immune response to particulate antigen. *Cancer Immunol. Immunother. 52:41.*

18. Marten, A., D. Flieger, S. Renoth, S. Weineck, P. Albers, M. Compes, B. Schottker, C. Ziske, S. Engelhart, P. Hanfland, L. Krizek, C. Faber, A. von Ruecker, S. Muller, T. Sauerbruch, and I. G. Schmidt-Wolf. 2002. Therapeutic vaccination against metastatic renal cell carcinoma by autologous dendritic cells: preclinical results and outcome of a first clinical phase I/II trial. *Cancer Immunol. Immunother. 51:637.*

19. Butterfield, L. H., A. Ribas, V. B. Dissette, S. N. Amarnani, H. T. Vu, D. Oseguera, H. J. Wang, R. M. Elashoff, W. H. McBride, B. Mukherji, A. J. Cochran, J. A. Glaspy, and J. S. Economou. 2003. Determinant spreading associated withclinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma.*Clin. Cancer Res. 9:998.*

20. Stift, A., J. Friedl, P. Dubsky, T. Bachleitner-Hofmann, G. Schueller, T. Zontsich,T. Benkoe, K. Radelbauer, C. Brostjan, R. Jakesz, and M. Gnant. 2003.Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J. Clin. Oncol. 21:135.*

21. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *J Exp Med 176:1693*.

22. Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity 11:753*.

23. Eggert, A. A., M. W. Schreurs, O. C. Boerman, W. J. Oyen, A. J. de Boer, C. J.Punt, C. G. Figdor, and G. J. Adema. 1999. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res. 59:3340*.9.

24. Hermans, I. F., D. S. Ritchie, J. Yang, J. M. Roberts, and F. Ronchese. 2000. $CD8^{+}$T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J. Immunol. 164:3095*.

25. Smith, A. L., and B. Fazekas de St Groth. 1999. Antigen-pulsed CD8alpha+ dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node. *J Exp Med 189:593*.

26. Morse, M. A., R. E. Coleman, G. Akabani, N. Niehaus, D. Coleman, and H. K. Lyerly. 1999. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res. 59:56*.

27. Kirk, C. J., D. Hartigan-O'Connor, B. J. Nickoloff, J. S. Chamberlain, M. Giedlin, L. Aukerman, and J. J. Mule. 2001. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res 61:2062*.

28. Cao, X., W. Zhang, L. He, Z. Xie, S. Ma, Q. Tao, Y. Yu, H. Hamada, and J. Wang. 1998. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J. Immunol. 161:6238*.

29. Farber, J. M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol 61:246*.

30. Nagira, M., T. Imai, R. Yoshida, S. Takagi, M. Iwasaki, M. Baba, Y. Tabira, J. Akagi, H. Nomiyama, and O. Yoshie. 1998. A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient

chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol 28:1516*.

31. Kim, C. H., L. M. Pelus, E. Appelbaum, K. Johanson, N. Anzai, and H. E. Broxmeyer. 1999. CCR7 ligands, SLC/6Ckine/Exodus2/TCA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors. *Cell Immunol 193:226*.
32. Kellermann, S. A., S. Hudak, E. R. Oldham, Y. J. Liu, and L. M. McEvoy. 1999. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol 162:3859*.
33. Hedrick, J. A., and A. Zlotnik. 1997. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J. Immunol. 159:1589*.
34. Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleyensteuber, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall, and et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science 266:1395*.
35. Yagi, T., T. Tokunaga, Y. Furuta, S. Nada, M. Yoshida, T. Tsukada, Y. Saga, N. Takeda, Y. Ikawa, and S. Aizawa. 1993. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem 214:70*.
36. Senju, S., K. Iyama, H. Kudo, S. Aizawa, and Y. Nishimura. 2000. Immunocytochemical analyses and targeted gene disruption of GTPBP1. *Mol Cell Biol 20:6195*.
37. Grant, E. P., and K. L. Rock. 1992. MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Immunol 148:13*.
38. Kodama, H., M. Nose, S. Niida, and S. Nishikawa. 1994. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol 22:979*.
39. Moore, M. W., F. R. Carbone, and M. J. Bevan. 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell 54:777*.
40. Falo, L. D., Jr., M. Kovacsovics-Bankowski, K. Thompson, and K. L. Rock. 1995. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces

protective tumour immunity. *Nat. Med. 1:649.*

41. Senju, S., S. Hirata, H. Matsuyoshi, M. Masuda, Y. Uemura, K. Araki, K. Yamamura, and Y. Nishimura. 2003. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood 101:3501.*
42. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S.Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med 176:1693.*
43. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods 223:77.*
44. Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol 2:269.*
45. Niwa, H., S. Masui, I. Chambers, A. G. Smith, and J. Miyazaki. 2002. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol 22:1526.*
46. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene 108:193.*
47. Kozak, M. 1990. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A 87:8301.*
48. Uemura, Y., S. Senju, K. Maenaka, L. K. Iwai, S. Fujii, H. Tabata, H. Tsukamoto, S. Hirata, Y. Z. Chen, and Y. Nishimura. 2003. Systematic analysis of the combinatorial nature of epitopes recognized by TCR leads to identification of mimicry epitopes for glutamic acid decarboxylase 65-specific TCRs. *J Immunol 170:947.*
49. Kelleher, M., and P. C. Beverley. 2001. Lipopolysaccharide modulation of dendritic cells is insufficient to mature dendritic cells to generate CTLs from naive polyclonal CD8+ T cells in vitro, whereas CD40 ligation is essential. *J Immunol 167:6247.*

50. Kleindienst, P., and T. Brocker. 2003. Endogenous dendritic cells are required for amplification of T cell responses induced by dendritic cell vaccines in vivo. *J. Immunol. 170:2817.*

51. Tuting, T., J. Steitz, J. Bruck, A. Gambotto, K. Steinbrink, A. B. DeLeo, P. Robbins, J. Knop, and A. H. Enk. 1999. Dendritic cell-based genetic immunization in mice with a recombinant adenovirus encoding murine TRP2 induces effective anti-melanoma immunity. *J. Gene. Med. 1:400.*

52. Bohm, W., S. Thoma, F. Leithauser, P. Moller, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1998. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J. Immunol. 161:897.*

53. Cao, X., W. Zhang, J. Wang, M. Zhang, X. Huang, H. Hamada, and W. Chen. 1999. Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology 97:616.*

54. Kurt, R. A., M. Bauck, S. Harma, K. McCulloch, A. Baher, and W. J. Urba. 2001. Role of C chemokine lymphotactin in mediating recruitment of antigen-specific CD62L(lo) cells in vitro and in vivo. *Cell Immunol. 209:83.*

55. Kaplan, J. M., Q. Yu, S. T. Piraino, S. E. Pennington, S. Shankara, L. A. Woodworth, and B. L. Roberts. 1999. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J. Immunol. 163:699.*

56. Monji, M., S. Senju, T. Nakatsura, K. Yamada, M. Sawatsubashi, A. Inokuchi, and Y. Nishimura. 2002. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun 294:734.*

57. Nakatsura, T., S. Senju, M. Ito, Y. Nishimura, and K. Itoh. 2002. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol 32:826.*

58. Nakatsura, T., S. Senju, K. Yamada, T. Jotsuka, M. Ogawa, and Y. Nishimura. 2001. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun 281:936.*

59. Van Tendeloo, V. F., P. Ponsaerts, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 2001. Highly

efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood 98:49*.

60. Dyall, J., J. B. Latouche, S. Schnell, and M. Sadelain. 2001. Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood 97:114*.
61. Araki, K., T. Imaizumi, T. Sekimoto, K. Yoshinobu, J. Yoshimuta, M. Akizuki,K. Miura, M. Araki, and K. Yamamura. 1999. Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol Biol 45:737*.
62. Wakitani, S., K. Takaoka, T. Hattori, N. Miyazawa, T. Iwanaga, S. Takeda, T. K. Watanabe, and A. Tanigami. 2003. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology 42:162*.
63. Wakayama, T., V. Tabar, I. Rodriguez, A. C. Perry, L. Studer, and P. Mombaerts. 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science 292:740*.
64. Hochedlinger, K., and R. Jaenisch. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature 415:1035*.
65. Li, F., S. Lu, L. Vida, J. A. Thomson, and G. R. Honig. 2001. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. *Blood 98:335*.
66. Kaufman, D. S., E. T. Hanson, R. L. Lewis, R. Auerbach, and J. A. Thomson. 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 98:10716*