

grossly similar to that of B-Raf^{-/-} thymocytes. This allows us to speculate that the Ras-Raf-1-ERK pathway exerts a promoting effect during DP-SP transition. However, results using dominant-interfering mutants must be interpreted with caution, as the specificity of Raf isoforms varies, and the specificity of the dominant-interfering mutant of Raf has not yet been elucidated [8, 42]; thus, this mutant may interfere with not only Raf-1 but also B-Raf function. Therefore, the DP arrest of thymocytes expressing the mutant Raf protein may be due to interference with B-Raf function, which can be supportive evidence of our results. Furthermore, it was reported that maximal activation of B-Raf requires Ras activation [15], and we have demonstrated that B-Raf activity is regulated by Ras in TCR-stimulated T cells [24]. Based on these results, the defect in thymocyte differentiation from the DP to SP stage (positive selection) in mice expressing a dominant-negative mutant of Ras could be partly explained by impaired B-Raf activation. Compared with the approaches using constitutively active or dominant-negative mutants of Raf, our specific, non-pharmacological approach provides a more convincing assessment of the function of B-Raf in T cell differentiation and raises the possibility that the Ras-B-Raf-ERK pathway is critical for differentiation of thymocytes. It is implied that the Raf isoforms would either function synergistically under certain circumstances or function specifically at different time points of thymocyte development.

We found that B-Raf acts as a positive regulator for TCR-dependent ERK activation in DP thymocytes, which has an obligatory role in positive selection [4, 5]. A currently favored model postulates that the strength, kinetics and compartmentalization of ERK activation dictates the thresholds for both positive and negative selection of thymocytes [9, 43, 44]. According to this viewpoint, the developmental defect observed in B-Raf^{-/-} thymocytes can be partly explained by the reduction in TCR-mediated ERK activation, which is necessary for thymocytes to pass through the checkpoint of positive selection. Furthermore, the leaky formation of SP thymocytes in B-Raf^{-/-} chimeric mice may be a result of thymocytes employing alternative signaling molecules such as Raf-1 and/or a reflection of biased thresholds of positive and negative selection. Further studies regarding the effects of B-Raf on thymic selection are needed to prove this point.

Materials and methods

Reagents and flow cytometry

FITC-, Cy5- or PE-conjugated anti-mouse CD44, CD25 and Thy1.2 mAb and anti-CD3ε mAb (145–2C11) were purchased from BD PharMingen (San Diego, CA). Anti-B220 mAb was

purchased from Miltenyi Biotec (Auburn, CA), and FITC-, Cy5- or PE-conjugated anti-mouse CD4, CD8, TCR-β chain, CD5 and CD69 mAb were from eBioscience (San Diego, CA). Polyclonal anti-ERK, Raf-1 and B-Raf Ab were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Polyclonal anti-phospho-ERK Ab and the MEK inhibitor U0126 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). HRP-conjugated rabbit anti-mouse and donkey anti-rabbit IgG were from Amersham Bioscience (Arlington Heights, IL). PMA and anti-hamster Ig Ab were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Intracellular staining for phospho-ERK was done using IntraPrep (Immunotech, Marseille, France) according to the manufacturer's instructions. Acquisition of data was performed on a FACScan, and the data were analyzed with CELLQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Cell stimulation, Western blotting and *in vitro* kinase assay

Jurkat cells transfected with B-Raf (or mock-transfected) were prepared as described [24]. Thymic DP and SP cells were purified by cell sorting using a BD FACSVantage (>98% CD4⁺CD8⁺ DP, >95% CD4⁺ SP or CD8⁺ SP). For TCR stimulation, cells were preincubated on ice for 20 min, and then soluble anti-CD3 mAb was added. After 15 min incubation, anti-hamster Ig Ab was added for cross-linking of CD3 and incubated for 5 min. Stimulation was performed by incubation at 37°C for the indicated time. Western blottings, immunoprecipitations, *in vitro* kinase assays for Raf-1 and B-Raf, and intracellular stainings were carried out as previously described [22, 24].

Preparation of fetal liver cells and co-culture with OP9-DL1

The day of vaginal plug discovery was designated as embryonic day 0.5. Genotyping of B-Raf^{-/-} fetuses was retrospectively performed on DNA isolated from fetal bodies by PCR. The primers for PCR have been described [19]. Single-cell suspensions of FL cells (day 11.5–12.5 of gestation) were cultured in 12-well tissue culture plates seeded with a confluent monolayer of OP9-DL1 to be differentiated into the T cell lineage as described [31]. Briefly, the co-culture was performed in the presence of 5 ng/mL IL-7 and 5 ng/mL fms-like tyrosine kinase-3 ligand (Peprotech, London, UK). Co-cultured cells were harvested by forceful pipetting at the indicated time points and then reseeded onto new OP9-DL1 or OP9-GFP or stained for flow cytometric analyses.

Generation of chimeric mice

C57BL/6 mice, RAG2^{-/-} mice [27] and B-Raf^{+/-} mice [19] were bred on the C57BL/6 background and maintained in specific pathogen-free conditions at a barrier facility in accordance with the Animal Experiment Committee of Kumamoto University. RAG2^{-/-} mice (6–8 wk old) irradiated with 5 Gy 1 day before the injection were used as recipients for lymphoid reconstitution with B-Raf-deficient and wild-type control cells. FL cells (1×10^6) were isolated from B-Raf^{+/+} or B-Raf^{+/-} fetuses on day 11.5–12.5 of gestation and then

injected intravenously into the recipient mice. OP9-DL1-induced DN cells were negatively selected by magnetic separation using anti-CD4 and anti-CD8 beads and positively selected using anti-Thy1.2 beads (Miltenyi Biotec) (>95% CD4⁺CD8⁻, Thy1.2⁺). Then 5×10^6 cells were i.v. injected into the 5 Gy-irradiated recipients. Cells from thymus, spleen and lymph nodes of the reconstituted recipient RAG2^{-/-} mice were harvested and analyzed 7–9 wk or 4–6 wk after the transfer of FL or DN cells, respectively. Donor thymocytes and T cells were recognized by the expression of the Thy-1 or TCR- β chain.

Quantitative analyses of T cell proliferation

For the analysis of cell division, T cell progenitor cells from the OP9-DL1 co-culture were labeled with 1 μ M CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) in PBS for 10 min at 37°C. Cells were washed in RPMI containing 10% FCS and reseeded onto OP9-DL1 or OP9-GFP. After 2 days of additional co-culture with OP9-DL1, the cells were harvested and analyzed for the intensity of CFSE dye together with other cell surface markers.

Acknowledgements: We thank Dr. Carlos Zuniga-Pflucker for the generous gift of OP9-DL1 and OP9-GFP cell lines. We also acknowledge Midori Fukuda for her secretarial assistance. This work was supported by Grants-in-Aid Nos. 14370115, 15510165 and 17510167 to Y. Nishimura from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture, Japan.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J. and Marais, R., Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 1999. **18**: 2137–2148.
- Germain, R. N., T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. **2**: 309–322.
- Starr, T. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003. **21**: 139–176.
- Fischer, A. M., Katayama, C. D., Pages, G., Pouyssegur, J. and Hedrick, S. M., The role of erk1 and erk2 in multiple stages of T cell development. *Immunity* 2005. **23**: 431–443.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., Auberger, P. and Pouyssegur, J., Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999. **286**: 1374–1377.
- Alberola-Ila, J., Hogquist, K. A., Swan, K. A., Bevan, M. J. and Perlmutter, R. M., Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J. Exp. Med.* 1996. **184**: 9–18.
- Swan, K. A., Alberola-Ila, J., Gross, J. A., Appleby, M. W., Forbush, K. A., Thomas, J. F. and Perlmutter, R. M., Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J.* 1995. **14**: 276–285.
- O'Shea, C. C., Crompton, T., Rosewell, I. R., Hayday, A. C. and Owen, M. J., Raf regulates positive selection. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2350–2355.
- Alberola-Ila, J. and Hernandez-Hoyos, G., The Ras/MAPK cascade and the control of positive selection. *Immunol. Rev.* 2003. **191**: 79–96.
- Crompton, T., Gilmour, K. C. and Owen, M. J., The MAP kinase pathway controls differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Cell* 1996. **86**: 243–251.
- Bomhardt, U., Basson, M. A., Krumrei, U. and Zamoyska, R., Activation of the extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase pathway discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *J. Immunol.* 1999. **163**: 715–722.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slatery, R., Murray, R. and McMahon, M., Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr. Biol.* 1996. **6**: 614–617.
- Brummer, T., Shaw, P. E., Reth, M. and Misawa, Y., Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO J.* 2002. **21**: 5611–5622.
- Hagemann, C. and Rapp, U. R., Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* 1999. **253**: 34–46.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S. and Marshall, C. J., Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 1997. **272**: 4378–4383.
- Kamata, T., Kang, J., Lee, T. H., Wojnowski, L., Pritchard, C. A. and Leavitt, A. D., A critical function for B-Raf at multiple stages of myelopoiesis. *Blood* 2005. **106**: 833–840.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K. et al., Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J.* 2001. **20**: 1952–1962.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Larner, A. C., Rapp, U. R. and Zimmer, A., Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 2000. **91**: 97–104.
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R. and Zimmer, A., Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat. Genet.* 1997. **16**: 293–297.
- Barnier, J. V., Papin, C., Eychene, A., Lecoq, O. and Calothy, G., The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 1995. **270**: 23381–23389.
- Emuss, V., Garnett, M., Mason, C. and Marais, R., Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res.* 2005. **65**: 9719–9726.
- Tsukamoto, H., Irie, A., Chen, Y. Z., Takeshita, K., Kim, J. R. and Nishimura, Y., TCR ligand avidity determines the mode of B-Raf/Raf-1/ERK activation leading to the activation of human CD4⁺ T cell clone. *Eur. J. Immunol.* 2006. **36**: 1926–1937.
- Owaki, H., Varma, R., Gillis, B., Bruder, J. T., Rapp, U. R., Davis, L. S. and Geppert, T. D., Raf-1 is required for T cell IL2 production. *EMBO J.* 1993. **12**: 4367–4373.
- Tsukamoto, H., Irie, A. and Nishimura, Y., B-Raf contributes to sustained extracellular signal-regulated kinase activation associated with interleukin-2 production stimulated through the T cell receptor. *J. Biol. Chem.* 2004. **279**: 48457–48465.
- Dillon, T. J., Karpitski, V., Wetzel, S. A., Parker, D. C., Shaw, A. S. and Stork, P. J., Ectopic B-Raf expression enhances extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in T cells and prevents antigen-presenting cell-induced anergy. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**: 35940–35949.
- Kurella, S., Yaciuk, J. C., Dozomov, I., Frank, M. B., Centola, M. and Farris, A. D., Transcriptional modulation of TCR, Notch and Wnt signaling pathways in SEB-energized CD4⁺ T cells. *Genes Immun.* 2005. **6**: 596–608.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J. et al., RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992. **68**: 855–867.
- Vossler, M. R., Yao, H., York, R. D., Pan, M. G., Rim, C. S. and Stork, P. J., cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 1997. **89**: 73–82.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J., Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U., Buer, J. and Azogui, O., Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 1999. **11**: 135–142.
- Ciofani, M. and Zuniga-Pflucker, J. C., Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat. Immunol.* 2005. **6**: 881–888.
- Schmitt, T. M. and Zuniga-Pflucker, J. C., Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity* 2002. **17**: 749–756.

- 32 Muller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosfeld, F. and Dzierzak, E., Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1994. **1**: 291–301.
- 33 Ciofani, M., Schmitt, T. M., Ciofani, A., Michie, A. M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. L. and Zuniga-Pflucker, J. C., Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 2004. **172**: 5230–5239.
- 34 Jameson, S. C., Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. **2**: 547–556.
- 35 Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W. and Love, P. E., CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 2301–2311.
- 36 Swat, W., Dessing, M., von Boehmer, H. and Kiselew, P., CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺8⁺ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 1993. **23**: 739–746.
- 37 Carey, K. D., Dillon, T. J., Schmitt, J. M., Baird, A. M., Holdorf, A. D., Straus, D. B., Shaw, A. S. and Stork, P. J., CD28 and the tyrosine kinase Ick stimulate mitogen-activated protein kinase activity in T cells via inhibition of the small G protein Rap1. *Mol. Cell. Biol.* 2000. **20**: 8409–8419.
- 38 Nagy, Z. S., Wang, Y., Erwin-Cohen, R. A., Aradi, J., Monia, B., Wang, L. H., Stepkowski, S. M. et al., Interleukin-2 family cytokines stimulate phosphorylation of the Pro-Ser-Pro motif of Stat5 transcription factors in human T cells: resistance to suppression of multiple serine kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* 2002. **72**: 819–828.
- 39 Reynolds, L. F., de Bettignies, C., Norton, T., Beeser, A., Chernoff, J. and Tybulewicz, V. L., Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of the Ras/ERK pathway via LAT, Sos, and RasGRP1. *J. Biol. Chem.* 2004. **279**: 18239–18246.
- 40 Eychene, A., Dusanter-Fourt, I., Barnier, J. V., Papin, C., Charon, M., Gisselbrecht, S. and Calothy, G., Expression and activation of B-Raf kinase isoforms in human and murine leukemia cell lines. *Oncogene* 1995. **10**: 1159–1165.
- 41 Iritani, B. M., Alberola-Ila, J., Forbush, K. A. and Perimutter, R. M., Distinct signals mediate maturation and allelic exclusion in lymphocyte progenitors. *Immunity* 1999. **10**: 713–722.
- 42 Wotton, D., Ways, D. K., Parker, P. J. and Owen, M. J., Activity of both Raf and Ras is necessary for activation of transcription of the human T cell receptor beta gene by protein kinase C, Ras plays multiple roles. *J. Biol. Chem.* 1993. **268**: 17975–17982.
- 43 McNeil, L. K., Starr, T. K. and Hogquist, K. A., A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005. **102**: 13574–13579.
- 44 Daniels, M. A., Teixeira, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G. et al., Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* 2006. **444**: 724–729.

● 総 説 ●

[シリーズ：疾患と組織適合性]

第 1 回

HLA 分子による癌特異抗原の提示を 利用した癌免疫療法の開発

千住 覚, 西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究所・免疫識別学分野

キーワード：癌特異抗原, Glypican-3 (GPC3), 肝細胞癌 (HCC), 癌免疫療法, ペプチドワクチン, 腫瘍マーカー, ES 細胞, 樹状細胞, ES-DC, 細胞ワクチン

はじめに

癌細胞にのみ発現する抗原を免疫することにより、癌細胞を攻撃して破壊する T 細胞を誘導する免疫療法を確立するために、様々な癌抗原ワクチンの開発が試みられている。従来、正常組織に発現を認めず癌細胞に特異的に高発現する癌抗原を同定することは困難であったが、cDNA マイクロアレイ解析による癌組織と正常組織におけるゲノムワイドの遺伝子発現プロファイル解析により、癌特異抗原の同定が飛躍的に進んだ。我々は、この手法を用いて多数の癌特異抗原を同定し、これを用いた癌免疫療法の臨床試験を開始している。本稿では、肝細胞癌に高発現する新規癌胎児性抗原である Glypican-3 (GPC3) の発見と、GPC3 由来の HLA-A2 および HLA-A24 により細胞傷害性(キラー) T 細胞に提示されるペプチドを用いた、癌免疫療法の開発について紹介する。

樹状細胞は、T 細胞の活性化において必須の役割を果たしているプロフェッショナル抗原提示細胞である。そこで、生体外で培養した樹状細胞に何らかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン療法が、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手

段として期待されている。筆者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞の供給源として胚性幹 (ES) 細胞に着目し、ES 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の開発に関する基礎研究を行っている。本稿では、マウスの腫瘍モデルを用いた、ES 細胞から分化誘導した樹状細胞 (ES-DC) による効率良い腫瘍免疫の誘導に関する研究成果、ならびに、最近開発したヒトの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する培養法について紹介する。

このような癌免疫療法の臨床応用において、どの癌抗原ペプチドあるいは、どの ES 細胞から誘導した ES-DC を、どの患者に投与するのかについて、癌患者および ES 細胞の HLA タイピングが重要であることは言うまでもない。

1. 肝細胞癌 (HCC) に対する免疫療法の現況

HCC の患者数は、欧米およびアジア諸国において依然として増加している。HCC は治療後も高頻度に再発を繰り返すため予後不良な癌であり、B 型および C 型肝炎と、それに引き続いて発症する肝硬変から発生する、ごく初期の癌に対する早期治療法や、

代表者連絡先 〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1
熊本大学大学院医学薬学研究所・免疫識別学分野
西村 泰治

T E L 096-373-5310
F A X 096-373-5314
E-mail mxnshim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれている。

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や、HCC 術後における術後化学療法は、いまだ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代より lymphokine-activated killer (LAK) cells, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いた養子免疫療法、DC ワクチン療法、 α フェト蛋白質由来のペプチドワクチン療法などが試みられている。また HCC において高発現する癌特異的抗原も複数報

告されており、各施設でその有用性が検討されている¹⁾。

2. 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) の発見

1) cDNA マイクロアレイ解析による HCC 特異的な癌胎児性抗原の発見

我々は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔博士らとの共同研究により、癌部と非癌部における cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾を用いて、HCC 特異的に高発現する遺伝子として GPC3 を同定した³⁾ (図 1A)。図に示すように、

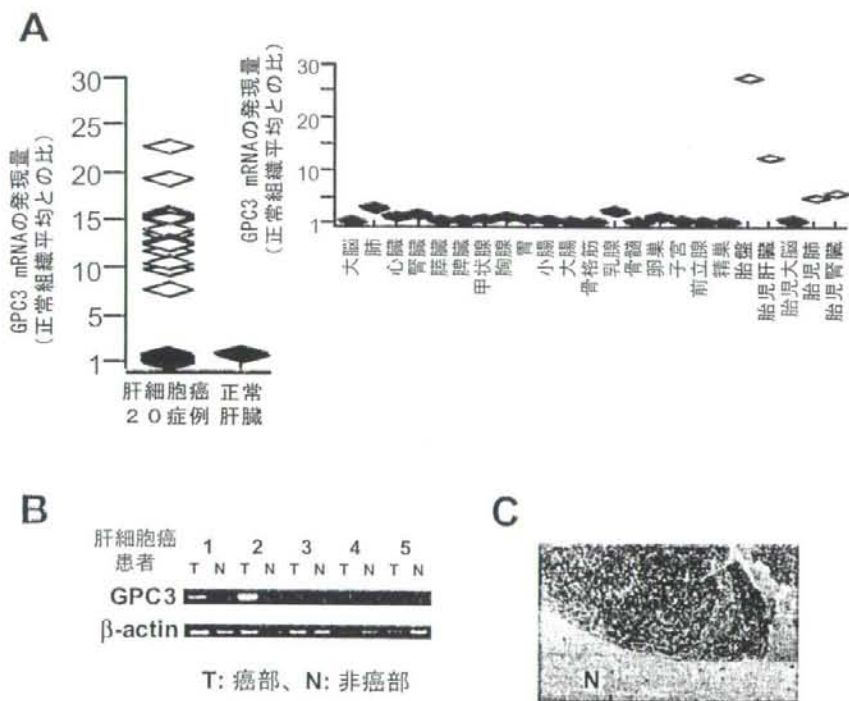


図1 HCC20例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾と HCC 組織における GPC3mRNA および蛋白質の発現

A: HCC 患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、さらに胎生期の 4 臓器を含む 23 臓器の正常組織において、各遺伝子の発現プロファイルを解析した。GPC3 は、肝臓癌患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上(平均 396.2)で、胎盤や胎生期の肝臓および腎臓に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器に発現を認めない、癌胎児性抗原をコードする遺伝子であった。B: HCC 組織の癌部 (T) と非癌部 (N) における GPC3 mRNA の発現の有無を RT-PCR 法にて検討したところ、癌部においてのみ GPC3 の発現を認めた。C: HCC 組織切片における GPC3 蛋白質の発現を、抗 GPC3 抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。

GPC3 は正常な肝細胞と比較して HCC の約 80% の症例の HCC 組織において高発現していたが、成人の正常組織には、ほとんど発現していなかった。いっぽう GPC3 は胎盤や胎児期の肝臓、肺あるいは腎臓に高発現しており、いわゆる癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen あるいは Oncofetal antigen) の範疇に入る蛋白質である。

2) GPC3 の構造と機能

膜結合型糖蛋白質である Glypican ファミリーは、現在までのところ 6 種類が報告されている⁴⁾。GPC3 は、580 アミノ酸からなる 60 kD のコア蛋白質にヘパラン硫酸糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で、C 末端が GPI アンカーにより形質膜に結合している。Piliaらは、X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患である巨人症の一つである、Simpson-Golabi-Behmel 症候群において、GPC3 の遺伝子変異を報告している。また、GPC3 ノックアウトマウスでも、Simpson-Golabi-Behmel 症候群と同様に体の巨大化などの表現型を示すことが報告されている。

GPC3 は、ある種の腫瘍細胞では増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスの誘導に関連があると報告されている⁵⁾。近年、GPC3 コア蛋白質が直接 Wnt と結合することにより、Wnt シグナルを活性化し、肝細胞癌の増殖を促進することが報告されている⁶⁾。

3. HCC 癌組織における GPC3 の発現と腫瘍マーカーとしての有用性

我々は、GPC3 遺伝子の発現量の差が、その遺伝子産物である蛋白質量の差として反映されているか否かについて RT-PCR 法、ならびに組織切片における免疫組織化学的解析を用いて確認した(図 1B, C)。その結果、GPC3 は蛋白質レベルにおいても、胎児期の肝臓組織に発現するが出生後発現しなくなり、HCC において再び発現することを確認した。

さらに HCC 患者の約 40% の血清中に可溶性 GPC3 が検出されるが、健康人、慢性肝炎、その他の肝疾患では全く検出されず、HCC の血清腫瘍マーカーとして有用であることを発見した³⁾。また HCC の外科的治療後に、血清 GPC3 が消失あるいは減少することから、治療効果の判定などの臨床への応

用が期待される。

4. 癌免疫療法のターゲットとしての GPC3 の有用性

1) マウスにおける抗腫瘍免疫の解析

発現の組織特異性が優れていることから、我々は癌胎児性抗原 GPC3 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかについてマウスを用いて検討した。日本人の約 60% が所有する HLA-A24 と、BALB/c マウスのクラス I 分子の K^d に結合するペプチドの構造モチーフは、非常に類似していることがわっている。さらに、ヒトとマウスの GPC3 では、アミノ酸配列のレベルで 95% 以上のホモロジーを認めることから、ヒトとマウスの GPC3 でアミノ酸配列が完全に一致し、HLA-A24 および K^d のいずれにも結合すると予測される GPC3 由来のペプチドを合成した。このペプチドを骨髄由来樹状細胞に負荷し、BALB/c マウスに免疫して解析することにより、K^d 分子に結合して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される K^d 拘束性 CTL エピトープペプチドを同定した⁷⁾。

このエピトープペプチドを負荷した骨髄由来樹状細胞ワクチンを腹腔内に予防的に投与した BALB/c マウスでは、コントロール群に比べマウス GPC3 遺伝子を強制発現させたマウス大腸癌細胞株の増殖は著明に抑制され、さらにマウスの生存期間の延長が確認された⁷⁾。このエピトープペプチドは HLA-A24 によっても提示され、ヒトでも同様に CTL エピトープとなる可能性があると思われた。

2) HCC 患者における GPC3 特異的 CTL の誘導

日本人の HLA-クラス I 対立遺伝子のうち、HLA-A24 (A*2402) は日本人の約 60% が所有し、HLA-A2 (A*0201) は約 20% が所有する、ありふれた対立遺伝子である。そこでヒトとマウスの GPC3 に保存されたアミノ酸配列をもつペプチドで、HLA-A2 (A*0201) に結合すると推定される GPC3 由来の 9~10 個のアミノ酸からなるペプチドを 9 種類選択した。これらのペプチドを HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) に免疫した後に、ELISPOT アッセイにより最も強く GPC3 特異的

CTL を誘導出来るエピトープペプチドを探索することにより、ペプチド A2-3; GPC3₁₄₄₋₁₅₂ を同定した⁸⁾。さらに、この GPC3 A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した HLA-A2Tgm では、重要臓器(脳, 皮膚, 心, 肺, 肝, 腎)において自己免疫反応は生じておらず、その安全性が示唆された。

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ と、H-2K^d (=HLA-A24) 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ を用いて、HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激して、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。その結果、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 8 名中 5 名の PBMC より、また、GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 6 名中 4 名の PBMC より、各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた⁸⁾ (表 1)。

表 1 HLA-A2 あるいは -A24 陽性 HCC 患者(それぞれ Pt-A2, Pt-A24) の約 50% において、GPC3 特異的な CTL が誘導された。

患者	年齢	性別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A2-1	80	F	IIIa	+	+	+
Pt-A2-2	72	M	II	+	+	+
Pt-A2-3	67	F	II	ND	ND	+
Pt-A2-4	54	M	I	+	+	+
Pt-A2-5	57	M	I	ND	ND	-
Pt-A2-6	66	M	I	-	-	-
Pt-A2-7	54	M	IIIa	+	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	ND	+
Pt-A2-9	66	F	IIIa	+	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	-

患者	年齢	性別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+	+

¹⁾ T1 分期を用いた。

²⁾ 免疫染色を用いて、腫瘍周囲の正常組織と比較して発現を評価した。

³⁾ 免疫染色により癌が染色された場合に、発現ありと判断した。

⁴⁾ GPC3 発現 HCC 細胞株 Hep2 に対する細胞毒性試験により 1:10²⁰ で 20% 以上細胞死させた場合に、CTL を誘導できたと判断した。

さらに、重症混合型免疫不全をもつことより、ヒトの細胞を拒絶できない NOD/SCID マウスに、GPC3 遺伝子を強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下移植して生着させた。その後、HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ で刺激することにより、HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト GPC3 特異的 CTL 株を静脈注射により養子免疫した。GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL 株を投与した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与した群と比較して、有意差をもって腫瘍の増殖抑制が観察された⁸⁾ (図 2)。

現在、国立癌センター東病院にて HLA-A2 あるいは -A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床第 1 相試験を展開中である。

5. 樹状細胞ワクチンを作製するための材料としての ES 細胞の有用性

有効な抗腫瘍免疫療法の確立には、抗腫瘍免疫応答の標的となる腫瘍抗原の同定とともに、標的腫瘍抗原に対する免疫応答を強力に活性化するための免疫法の開発が不可欠である。また、医療技術としての普及を考慮すると、有効性はもちろん安全性や経済性をも考慮した技術の開発が必要である。

現在、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法には、アフレーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球を、GM-CSF 等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製された樹状細胞が用いられている。しかしながら、この方法には、アフレーシス操作に伴う患者への負荷、さらに、末梢血白血球から分離される単球の数や、単球から樹状細胞への分化誘導効率に個人差があるため、樹状細胞の収量が不安定であることなど、医療技術として広く普及するにはいくつかの問題がある。

ES 細胞は、血液細胞、神経細胞、あるいは内分泌細胞など様々な細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。現在、ES 細胞からの分化誘導により作製した各種細胞を移植する、再生医療の実用化をめざした研究が国内外において盛んに

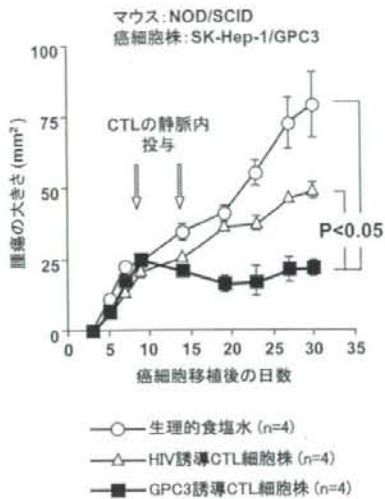


図2 免疫不全マウスに移植したGPC3発現ヒトHCC細胞株に対するヒトCTL養子免疫療法の有効性

NOD/SCID マウスの背部の皮下に、ヒトHCC細胞株SK-Hep-1にGPC3遺伝子を強制発現させたSK-Hep-1/GPC3を 1×10^7 個移植し、移植後9日目に 5×5 mmの大きさになった時点と、その5日後(移植後14日目)にCTLを 8×10^7 個、計2回静脈内に投与した。HCC患者のPBMCをGPC3エピトープペプチドで刺激して誘導したCTL投与群(■)と、コントロールとしてHIVエピトープペプチドで誘導したCTL投与群(△)、生理食塩水のみを投与した群(○)の間で比較すると、GPC3特異的CTL投与群ではコントロール群に比べ、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。

行われている。筆者らは、ES細胞を材料にして細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製することを考え、数年前に研究を開始した。

ES細胞は、適切な条件の下で培養することにより、未分化な状態を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、樹状細胞の材料としてES細胞を用いることが可能になれば、材料をいくらかでも増やすことができることになり、細胞ドナーへ新たな負担をかけることなく大量の樹状細胞を作製できる。

また、ES細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション等により、ウイルスベクターを使用することなく、遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変ES細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原分子あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々に修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

6. マウスES細胞からの樹状細胞の作製法

筆者らは、まず、マウスのES細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。そして、OP9細胞(正常なM-CSF遺伝子を欠損したop/opマウスに由来する骨髓ストローマ細胞株)と共培養することにより、マウスES細胞から血液細胞への分化誘導を行う仲野らの方法⁹⁾を参考にして、マウスES細胞から樹状細胞を作製する培養プロトコルを確立した¹⁰⁾。

まず、ES細胞の中胚葉性細胞への分化を促すために、ES細胞を単層培養しているOP9細胞とともに5-6日間培養する。この結果、ほとんどのES細胞が、中胚葉系細胞へ分化する。次に、分化した細胞をトリプシン/EDTAを用いて培養プレートから回収し、新たに準備したOP9細胞上でGM-CSFの存在下で5-6日間培養する。この結果誘導されるES細胞由来のミエロイド系の細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらにGM-CSFの存在下で培養を続けると7-10日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、マウスの骨髓細胞からGM-CSFを用いて分化誘導した樹状細胞と同等の抗原提示機能とT細胞刺激活性を有しており、また、形態および表面マーカー等から、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる。これをさらにTNF- α 、IL-4、抗CD40抗体、LPS等で刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞が誘導される。このES細胞由来の樹状細胞を、ES-DCと名付けた。図3にOP9細胞の上に出現したES細胞由来の浮

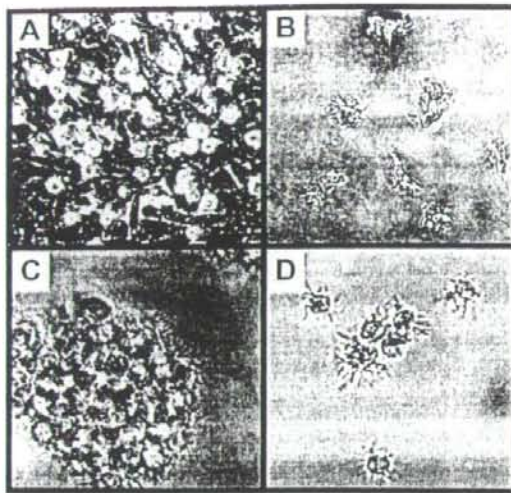


図3 マウス ES-DC の分化にともなう細胞形態の変化
 A: OP9 細胞上で ES 細胞から分化した血球系細胞, B: 分化細胞をベトリディッシュへ植え替えた後に出現した ES-DC, C: IL-4, TNF- α , 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC, D: IL-4, LPS, 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC

遊細胞から, ES-DC への分化に伴う細胞形態の変化を示す。

7. 遺伝的改変を行ったマウス ES 細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導

細胞ワクチンとして生体に投与するために樹状細胞に腫瘍抗原を負荷する方法として, 樹状細胞に腫瘍細胞の分解産物を貪食させる方法, あるいは, 腫瘍抗原に由来し T 細胞から認識されるエピトープに相当する合成ペプチドをパルスする方法などがある。一方, 腫瘍抗原の遺伝子を樹状細胞に導入し, 樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させることにより, 生体投与後も持続的な抗原提示がおり, より効率良く T 細胞を刺激できると期待される。

筆者らは, 図 4 に示す遺伝子導入 ES-DC を作製する手順により, モデル腫瘍抗原として OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現する ES-DC を作製した。この OVA 発現 ES-DC をマウス個体に移入することにより, OVA 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞を感作することができた。また, この ES-DC を in

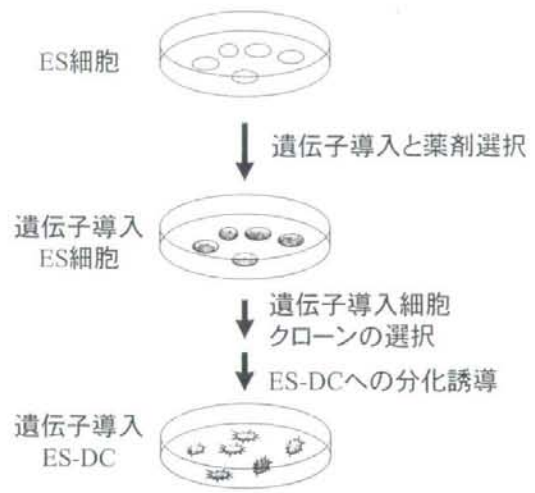


図4 遺伝子導入 ES-DC の作製手順
 まず, リポフェクションあるいは電気穿孔法により, 未分化状態にある ES 細胞へ, 抗原あるいは免疫抑制因子等の遺伝子発現ベクターを導入する。ベクターに付加している薬剤耐性遺伝子に合わせて G418 あるいはピューロマイシン等の薬剤を加えて培養すると, ベクターが導入された ES 細胞のクローンがコロニーとして出現する。複数の ES 細胞クローンを単離し, その中から適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択して増殖させる。樹立した遺伝子導入 ES 細胞クローンを ES-DC に分化誘導することにより, 遺伝子導入 ES-DC をいくらかでも作製することができる。

vitro でマウスの脾臓由来の T 細胞と共培養して刺激した場合も, OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化することができた。さらに, この樹状細胞を投与することにより OVA 抗原に対して感作されたマウスは, OVA を発現するマウス腫瘍細胞 (MO4) を移植した場合に, これを拒絶することができた¹¹⁾。

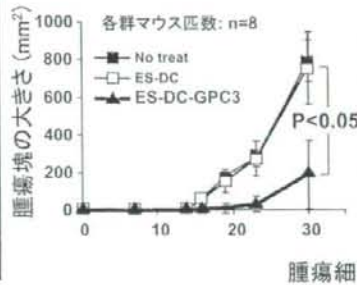
ES-DC による免疫療法では, モデル抗原である OVA を用いた場合だけでなく, 腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である。筆者らは, GPC3 がヒトの HCC のみならず, メラノーマにも高発現する新規癌胎児性抗原であることを発見している¹²⁾。前述の方法を用いて ES-DC に GPC3 を強制発現させたもの (ES-DC-GPC3) をマウス個体に予防的に投与することにより, 図 5 に示すように, マウスの皮下に移植され

皮下移植されたB16-F10メラノーマ細胞株を用いた予防実験

A 実験プロトコール



B 腫瘍の増殖



C 腫瘍移植後のマウスの生存率

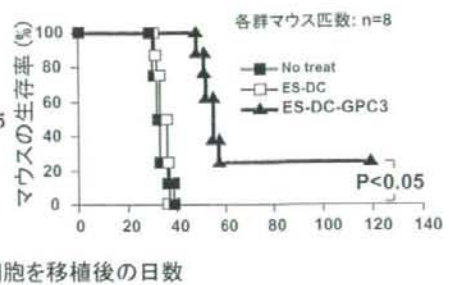


図5 HCC およびメラノーマの新規癌胎児性抗原 GPC3 を発現する ES-DC による抗腫瘍効果の誘導

マウス ES 細胞にマウス GPC3 遺伝子を導入して発現させ、ES-DC (ES-DC-GPC3) を分化誘導した。A; 遺伝子改変を加える前の ES-DC (□), あるいは ES-DC-GPC3 (▲) をマウスの腹腔内に 7 日間隔で 2 回投与した。そして、2 回目の投与から 7 日後に、これらのマウスと未処置対照群マウス (■) の皮下に、GPC3 遺伝子を自然に発現するメラノーマ細胞 (B16-F10) を移植し、B; その後の腫瘍の大きさの変化と、C; マウスの生存期間を観察した。

た、GPC3 を自然に発現するマウスメラノーマ細胞 B16-F10 の増殖を著明に抑制し、さらにマウスの生存期間を延長することが可能であった¹³⁾。

8. 抗原とケモカインを同時に発現するマウス ES-DC を用いた抗腫瘍免疫応答の誘導

抗原に暴露されていないナイーブ T 細胞は、リンパ節などの T 細胞領域において樹状細胞から抗原を提示され、エフェクター T 細胞やメモリー T 細胞となる。しかしながら、樹状細胞を体外から投与した場合、所属リンパ節へ到達するのは投与した樹状細胞のうちの 1% 以下であると報告されている。したがって、抗原特異的な T 細胞と遭遇し T 細胞を感作するという役目を果たせるものは、移入した樹状細胞のうちごく一部であると考えられる。

筆者らは、この効率を改善することにより、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果を、さらに増強できると考えた。そして、ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを発現させる方法を考案した。生体移入した ES-DC がリンパ組織へ遊走できなくても、ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DC が存在する場所へ T 細胞

が集まり、その場所で ES-DC から T 細胞へ抗原刺激が伝えられる事により、抗原特異的な T 細胞を活性化する効果を高めることができるのではないかと考えた。

前述した OVA 遺伝子を導入したマウス ES 細胞に、さらに、T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、この ES 細胞から OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC を作製した。T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、SLC (CCL21), Mig (CXCL9), および Lymphotactin (XCL1) の遺伝子をそれぞれ導入し、各々の効果を比較した。その結果、この 3 種類のケモカインのいずれについても、OVA を単独で発現する ES-DC よりも、OVA とケモカインを同時に発現する ES-DCの方が、より効果的に T 細胞を活性化できることがわかった¹¹⁾。さらに、SLC あるいは Mig を OVA と同時に発現する ES-DC は、OVA 単独発現の ES-DC よりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた(図 6)。特に SLC の共発現により、最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた。

皮下移植されたMO4メラノーマ細胞株を用いた予防実験

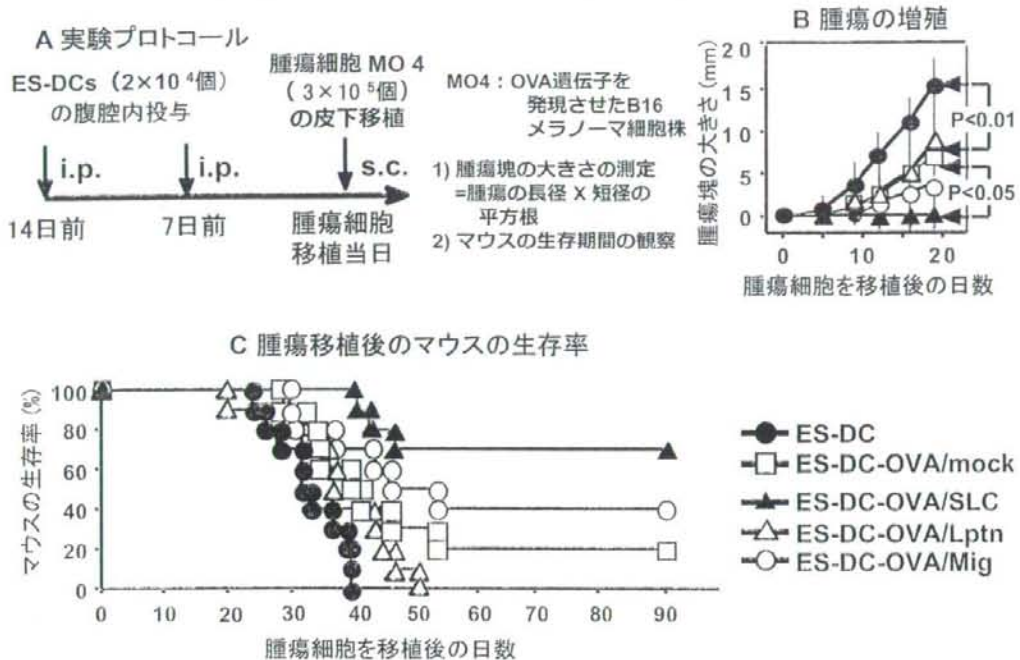


図6 導入遺伝子由来のケモカインとモデル腫瘍抗原 OVA を同時に発現する ES-DC による抗腫瘍効果の増強
 マウス ES 細胞への遺伝子導入とクローンの選択を 2 回繰り返すことにより、モデル腫瘍抗原として OVA 抗原と、T 細胞の遊走を誘導するケモカイン (SLC, Lymphotoctin, あるいは Mig) の遺伝子を同時に発現する ES-DC (それぞれ ES-DC-OVA/SLC ▲, ES-DC-OVA/Lptn △, ES-DC-OVA/Mig ○) を作製した。A; これらの遺伝的変異 ES-DC (▲, △, ○), 遺伝子変異を加える前の ES-DC (●), あるいは OVA のみを発現する ES-DC (ES-DC-OVA/mock □) をマウス腹腔内に 7 日間隔で 2 回投与した。そして、2 回目の投与から 7 日後に、OVA 遺伝子を強制発現させた腫瘍細胞 (MO4) を皮下に移植し、B; その後の腫瘍の大きさの変化と、C; マウスの生存期間を観察した。

9. アロマウス ES-DC を利用した腫瘍免疫の誘導および ES-DC の自己免疫疾患予防への応用

ES-DC を臨床応用しようとする場合、ES 細胞ドナーとレシピエントの間の HLA を初めとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある。しかしながら、マウスを用いた実験では、ES 細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも、MHC のアレルを一部共有していれば、共有された MHC クラス I 分子に提示された抗原により、抗原特異的な T 細胞を活性化し、抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している¹⁴⁾。

筆者らは、ES-DC 技術の応用として、抗腫瘍免疫

療法だけでなく、免疫抑制分子と自己免疫疾患の標的となる自己抗原を同時に強制発現させた ES-DC による、自己免疫疾患の予防にも成功している^{15,16)}。

10. ヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製

以上のように、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたマウス ES-DC をマウス個体に移入することにより、抗原特異的な CTL を活性化し、抗腫瘍免疫効果を誘導できることが示された。これらの結果は、ES-DC を用いた抗腫瘍免疫療法が臨床的にも有用ではないかと期待させるものである。筆者らは、ES-DC の臨床応用をめざして、ヒトの ES 細胞から

ES-DC を作製する分化誘導法の開発を行った。

ヒトの ES 細胞は、マウスの ES 細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが、マウスの場合と同様に OP9 細胞をフィーダー細胞として用いることにより、血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった¹⁷⁾。筆者らのヒトの ES-DC 分化誘導法では、培養系へ GM-CSF, M-CSF, および IL-4 を添加することにより効率良い分化誘導が可能であった。ヒト ES-DC もマウス ES-DC と同様に蛋白質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性やアロ MLR 刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウス ES-DC の場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった。

おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは、HCC の免疫療法のための新たなターゲットとして、その臨床試験の結果が期待される。癌の免疫逃避に対抗するためには、多様な癌拒絶抗原のレパートリーを確立することが望まれる。GPC3 がその一つとして、HCC の再発および発症防止に寄与することを期待したい。

最近、ES 細胞で発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの線維芽細胞等の体細胞に導入することにより、ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を作製できることが報告された^{18,19)}。iPS 細胞の作製には、ES 細胞の場合とは異なりヒト胚の滅失を必要としないという利点がある。さらに、iPS 細胞は、皮膚線維芽細胞など、比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため、治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である。ES 細胞から樹状細胞を作製する技術を iPS 細胞へ適用できれば、倫理的な問題を回避し、かつ、患者本人への負担を大幅に軽減しつつ治療に必要な樹状細胞を作製することが可能となる。著者らは、現在 iPS 細胞から樹状細胞を作製する研究も開始している。

文 献

1. Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for

hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 127: S232-241, 2004.

2. Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*. 61: 2129-2137, 2001.
3. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 306: 16-25, 2003.
4. Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, et al. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem*. 274: 26968-26977, 1999.
5. Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell. Biol*. 141: 1407-1414, 1998.
6. Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. 65: 6245-6254, 2005.
7. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res*. 10: 8630-8640, 2004.
8. Komori H, Nakatsura T, Senju S, et al. Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 12: 2689-2697, 2006.
9. Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265: 1098-1101, 1994.
10. Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells

- derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 101: 3501–3508, 2003.
11. Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al. Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein. *J. Immunol.* 172: 776–786, 2004.
 12. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 6612–6621, 2004.
 13. Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 66: 2414–2422, 2006.
 14. Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al. Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 5–13, 2005.
 15. Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* 174: 1888–1897, 2005.
 16. Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol.* 178: 918–925, 2007.
 17. Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 25: 2720–2729, 2007.
 18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 1–12, 2007.
 19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920, 2007.



解説

ES細胞由来の樹状細胞による 抗腫瘍免疫応答の誘導*

千住 覚** 西村 泰治**

Key Words: ES cells, dendritic cells, immunotherapy, T lymphocytes, tumor antigen

はじめに

腫瘍関連抗原を標的とした抗原特異的な抗腫瘍免疫療法を有効な治療法として確立するために、腫瘍抗原に特異的なT細胞を効果的に活性化するためのさまざまなワクチン法の開発が試みられている。樹状細胞は、強力なT細胞刺激活性を有しており、かつ、生体内においてナイーブT細胞の活性化において必須の役割を果たしているプロフェッショナル抗原提示細胞である。そこで、生体外で培養した樹状細胞になんらかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン療法が、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手段として期待されている。筆者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製するための材料として胚性幹(ES)細胞に着目し、ES細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の研究を行っている。本稿では、マウスの腫瘍モデルを用いたES細胞由来樹状細胞による抗腫瘍免疫誘導実験、さらに、最近開発したヒトのES細胞から樹状細胞を分化誘導する培養法を紹介する。

樹状細胞ワクチンを作製するための 材料としてのES細胞の有用性

有効な抗腫瘍免疫療法の確立には、抗腫瘍免疫応答の標的となる腫瘍抗原の同定とともに、標的腫瘍抗原に対する免疫応答を強力に賦活化するための免疫法の開発が不可欠である。また、

医療技術としての普及を考慮すると、有効性はもちろん安全性や経済性をも考慮した技術の開発が必要である。

現在、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法には、アフエレーシス(成分採血)により分離した末梢血白血球中の単球をGM-CSF等のサイトカインを加えて培養し分化誘導することにより作製された樹状細胞が用いられている。しかしながら、この方法には、アフエレーシス操作に伴う患者への負荷、さらに、末梢血白血球から分離される単球の数や単球から樹状細胞への分化誘導効率に個人差があるため、樹状細胞の収量が不安定であることなど、医療技術として広く普及するにはいくつかの問題がある。

ES細胞は、血液細胞、神経細胞、あるいは内分泌細胞などさまざまな細胞へ分化する能力を備えている代表的な多能性幹細胞である。現在、ES細胞からの分化誘導により作製した各種細胞を移植する再生医療の実用化をめざした研究が国内外においてさかんに行われている。筆者らは、ES細胞を材料にして細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製することを考え、数年前に研究を開始した。

ES細胞は、適切な条件の下で培養することにより、未分化な状態を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、樹状細胞の材料としてES細胞を用いることが可能になれば、材料をいくらでも増やすことができること

* Anti-tumor immunotherapy with ES cell-derived dendritic cells.

** Satoru SENJU, M.D., Ph.D. & Yasuharu NISHIMURA, M.D., Ph.D.; 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野[〒860-8556 熊本県本庄1-1-1]; Department of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto 860-8556, JAPAN

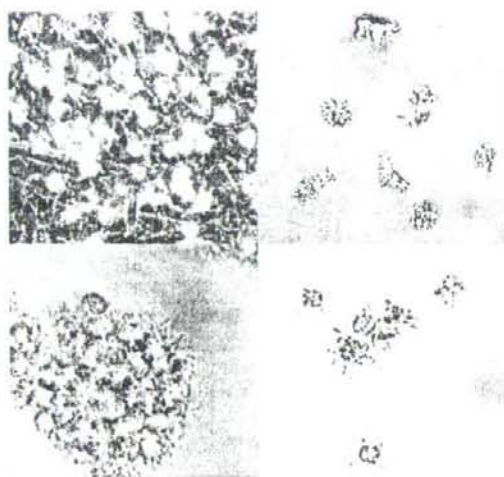


図1 マウスES-DCの分化に伴う細胞形態の変化
A: OP9細胞上のES細胞由来の血球系細胞。B: 分化細胞をペトリディッシュへ植え継いだ後出現したES-DC。C: IL-4, TNF- α , 抗CD40抗体を同時に加えて成熟刺激を与えたES-DC。D: IL-4, LPS, 抗CD40抗体を同時に加えたES-DC。

になり、細胞ドナーへ新たな負担をかけることなく大量の樹状細胞を作製できる。

また、ES細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション等により、ウイルスベクターを使用することなく、遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変ES細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原分子あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能をさまざまに修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

マウスES細胞からの樹状細胞の作製法

筆者らは、まず、マウスのES細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。そして、OP9細胞(正常なM-CSF遺伝子を欠損したop/opマウスに由来する骨髓ストローマ細胞株)と共培養することによりマウスES細胞から血液細胞への分化誘導を行うNakanoらの方法¹⁾を参考に、マウスES細胞から樹状細胞を作製す

る培養プロトコールを確立した²⁾。

まず、ES細胞の中胚葉性細胞への分化を促すために、ES細胞を単層培養しているOP9細胞とともに5~6日間培養する。この結果、ほとんどのES細胞が、中胚葉系細胞へ分化する。次に、分化した細胞をトリプシン/EDTAを用いて培養プレートから回収し、新たに準備したOP9細胞上でGM-CSFの存在下で5~6日間培養する。この結果誘導されるES細胞由来のミエロイド系の細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらにGM-CSFの存在下で培養を続けると7~10日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、マウスの骨髓細胞からGM-CSFを用いて分化誘導した樹状細胞と同等の抗原提示機能とT細胞刺激活性を有しており、また、形態および表面マーカー等から、ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる。これをさらにTNF- α , IL-4, 抗CD40抗体, LPS等で刺激すると、著明な樹状突起を有し、より強力なT細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞が誘導される。著者らは、このES細胞由来の樹状細胞を、ES-DCと名付けた。図1に、OP9細胞の上に出現したES細胞由来の浮遊細胞からES-DCへの分化に伴う細胞形態の変化を示す。

遺伝的改変を行ったES細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫の誘導

細胞ワクチンとして生体に投与するために樹状細胞に腫瘍抗原を負荷する方法として、樹状細胞に腫瘍細胞の分解産物を貪食させる方法、あるいは、腫瘍抗原に由来しT細胞から認識されるエピトープに相当する合成ペプチドをパルスする方法等がある。一方、腫瘍抗原の遺伝子を樹状細胞に導入し、樹状細胞自身に腫瘍抗原を発現させることにより、生体投与後も持続的な抗原提示が起り、より効率よくT細胞刺激を行えることが期待される。

筆者らは、図2に示す遺伝子導入ES-DCを作製する手順により、モデル腫瘍抗原としてOVA(卵白アルブミン)抗原を発現するES-DCを作製した³⁾。このOVA発現ES-DCをマウス個体に移入することにより、OVA抗原に特異的な細胞傷害性T細胞を感作することができた。また、このES-

DCを*in vitro*でマウスの脾臓由来のT細胞と共に培養して刺激した場合も、OVA抗原特異的な細胞傷害性T細胞を活性化することができた。さらに、この樹状細胞を投与することによりOVA抗原に対して感作したマウスは、OVAを発現するマウス腫瘍細胞(MO4)を移植した場合にこれを拒絶することができた³⁾。

ES-DCによる免疫療法では、モデル抗原であるOVAを用いた場合だけでなく、腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である。Glypican 3は、筆者らの研究室の中面(現所属:国立がんセンター東病院)らがヒトの肝細胞がんおよびメラノーマに発現する腫瘍抗原として同定したものである⁴⁾。前述の方法を用いてES-DCにGlypican 3を強制発現させたものをマウス個体に予防的に投与することにより、Glypican 3を発現するマウスメラノーマ細胞B16-F10に対する拒絶効果を誘導することが可能であった⁵⁾。

抗原とケモカインを同時に発現するES-DCを用いた抗腫瘍免疫応答の誘導

ナイーブ(抗原に曝露されていない)T細胞は、リンパ節などのT細胞領域において樹状細胞から抗原を提示され、エフェクターT細胞やメモリーT細胞となる。しかしながら、樹状細胞を体外から投与した場合、所属リンパ節へ到達するのは投与した樹状細胞のうちの1%以下であると報告されている。したがって、抗原特異的なT細胞と遭遇しT細胞を感作するという役目を果たせるものは、移入した樹状細胞のうちごく一部であると考えられる。

筆者らは、この効率を改善することにより、抗原を負荷した樹状細胞による免疫効果をさらに向上させられる可能性があると考えた。そして、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを発現させるという方法を考案した。生体移入したES-DCがリンパ性臓器へ遊走できなくても、ES-DCにT細胞の遊走を促すケモカインを強制発現させておけば、ES-DCが存在する場所へT細胞が集まり、その場所でES-DCからT細胞へ抗原刺激が伝えられることにより、抗原特異的なT細胞を活性化する効果が高めることができるの

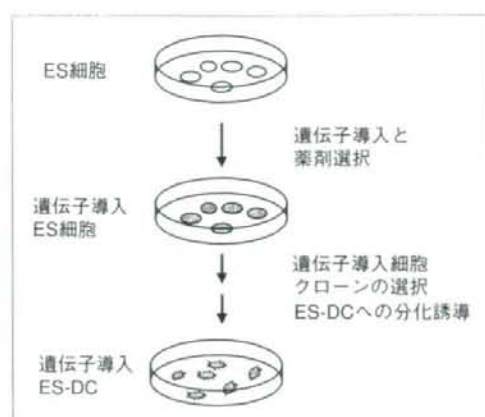


図2 遺伝子導入ES-DC作製の手順

まず、リポフェクションあるいは電気穿孔法により、未分化状態にあるES細胞へ、抗原あるいは免疫制御分子等の発現ベクターを導入する。ベクターに付加している薬剤耐性遺伝子に合わせてG418あるいはピューロマイシン等の薬剤を加えて培養すると、ベクターが導入されたES細胞のクローンがコロニーとして出現する。複数のES細胞クローンを単離し、その中から適切な遺伝子改変ES細胞クローンを選択して増殖させる。樹立した遺伝子導入ES細胞クローンをES-DCに分化誘導することにより、遺伝子導入ES-DCをいくらかでも作製することができる。

ではないかと考えたのである。

前述したOVA遺伝子を導入したマウスES細胞に、さらに、T細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、このES細胞からOVAとケモカインを同時に発現するES-DCを作製した³⁾。T細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在する樹状細胞からは産生されない、SLC(CCL21)、Mig(CXCL9)、およびLymphotactin(XCL1)の遺伝子をそれぞれ導入し、それぞれの効果を比較した。その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVAを単独で発現するES-DCよりも、OVAとケモカインを同時に発現するES-DCの方が、より効果的にT細胞を活性化することができることがわかった(図3)。さらに、SLCあるいはMigをOVAと同時に発現するES-DCは、OVA単独発現のES-DCよりも、抗腫瘍効果の誘導においても優れていた(図4)。とくにSLCの共発現により、もっとも強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた。

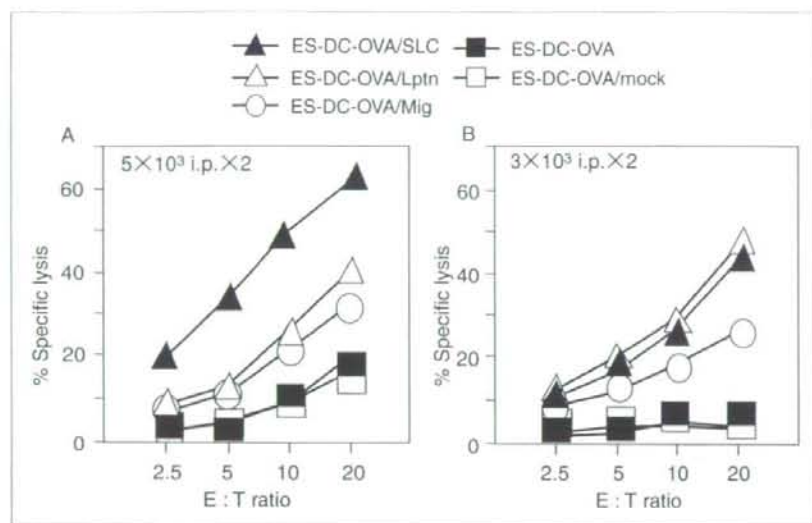


図3 導入遺伝子由来のケモカインと抗原を同時に発現するES-DCによるT細胞の感作ES細胞への遺伝子導入とクローンの選択を2回繰り返すことにより、OVA抗原とT細胞の遊走を誘導するケモカイン(SLC, Mig, あるいはLymphotactin)を同時に発現するES-DCを作製した。これらの遺伝的改変ES-DCあるいはOVAのみを発現するES-DCをマウス腹腔内に7日間隔で2回投与した(1回あたりの投与細胞数は、Aでは 5×10^3 個、Bでは 3×10^3 個)。2回目の投与から7日後に、マウスの脾細胞を回収し、*in vitro*で5日間OVA由来の抗原ペプチドの存在下で培養した後、OVA特異的細胞傷害性T細胞活性を測定した。

α ガラクトシルセラミド(α -GalCer)を 負荷した抗原発現ES-DCによる 抗腫瘍免疫の誘導

NKT細胞は、CD1d分子上に提示された α -GalCer等の脂質抗原を認識し活性化される特殊なT細胞である。樹状細胞に α -GalCerを負荷して投与することにより、NKT細胞によるIFN- γ の産生を強力に誘導できることが知られており、 α -GalCerを負荷した樹状細胞による抗腫瘍免疫療法の臨床試験も行われている。マウスES-DCも、通常の樹状細胞と同様に α -GalCerを負荷した場合にNKT細胞を活性化することができる⁶⁾。そこで、腫瘍抗原を発現するES-DCに、 α -GalCerを負荷して投与することにより、抗原特異的なT細胞とNKT細胞を同時に活性化し、より強力な抗腫瘍効果が得られるのではないかと考え実験を行った。

前述のOVA抗原を人為的に発現させたマウスメラノーマ細胞MO4をマウス腹腔内に移植し、その3日後にES-DCを投与し、その後のマウス

の生存期間を観察した⁶⁾。その際、OVA抗原を発現する、あるいは発現しないES-DCに、それぞれ、 α -GalCerを負荷した場合と負荷しない場合の4通りを比較した。図5に示すように、 α -GalCerを負荷していない抗原を発現しないES-DCを投与した場合に比べて、 α -GalCerを負荷したOVA抗原非発現のES-DCあるいは α -GalCerを負荷していない抗原発現ES-DCを投与した場合、わずかではあるが有意な生存期間の延長がみられた。一方、 α -GalCerを負荷したOVA抗原発現のES-DCを投与した場合には、2倍以上の生存期間の延長がみられた。この結果から、抗原特異的なT細胞とNKT細胞を同時に活性化することにより、著明な相乗効果が得られることがわかった。

ヒトES細胞からの樹状細胞の作製

以上のように、遺伝子導入により腫瘍抗原を発現させたマウスES-DCをマウス個体に移入することにより、抗原特異的なcytotoxic T-lymphocyte (CTL)を活性化し、抗腫瘍免疫効果を誘導できることが示された。これらの結果は、ES-DCを用い

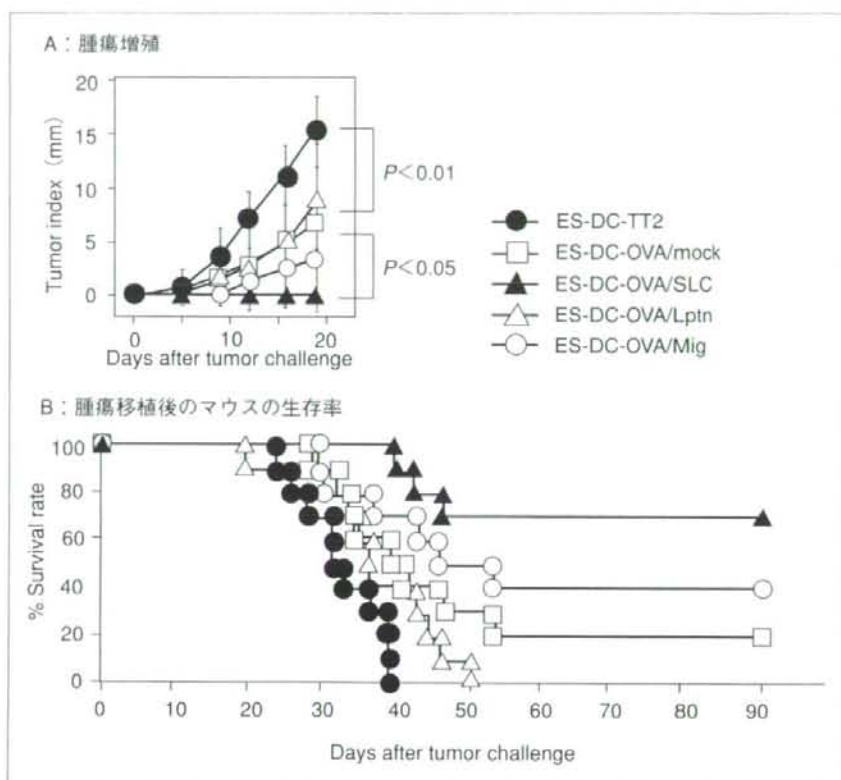


図4 導入遺伝子由来のケモカインと抗原を同時に発現するES-DCによる抗腫瘍効果の誘導
 図3の実験と同様に遺伝子導入ES-DCをマウスの腹腔内へ投与(3×10^6 個を2回)した。そして、2回目の投与から7日後に、OVAを発現する腫瘍細胞(MO4)を皮下に移植し、その後の腫瘍の大きさの変化とマウスの生存を観察した。

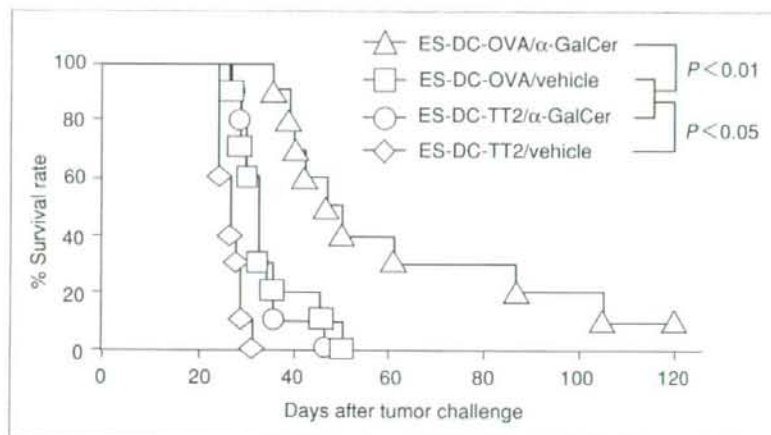


図5 α -GalCerを負荷した抗原発現ES-DCによる抗腫瘍免疫の誘導
 OVAを発現するマウスメラノーマ細胞MO4(3×10^6 個)をマウス腹腔内に移植し、その3日後にES-DC(1×10^6 個)を1回腹腔内投与し、その後のマウスの生存期間を観察した。ES-DCは、OVA抗原を発現する、あるいは発現しないものに、各々、 α -GalCerを負荷した場合と負荷しない場合の4通りを比較した。

た抗腫瘍免疫療法が臨床的にも有用ではないかと期待させるものである。筆者らは、ES-DCの臨床応用をめざして、ヒトのES細胞からES-DCを作製する分化誘導法の開発を行った⁷⁾。

ヒトのES細胞は、マウスのES細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが、マウスの場合と同様にOP9細胞をフィーダー細胞として用いることにより、血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった。筆者らのヒトのES-DC分化誘導法では、培養系へGM-CSF, M-CSF, およびIL-4を添加することにより効率的な分化誘導が可能であった。ヒトES-DCもマウスES-DCと同様にタンパク質抗原をプロセスしてT細胞へ提示する活性やアロMLR刺激活性など、樹状細胞としての機能を備えていた。また、マウスES-DCの場合と同様の手法で、ヒトの遺伝子改変ES-DCを作製することも可能であった。

おわりに

一般にES細胞由来の分化細胞を生体へ投与した場合、未分化なES細胞の混入による奇形腫の発生が懸念される。しかしながら、これまでに述べてきたマウスを用いた実験では、ES-DCを移入して100日以上観察した場合も含め、奇形腫の発生は認められていない。

筆者らは、ES-DC技術の応用として、抗腫瘍免疫療法だけでなく、免疫抑制分子と自己免疫疾患の標的となる自己抗原を同時に強制発現させたES-DCによる自己免疫疾患の治療をめざした研究も行っている^{8,9)}。ES-DCを臨床応用しようとする場合、ES細胞ドナーとレシピエントの間のHLAをはじめとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある。しかしながら、マウスを用いた実験では、ES細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも、MHCのアリルを一部共有していれば、共有されたMHCクラスI分子に提示された抗原により、抗原特異的なT細胞を活性化し、抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している¹⁰⁾。

最近、ES細胞で発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの線維芽細胞等の体細胞に導入することにより、ES細胞と同等の多分化

能を有するinduced Pluripotent Stem (iPS)細胞を作製できることが報告された^{11,12)}。iPS細胞の作製には、ES細胞の場合とは異なりヒト胚の滅失を必要としないという利点がある。さらに、iPS細胞は、皮膚線維芽細胞など、比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため、治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である。ES細胞から樹状細胞を作製する技術をiPS細胞へ適用できれば、倫理的な問題を回避し、かつ、患者本人への負担を大幅に軽減しつつ治療に必要な樹状細胞を作製することが可能となる。今後は、iPS細胞から樹状細胞を作製する研究も行っていきたいと考えている。

文 献

- 1) Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994; 265: 1098-101.
- 2) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, et al. Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* 2003; 101: 3501-8.
- 3) Matsuyoshi H, Senju S, Hirata S, et al. Enhanced priming of antigen-specific CTL *in vivo* by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein. *J Immunol* 2004; 172: 776-86.
- 4) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 16-25.
- 5) Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, et al. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res* 2006; 66: 2414-22.
- 6) Matsuyoshi H, Hirata S, Yoshitake Y, et al. Therapeutic effect of α -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLIC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Sci* 2005;

- 96 : 889-96.
- 7) Senju S, Suemori H, Zembutsu H, et al. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 2720-9.
 - 8) Hirata S, Senju S, Matsuyoshi H, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J Immunol* 2005 ; 174 : 1888-97.
 - 9) Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, et al. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J Immunol* 2007 ; 178 : 918-25.
 - 10) Fukuma D, Matsuyoshi H, Hirata S, et al. Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 335 : 5-13.
 - 11) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 1-12.
 - 12) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 ; 318 : 1917-20.

* * *