

10 症例の内 1 例の CR, 4 例の PR を報告している。Timmerman らは B 細胞性リンパ腫を対象に, Id を抗原とした樹状細胞療法の第 I 相臨床試験を行い, 最初の化学療法終了後に測定病変が残存した 18 症例の内 4 症例で腫瘍退縮が認められたと報告している。また樹状細胞療法終了後に腫瘍が進行した症例に対して, Id-KLH 結合タンパクを boosting として接種後, 6 症例の内 2 例に CR, 1 例に PR を認めている。

9. その他の悪性腫瘍

消化器系癌を中心に第 I 相臨床試験が行われている(表 6)^{49)~54)}。東京女子医科大学消化器病センター外科(自験例)では, CD 3 抗体刺激 T 細胞移入療法とライセートを抗原とした樹状細胞療法の併用療法の第 I 相臨床試験が行われた。抗原に対する DTH 反応を基準とした dose escalation study では 1×10^8 dose の樹状細胞投与で 16 例中全例に KLH に対する DTH 反応の陽性化が認められ, 16 例中 13 例にライセートに対する DTH 反応の陽性化が認められた。 2×10^7 dose の樹状細胞投与では 7 例中 4 例に KLH に対する DTH 反応の陽性化が認められ, 7 例中 1 例にライセートに対する DTH 反応の陽性化が認められた。そのことから, 自験例では 1×10^8 dose の樹状細胞投与数が獲得免疫を成立させるために必要であると考えられた。また, 測定可能病変を有する 10 症例のうち 2 例で PR, 4 例で SD を認めた。2 例の PR のうち 1 例, 4 例の SD のうち 3 例は肝細胞癌であった。

東京女子医科大学消化器病センター外科では第 I 相臨床試験終了後, 第 II 相臨床試験を施行中である。対象は肝細胞癌, 肝内胆管癌, 胆管癌, 通常型膵管癌, 転移性大腸癌の症例で, 外科治療後の微小残存病変に対する術後補助療法として臨床試験を行っており, その結果が待たれる。

10. 樹状細胞腫瘍内局注療法

Triozzi らは転移性皮下腫瘍(悪性黒色腫 7 例, 乳癌 3 例)に対して樹状細胞腫瘍内局注療法を行い, 悪性黒色腫 7 例中 4 例, 乳癌 3 例中 2 例に腫瘍の縮小を認めた

と報告している⁵⁵⁾。東京女子医科大学消化器病センター外科では, 標準治療が無効であった進行消化器癌または転移再発消化器癌を対象に, 樹状細胞腫瘍内局注療法の第 I 相・II 相臨床試験が行われた。体表から近いリンパ節転移, 食道癌局所, あるいは転移性肝癌に対して超音波ガイド下, CT ガイド下あるいは内視鏡下に樹状細胞の腫瘍内局注療法が行われ, 17 例中 3 例に PR を認めている。

樹状細胞療法の問題点・課題点

樹状細胞療法にはいくつかの問題点・課題点がある。① 抗原を必要とする点, ② 1 種類の抗原で良いかという点, ③ 抗原に対する獲得免疫が成立するには時間を要する点, ④ 免疫応答をどのように評価するかという点, ⑤ どのような状態の癌に治療をするのが良いかという点が挙げられる。

抗原同定法の進歩とともに腫瘍関連抗原の同定が進んでおり, 同定された抗原を用いて前述のような臨床試験が進んでいる。しかし HLA のマッチングが必要であり, すべての症例に治療を行うことは難しいのが現状である。また癌の免疫逃避(tumor evasion)の問題があるため, 1 種類の抗原ではなくできるだけ数種類の抗原を用いることが必要であると同時に, 腫瘍側がそれらの抗原を発現している必要がある。そのためペプチドを抗原として用いるためには, あらゆる HLA タイプで数種類の腫瘍関連抗原の同定が必要であり, しかも腫瘍側がそれらの抗原を発現しているか否かの検索が必要となる。

ライセートあるいは DC/腫瘍融合細胞を用いる方法が, 現時点では外科側として最も簡便なテーラーメイド治療となる。しかし大多数の癌では培養での細胞株化が難易であり, 切除された癌の容量でライセート量が決定するため, 治療回数が限定されてしまうことが臨床問題となる。

樹状細胞療法での生体の免疫応答は試験管内でのアッセイ(ELISPOT, ELISA, cytokine assay, limiting dilution assay, cytotoxicity assay)や生体内での判定(DTH 反応)が用いられているが, いずれの方法が良いかはコ

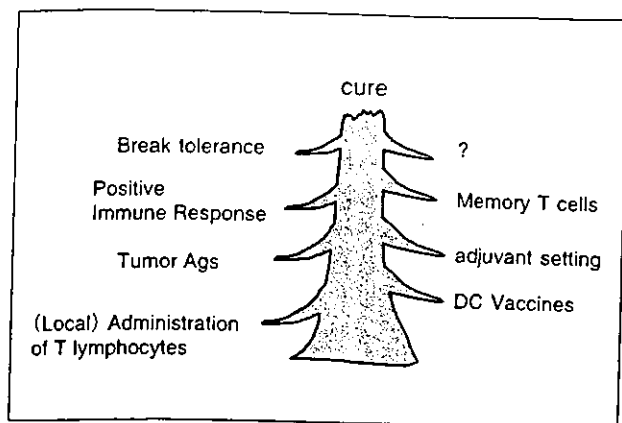


図8 Current Strategy of Immunotherapy

ンセンサスが得られていない。その一番の理由は、試験管内では抗原特異的な免疫応答が検出できても、臨床効果と必ずしも相関しないためである。現在、標準療法が無効であった進行癌や転移再発癌を臨床試験の対象として樹状細胞療法が行われているため、臨床効果(CR, PRあるいはSD)が得られている報告は少ない。臨床効果の比較的得られた第Ⅱ相臨床試験で、臨床効果と各免疫学的モニタリング法を比較検討する必要がある。

抗原に対する免疫応答が起こり獲得免疫が成立するまでには月単位の時間が必要である。標準療法が無効であった進行癌や転移再発癌を臨床試験の対象として樹状細胞療法が行われているが、獲得免疫が成立するまでは治療効果が得られないため、獲得免疫が成立するまでの期間は腫瘍増殖を抑制できないと考えられる。実際腫瘍増殖が著しいため治療プロトコルを完遂できない症例が報告では散見される。

以上のことから、今後標準療法が無効であった進行癌や転移再発癌を臨床試験の対象として、樹状細胞療法の第Ⅱ相・Ⅲ相臨床試験をデザインする時には、樹状細胞療法単独で行うべきではないと考える。生体外で培養・生成した免疫担当細胞を生体内に移入する養子免疫療法として古典的LAK療法、腫瘍抗原特異的T細胞移入療法(CTL)、抗体(CD3抗体あるいはCD3/CD28抗体)刺激T細胞移入療法がある。抗腫瘍効果を持つと考えられる細胞を生体内に移入する治療と樹状細胞療法を

併用することで、樹状細胞療法の弱点を補えると考えられる。

一方、獲得免疫を成立させて特定の疾患を治療する試みは、予防接種に代表されるように prophylactic であり therapeutic ではない面がある。そのため樹状細胞療法も今後第Ⅱ相・Ⅲ相臨床試験をデザインする時には標準療法後(外科療法、化学療法、放射線療法)の微小残存病変(いわゆる adjuvant therapy)を対象として行うべきと考える。

総括

樹状細胞療法の今後の方向性としては、標準療法後の微小残存病変に対する補助療法として位置づけ、抗腫瘍効果を持つと考えられる細胞の移入療法と樹状細胞療法とを併用して行うことが望ましい。また適切な数種類の抗原(ペプチドもしくはライセート)を用いて樹状細胞療法を行い、できるだけ早期に生体内に抗原に対する獲得免疫を成立させることが目標となる(図8)。第Ⅱ相・Ⅲ相臨床試験を行い、relapse free survival (RFS)や overall survival (OS)の延長を証明することが、樹状細胞療法あるいは免疫細胞療法を標準治療の1つとして認知させるために必要である。

文献

- 1) Porgador A, et al : Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol* 156, 2918-2926, 1996
- 2) Fields RC, et al : Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9482-9487, 1998
- 3) Paglia P, et al : Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med* 183, 317-322, 1996
- 4) Boczkowski D, et al : Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 184, 465-472, 1996
- 5) Candido KA, et al : Local administration of dendritic cells inhibits established breast tumor growth: implications for apoptosis-inducing agents. *Cancer Res* 61, 228-236, 2001

- 6) Eggert AA, et al : Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res* 59, 3340-3345, 1999
- 7) Morse MA, et al : Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* 59, 56-58, 1999
- 8) De Vries IJ, et al : Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63, 12-17, 2003
- 9) Eggert AA, et al : Analysis of dendritic cell trafficking using EGFP-transgenic mice. *Immunol Lett* 89, 17-24, 2003
- 10) Fong L, et al : Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166, 4254-4259, 2001
- 11) Bedrosian I, et al : Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD 8 + T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* 21, 3826-3835, 2003
- 12) Gilliet M, et al : Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 responses to protein neoantigen. *Blood* 102, 36-42, 2003
- 13) Nestle FO, et al : Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332, 1998
- 14) Thurner B, et al : Vaccination with mage-3 A 1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage 4 melanoma. *J Exp Med* 190, 1669-1678, 1999
- 15) Mackensen A, et al : Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD 34 (+) hematopoietic progenitor cells. *Int J Cancer* 86, 385-392, 2000
- 16) Panelli MC, et al : Phase I study in patients with metastatic melanoma of immunization with dendritic cells presenting epitopes derived from the melanoma-associated antigens MART-1 and gp 100. *J Immunother* 23, 487-498, 2000
- 17) Lau R, et al : Phase I trial of intravenous peptide-pulsed dendritic cells in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24, 66-78, 2001
- 18) Banchereau J, et al : Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD 34 (+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61, 6451-6458, 2001
- 19) Chang AE, et al : A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 8, 1021-1032, 2002
- 20) Krause SW, et al : The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells. *J Immunother* 25, 421-428, 2002
- 21) Nagayama H, et al : Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Res* 13, 521-530, 2003
- 22) Hersey P, et al : Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53 : 125-134, 2003
- 23) Murphy GP, et al : Infusion of dendritic cells pulsed with HLA-A 2-specific prostate-specific membrane antigen peptides : a phase II prostate cancer vaccine trial involving patients with hormone-refractory metastatic disease. *Prostate* 38, 73-78, 1999
- 24) Burch PA et al : Priming tissue-specific cellular immunity in a phase I trial of autologous dendritic cells for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2175-2182, 2000
- 25) Small EJ, et al : Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 18, 3894-3903, 2000
- 26) Rieser C, et al : Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int* 63, 151-159, 1999
- 27) Oosterwijk-Wakka JC, et al : Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2 : a phase I study. *J Immunother* 25, 500-508, 2002
- 28) Marten A, et al : 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, 637-644, 2002
- 29) Marten A, et al : Allogeneic dendritic cells fused with tumor cells : preclinical results and outcome of a clinical phase I/II trial in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 14, 483-494, 2003
- 30) Su Z, et al : Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63, 2127-

- 2133, 2003
- 31) Gitlitz BJ, et al : A pilot trial of tumor lysate-loaded dendritic cells for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *J Immunother* 26, 412-419, 2003
 - 32) Holtl, L, et al : Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 8, 3369-3376, 2002
 - 33) Fong, L, et al : Altered peptide ligand vaccination with Flt 3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8809-8814, 2001
 - 34) Morse, M. A, et al : Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* 21, 341-349, 2003
 - 35) Rains N, Cannan, RJ, Stubbs RS, et al : Development of a dendritic cell (DC)-based vaccine for patients with advanced colorectal cancer. *Hepatology* 48, 347-351, 2001
 - 36) Geiger JD, et al : Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 61, 8513-8519, 2001
 - 37) Yamanaka R, et al : Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses : results of a clinical phase I/II trial. *Br J Cancer* 89, 1172-1179, 2003
 - 38) Yu JS, et al : Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 61, 842-847, 2001
 - 39) Kikuchi T, et al : Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother* 50, 337-344, 2001
 - 40) Cull G, et al : Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotypic-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *Br J Haematol* 107, 648-655, 1999
 - 41) Takahashi T, et al : Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia. *Leuk Res* 27, 795-802, 2003
 - 42) Fujii S, et al : Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 42, 357-369, 2001
 - 43) Yi Q, et al : Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 117, 297-305, 2002
 - 44) Reichardt VL, et al : Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study. *Blood* 93, 2411-2419, 1999
 - 45) Lim SH, et al : Idiotype protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *Int J Cancer* 83, 215-222, 1999
 - 46) Reichardt VL, et al : Idiotypic vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells. *Haematologica* 88, 1139-1149, 2003
 - 47) Maier T, et al : Vaccination of patients with cutaneous T-cell lymphoma using intranodal injection of autologous tumor-lysate-pulsed dendritic cells. *Blood* 102, 2338-2344, 2003
 - 48) Timmerman JM, et al : Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma : clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526, 2002
 - 49) Stift A, et al : Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 21, 135-142, 2003
 - 50) Sadanaga N, et al : Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 7, 2277-2284, 2001
 - 51) Itoh T, et al : Immunotherapy of solid cancer using dendritic cells pulsed with the HLA-A 24-restricted peptide of carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 51, 99-106, 2002
 - 52) Kono K, et al : Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3394-400, 2002
 - 53) Iwashita Y, et al : A phase I study of autologous dendritic cell-based immunotherapy for patients with unresectable primary liver cancer. *Cancer Immunol Immunother* 52, 155-161, 2003
 - 54) Hernando JJ, et al : Vaccination with autologous tumour antigen-pulsed dendritic cells in advanced gynaecological malignancies : clinical and immunological evaluation of a phase I trial. *Cancer Immunol Immunother* 51, 45-52, 2002
 - 55) Triozzi PL, et al : Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer* 89, 2646-2654, 2000

腫瘍細胞の多様性に対応した複合癌免疫細胞療法の新規開発

松下 典正*¹ 小林 泰信*² 田中 宜之*¹ 中尾 真修*¹ 清水 公一*³
竹下 信啓*³ 谷川 啓司*² 有賀 淳*^{1,2,3}

(*Jpn J Cancer Chemother* 31(11):1655-1658, October, 2004)

Combined Cell Therapy by Using Dendritic Cells, T-Cells and NK Cells to Human Polymorphic Cancer: Norimasa Matsushita*¹, Yasunobu Kobayashi*², Yoshiyuki Tanaka*¹, Masanobu Nakao*¹, Koichi Shimizu*³, Nobuhiro Take-shita*³, Keishi Tanigawa*² and Atsushi Aruga*^{1,2,3} (*¹CICT, Graduate School of Medicine, Tokyo Women's Medical University, *²Cancer Immunotherapy Research Center, J.B. Therapeutics Inc., *³Dept. of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University)

Summary

Although an expression of MHC molecules and tumor associated antigens of the cancer are not uniform, we consider that the cancer immunotherapy for some specific tumor antigens cannot correspond to molecular biological varieties of the cancer. Consequently, we tried to develop a method to separate dendritic cells (DC), T-cells and natural killer (NK) cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from healthy volunteers. PBMC were separated by centrifugation on Ficoll-Hypaque gradients from peripheral blood obtained from healthy volunteers. After separating these cells, the cells were put into a plastic flask, and we isolated monocyte fraction (dendritic cells), NK cell fraction and T-cell fraction one after another by the difference in its ability to adhere to a plastic flask. We analyzed surface markers and activation states of these groups. We could induce dendritic cells from the monocyte fraction, CD3-activated T-cells (CAT) from the T-cell fraction, and adherent lymphokine activated-killer cells (A-LAK) from the NK cell fraction. Therefore, we indicate the possibility of the combined cell therapy with three immune cell fractions in which we can induce from the same blood at once. Key words: Adoptive immunotherapy, Cancer cell therapy, Adherent LAK, NK, CAT

要旨 癌細胞のMHC分子および腫瘍関連抗原の発現は均一ではなく、特定の抗原特異的免疫療法では癌細胞の分子生物学的多様性に対応できないことが考えられる。今回、健康人末梢血単核細胞の付着能の差を利用して同一末梢血より樹状細胞、T細胞、NK細胞をそれぞれ分離培養する方法の開発を試みた。健康人末梢血より比重遠心法にてPBMCを分離した後、プラスチックに静置し、付着能の差を利用して単球分画(樹状細胞分画)、NK細胞分画、T細胞分画を採取し、各細胞群の表面マーカーおよび活性化状態を解析した。得られた単球分画から樹状細胞を、T細胞分画よりCD3-activated T-cells (CAT)を、NK細胞分画よりadherent lymphokine activated-killer cells (A-LAK)を誘導可能であり、PBMCより同時に3種類の免疫細胞を分離培養して利用する複合癌免疫細胞療法の可能性が示された。

はじめに

近年の腫瘍抗原の発見、人工抗原ペプチドの合成、樹状細胞の培養法の確立などにより、腫瘍抗原特異的免疫療法の研究が進められている。われわれも癌特異的CTLや樹状細胞癌ワクチンを用いた特異的免疫細胞療法の臨床研究を行っているが、特定の癌抗原のみを標的とした特異的治療ではHLA分子や標的腫瘍抗原が欠損した腫瘍細胞に対応できないことが考えられる。今回、同一

PBMCから特異的免疫療法に利用する樹状細胞やT細胞と同時に、非特異的細胞傷害活性を有するNK細胞を分離培養して、3種類の異なる免疫細胞を利用する複合癌免疫細胞療法の新規開発をめざし、基礎的解析を行った。

I. 材料と方法

1. 免疫細胞の分離培養方法 (図1)

健康人5名の末梢血よりFicoll-Hypaque比重遠心分離法にて単核細胞(PBMC)を採取しAIM-V培地に懸

*² ジェー・ビー・セラピューティクス癌免疫療法研究所

*³ 東京女子医科大学消化器病センター・外科

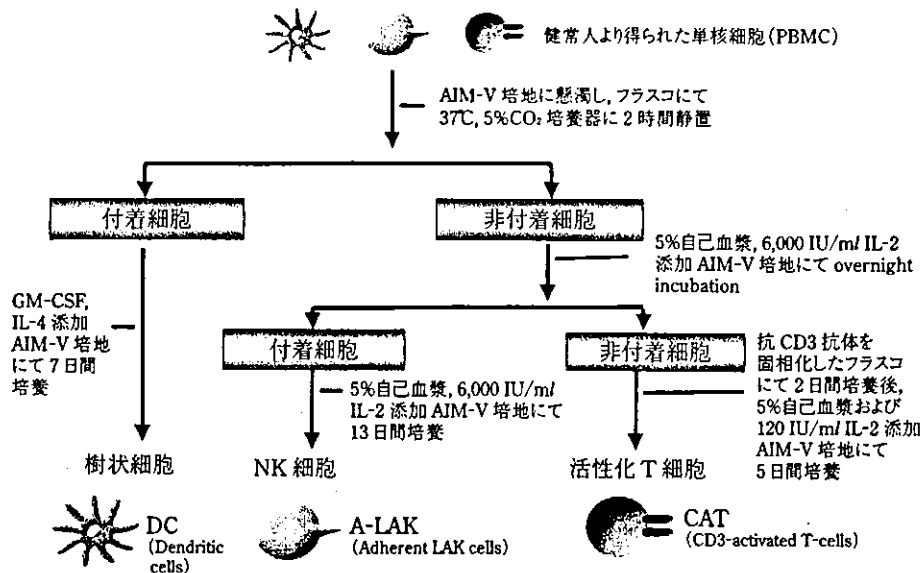


図 1 末梢血単核細胞 (PBMC) からの経時的な 3 種類の免疫細胞の分離培養方法

濁してフラスコに入れ、37°C、5%CO₂ の培養器に 2 時間静置後フラスコ付着細胞と非付着細胞をそれぞれ回収した。フラスコ付着細胞は 100 ng/ml GM-CSF、50 ng/ml IL-4 添加 AIM-V 培地にて 7 日間培養し樹状細胞を誘導した。非付着細胞は、5% 自己血漿および 6,000 IU/ml IL-2 を添加した培養液に懸濁して再度フラスコに静置し、overnight incubation を行った。その後のフラスコ付着細胞を回収して、さらに 13 日間培養し、adherent lymphokine activated-killer cells (A-LAK) を誘導した。overnight incubation 後のフラスコ非付着細胞は、抗 CD3 抗体を固相化したフラスコに移して 2 日間刺激培養後、5% 自己血漿および 120 IU/ml IL-2 を添加した AIM-V 培地にてさらに 5 日間培養して CD3-activated T-cells (CAT) を誘導した。

2. 分離細胞の細胞表面抗原解析

分離された各細胞群の細胞表面マーカーを抗 CD4, CD8, CD11c, CD16, CD25, CD56, CD69, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー (EPICS-XL: BECKMAN COULTER) にて測定した。

3. 培養細胞の癌細胞傷害活性測定

分離細胞を培養後、A-LAK および CAT の種々の悪性腫瘍細胞株 (K562: CML 株, AG: 胆嚢癌株, HuH2: 肝細胞癌株, Daudi: Burkitt リンパ腫株) に対する細胞傷害活性を 4h-⁵¹Cr release assay にて測定した。

II. 結 果

1. 健康人 PBMC からの選択的免疫細胞分離および培養 (図 2a)

健康人 PBMC を 2 時間フラスコに静置して得られた付

着細胞を GM-CSF、IL-4 添加培地にて培養した細胞では CD80, CD83, CD86, HLA-DR の発現を認め、樹状細胞が誘導された。次に単球分画除去後の細胞を高濃度 IL-2 添加培地にて overnight incubation し、フラスコに付着した細胞を培養して得られた A-LAK 細胞では、CD4 や CD8 陽性 T 細胞をほとんど認めず、CD16, CD56 陽性 NK 細胞の比率が高く、NK 細胞の選択的分離培養が可能であった。overnight incubation 後の非付着細胞を、固相化抗 CD3 抗体処理フラスコにて刺激後培養して得られた細胞は、CD16 や CD56 陽性細胞をほとんど認めず、CD8 陽性細胞が多数認められ、CAT の培養が確認された。この結果は実施した健康人 5 名で同様であり、健康人末梢血 PBMC より、フラスコ付着能の差を利用して経時的に 3 種類の免疫細胞を分離誘導することが可能と考えられた。

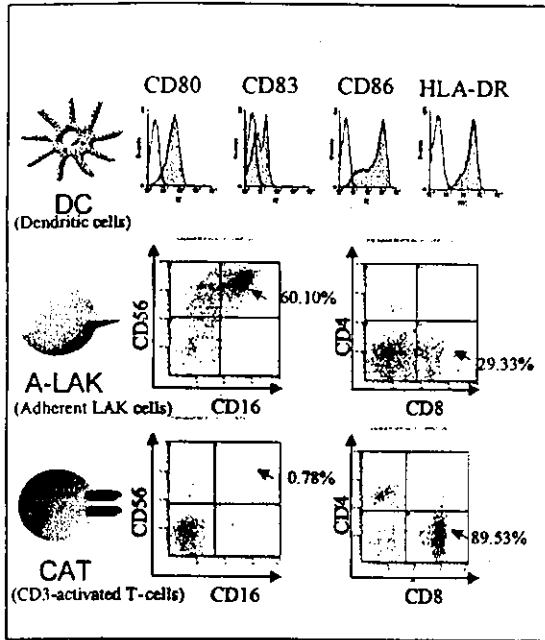
2. 培養細胞の癌細胞傷害活性測定 (図 2b)

PBMC より分離した NK 細胞および T 細胞を活性化培養し、それぞれ誘導した A-LAK と CAT の癌細胞傷害活性を種々の培養悪性腫瘍細胞株を標的として測定した結果、HLA-class I の発現の強弱にかかわらず、K562, AG (胆嚢癌株), HuH2 (肝細胞癌株), Daudi など、すべての悪性腫瘍細胞株に対して A-LAK が CAT に比較し、著明に高い細胞傷害活性を示した。以上より分離された NK 細胞を活性化培養した A-LAK では HLA の発現にかかわらず、高い非特異的腫瘍細胞傷害活性が認められた。

3. フラスコ付着 NK 細胞の活性化状態の解析 (図 3)

高濃度 IL-2 添加培養液にて overnight incubation することにより、NK 細胞が選択的にフラスコ底面に付着したが、非付着細胞分画にも NK 細胞の混入が認められた。

a: 健康人細胞分離培養結果の1例



b: A-LAK, CATの細胞傷害活性

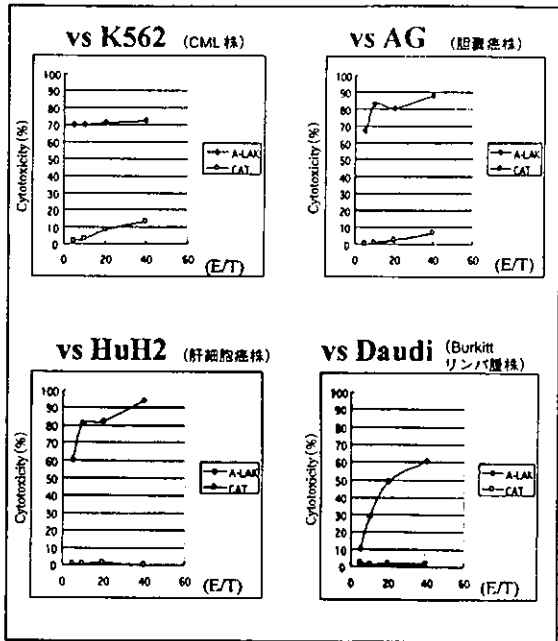


図2 選択的免疫細胞分離培養結果と培養細胞の細胞傷害活性

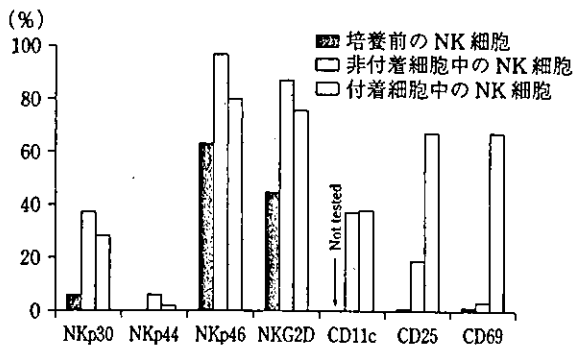


図3 フラスコ附着および非附着NK細胞の細胞表面抗原測定

IL-2添加培地にて overnight incubation 後の分離回収時におけるNK細胞の natural cytotoxicity receptors (NCRs), NKG2D, CD11c, CD25 (IL-2R α), CD69発現の比較

ため、附着および非附着NK細胞の活性化状態をフローサイトメトリーにて解析した。接着分子であるCD11c、活性化シグナル伝達分子であるNKp30, NKp44, NKp46などの natural cytotoxicity receptors (NCRs) およびNKG2D¹⁾は附着NK細胞と非附着NK細胞で発現に差を認めなかったが、T細胞やNK細胞の活性化早期に発現する細胞表面糖蛋白であるCD69は、附着NK細胞において有意に高く発現していた。また、IL-2 receptor α chainであるCD25も附着NK細胞に有意に高く発現していた。

III. 考 察

現在われわれの施設では、癌に対する免疫細胞療法として、活性化自己リンパ球移入療法と、自己癌抽出抗原

を利用した樹状細胞癌ワクチン療法の臨床研究を実施している。この治療では自己癌抗原特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) が癌細胞を特異的に認識し抗腫瘍効果を発現するが、このように免疫細胞療法においては効率的なCTLの誘導が抗腫瘍効果を上げるために重要と考えられてきた²⁾。しかし癌細胞の抗原の種類や、その発現率は均一でなく、Rosenbergらが報告したように抗原特異的免疫細胞療法を継続した結果、癌細胞の β_2 -microglobulin 遺伝子が変異し、MHC class Iの発現が低下した症例が確認された³⁾。これらの癌細胞に対しては、もはやCTLによる抗腫瘍効果は期待できない。現在われわれは末梢血単核細胞から樹状細胞およびT細胞を分離培養して免疫細胞療法に利用しているが、今回MHC class I分子の発現が低下した癌細胞に対して高い抗腫瘍効果を示すNK細胞^{4,5)}を同時に分離培養し、3種類の免疫細胞を利用した複合免疫細胞療法の開発を試みた。Melderらは高濃度IL-2添加培地にてリンパ球を overnight incubation することにより、活性化したNK細胞がプラスチックフラスコの底面に附着し、NK細胞を分離培養できることを報告しており⁶⁻⁸⁾、今回NK細胞のIL-2依存性附着能を利用することにより、健康人同一末梢血単核細胞より経時的に樹状細胞、T細胞、NK細胞の分離培養が可能であった。しかし、NK細胞の分離時、フラスコに附着しないNK細胞も認めたため、附着NK細胞と非附着NK細胞において細胞表面抗原の比較を行った結果、高親和性IL-2 receptorを構成するIL-2R α chain (CD25) およびNK細胞の活性化早期に発現するCD69⁹⁾の発現が附着NK細胞において著明に高値であった。附着NK細胞

胞では細胞傷害活性が、非付着 NK 細胞より高値であるという報告もあり¹⁰⁾、高濃度 IL-2 添加培養により、プラスチックに付着する NK 細胞を回収し活性化培養することにより、効果的な NK 細胞の分離培養が可能となることが示唆された。

結 語

今回の分離培養法の開発により、抗原発現の多様性を認める癌細胞に対して、樹状細胞癌ワクチンによる抗原特異的免疫応答の誘導、誘導された CTL 前駆細胞を増強した CAT (T 細胞)、MHC 発現の低下した腫瘍に対して非特異的抗腫瘍効果を有する A-LAK (NK 細胞) を利用した複合癌免疫細胞療法の可能性が示された。現在、担癌患者においても同様の分離培養が可能であるかを検討中である。

文 献

- 1) Biassoni R, Cantoni C, Marras D, *et al*: Human natural killer cell receptors: Insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med* 7(4): 376-387, 2003.
- 2) 有賀 淳, 高崎 健: CTL 療法. 血液・腫瘍科 38(1): 45-52, 1999.
- 3) Rosenberg SA, Yang JC, Robbins PF, *et al*: Cell transfer therapy for cancer: Lessons from sequential treatments of a patient With metastatic melanoma. *J Immunother* 26(5): 385-393, 2003.
- 4) Moretta A, Bottino C, Mingari MC, *et al*: What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3(1): 6-8, 2002.
- 5) 森 清: KIR などのヒト NK 細胞マーカーと機能分子. 血液・腫瘍科 37(6): 477-481, 1998.
- 6) Melder RJ, Whiteside TL, Vujanovic NL, *et al*: A new approach to generating antitumor effectors for adoptive immunotherapy using human adherent lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res* 48: 3461-3469, 1988.
- 7) Melder RJ, Rosenfeld CS, Herberman RB, *et al*: Large-scale preparation of adherent lymphokine-activated killer (A-LAK) cells for adoptive immunotherapy in man. *Cancer Immunol Immunother* 29: 67-73, 1989.
- 8) Melder RJ, Walker ER, Herberman RB, *et al*: Surface characteristics, morphology, and ultrastructure of human adherent lymphokine-activated killer cells. *J Leukoc Biol* 48: 163-173, 1990.
- 9) Llera AS, Viedma F, Sanchez-Madrid F, *et al*: Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem* 276(10): 7312-7319, 2001.
- 10) Vujanovic NL, Rabinowich H, Lee YJ, *et al*: Distinct phenotypic and functional characteristics of human natural killer cells obtained by rapid interleukin 2-induced adherence to plastic. *Cell Immunol* 151: 133-157, 1993.

最新のがん免疫療法

Recent advances in cancer immunotherapy

特集

田中 宜之 中尾 真修 有賀 淳*
 TANAKA Yoshiyuki NAKAO Masanobu ARUGA Atsushi

健康推進・全身疾患予防

Key words 腫瘍免疫 サイトカイン 抗体療法 ワクチン療法 活性化リンパ球療法 免疫細胞療法

80年代から90年代にかけて急速に発展した腫瘍免疫学により、悪性腫瘍に対する生体の免疫応答のメカニズムとそれにかかわる生体物質が次々に明らかにされてきた。その中でさまざまな免疫療法が考案され、臨床試験が行われており、サイトカイン療法や分子標的療法としての抗体療法などで、すでに悪性腫瘍の標準的治療としての地位を確保している。ところが、がん免疫療法の中心的存在と期待された免疫細胞療法については80年代後半に盛んに行われたLAK (lymphokine-activated killer) 療法, TIL (Tumor-infiltrating lymphocyte) 療法, CTL (Cytotoxic T lymphocyte) 療法などの活性化リンパ球療法や強力な抗原提示細胞である樹状細胞と腫瘍抗原を用いたがんワクチン療法が臨床試験として実施されてきたが、ある程度の成果をあげながらも、現在までのところ、癌の標準的治療となるだけの治療効果をあげるに至っていない。本稿では、サイトカイン療法、抗体療法そして免疫細胞療法に関する最新の基礎研究の成果および臨床試験の結果を紹介しながら、最先端でのがん免疫療法および今後の方向性について言及したい。

I. サイトカイン療法・抗体療法

1. サイトカイン療法

現在、臨床で使用される機会のもっとも多いものはIFN およびIL-2である¹⁾。固形がんでは腎細胞癌に対してIFN- α もしくはIL-2の単剤投与が標準的治療法のひとつと考えられており両者の

間の長期腫瘍縮小効果に差はなく5%程度と考えられている。悪性黒色腫に対してはdacarbazine (DTIC) +nimustine (ACNU) +vincristine (VCR) にIFN- β の原発巣周囲への局所注射を併用したDAV-Feron 療法が免疫化学療法として本邦にて行われており奏功率は30%台まで上がっている。造血器腫瘍では慢性骨髄性白血病に対しIFN- α の単剤投与が標準治療の一つであり、これにより細胞遺伝学的完全寛解が維持でき、生存期間を有意に延長させることが示されている。

東京女子医科大学大学院医学研究科がん免疫細胞治療学分野
*教授

2. 分子標的治療としての抗体療法

抗体療法はいまや臨床の場で悪性腫瘍に対する一般的に使用される医療となってきた。こうした抗体医薬はマウスモノクローナル抗体を分子生物学的手法により、抗原認識部位以外、すべてヒト由来のアミノ酸配列(約95%)に置き換えたヒト化抗体である。そのため、異種抗体が産生されにくく、血中半減期が長いこと、補体依存性や抗体依存性の細胞傷害反応の活性化効率が高等の特徴を有している。

trastuzumabはその標的分子であるHer2蛋白を過剰発現する転移・再発性乳癌に対して使用され²⁾、単剤投与での奏率は15%でpaclitaxelやdocetaxelと併用することにより約60%の奏率が報告されている。rituximabは標的分子であるCD20陽性の低悪性度B細胞性リンパ腫に対して使用され²⁾、単剤で60%という驚異的な奏率を示しており、さらに基礎研究でリンパ腫細胞株をrituximabで前処理することで抗ガン剤の感受性が高まるのみでなく、耐性細胞株の抗ガン剤感受性を回復させることなどから、化学療法との併用で抗腫瘍効果が高まることが期待されていたところ、本年のアメリカ臨床腫瘍学会にて60歳以下のCD20陽性低悪性度B細胞性リンパ腫の患者に対し、従来の化学療法レジメンに加え、rituximabを投与することで、約2年後の生存率が10%改善し、95%に達することを示す研究結果が発表され、この領域での標準治療となりつつある。

最後に、本邦ではまだ未承認であるが、昨年12月米国FDAが承認したbevacizumabはVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)を標的分子とする抗体薬であり血管新生を阻害することにより腫瘍増殖を抑制する作用機序を持つ。第Ⅱ相の臨床試験では転移性大腸癌に対して5-FU+LVと併用することにより40%の奏率を示し、生存期間中央値(MST)を8ヵ月延長することが示された³⁾。また、その作用機序により大腸癌以外での固形腫瘍でも奏功する可能性が高く、現在臨床試験が続けられている。本邦での早期承認が待たれるところである。

Ⅱ. 免疫細胞療法および腫瘍抗原を用いたがんワクチン療法

1. T細胞による腫瘍認識機構および樹状細胞

90年代の免疫細胞療法にもっとも大きなインパクトを与えたのは、T細胞による腫瘍認識機構の解明および腫瘍抗原の同定さらに強力な抗原提示細胞である樹状細胞に対する基礎研究の進展およびその臨床応用にあった。T細胞が腫瘍細胞を認識する上でKeyとなる分子はT細胞上のT細胞レセプター(TCR)、腫瘍細胞上の主要組織適合抗原(MHC、ヒトではHLA)およびHLA上に提示される腫瘍抗原である(図1)。HLAはclass Iとclass IIに大別され、HLA class Iは抗腫瘍活性の主体で細胞傷害性T細胞(CTL)となるCD8陽性T細胞のTCRに、HLA class IIはimmunomodulatorとして働くCD4陽性T細胞のTCRに提示される。これによりそれぞれのT細胞を活性化しCTLはパーフォリン、グランザイム等を分泌させ腫瘍細胞を破壊し、CD4陽性細胞からはさまざまなサイトカインを分泌することにより、CTLによる腫瘍細胞の認識・破壊を促進させるほか、B細胞系を刺激し腫瘍に対する抗体産生を促進させる。壊死やアポトーシスに陥った腫瘍細胞は樹状細胞など抗原提示細胞に貪食され、腫瘍抗原が主にHLA class II上に、一部はcross presentationにより、HLA class I上に提示されることにより、腫瘍反応性のT細胞をさらに刺激・増殖させると考えられている。

それでは、腫瘍抗原とはいったいどこからきて、どのようにTCRに提示されるのだろうか?80年代、Tリンパ球が腫瘍を認識するための腫瘍由来の分子(腫瘍抗原)を同定することは“夢”の話でもあった。それが90年代に入って分子生物学の発達により、悪性黒色腫において、腫瘍のcDNAの発現ライブラリーを腫瘍反応性CD8陽性T細胞クローンでスクリーニングすることで、BoonらによりHLA class Iに拘束される腫瘍抗原とし

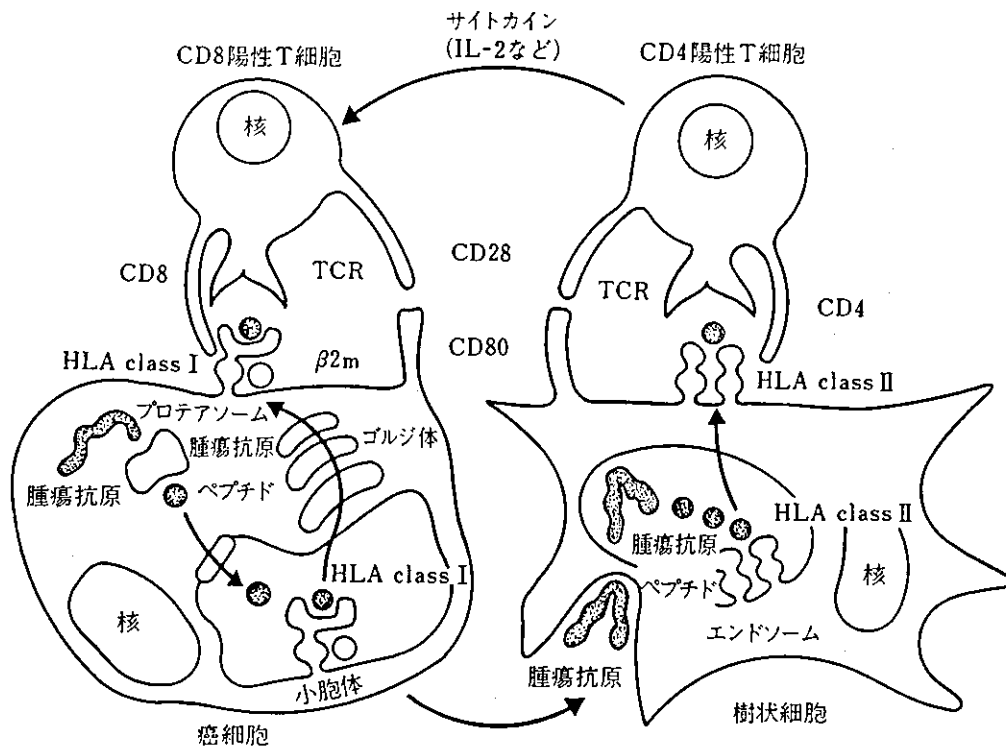


図 1

てMAGE-1がはじめて同定された⁴⁾。また、腫瘍反応性のT細胞クローンを得にくい低免疫原生の上皮性腫瘍の腫瘍抗原を同定する方法として、患者血清に含まれる抗腫瘍抗体を用いて同じく腫瘍のcDNAの発現ライブラリースクリーニングし液性免疫を誘導する抗原を発見する方法としてSerological Analysis of Antigens by Recombinant Expression Cloning (SEREX)法が開発された。SEREX法で発見された抗原の中には、NY-ESO-1などCD8陽性細胞の反応を誘導する腫瘍抗原も存在し、有力な腫瘍抗原探索法として考えられるようになった。これらの方法を用いてメラノソーム由来の抗原であるMART-1, gp100など、腫瘍組織と精巢のみで発現が確認されているCancer-Testis抗原としてMAGE-1, 3, BAGE, GAGE, 癌遺伝子産物や腫瘍マーカー由来の抗原として、CEA, Her2, p53などが腫瘍抗原として次々発見されている。これら腫瘍抗原となる蛋白質は、腫瘍細胞内で短く切断されHLAのアロタイプ特有の親和性にしたがって選別を受け、HLA class I上には9~10個、HLA class II上に

は14~21個のペプチドにまで短くされた後、HLA上に存在する“溝”にはまり込んだ状態で、TCRへ向け提示され、Tリンパ球は悪性腫瘍との遭遇を認識する。

最近、細胞内でのペプチドの生成に関して、通常の細胞内蛋白分解酵素が直線的にタンパク質を切断して生成するばかりでなく、RNAの転写過程のように、アミノ酸数個が抜け落ちることにより抗原ペプチドが生成されるペプチドスプライシングという現象が報告され⁵⁾⁶⁾、ペプチドの生成は想像以上に複雑な過程であることが示された。こうしたペプチドはエピトープペプチドと呼ばれ、ペプチド合成機を用いて人工的に大量合成することが可能であり、合成の際、ペプチド内のアミノ酸を置換した改変型ペプチドを用いることにより、HLAに対する親和性を高め、抗原性を高めることが可能であることも分かった。これら基礎研究の進展を受け1998年米国国立がんセンター(NCI)のRosenbergらは悪性黒色腫の患者に対しgp100の改変型ペプチドを直接ワクチンするPhase I-IIの臨床試験により、42%という高い

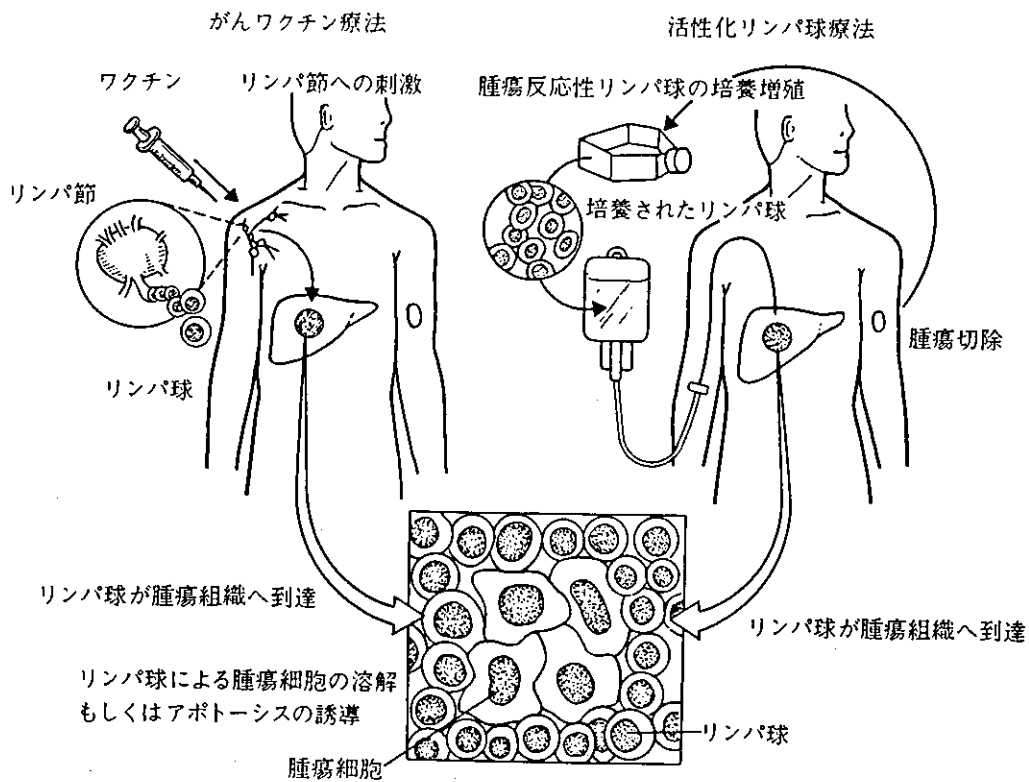


図 2

奏功率を得た⁷⁾。しかしながら、この後、さまざまな癌腫に対して、さまざまな抗原ペプチドを用いた臨床試験が行われたが、その多くは十分な奏功率を示すに至っていない。

こうした腫瘍抗原の発見と時を同じくして樹状細胞 (dendritic cell) を培養することが可能になり、その生物学的特徴の解明が進んだことは腫瘍免疫学の大きな話題となった。樹状細胞はわれわれの生体内に存在する強力な抗原提示細胞であり、司令塔として体内の免疫をコントロールする中心的役割を果たす細胞である。腫瘍免疫において樹状細胞は腫瘍局所で腫瘍抗原を効率よく貪食した後、所属リンパ節に遊走し、プロセスした腫瘍抗原を豊富な co-stimulatory molecule と HLA 分子とともに T 細胞に提示し、さらに IL-12 などのサイトカインを分泌することにより効率よく抗腫瘍免疫を誘導する。さらに、この樹状細胞にはいくつかの subset が存在し、免疫系を刺激、活性化させる集団だけではなく、逆に抑制的に働く集団が存在することも明らかになった。この樹状細胞に腫瘍抗原を DNA, RNA, タンパク質、ペ

プチドそれぞれのレベルで持たせ、担癌患者にワクチンする臨床試験が実施され、悪性黒色腫や前立腺癌など Phase II の臨床試験で 30% 程度の奏功率を認めたとする報告も存在するが、奏功率 0% の報告もある。樹状細胞の臨床試験を行う場合、誘導法、成熟度、投与細胞数、細胞表面抗原の状態など多くのパラメーターが存在し治療を標準化することがきわめて難しい。また、費用面でも非常に高額となること、クリーンルームなど特殊設備が必要なことを考えると、多施設大規模臨床試験を行うことは現実的に困難であり、このことが治療の有用性評価に結論を与えていない要因と考える。

2. ワクチン療法 vs 活性化リンパ球療法(図2)

これまで癌免疫療法をリードしてきた前出の Rosenberg 氏の総説が今年 4 月に The New England Journal of Medicine に掲載されたが、効果的な免疫療法の 3 つの条件として、①担がん患者の体内に高い抗腫瘍活性を持ったリンパ球が存在すること、②そのリンパ球が血管外に遊走し腫瘍

組織に到達できること、③腫瘍組織内で腫瘍の認識・攻撃が効果的に行われることを上げている⁹⁾。

また、ワクチン療法ではこれまで進行癌を治療しえたマウスモデルの報告はなく、この理由としてワクチン療法では量的、質的に十分なリンパ球が誘導できないか、もしくは腫瘍組織にリンパ球が到達したときには麻痺してしまっており腫瘍を攻撃できないのではないかと推論した。そして、むしろ、腫瘍抗原特異的な高い抗腫瘍活性をもつリンパ球を体外で大量に培養し、生体内に戻すことで上記条件をある程度クリアすることが可能であると主張している。事実、NCIで2002年行われた悪性黒色腫に対する臨床試験で腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の自己腫瘍もしくは他家腫瘍に対して高い反応性を示すものを選択的に培養し、化学療法にてregulatory T cellsなど免疫寛容をもたらす細胞集団の機能を失わせた後に、増殖させた腫瘍反応性リンパ球を投与することにより、生体内でこれらリンパ球が数ヶ月間増殖することを確認した。治療の奏功率は46%に達している⁹⁾。

また、マウスの実験系でTNFスーパーファミリーのTNFSF14(LIGHT)という分子を腫瘍局所で発現させることにより、腫瘍組織の間質から接着分子発現やケモカインの分泌を促し、リンパ球が腫瘍組織の中に集積され、進行癌モデルにおいても腫瘍を退縮させることに成功した論文を紹介し、前述の活性化リンパ球療法とTNFSFを上手に活用することにより効果的な免疫療法が生まれる可能性を指摘している¹⁰⁾。比較的強い免疫が誘導できる感染症でさえ、いったん感染が成立するとワクチンでの治癒は困難である。ましてや進行癌によりいったん破壊された免疫系を、ワクチンで再構築し、腫瘍を退縮させることはきわめて困難であると考えられるが、今後のNCIにおける臨床試験に大きな期待を抱きつつ見つめていきたい。

3. 今後の免疫療法の方向性

それでは今後、癌免疫療法はどのような方向性

で進むべきなのであろうか？筆者らは現時点では外科治癒切除後の再発・転移予防治療として、そして近未来的には発癌自体の予防として使用されるべきと考えている。外科手術後の再発・転移予防治療は現在、東京女子医科大学消化器病センター外科にて術後の樹状細胞がんワクチンと活性化リンパ球による免疫細胞療法の第Ⅱ相臨床試験が進められており、途中経過ではあるが有意に再発・転移を予防する傾向を認めている。

さらに、発癌自体に対する免疫の役割としては、Shankaranらが、RAG2とSTAT-1のダブルノックアウトマウス(リンパ球機能およびIFNに対する反応性を失っているマウス)とWild typeのマウスと比較することにより、ノックアウトマウスでは発癌率が有意に高く、また、通常の状態では腫瘍が発生進展していく中、腫瘍の抗原性が低下していくことが示された¹¹⁾。このことは、生体内に免疫監視機構が存在し、その網を潜り抜けて腫瘍が発生進展してくる中、免疫原性の高い腫瘍は消去されるCancer Immunoeditingが働いていることを示している。実際、多発性骨髄腫の前がん病変であるMonoclonal Gammopathyの患者の生体内においては、腫瘍細胞に対して比較的強い細胞性免疫が誘導されているが、いったん多発性骨髄腫を発症した患者を調べると、腫瘍細胞に対する免疫反応は著しく下がってしまうことが知られている。

これより、免疫療法は発ガンの過程を阻害する目的で使用することが最も効果的であることがわかる。Her2トランスジェニックマウスの乳癌自然発生のモデルやAPC遺伝子のノックアウトマウスを用いた大腸癌自然発癌モデルにおいて、Her2タンパク質や腫瘍由来の抗原蛋白を与えた樹状細胞でワクチンすることにより、癌の発生頻度が著しく抑制されることが報告されている。Koutskyらは2002年に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス16型(HPV-16)に感染している若い女性2,392人を2群に分け一方にHPV-16ウイルス用粒子を、もう一方にはプラセ

ボをワクチンしたのち経過観察する, double blind randomized trial を行い, ワクチン群で完全に前癌病変の発生を抑制することに成功した¹²⁾. さらに, 同じく子宮頸癌の前癌病変を持つ患者に HPV 由来 E2 蛋白をコードした遺伝子改変ウイルスを用いてワクチンすることにより, 80%以上の確率で軽快もしくは治癒させることに今年成功している¹³⁾. このように, ウイルス性発がんに対しての予防目的のワクチン療法が今後最も臨床応用される期待が大きい領域で有ることは間違いない.

おわりに

筆頭著者が米国に留学中, 臨床カンファレンス

に顔を出したとき, ちょうど悪性黒色腫の肺転移患者の治療方針を検討していた. 外科のレジデントがワクチン療法や免疫細胞療法に言及したとき, 腫瘍内科の教授が“Great idea, no effect”と一喝したことを印象深く覚えている. そのときから3年が過ぎたが, 進行癌に対しては未だこの言葉に反論することはできない. 反面, 抗体療法は著しい進歩を遂げ, いまや標準治療の座を占めるものも出現してきた. 急速な時代の流れの中今後, 臨床的にどのように免疫療法が取り入れられていくか予想することは困難であるが, 21世紀中にはがんワクチン療法などの免疫細胞療法が予防的医療の領域で標準治療となることを確信している.

文 献

- 1) Albo D, Wang TN : Biologic cancer therapy. The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook 3ed ed, Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM, 510-556, A Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2003.
- 2) Naughton M : Medical Management of Malignant Disease, The Washington Manual TM of Medical Therapeutics, 31st edition, Green GB, Harris IS, Lin GA, et al, 463-464, A Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2004.
- 3) Fernando NH, Hurwitz HI : Targeted therapy of colorectal cancer : clinical experience with bevacizumab : Oncologist 9 Suppl 1 : 11-18, 2004.
- 4) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254(5038) : 1643-1647, 1991.
- 5) Hanada K, Yewdell JW, Yang JC : Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. Nature 427(6971) : 252-256, 2004.
- 6) Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, et al : An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. Science 2004 Apr 23 ; 304(5670) : 587-90, Epub 2004 Mar 04.
- 7) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al : Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. Nat Med 4(3) : 321-327, 1998.
- 8) Rosenberg SA : Shedding light on immunotherapy for cancer. N Engl J Med 350(14) : 1461-1463, 2004.
- 9) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al : Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298(5594) : 850-854, 2002.
- 10) Yu P, Lee Y, Liu W, et al : Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. Nat Immunol 5(2) : 141-149, 2004.
- 11) Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al : IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity Nature 410(6832) : 1107-1111, 2001.
- 12) Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al : Chiacchierini LM, Jansen KU ; Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. N Engl J Med 347(21) : 1645-1651, 2002.
- 13) Corona Gutierrez CM, Tinoco A, Navarro T, et al : Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus. Hum Gene Ther 15(5) : 421-431, 2004.

Host-oriented Peptide Evaluation Using Whole Blood Assay for Generating Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes

YOSHIHARU KAWABUCHI, YOSHIYUKI YAMAGUCHI, AKIKO OHSHITA,
KAZUHITO MINAMI and TETSUYA TOGE

*Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine,
Hiroshima University, Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan*

Abstract. A whole blood assay using antigenic peptide was established to predict host cytotoxic T lymphocyte (CTL) precursor status. Blood samples from HLA-A24 donors and colorectal cancer patients were directly diluted with RPMI-1640 medium to a 20% blood concentration, then distributed to tubes and a peptide of an HLA-A24-restricted CEA peptide panel (20 μ M) was added to the tubes. Incubation was performed for 4-5 days and supernatants were subjected to ELISA specific for IFN-gamma protein. It was observed that certain CEA peptides could stimulate the diluted blood samples to produce IFN-gamma. Only the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) that were purified from the IFN-gamma-positive samples of the whole blood assay showed positive spots, detected with IFN-gamma ELISPOT assay, and could proliferate with the stimulation of immobilized anti-CD3 antibody plus interleukin-2 (CD3/IL-2 system). The proliferating PBMCs expressed cytotoxic activity against HLA-A24+ CEA-expressing tumor cells and the TISI target cells pulsed with the CEA peptide that had been used to stimulate the PBMCs to produce IFN-gamma, but they did not kill the target cells pulsed with peptides that had failed to stimulate IFN-gamma production, nor did they kill the target cells alone. These findings suggest that the IFN-gamma production of the blood samples detected by the whole blood assay identifies the peptide that can induce the CEA antigen-specific CTL response. Detection of IFN-gamma gene expression using real-time-PCR analysis could identify the peptide within 6 hours, which is earlier than the protein analysis by ELISA. The whole blood assay using the CEA peptide panel for healthy donors and colorectal cancer patients revealed that IFN-gamma-inducible peptides were different among the individual samples

tested, indicating that the CEA peptides that should be used for generating CTLs are different in individual patients. The whole blood assay using a CEA antigen peptide panel is simple and beneficial for identifying candidate peptides. The host-oriented peptide evaluation (HOPE) approach may provide hope for the augmentation of clinical efficacies for peptide-based cancer immunotherapy.

The discovery and molecular cloning of the crucial lymphocyte growth factor, interleukin-2 (IL-2), has facilitated the clinical application of the adoptive immunotherapy (AIT) of cancer using autologous lymphocytes activated *in vitro* with IL-2 (1). Disease-associated immunosuppression in patients with cancer can disturb the effective emergence of anti-tumor responses *in vivo* (2), so that the adoptive transfer of effector lymphocytes, after being educated and activated *ex vivo* to recognize tumor cells, would, theoretically, be an effective treatment for cancer. Among the techniques developed, the use of lymphokine-activated killer (LAK) cells (3), autolymphocyte therapy (ALT) (4) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) (5) have been the best studied. While further trials are ongoing, thus far these approaches have not consistently shown benefits in comparison to standard immune-based treatment with biologic response modifiers (6). The success of adoptive cellular therapy depends on the ability to select optimally or produce cells genetically with the desired antigenic specificity, and then induce cellular proliferation while preserving the effector function, engraftment and homing abilities of the lymphocytes. Unfortunately, many previous clinical trials were carried out with adoptively transferred cells that were propagated in what are now understood to be sub-optimal conditions that impair the essential functions of the adoptively transferred cells (7).

The molecular understanding of antigen presentation and recognition has permitted us to establish new approaches to AIT for metastatic cancer patients, among which the use of dendritic cells (DCs) is encouraging (6). We have previously

Correspondence to: Yoshiyuki Yamaguchi, M.D., Ph.D., Kasumi 1-2-3-, Minami-ku, Hiroshima 734-8553, Japan. Tel: +81-82-257-5869, Fax: +81-82-256-7109, e-mail: shogo@hiroshima-u.ac.jp

Key Words: Peptide, cytotoxic T lymphocytes, interferon-gamma, ELISA.

Table I. Peptides used in this study.

| | |
|------------|------------|
| CEA10(10) | RWCIPWQRLI |
| CEA101(9) | IYPNASLLI |
| CEA234(9) | LYGPDAPTI |
| CEA268(10) | QYSWFVNGTF |
| CEA318(9) | VYAEPKPF |
| CEA425(9) | TYRPGVNL |
| CEA426(10) | YYRPGVNSL |
| CEA590(9) | LYGPDPTII |
| CEA604(10) | SYLSGANLNL |
| CEA652(9) | TYACFVSNL |

published a novel system for generating cytotoxic effector lymphocytes using DCs, the nomenclature of which is "peptide-pulsed DC-activated killer" (PDAK) cells (8). It has been shown that an antigenic protein has several antigenic epitopes presented on host HLA molecules (9, 10), so that we should choose, if possible, the best peptide sequence for stimulating patients' lymphocytes to be effective PDAK cells. This may depend on the patients' precursor status of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) reactive with the peptide. In this paper, we tried to establish a screening method for defining the candidate peptides appropriate for generating PDAK cells in individual patients.

Materials and Methods

Cells. A human B-lymphoblastoid cell line, TISI cells, that is defective in antigen processing but expresses the HLA-A24 allele and can effectively present exogenously supplied peptides, was used (11). The gastric cancer cell line MKN45 (12) expresses HLA-A24 and carcinoembryonic antigen (CEA). Both cell lines were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS).

Whole blood assay. Peripheral venous blood was collected by venipuncture from HLA-A24+ healthy donors (n=5) and patients with untreated colorectal cancer (n=9) and then immediately heparinized. The heparinized venous blood was diluted with RPMI-1640 medium (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 1 ml of which was distributed to polypropylene round-bottom tubes (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA). One antigenic peptide of a peptide panel was added to one tube. The panel of HLA-A24-restricted CEA peptides (TAKARA BIO INC., Ohtsu, Japan) used in this study is shown in Table I. Flu38 was prepared as a positive control and HIV (SIGMA Genosys, Ishikari, Japan) was used as a negative control. Incubation was performed at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Samples were resuspended and centrifuged and supernatants were collected and stored at -30°C until used. We measured IFN-gamma protein in the supernatants with enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) using the Quantikine Human IFN-gamma immunoassay kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. The density of each well was detected as absorbance at 450 nm with the correction wavelength set at 540nm in the Emax™ Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). In preliminary experiments, the optical density at 630 nm of the supernatant was also measured to determine hemolytic changes of the blood culture (13).

ELISPOT assay. IFN-gamma-secreting cells were analyzed with enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the samples of the whole blood assay mentioned above by standard density gradient centrifugation using Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). The ELISPOT assay was conducted on cells (4 x 10⁴/well) using Human IFN-gamma ELISpot Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

Proliferation assay. PBMCs (5 x 10⁵ /ml) isolated after the whole blood assay were resuspended in RPMI-1640 medium containing 40 IU/ml IL-2 and 2% autologous serum (complete medium) and stimulated in a 24-well tissue culture plate, which had been coated with 1 µg/ml anti-CD3 antibody (OKT-3, Kyowahakko, Tokyo, Japan) for more than 24 hours and rinsed with RPMI-1640 medium more than 3 times (14). The cells were incubated at 37°C in a humidified CO₂ incubator for 7 to 14 days with the medium half-changed with fresh complete medium twice a week. Cells activated with IL-2 plus anti-CD3 antibody stimulation (CD3/IL-2 system) were washed, resuspended in the medium, distributed in a 96-well microtiter plate in triplicate (100 µl/well) and pulsed with 1 µCi ³H-thymidine, followed by another incubation for 8 hours. The incubation was terminated by harvesting the cells and their radioactivities were counted with a scintillation counter (Packard, USA).

Cytotoxicity assay. The cytotoxic activity of lymphocytes activated with peptides and the CD3/IL-2 system was determined by a standard ⁵¹Cr-releasing assay. First, target cells were pulsed with peptide and labeled with ⁵¹Cr. Target cells and effector lymphocytes were cocultured in 96-well round-bottomed microtiter plates in triplicate at effector-to-target (E/T) ratios of 10 and 20 in a volume of 200 µl. After a 4-hour incubation, the radioactivity of the supernatants was measured using an auto-gamma scintillation counter (Packard). Spontaneous release was determined in wells containing the target cells alone and maximum release was obtained by adding 100 µl of 1% Triton X-100 solution to the target cells instead of the effector cells. Cytotoxic activity was calculated from triplicate samples by the following formula: cytotoxic activity (per cent) = (experimental release [cpm] - spontaneous release [cpm]) / (maximal release [cpm] - spontaneous release [cpm]) X 100.

Real-time quantitative PCR with the LightCycler™. Total RNA was extracted from PBMC isolated from samples of whole blood assay according to the protocol of the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Wien, Austria). The reverse transcription reaction was carried out according to the protocol of Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). The LightCycler™-Primer Set IFN-gamma and LightCycler™-

Table II. Optimal conditions for the whole blood assay using antigenic peptide.

| Blood concentration (%) | Days in culture | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 10 | 73 ^a 0.01 ^b | 102 0.02 | 113 0.03 | 155 0.02 |
| 20 | 192 0.02 | 237 0.03 | 303 0.03 | 298 0.03 |
| 30 | 36 0.04 | 45 0.05 | 52 0.07 | 48 0.09 |
| 40 | 38 0.05 | 72 0.07 | 64 0.15 | 60 0.16 |
| 50 | 48 0.08 | 33 0.12 | 47 0.18 | 25 0.38 |

Whole blood was diluted with medium and cultured for 2-5 days as indicated in the presence of 20 μ M CEA652; the supernatant was subjected to ELISA for IFN-gamma (a) and measurement of optical density at 630 nm (b).

Primer Set G6PDH (Search GmbH, Heidelberg, Germany) were used in the analysis of IFN-gamma and G6PDH gene expression. The PCR reactions were performed in a LightCycler™ instrument using LightCycler™ FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Thermocycling was done in a final volume of 20 μ l containing 10 μ l of DNA sample (diluted 1:10) and other components; 2 μ l of LightCycler™ Primer mix; 2 μ l of LightCycler™ FastStart DNA Master SybrGreen I (including Taq DNA polymerase, reaction buffer, deoxynucleotide triphosphate mix, SYBR Green I dye and 10mM MgCl₂); and 6 μ l of PCR grade water. After 10 minutes at 95°C to denature the cDNA and to activate the Taq DNA polymerase, the cycling conditions were as follows: 35 cycles consisting of denaturation at 95°C for 10 seconds, annealing at 68°C for 10 seconds and extension at 72°C for 16 seconds. After PCR, a melting curve was constructed by increasing the temperature from 58°C to 95°C with a temperature transition rate of 0.1°C/second. IFN-gamma and G6PDH sequences were amplified in duplicate from the patient samples. The assay was completed in ~1 hour. To ensure that the correct product was amplified in the reaction, all samples were separated by 2% agarose gel electrophoresis. The LightCycler™ instrument measured the fluorescence of each sample in every cycle at the end of the annealing step. The Fit Points Method was used to determine the cross point (Cp) automatically for the individual samples. The LightCycler™ software constructed the calibration curve by plotting the Cp vs the logarithm of the number of copies for each calibrator. The numbers of copies in unknown samples were calculated by comparing their Cps with the calibration curve. To correct for differences in both RNA quality and quantity between samples, the data were normalized using the ratio of the target cDNA concentration to that of G6PDH.

Table III. Comparison among IFN-gamma production, IFN-gamma spots and lymphocyte proliferative responses.

| Peptide | Pt-1 | | | Pt-2 | | |
|------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|
| | IFN-g | Spots | ³ H-TdR | IFN-g | Spots | ³ H-TdR |
| None | 0 | 0 | 104 | 0 | 0 | 331 |
| FLU38(10) | 100 | 12 | 4645* | 64 | 14 | 655* |
| CEA10(10) | 0 | 0 | 98 | 0 | - | - |
| CEA101(9) | 0 | 0 | 88 | 0 | 0 | 294 |
| CEA234(9) | 0 | 0 | 101 | 725 | 133 | 8331* |
| CEA268(10) | 0 | 0 | 99 | 0 | 0 | 306 |
| CEA318(9) | 0 | 0 | 109 | 0 | - | - |
| CEA425(9) | 0 | 0 | 87 | 470 | 77 | 3350* |
| CEA426(10) | 0 | 0 | 105 | 0 | - | - |
| CEA590(9) | 130 | 16 | 623* | 0 | - | - |
| CEA604(10) | 0 | 0 | 87 | 540 | 104 | 6744* |
| CEA652(9) | 640 | 72 | 2036* | 240 | 48 | 2087* |

Blood samples were diluted with medium and stimulated with peptides, then the supernatants were subjected to ELISA specific for IFN-gamma protein. PBMCs were harvested from the same blood samples after peptide stimulation and subjected to IFN-gamma ELISPOT analysis. Harvested PBMCs were stimulated with the CD3/IL-2 system and ³H-TdR uptakes were determined. Standard deviations of ³H-TdR uptakes were less than 15% of each value. Significant differences from the value with no peptide, **p*<0.05. Pt, patient.

Statistical analysis. Statistical analysis was conducted by a χ^2 test or Student's *t*-test using StatView software (Version 5) on a Macintosh computer.

Results

Optimal incubation period and blood concentration for whole blood assay. At first, in order to determine the optimal conditions for the incubation period and blood concentration for the whole blood assay that detects IFN-gamma production by peptide stimulation, blood samples from HLA-A24 donors were directly stimulated under various incubation conditions with a CEA652 peptide that has been reported to have the most potent motif for binding to HLA-A24 molecules (9) (Table II). IFN-gamma production in the supernatant was apparently detectable with ELISA in the tubes of 20% blood sample, even on day 2. IFN-gamma production increased thereafter and peaked on day 4, showing a maximal production of 303 pg/ml. The supernatant from the tube of the 5-day culture of the 20% blood sample showed a similar IFN-gamma production of 298 pg/ml. The supernatant from the tubes of 10% blood samples showed lower IFN-gamma production and concentrations of 30% or more blood

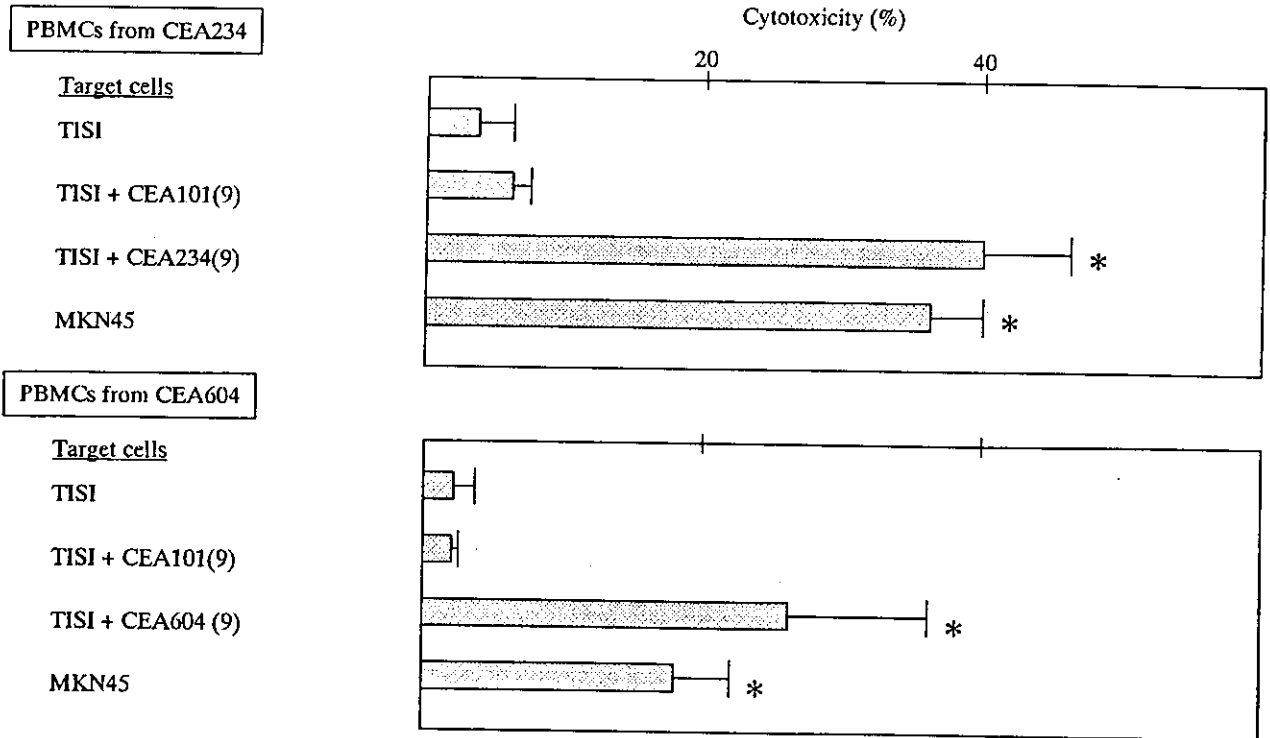


Figure 1. Cytotoxic activity of PBMCs from IFN-gamma-positive whole blood assay. PBMCs were harvested from IFN-gamma-positive whole blood assay, stimulated with the CD3/IL-2 system and subjected to cytotoxicity assay using the target cells indicated. Significant differences from the cytotoxic activity against TISI cells alone, * $p < 0.01$.

Table IV. Diversity of IFN-gamma-inducible peptides in colorectal cancer patients.

| Peptide | HD-1 | HD-2 | HD-3 | HD-4 | HD-5 | Pt-1 | Pt-2 | Pt-3 | Pt-4 | Pt-5 | Pt-6 | Pt-7 | Pt-8 | Pt-9 |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| None | 125 | 0 | 0 | 50 | 0 | - | - | - | 0 | - | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FLU38(10) | 150 | 285 | 170 | 100 | 220 | - | - | - | 0 | - | 500 | 285 | 100 | 85 |
| CEA10(10) | 325 | 210 | 0 | 0 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 67 | 0 | 20 | 55 | 0 |
| CEA101(9) | 75 | 35 | 100 | 0 | 0 | 0 | 75 | 0 | 0 | 90 | 200 | 250 | 0 | 0 |
| CEA234(9) | 0 | 170 | 50 | 80 | 70 | 0 | 20 | 0 | 725 | 0 | 0 | 40 | 0 | 170 |
| CEA268(10) | 75 | 80 | 0 | 525 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 140 | 80 | 40 | 0 | 0 |
| CEA318(9) | 240 | 0 | 0 | 60 | 0 | 106 | 0 | 20 | 0 | 31 | 1000 | 100 | 10 | 0 |
| CEA425(9) | 975 | 0 | 30 | 30 | 100 | 4547 | 0 | 0 | 470 | 126 | 120 | 20 | 10 | 0 |
| CEA426(10) | 550 | 65 | 60 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 20 | 0 | 70 |
| CEA590(9) | 300 | 320 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 60 | 180 | 925 |
| CEA604(10) | 0 | 50 | 0 | 50 | 40 | 227 | 0 | 25 | 540 | 0 | 300 | 50 | 10 | 0 |
| CEA652(9) | 255 | 560 | 670 | 230 | 280 | 0 | 140 | 339 | 240 | 216 | 275 | 350 | 640 | 0 |

Whole blood assay was performed in HLA-A24 healthy donors and colorectal cancer patients and IFN-gamma production was shown. HD, healthy donor; Pt, patient

samples had incomparable IFN-gamma production. At the same time, the optical density at 630 nm of the same culture supernatants was determined. The optical density at 630 nm increased in parallel with blood concentration and the sample with 50% concentration and a 5-day culture showed the highest optical density of 0.38.

Collectively, we determined that the optimal conditions of the whole blood assay were 4-5 days for the incubation period and a 5-fold dilution.

ELISPOT assay for IFN-gamma-positive PBMCs. We next performed the ELISPOT assay on PBMCs collected from

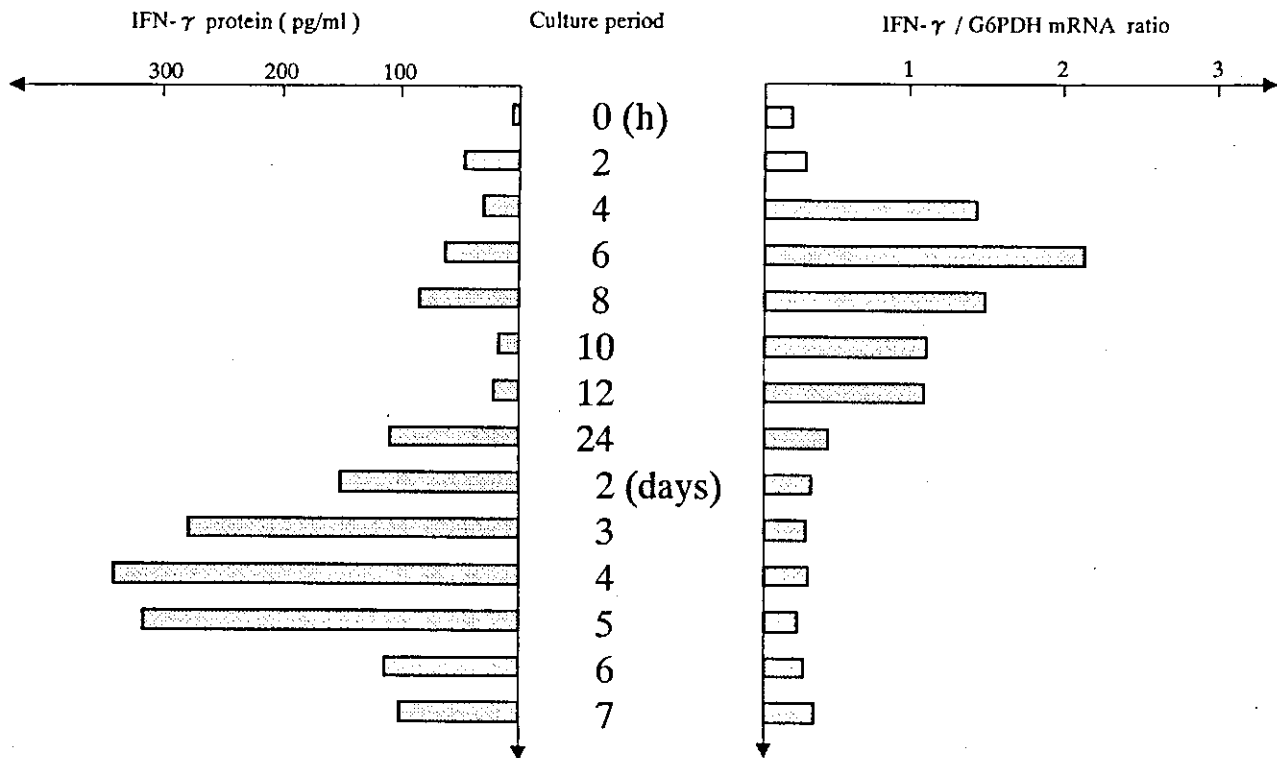


Figure 2. Detection of IFN-gamma gene by real-time PCR. Whole blood assay was performed using CEA652 peptide and IFN-gamma expression was analyzed at various times by protein levels using ELISA and by mRNA levels using real-time-PCR.

the whole blood assay stimulated with a CEA peptide panel. Representative data are shown in Table III. In Pt-1, CEA652 and CEA590 peptides were active in stimulating IFN-gamma production that was evaluated with the whole blood assay, which showed IFN-gamma productions of 640 and 130 pg/ml, respectively. The ELISPOT assay on the same PBMCs purified from the whole blood assay of Pt-1 showed positive spots only for the PBMCs purified from CEA652 and CEA590 peptide tubes, with these PBMCs showing 72 and 16 spots, respectively. The assay showed no spots for the PBMCs from the other tubes. Similar results were obtained in Pt-2, in which CEA234, 425, 604 and 652 were active in stimulating IFN-gamma production in the whole blood assay; PBMCs from the IFN-gamma-positive tubes could make IFN-gamma spots, but those from the other tubes could not.

Proliferative responses of IFN-gamma-positive PBMCs. PBMCs collected from the whole blood assay were stimulated with the CD3/IL-2 system and the proliferative responses were evaluated by $^3\text{H-TdR}$ uptakes (Table III). PBMCs from the CEA652 and CEA590 tubes of Pt-1 could proliferate by CD3/IL-2 stimulation, showing $^3\text{H-TdR}$ uptake of 2036 and 623 cpm, respectively. This $^3\text{H-TdR}$

uptake was significantly higher than those of PBMCs from IFN-gamma-negative tubes ($p < 0.01$). Similar results were obtained in Pt-2. Only the PBMCs from the IFN-gamma-positive tubes could proliferate due to the CD3/IL-2 stimulation, but those from the other tubes could not.

Cytotoxic activity of PBMCs stimulated with the CD3/IL-2 system. In order to clarify whether or not the IFN-gamma production detected with the whole blood assay indicates truly antigenic peptide-specific immune responses, a cytotoxicity assay was developed for PBMCs purified from IFN-gamma-positive tubes in the whole blood assay (Figure 1). The PBMCs that were collected from the CEA234 tube of Pt-2 and stimulated with the CD3/IL-2 system did not kill TISI target cells alone. The PBMCs also did not kill TISI cells pulsed with the CEA101 peptide that could not stimulate IFN-gamma production for Pt-2 PBMCs. The PBMCs did kill TISI target cells pulsed with CEA234, showing a cytotoxic activity of 40% at an E/T ratio of 10. Similar results were obtained in the PBMCs from the CEA604 tube of Pt-2. These PBMCs from CEA234 and 604 killed MKN45 target cells that express HLA-A24 and CEA molecules.

Host-oriented detection of IFN-gamma-inducible peptide with whole blood assay. The whole blood assay using the CEA peptide panel was performed to detect the IFN-gamma-inducible peptides in HLA-A24+ healthy donors and HLA-A24+ colorectal cancer patients (Table IV). The highest levels of IFN-gamma production in each blood sample were observed with stimulations of CEA425, 652, 652, 268 and 652 in healthy donors 1 to 5, respectively, and with stimulations of CEA425, 652, 652, 234, 652, 318, 652, 652 and 590 in colorectal cancer patients 1 to 9, respectively. These levels ranged from 280 to 975 pg/ml in the healthy donors and from 140 to 4547 pg/ml in the patients.

Use of real-time PCR for detecting IFN-gamma-inducible peptide in whole blood assay. The IFN-gamma effects on the peptide stimulation in the whole blood assay were analyzed at various times at the mRNA level using real-time PCR in parallel with analyses performed at the protein level by ELISA (Figure 2). The production of IFN-gamma protein by stimulation with CEA652 peptide was detectable by ELISA on day 2, peaked on day 4, then decreased. The IFN-gamma gene expression was detectable only 4 hours after the stimulation and it peaked at 6 hours after the stimulation, then decreased. The IFN-gamma gene expression was no longer detectable on the days after the stimulation.

Discussion

Cytokine production profiles have been studied in relation to patients' immunity and are, in general, measured with purified PBMCs (15). However, it has been reported that a good correlation is obtained on comparing PBMC cultures with the whole blood system if the cell number is taken into account, and that whole blood culture is a simple and reproducible method for the measurement of mitogen-induced cytokine production (16). Our previous study demonstrated that the clinical responses of locoregional immunotherapy for malignant effusion were correlated with cytokine profiles analyzed using whole blood and whole effusion assay (17). In this study, CEA peptides could stimulate IFN-gamma production in the whole blood assay. This significance, however, must be clarified on a scientific basis.

First, the culture conditions of the whole blood assay must be established. Our experiments showed that the optimal conditions for the whole blood assay were an incubation period of 4-5 days and a 5-fold dilution. Although a more concentrated blood sample would have contained more CTL precursor that was able to produce IFN-gamma by CEA peptide stimulation, a greater concentration of the blood sample did not always produce more IFN-gamma. The dilution of 20% was optimal for

preparing the samples for IFN-gamma measurement. The optical density at 630 nm increased with greater blood concentration, indicating that a more concentrated blood sample has increased hemolysis (13). The hemolysis may worsen the culture conditions and disturb the IFN-gamma production.

Second, the significance of the IFN-gamma production of the whole blood assay with CEA peptide stimulation should be clarified. IFN-gamma has been the key cytokine used in the monitoring of specific immune responses. For example, tumor-antigen encoding genes MAGE (18), MART-1/Melan-A (19) and SART (20) were discovered with the pairs of autologous tumor cells and their CTLs using IFN-gamma production as an indicator. However, did the IFN-gamma production in our study truly reflect peptide-specific responses? It was observed that only the PBMCs stimulated with CEA peptides to produce IFN-gamma could grow by means of stimulation of the CD3/IL-2 system. Moreover, these grown PBMCs killed HLA-matched CEA-expressing tumor cells and target cells pulsed with the peptide that had been used to stimulate the PBMCs, but did not kill target cells pulsed with the peptide that failed to stimulate IFN-gamma production and did not kill target cells alone. These findings indicate that activated PBMCs from the IFN-gamma-positive tubes of the whole blood assay express killing activity in an antigen peptide-specific manner. These results suggest that the IFN-gamma production that we observed in the whole blood assay directly indicates the peptide-induced specific immune responses. We would like to propose that the whole blood assay is a simple and beneficial method for screening the candidate peptides that can generate the antigen peptide-specific CTLs.

Based on the above results, the whole blood assay using the CEA peptide panel was performed in HLA-A24+ healthy donors and in patients with colorectal cancer. Surprisingly, it was observed that the IFN-gamma-inducible CEA peptides were different among the healthy donors and patients tested. Although CEA652 has been shown to have the most potent binding affinity for the HLA-A24 molecule and to induce CEA-reactive CTLs (9), it did not always stimulate sufficient IFN-gamma production of PBMCs in our blood samples. Previously, many vaccine studies for cancer treatment were designed using peptides that had a potent affinity to HLA molecules, but these studies have been unable to establish the expected clinical tumor responses (21, 22). Recently, the evidence-based vaccination protocol, in which notable tumor responses were generated, was published. In that study, the researchers chose only peptides that could stimulate PBMCs to produce IFN-gamma (23), indicating that the peptides to be used in cancer immunotherapy should be selected according not only to the HLA binding affinity of the peptide, but also to