

- 川正貴. 養子免疫療法の効果増強を目的にケモカイン受容体とがん腫瘍特異的T細胞受容体の両遺伝子を導入したTリンパ球: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
- 11) 永井功造、藤原 弘、越智俊元、安 軍、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、安川正貴. Aurora-A kinase特異的T細胞受容体遺伝子を用いたがん遺伝子免疫療法の開発: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
- 12) 岡村(出町) 文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、近藤紳司、廣澤友也、西尾信博、植村靖史、葛島清隆. HLA-A24拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的CTLの認識エピトープはオートファジーを介して提示される: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
- 13) 越智俊元、藤原 弘、岡本幸子、安 軍、永井功造、白方俊章、峰野純一、葛島清隆、珠玖 洋、安川正貴. 内在性TCRを抑制できるWT1特異的TCRベクターを用いたがんに対する新たな免疫遺伝子療法の開発: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
- 14) Kitawaki T, Kadowaki N, Fukunaga K, Kasai Y, Maekawa T, Ohmori K, Maekawa R, Kondo T, Nieda M, Yokokawa K, Ito T, Shimizu A, Tada H, Kuzushima K, Ishikawa T, Uchiyama T. Phase I/IIa clinical trials of dendritic cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia in elderly patients using autologous apoptotic leukemic cells or a heteroclitic WT1 peptide as antigens: DC2010, Swiss, 2010年10月
- 15) Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histocompatibility Antigens. 第17回 BMT Tandem Meetings, ハワイ、2011年2月
- 16) 藤原 弘、越智俊元、永井功造、安 軍、岡本幸子、峰野純一、浅井洋晶、宮崎幸大、白方俊章、成見弘、葛島清隆、珠玖 洋、安川正貴. Development of gene-immunotherapy using tumor antigen-specific T-cell receptor gene against human leukemia (Update report): Attempts to conquer facing problems. 第33回日本造血細胞移植学会総会、松山市、2011年3月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略）
分担研究報告書

同種造血細胞移植後の再発予防のための免疫療法の開発に関する研究

研究分担者 赤塚美樹（藤田保健衛生大学医学部・准教授）

研究要旨

再発ハイリスク造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植は確立された治療法であるが、移植後再発は依然として大きな問題である。同種移植では移植片対宿主病（GVHD）が予後にかかわる重大な合併症であり、GVHD を起こさずに選択的な移植片対白血病（GVL）効果を誘導する抗原特異的免疫療法は一つの解決策となる。GVL 効果の標的として、不適合 HLA 分子、マイナー組織適合抗原、腫瘍抗原などが考えられる。我々はこれらの標的がどのような強さや割合で GVL 効果に寄与しているかの検討を進めている。

これまでに同定された造血器腫瘍に比較的高発現する HLA-A*02:01 および HLA-A*24:02 によって提示される腫瘍抗原エピトープを産生するようなミニジーンを移植ドナーの末梢血 B 細胞由来の活性化 B 細胞および EBV 不死化 B 細胞（B-LCL）にミニジーンを遺伝子導入した。これらを移植後の患者末梢血 T 細胞に対する抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。これ以外に移植前の患者末梢血由来の活性化 B 細胞および B-LCL をマイナー組織適合抗原の抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。マイナー組織適合抗原に対する CD8 陽性 T 細胞の前駆体頻度は移植後 100 日前後、半年ともに認められたが、腫瘍抗原に対する反応は検出限界以下であり、少なくとも 2 症例において、移植後早期の免疫反応の標的はマイナー組織適合抗原であることが示唆された。今後症例を重ね、どの抗原を移植後どの時期に免疫標的とするか効果的かを究明したい。

A. 研究目的

同種造血細胞移植は、造血器腫瘍に対して確立された治療である。しかし再発ハイリスク造血器腫瘍患者における再発率は 20～50%と高率であり、その多くが死亡している。従って、移植成績の更なる向上が同種造血細胞移植が今後とも医療として成り立つために求められている。

同種造血細胞移植後にはドナーのリンパ

球がマイナー組織適合抗原を標的とする移植片対白血病（GVL）効果を誘導し原病の治癒をもたらすと考えられている。他方、WT-1 などの腫瘍抗原に対する免疫反応も GVL 効果に関与するという報告がなされつつある。しかし、これまでこれら 2 つの抗原系のどちらが有意であるかを同時に解析した報告はほとんど無い。

抗原特異的免疫反応を評価するにあたり、

最近では HLA マルチマーを用いたフローサイトメトリー法が多用されているが、同時に多くの抗原を評価するのは困難である。他方、古典的な限界希釈法による T 細胞前駆体頻度の測定は、感度が HLA マルチマー法より 10 分の 1 劣るとされるが、*in vitro* の培養を伴うにも関わらずほぼ正確に体内での頻度を推定しうる。そこで本研究ではこれまでに同定された造血器腫瘍に比較的高発現する HLA-A*02:01 および HLA-A*24:02 によって提示される腫瘍抗原エピトープを産生するようなミニジーンを移植ドナーの末梢血 B 細胞由来の活性化 B 細胞および EBV 不死化 B 細胞 (B-LCL) にミニジーンを遺伝子導入し、移植後の患者末梢血 T 細胞に対する抗原提示細胞、細胞傷害性試験の標的細胞とした。またマイナー組織適合抗原に対する包括的な T 細胞前駆体頻度の測定では、患者の移植前に採取した末梢血単核球と、それより作成した活性化 B 細胞および B-LCL を用いた。これら 2 つの評価を同時に行うことで、どの抗原を移植後どの時期に免疫標的とするか効果的かを究明することを目標とした。

B. 研究方法

①腫瘍抗原ミニジーンベクターの作成：

造血器腫瘍で発現が亢進し、免疫標的となることが報告されている HLA-A*24:02 および HLA-A*02:01 拘束性のエピトープを対象とした。用いたエピトープの由来遺伝子名とエピトープのアミノ酸配列を表 1 に示す。これらの C 末端にはオリジナルのアミノ酸を最低 5 残基残した状態で、全ての拡大エピトープをコードする塩基配列を *in frame* で生化学的にタンデムに結合した。シーケンスにて配列を確認後、さらに NGFR を共発現で

きるようなレトロウイルスベクターに組み込み、GALV-Phoenix パッケージ細胞にトランスフェクションし、プロデューサーとした (図 1)。

②刺激細胞の作成：

CD40L を恒常的に発現するマウス NIH-3T3 細胞を移植ドナーおよび患者末梢血 B 細胞培養のフィーダー細胞とした。照射したフィーダー細胞上に末梢血単核球を蒔き、IL-4 を添加し、B 細胞が集塊を形成して増えて来るまで反復刺激した。患者移植前 B 細胞はこの段階で一旦凍結保存した。ドナー B 細胞は、先に用意した腫瘍抗原ミニジーンレトロウイルスベクターをレトロネクチン法にて感染し、必要に応じて NGFR 発現細胞をポジティブセレクションし濃縮し、その後凍結保存した。

③限界希釈法による培養：

移植後に試験計画に沿って凍結保存された末梢血単核球を解凍し、MACS システムによって CD8 陽性細胞を純化した。次いで 96 ウェル丸底プレートの A 行 12 ウェルに均等に CD8 陽性 T 細胞を蒔き、B→H 行まで 2 倍ずつ段階希釈した。これを 2 枚ペアで作成した。片方のプレートの全ウェルには移植前の患者末梢血単核球細胞または活性化 B 細胞 (33Gy 照射後)、もう 1 つのプレートにはミニジーンを導入したドナー活性化 B 細胞 (33Gy 照射) を刺激細胞として添加した。ミニジーン導入が不十分な場合は、該当する HLA 型に拘束される腫瘍抗原ペプチドを活性化 B 細胞にパルスしてから用いた。

培養液は 3-4 おきに半量交換し、IL-2 を添加した。解析に十分な細胞が得られるま

で 7～10 日おきに反復抗原刺激を同様に
行った。

④細胞傷害性試験と前駆体頻度解析：

患者移植前末梢血由来の PHA 活性化 T 細胞、ドナーミニジーン導入 B-LCL をそれぞれマイナー組織適合抗原、腫瘍抗原を提示する標的細胞として用いた。陰性コントロールとしてドナー由来細胞を用いた。細胞は 3.7KBq の ^{51}Cr により標識した。培養プレートはマルチチャンネルピペットにて 4 つのレプリカを作成し、ここにそれぞれ陰性コントロールおよび評価する抗原提示標的細胞を蒔き、4 時間後に上清に遊離する ^{51}Cr を測定した。T 細胞前駆体頻度の測定には L-Calc software (StemCell Technologies)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に従って作成した研究計画書を作成し、すでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得た後に、担当医による人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明を実施後書面にて同意を得られた場合のみに実施された。

以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

①腫瘍抗原ミニジーン発現ベクターの構築：

ミニジーンはタンデムに結合されており、プロテアソームに正しく認識され C 末端が

切り出されるように 5 アミノ酸残基を付加した。しかし、このような複雑なミニジーンはこれまで報告がないため、エピトープが正しく産生され HLA 分子に提示されているかをまず確認した。

過去に当研究室で樹立された telomerase reverse transcriptase (hTERT) 由来の HLA-A*24:02 拘束性細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローン (Int J Cancer. 110:403-12, 2004.) および epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) 由来の HLA-A*24:02 拘束性 CTL クローン (Tissue Antigens. 64:650-9, 2004.)、他を用いた細胞傷害性試験を行った。表 2 に結果を示す。HLA-A*24:02 陽性の B-LCL#2 は傷害を受けなかったが、ミニジーン発現ベクター（以下、TAA）を感染させた B-LCL#2/TAA は 2 つの CTL で良好に認識された。しかし HLA-A*24:02 拘束性 WT-1 エピトープ特異的 TAK-1 CTL は B-LCL#2/TAA を傷害出来なかった。この原因として TAK-1 が長期培養の結果 senescence 状態であったこと、エフェクター／標的比率が高く取れなかったこと、WT-1 エピトープが改変型でなく、天然型（第 2 番目のアミノ酸が Met）であったことが考えられた。

以上、他のエピトープについては良好な CTL クローンがなく検討が出来なかったが、タンデムに結合したミニジーンは機能しているものと考え、以下の実験を行った。

②前駆体頻度の測定：

予後不良悪性リンパ腫に対して HLA 一致 (A2402/3101, B4007/5601, C0401/-)、性不一致同胞より骨髄移植を受けた患者末梢血（移植前、移植後 105 日目、180 日目）の CD8 陽性細胞について限界希釈を行い、それぞれ患者の移植前末梢血単核球細胞（マ

イナー組織適合抗原刺激)、ドナーミニジーン導入活性化 B 細胞で 3 回刺激後、⁵¹Cr 遊離試験を行った。その結果、既知の腫瘍抗原に対する CTL 反応は移植ドナーについては認められた (1/123,315) もの、移植後は検出されなかったのに対し、マイナー抗原に対する CTL 前駆体頻度は、移植後 105 日目で 1/47,883、180 日目で 1/45,500 の頻度であった。

2 例目 (Ph 陽性 ALL, HLA 同胞肝移植、HLA-A*02:01/02:10, B*35:01/40:06, C*03:03/08:01) においても移植後 1 年目まで同様な傾向を認めたが、ドナーにおいても既知の腫瘍抗原に反応する CTL 前駆体は検出できなかった。

D. 考察

同種造血細胞移植後の免疫反応の標的抗原が同種抗原であるマイナー組織適合抗原であるか、腫瘍抗原であるかを 2 例について解析した。まだ予備的実験のレベルであるが、過去に過剰発現する腫瘍抗原として報告のある WT-1, hTERT などに対する反応は移植後早期では検出できなかった。1 例目のドナー T 細胞にはこれらの腫瘍抗原に対する CTL 前駆体が存在しており、移植後の免疫抑制状態や、寛解期移植のために腫瘍が存在しなかったことが CTL 前駆体の誘導されなかった原因と考えられた。

対してマイナー組織適合抗原組織適合への反応性は移植後 100 日目、半年の段階で CTL 前駆体が検出され、移植後早期の免疫反応はマイナー組織適合抗原に向けられていると考えられた。これは移植時に残存する患者の血液系細胞がマイナー組織適合抗原の抗原提示細胞として機能するため、想定される結果であった。ただし、以上は限

られた症例での検討であり、今後さらに症例の蓄積が必要である。特に寛解期移植と非寛解期移植では上述のごとく、腫瘍抗原に対する CTL 前駆体の誘導効率は異なってくると予想される。

本研究で腫瘍抗原ミニジーンを用いた理由は、endogenous に発現される抗原レベルに近づくことであった。すなわちペプチドパルス抗原提示細胞で刺激し、細胞傷害性試験もペプチドパルス標的細胞を用いるこれまでの研究では、ペプチド依存性の反応を見ているに過ぎない可能性があったことによる。本研究でも反応性が不十分か、腫瘍抗原ミニジーン導入活性化 B 細胞の数が不十分な場合はペプチドパルス抗原提示細胞を要したが、細胞傷害性試験の標的細胞はミニジーン導入細胞を用いることにより、ペプチド依存性の傷害活性はある程度回避できたと考える。今後、活性化 B 細胞をさらに効率よく増やせる方法の開発 (NIH-3T3 に代えて K562 ベースのシステムの利用) とレトロウイルスベクターの感染効率を向上させていく。

なお、マイナー組織適合抗原ペプチドを用いた移植後再発予防ワクチンの臨床試験が進行中であり、ワクチン後の患者体内における免疫反応を解析中である。

また、同種造血細胞移植が本来養子免疫療法であることから、マイナー組織適合抗原を認識する T 細胞の T 細胞受容体 cDNA を導入した遺伝子改変 T 細胞も準備中であり、今後、機能解析を行う予定である。

E. 結論

移植後の GVL 効果をもたらす免疫反応の標的抗原について検討を開始した。移植後半年～1年までは腫瘍抗原よりマイナー組

織適合抗原が主な標的となることを示唆する予備的な結果を得た。今後さらに症例を蓄積し、標的となる抗原につき詳細な解析を行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirose T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Erni N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched HLA class II-restricted CD8(+) cytotoxic T-cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci*, [Epub ahead of print] (PMID: 21466613)
 - 2) An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol*. 93:176-85, 2011. (PMID: 21229399)
 - 3) Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T, Tsurumi T. The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene. *PLoS One*. 5:e11901, 2010. (PMID: 20689582)
- ### 2. 学会発表
- 1) Akatsuka Y, Yamamura Y, Bleakley M, Hikita J, Hamajima T, Nannya Y, Matsubara A,

- Riddell SR, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally. 第16回日本遺伝子治療学会総会 (ポスター #147)、宇都宮 2010年7月1日. The 16th Annual Meeting-JSGT2010, 2010.
- 2) 小川誠司, 松原亜以子, 鬼塚真, 柏瀬貢一, 真田昌, 南谷泰仁, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 佐治博夫, 丸谷悦子, 猪子英俊, 森島泰雄, 小寺良尚, 笹月健彦. MHC と疾患 GWAS の手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索. 第13回日本組織適合性学会大会 (口演)、東京 2010年9月18日. *MHC: Major Histocompatibility Complex* 17巻2号, 141, 2010.
 - 3) 岡村文子, 鳥飼宏基, 赤塚美樹, 近藤紳司, 廣澤友也, 西尾信博, 植村靖史, 葛島清隆. HLA-A24 拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的 CTL のエピトープはオートファジーを介して膀胱がん細胞に提示される. 第14回日本がん免疫学会総会 (口演, #11)、熊本 2009年7月22日. 日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp11, 2010.
 - 4) 岡村文子, 鳥飼宏基, 赤塚美樹, 近藤紳司, 廣澤友也, 西尾信博, 植村靖史, 葛島清隆. HLA-A24 拘束性ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ特異的 CTL のエピトープはオートファジーを介して提示される. 第69回日本癌学会総会 (ポスター, P-0871)、大阪 2009年9月24日. 日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp263, 2010.
 - 5) Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y,

- Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera, Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histocompatibility Antigens. 第 17 回 BMT Tandem Meetings (ポスター #508)、ハワイ 2011 年 2 月 19 日. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 17(2) Suppl.1, pp S335, 2011.
- 6) Akatsuka Y. Characterization And Clinical Application of Minor Histocompatibility Antigens. The 15th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation (Plenary session), Muju Resort, Feb 25, 2011. *The Korean Journal of Hematology* 46(suppl) pp10, 2011.
- 7) 赤塚美樹. マイナー組織適合抗原の重要性. 第 33 回日本造血細胞移植学会 (シンポジウム 2)、愛媛 2011 年 3 月 9 日. 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp164, 2011.
- 8) 赤塚美樹、山村武史、Bleakley Marie、疋田潤哉、濱島剛、南谷泰仁、松原亜以子、Riddell Stanley、恵美宣彦、小寺良尚、森島泰雄、小川誠司. HapMap 資源を利用したマイナー組織適合抗原に関わる SNP 同定のためのオンラインソフトの開発. 第 33 回日本造血細胞移植学会 (ポスター PS2-128)、愛媛 2011 年 3 月 10 日. 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp336, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

表 1. ミニジーンに組み込んだ腫瘍抗原エピートープの一覧

腫瘍抗原名	拘束性HLA	アミノ酸配列	報告
WT-1	A*2402	CMTWVWQMNIL	Blood. 95:286-93, 2000.
	A*0201	RMFPNAPYL	Immunogenetics. 51:99-107, 2000.
	DR*0405,		J Immunother. 30:282-93, 2007.
	DP5	KRYFK-LSHLQMHSRKH	Blood 106: 1415-1418, 2005
PR1	A*0201	VLQELNVTV	Blood 88:2450-2457, 1996.
hTERT	A*0201	ILAKFLHWL	PNAS 97:4796-4801, 2000.
	A*2402	VYGFVRACL	Blood 97: 2903-2907, 2001
PRAME	A*2402	LYVDSLFFL	Immunity. 6:199-208, 1997.
	A*0201	ALYVDSLFFL (PRA300)	
	A*0201	SLYSFPEPEA (PRA142)	Blood 113: 2245-2255, 2009
BCR-ABL	Class I and II	IVHSATGFKQSSKALQRPVASFEP	
AuroraA ₂₀₇₋₂₁₅	A*0201		
	A*2402	YLILEYAPL	Blood 113: 66-74, 2009
RHAMM-R3	A*0201	ILSLELMKL	Blood 111: 1357-1365, 2008.
Ep-CAM	A*2402	RYQLDPKFI	Tissue Antigens 64: 650-9, 2004
MAGEA3	A*2402	IMPKAGLLI	Cancer Res. 57: 4465-8, 1997.

表 2. ミニジーンを組み込んだ B-LCL の抗原特異的 CTL への感受性

CTL (E/T比)	B-LCL#1	B-LCL#1/TAA	B-LCL#2	B-LCL#2/TAA
EpCAM (30:1)	6	6	3	52
hTERT (30:1)	8	2	-2	69
TAK-1 (10:1)	5	3	-2	8
HLA型	A*26:02/31:01		A*24:02/02:01	

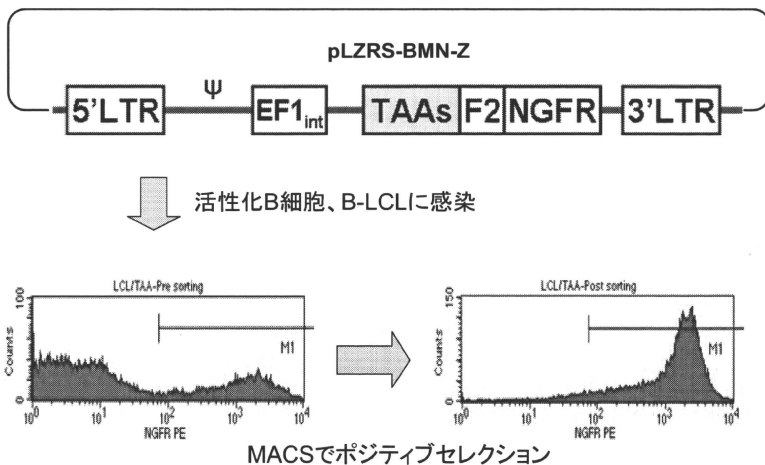


図 1. レトロウイルスベクターの構造と B-LCL 感染後の発現

Phoenix ベクター骨格に elongation factor-1 の Intron-1~Exon-2、表 1 に示すミニジーンをタンデムに結合したもの (TAA)、 Δ NGFR を、F2 配列を利用して in frame にて組み込んだ。NGFR が細胞表面に発現すれば、TAA 部分は翻訳されていることとなる。下左図はレトロウイルス上清にて 1 回感染後の B-LCL における NGFR 発現状態を示す。この NGFR-PE 染色後 B-LCL を Anti-PE ビーズおよび MACS システムにてポジティブセレクションを行った後の結果を下右図に示す。なお、活性化 B 細胞における感染効率率は 10% 程度であり、増殖が B-LCL より不良なためポジティブセレクション後の純度も低い傾向にあった (データ示さず)。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

WT1発現リンパ芽球様細胞株の抗原提示細胞としての有用性の検証

分担研究者 神田 輝 愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部 室長

研究要旨 ヒト末梢血由来のBリンパ球にEBウイルスを試験管内感染させることで樹立できるリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line, LCL)は抗原提示細胞として機能することが知られている。本研究では、組換えEBウイルス産生の技術を応用することで、広くがん細胞に高発現しているがん抗原であるWT1(Wilms' tumor gene 1)抗原を発現するLCLの樹立し、その抗原提示細胞としての有用性を検証した。その結果、WT1抗原を恒常発現しつつex vivoで大量増殖可能なLCL(WT1-LCL)が樹立できた。樹立したWT1-LCLはWT1抗原特異的細胞傷害性T細胞(cytotoxic T cell, CTL)によりHLA拘束性に細胞溶解を起こすことから、WT1蛋白質がペプチドにプロセッシングされて抗原提示されていることが確認できた。またWT1-LCLを抗原提示細胞として用いたCTL誘導実験において、WT1特異的CTLの誘導がわずかながら検出された。以上の結果より、組換えEBウイルスを用いて樹立可能ながん抗原発現LCLの抗原提示細胞としての可能性が示された。

A. 研究目的

担癌患者の生体内には、がん細胞に対する特異的免疫応答が存在する。こうした免疫応答を強化することで、がん細胞の増殖抑制を図るのが癌の免疫療法である。そこでがん細胞に特異的に発現しているがん抗原（腫瘍特異抗原）の同定がすすんでいる。一方で、同定したがん抗原を抗原提示する抗原提示細胞の樹立も一つの大きな課題である。

われわれは、EBウイルス関連腫瘍において既に臨床応用されている免疫療法に着目した。EBウイルスはヒトBリンパ球に高い感染性を示すヘルペスウイルスの一種で、健康成人の大多数に潜伏持続感染している。EBウイルス感染Bリンパ球は免疫原性を有し、既感染者の末梢血中にはEBウイルス抗原を標的とするCTLが存在する。試験管内においてEBウイルスをBリンパ球に感染さ

せて得られる不死化細胞株であるリンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line、以下LCL)は、EBウイルス抗原の抗原提示細胞として機能し、これを用いてEBウイルス抗原を標的とするCTLを体外において効率良く誘導・増幅できることが報告されている。LCLを抗原提示細胞として用いたCTL誘導法は、EBウイルス関連腫瘍の治療法として既に臨床応用されているものであり、体外で増幅したCTLの輸注に際しての安全確認のプロトコールが米国において既に確立している。

したがって、LCLにがん抗原を恒常発現すれば、LCLの持つ抗原提示能により、体外においてがん抗原を標的とする細胞性免疫を誘導、もしくは増幅できるのではないかと考えられる。しかし従来の方法ではLCLにがん抗原を効率よく恒常発現させるのは技術的に困難であった。

そこでわれわれはBAC(Bacterial Artificial Chromosome)システムによる組換えEBウイルス産生法を開発した(Kanda et al. J. Virol. 78:7004-7015, 2004)。この方法においては、EBVゲノム全長を保持したBACクローンを用いて、ウイルスゲノム上へ任意の外來遺伝子を迅速・かつ確実に挿入できる。こうしてあらかじめEBウイルスゲノム上にがん抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBウイルスを用いてLCLの樹立を行うと、不死化する細胞はほぼ100%がん抗原を発現すると期待される。しかもLCLにおいては活性化Bリンパ球特有の表面マーカー、共刺激分子が発現するため、抗原提示能を保持しつつ増殖することが保証されている。

本研究計画では、研究対象とするがん抗原として、固形癌、造血器腫瘍を問わず幅広く高発現している癌抗原であるWT1(Wilms' tumor 1, ウィルムス腫瘍原因遺伝子)を選択した。すなわち①WT1遺伝子組み込み組換えEBウイルスによる健康人ドナー由来LCL樹立、②樹立したLCLにおけるWT1抗原提示の確認、③WT1発現LCLの抗原提示細胞としての有効性の検証、を目的として研究を行なった。

B. 研究方法

1) WT1抗原発現LCLの樹立：

WT1発現LCLの樹立は、申請者らが最近確立した新しい組換えEBウイルス産生システム(投稿準備中)により行った。すなわちEBウイルス(B95-8株)ゲノム全長(約175 kb)を、BACベクターにクローン化して、これを大腸菌内相同組換え法により改変してWT1遺伝子の発現カセットを組み込んだ。得られたBACクローンDNAをヒト293細胞に導入して、WT1遺伝子組み込みEBウイルスを産生した。この組換えEBウイルスを、インフォームドコンセントを得た上で採取した健康人ドナー2名(HLA型 A24：1名、

A26/A33：1名)由来の末梢血単核球(PBMC)に感染させることで、LCLの樹立を行なった。

2) WT1抗原発現LCLにおけるWT1抗原提示、およびHLA拘束性の確認：

ドナー1名(HLA型 A24)から樹立したWT1発現LCLについて、WT1抗原がプロセシングされて提示されているか否かを確認した。エフェクター細胞として、WT1特異的CTL(HLA型A24拘束性WT1抗原特異的T細胞受容体をTリンパ球に遺伝子導入して作製したもの愛媛大学・タカラバイオ㈱との共同研究)を用いた。

一方で別のドナー(HLA型 A26/33)から樹立したWT1発現LCLをターゲット細胞として、同様のアッセイを行ない、HLA拘束性の有無を調べた。

3) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

さらにWT1発現LCLの抗原提示細胞としての有用性を以下の二つの方法により調べた第一の方法として、健康人ドナー(A24)由来のWT1発現LCLと同一人由来のPBMCの共培養を3週間行なった。そこで第二の方法として、以下を行なった。すなわち健康人ドナー(A24)由来CD8(+)T細胞に対して、WT1₂₃₅₋₂₄₅(CMTWNQMNL)ペプチドをパルスした同一ドナー由来の成熟樹状細胞(mDC)による前刺激を2回加えた後に、抗原提示細胞をWT1発現LCLに変えて、さらに1週間培養した。

C. 研究結果

1) WT1抗原発現LCLの樹立：

2名いずれのドナー由来のリンパ球に感染させた場合も、約4週間後に複数のLCLが樹立された。ウエスタンブロット解析によりWT1蛋白質の発現が確認できた。また樹立したLCLにおけるWT1の発現レベルは、

WT1高発現細胞として知られるK562細胞よりも高かった。WT1発現LCLは、長期間培養しても、安定にWT1蛋白質を発現しつつ、大量増殖可能であった。

2) WT1抗原発現LCLにおけるWT1抗原提示、およびHLA拘束性の確認：

エフェクター細胞との共培養により、WT1発現LCLでは細胞溶解が起きたが、コントロールのWT1非発現LCLでは細胞溶解が起こらなかった。よってWT1発現LCL内で発現するWT1蛋白質は、ペプチドへとプロセッシングされてHLA分子上に抗原提示されていることが確認された。

一方で、別のドナー(HLA型 A26/33)から樹立したWT1発現LCLをターゲット細胞として、同様のアッセイを行なったところ、特異的な細胞溶解はほとんど認められなかったことから、CTLによる細胞溶解はHLA拘束性であることが確認された。

3) WT1発現LCLを用いたCTL誘導の試み：

第一の方法を用いた場合、テトラマー解析の結果、WT1抗原特異的CTLよりもEBウイルス抗原特異的CTLの方が優位に増幅することが判明した。一方、第二の方法を用いた場合は、WT1特異的テトラマー陽性細胞が出現し(0.43%)、しかもこの時点ではEBウイルス抗原特異的CTLは認めなかった。その後、WT1発現LCLとの共培養を継続したものの、WT1特異的テトラマー陽性細胞の増幅は起こらなかった。

D. 考察

WT1発現LCLには、WT1蛋白質全長が発現しており、今回調べたエピトープ以外にも複数のエピトープが抗原提示されていることが期待できる。またLCLにはHLAクラスI分子とクラスII分子の両者が発現しているため、HLAクラスI分子上のみならず、ク

ラスII分子上への抗原提示も期待できる。こうした可能性を考慮しつつ、今後WT1発現LCLの有用性の検証を行なっていく必要があると考えられた。

E. 結論

WT1抗原遺伝子を組み込んだ組換えEBウイルスの1回感染により、ドナーのHLA型によらず、任意の人の末梢血からWT1発現LCLを樹立できることが明らかになった。また樹立したLCLで発現したWT1蛋白質は、ペプチドへとプロセッシングされて、HLAクラスI分子上に抗原提示されていることが示された。一方で、WT1発現LCLを用いたWT1特異的CTLの体外増幅のプロトコール確立には、さらなる条件検討が必要である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato Y, Shirata N, Murata T, Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Kanda T, and Tsurumi T.: Transient Increases in p53-responsible Gene Expression at Early Stages of Epstein-Barr Virus Productive Replication. *Cell Cycle*. 9(4):807-814, 2010.
- 2) Murata T, Hotta N, Toyama S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Ohshima T, Kanda T, Tsurumi T. Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J Biol Chem*. 285(31):23925-23935, 2010.
- 3) Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T, Tsurumi T. The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77

- gene. *PLoS One*. 5(7):e11901, 2010.
- 4) Tetrameric ring formation of Epstein-Barr virus polymerase processivity factor for viral replication. Nakayama S, Murata T, Yasui Y, Murayama K, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T. *J Virol*. 84(24):12589-12598, 2010.
2. 学会発表
- 1) 神田輝. 潜伏感染EBウイルスエピゾームの宿主染色体付着に必要なシス塩基配列の解析: 第27回染色体ワークショップ. 御殿場市、2010年1月
 - 2) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染EBウイルスエピゾームの宿主染色体付着機構の解析. 第25回ヘルペスウイルス研究会. 第25回ヘルペスウイルス研究会、浜松市、2010年5月
 - 3) 神田輝、鶴見達也. 潜伏感染細胞中でEBNA1蛋白質と相互作用する細胞性因子の解析: 第7回EBウイルス研究会、第7回EBウイルス研究会、札幌市、2010年7月
 - 4) 神田輝、鶴見達也. The impact of viral repetitive sequences on the biological properties of Epstein-Barr virus recombinants: 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus and Associated Diseases. 英国 Birmingham、2010年9月
 - 5) 神田輝、越智俊元、安川正貴、岡本幸子、峰野純一、葛島清隆、鶴見達也. WT1蛋白質高発現リンパ芽球様細胞株を用いたWT1特異的細胞性免疫誘導の試み: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
 - 6) 安田愛、野口耕治、片山和浩、三橋純子、坂東俊和、杉山弘、神田輝、杉本芳一. Epstein-Barr virus由来のEBNA1蛋白質に対する機能的阻害剤探索: 第69回日本癌学会学術総会、大阪市、2010年9月
 - 7) 神田輝、鶴見達也. EBウイルス潜伏感染細胞内におけるEBNA1蛋白質結合細胞性因子の解析: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月
 - 8) 野口耕司、安田愛、片山和浩、三橋純子、蓑島維文、坂東俊和、杉山弘、神田輝、杉本芳一. EBNA1蛋白質のDNA結合能を阻害する化合物の探索研究: 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、2010年11月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hoshino Y, Nishikawa K, <u>Kuzushima K</u> , Kimura H.	Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8+T cells in acute infectious mononucleosis.	<i>J Clin Virol.</i>	50(3)	244-246	2011
An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, <u>Kuzushima K</u> , Yasukawa M.	Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis.	<i>Int J Hematol.</i>	93(2)	176-185	2011
Sato Y, Shirata N, Murata T, Nakasu S, Kudoh A, Iwahori S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, <u>Kanda T</u> , and Tsurumi T.	Transient Increases in p53-responsible Gene Expression at Early Stages of Epstein-Barr Virus Productive Replication.	<i>Cell Cycle</i>	9(4)	807-814	2010
Murata T, Hotta N, Toyama S, Nakayama S, Chiba S, Isomura H, Ohshima T, <u>Kanda T</u> , Tsurumi T.	Transcriptional repression by su-moylation of Epstein-Barr virus BZLF1 pro-teín correlates with association of histone deacetylase.	<i>J Biol Chem.</i>	285(31)	23925-23935	2010
Isomura H, Stinski MF, Murata T, Nakayama S, Chiba S, Akatsuka Y, Kanda T, Tsurumi T.	The human cytomegalovirus UL76 gene regulates the level of expression of the UL77 gene.	<i>PLoS One</i>	5(7)	e11901	2010
Nakayama S, Murata T, Yasui Y, Murayama K, Isomura H, Kanda T, Tsurumi T.	Tetrameric ring formation of Epstein-Barr virus polymerase processivity factor for viral replication.	<i>J Virol.</i>	84(24)	12589-12598	2010

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells

Akie Yamahira^a, Miwako Narita^a, Takeshi Nakamura^a, Norihiro Watanabe^{a,b}, Masami Kaji^a,
Tomoyota Taniguchi^{a,b}, Shigeo Hashimoto^c, Tatsuo Furukawa^d, Ken Toba^e, Yoshifusa Aizawa^e,
Kiyotaka Kuzushima^f, Masuhiro Takahashi^{a,*}

^a Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University, Niigata, Japan

^b Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan

^c Division of Hematology, Nagaoka Red Cross Hospital, Nagaoka, Niigata, Japan

^d Division of Stem Cell Transplantation, Niigata University Medical and Dental General Hospital, Niigata, Japan

^e Department of Hematology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, Japan

^f Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Aichi, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2010

Received in revised form 4 December 2010

Accepted 6 December 2010

Available online xxx

Keywords:

Leukemic plasmacytoid dendritic cell line

PMDC05

LPS

Antigen presentation

WT1

CMVpp65

Antigen-specific CTL

Cellular immunotherapy

ABSTRACT

Establishment of a leukemia plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) and intra-lineage transformation from pDCs to mDCs in PMDC05 has been reported. In this paper, we show the applicability of PMDC05 for cellular immunotherapy. By stimulation with LPS, PMDC05 showed enhancement in expression of antigen presentation-associated surface molecules and production of cytokines (IL-12p70 and TNF- α). The antigen presenting ability was markedly increased in PMDC05 stimulated with LPS. By co-culturing of CD8⁺ T cells with LPS-stimulated and WT1/CMVpp65 peptide-pulsed PMDC05, WT1/CMVpp65 tetramer⁺ cytotoxic T lymphocytes were efficiently generated. These findings reveal the applicability of PMDC05 in cellular immunotherapy for tumor and severe viral infections.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Adoptive transfer of antitumor cytotoxic T lymphocytes is one of the efficient modalities of cellular immunotherapy for tumors. For instance, donor lymphocyte infusions brought complete remission in patients who relapsed after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia [1]. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones attained the elimination of antigen-positive tumor cells, regression of individual metastases, and minor, mixed or stable responses in patients with metastatic melanoma [2]. It has been reported that adoptive transfer of anti-Epstein Barr virus (EBV)-specific T cell lines had antitumor activity including long-lasting complete remission in patients with EBV⁺ Hodgkin's disease [3]. Likewise, administration of EBV-specific

cytotoxic T-cell (CTL) lines to patients with advanced nasopharyngeal carcinoma was demonstrated to be associated with significant antitumor activity [4]. Lymphodepleting chemotherapy followed by the transfer of rapidly expanded tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and IL-2 therapy could induce significant tumor regression in pretreated patients with refractory metastatic melanoma [5]. As to the treatment for cytomegalovirus (CMV) infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT), which is frequently associated with life-threatening complication, Eisele et al. showed the application of donor CMV-specific T cell lines has antiviral activity in a patient infected by a ganciclovir resistant CMV strain [6]. Although these promising data have been reported, the clinical efficiency of adoptive lymphocyte transfer for tumor patients is not fully satisfactory. It is technically difficult and labor-requiring to expand tumor-specific CTLs and keep them in activated state. Adoptive transfer of tumor-specific CTLs might become more feasible and universal for the treatment of cancer, if the method of inducing and expanding these CTLs could be practically available.

We established a plasmacytoid dendritic cell (pDC) line (PMDC05) from leukemia cells of pDC leukemia. PMDC05 cells were

* Corresponding author at: Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, 746-2 Asahimachi-dori, Chuou-ku, Niigata 951-8518, Japan. Tel.: +81 25 227 2387; fax: +81 25 227 2387.
E-mail address: matak@ig.niigata-u.ac.jp (M. Takahashi).

positive for CD4, CD56, HLA-DR, CD123 (IL-3R α) and CD86 in the absence of major lineage markers. TLR7 was prominently expressed and production of IFN- α was enhanced by the stimulation with CpG-A, which revealed PMDC05 was in the pDC lineage [7]. In addition, PMDC05 secreted IL-12 by stimulation with LPS and showed a potent antigen presenting ability by stimulation with LPS. In the present study, we attempted to establish an efficient method to generate antigen-specific CTLs by using PMDC05 as antigen presenting cells (APCs).

2. Materials and methods

2.1. Culture of leukemic pDC line (PMDC05)

A leukemic pDC line, named as PMDC05 [7,8], was established from leukemic blasts of a HLA-A*0201/2402 patient with pDC leukemia [9] by culturing in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) with 10% FBS in our laboratory. Proliferation of PMDC05 was maintained in the culture including no cytokines or feeder cells. The characteristics of PMDC05 have been reported previously. HLA typing of PMDC05 cells revealed HLA-A*0201/2402 identical to that of the original leukemia cells.

2.2. Stimulation of PMDC05 with LPS

PMDC05 cells were cultured at a cell concentration of 10^6 /ml in 10% FBS containing IMDM with or without 0.1 μ g/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 24 h.

2.3. Surface phenotype analysis of PMDC05

PMDC05 cells were stained with the following PE-labeled monoclonal antibodies: CD1a (Immunotech, Marseille, France), CD40 (Immunotech), CD80 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD83 (Immunotech), CD86 (BD Biosciences) and HLA-DR (BD Biosciences) as described previously [7]. Stained cells were analyzed with FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences) and the data was analyzed with CellQuestPro software (BD Biosciences).

2.4. Assessment of cytokine production by ELISA

The concentration of IL-12p70 and TNF- α in the culture supernatant was quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Hu-TNF- α and Hu-IL-12p70 ELISA kit, Pierce Biotech, Rockford, IL, USA), following the manufacturer's instruction.

2.5. Allogeneic mixed leukocyte culture (MLC)

One hundred thousand normal peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) were co-cultured in a 96-well flat-bottom microplate (BD Biosciences) with graded numbers of PMDC05, which had been cultured with LPS for 2 days and irradiated with 60 Gy of ¹³⁷Cs generated gamma irradiation (PS-3000S Cs-137, Ponsy, Osaka, Japan) immediately before MLC, as described previously [10].

2.6. Generation of antigen-specific CTLs

Generation of antigen-specific CTLs was performed as described previously [11]. Briefly, PB-MNCs from a HLA-A*24 healthy donor or CD8⁺ cells, which were separated by the Anti-PE MicroBeads MACS System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from the PB-MNCs, were co-cultured with 60 Gy-irradiated PMDC05 cells, which were loaded with WT1 or CMV peptides, at a cell ratio of 10:1 in 5% autologous serum-containing RPMI1640 medium. For loading with WT1 or CMV peptides, PMDC05 cells were pre-incubated with peptide for 24 h and washed twice with medium before co-culturing. PMDC05 cells were activated with 0.1 μ g/ml LPS during pre-incubation with WT1 or CMV peptides. Peptides used in the study were modified-type 9-mer WT1 peptides (CYTWNQMLN, NeoMPS, San Diego, CA) and CMVpp65(A24) peptides (QYDPVAALF, Funakoshi, Tokyo, Japan), both of which were restricted to HLA-A*24 and demonstrated to possess a definite antigenicity to CD8⁺ T cells. IL-2 (Shionogi, Osaka, Japan) and IL-7 (Cytheris S.A., Vanves, France) were added on day 3 of the co-culturing at the concentration of 30 IU/ml and 10 ng/ml, respectively, and half of the medium with IL-2 and IL-7 were replenished every 2–3 days. The co-culture was stimulated repeatedly every week with the same WT1 or CMV peptide-pulsed PMDC05 cells, and WT1 or CMV tetramer analysis was performed every week immediately before the addition of PMDC05 cells.

2.7. Analysis of WT1 or CMV tetramer⁺ cells

Modified-type WT1 peptide/HLA-A*2402 tetramers (WT1 tetramers) and HIV-1 env peptide (HLA-A*2402-restricted, 9-mer peptide: RYLRDQQLI)/HLA-A*2402 tetramers (HIV tetramers) were kindly provided by Dr. K. Kuzushima (Aichi Cancer

Center Research Institute, Nagoya, Aichi, Japan). CMV pp65 peptide (HLA-A*2402-restricted, 9-mer peptide: QYDPVAALF)/HLA-A*2402 tetramers (CMV tetramers) were purchased from MBL (Nagoya, Aichi, Japan). WT1 or CMV tetramer assay was performed as described previously [12]. Briefly, co-cultured cells were double stained with FITC-labeled CD8 antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and PE-labeled tetramers. HIV tetramers were used as the negative control. Stained cells were analyzed with FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences), and the data was analyzed by CellQuestPro software (BD Biosciences).

2.8. Statistical analysis

The statistical relevance of differences in ³H-thymidine incorporation in MLC was evaluated with a two-way ANOVA, applying GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Differences were considered as significant at $p < 0.05$.

3. Results

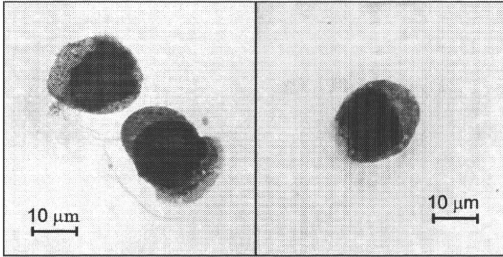
3.1. Activation of PMDC05 with LPS

PMDC05 cells, which were cultured with or without LPS, were cytopun on the slideglass, stained with May-Grünwald/Giemsa solution and observed for morphological changes after stimulation with LPS. By stimulation with LPS, PMDC05 cells elongated villous or hairy cytoplasmic projections, which are characteristic to activated DCs (Fig. 1). After culturing with LPS for 24 h, the expression of CD40, CD80 and CD83 appeared and the expression of CD86 and HLA-DR definitely increased in PMDC05 (Fig. 2). By stimulation with LPS, the production of IL-12p70 in PMDC05 increased with a peak at 18 h of culturing and decreased thereafter (Fig. 3A). Similarly, TNF- α secretion in LPS-stimulated PMDC05 was enhanced with a peak at 18 h of culturing and the level of TNF- α remained high thereafter (Fig. 3B). LPS-stimulated PMDC05 cells showed much more potent antigen presenting ability compared with non-stimulated PMDC05 in mixed leukocyte culture consisting of graded numbers of PMDC05 cells as stimulator cells and allogeneic normal PB-MNCs as responder cells (Fig. 4).

3.2. Generation of antigen-specific CD8⁺ T cells by stimulation with antigen-pulsed PMDC05 cells

Normal HLA A-24⁺ PB-MNCs or CD8⁺ T cells were co-cultured with 60 Gy-irradiated PMDC05 cells pulsed with WT1 or CMV 9-mer peptides in 5% autologous serum-containing RPMI1640 medium with IL-2 and IL-7. Half of the culture medium was replenished every 2–3 days and WT1 or CMV peptide-pulsed PMDC05 cells were added to the co-culture every week. In order not to add WT1 or CMV peptide to the co-culture, peptide-pulsed PMDC05 cells were washed thoroughly two times before being added to the culture. WT1 or CMV tetramer analysis was performed every week at the time of the stimulation with PMDC05. In comparison, culture of MNCs with WT1 peptide only, as well as that of MNCs only, was performed in the study using WT1 peptide. In the study of generating WT1-specific CD8⁺ T cells, although WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells were not detected before co-culturing, WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells began to appear after 28 days of the co-culturing consisting of CD8⁺ T cells and WT1 peptide-pulsed PMDC05 (Fig. 5A). The percentage of WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells in the co-culturing consisting of CD8⁺ T cells and WT1 peptide-pulsed PMDC05 has increased up to 75% after 49 days of culturing (Fig. 5B). However, WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells were not detected in the co-culturing consisting of WT1 peptide-pulsed PMDC05 and MNCs throughout the culture period. The culture of MNCs with WT1 peptide but without PMDC05 cells as well as that of MNCs without WT1 peptide nor PMDC05 did not generate a definite cluster of WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells throughout the culture period (Fig. 5A and B). In addition, we performed co-culture consisting of CD8⁺ T cells and WT1 peptide-pulsed C2F8 cells (chronic myelogenous

no stimulation



LPS stimulation

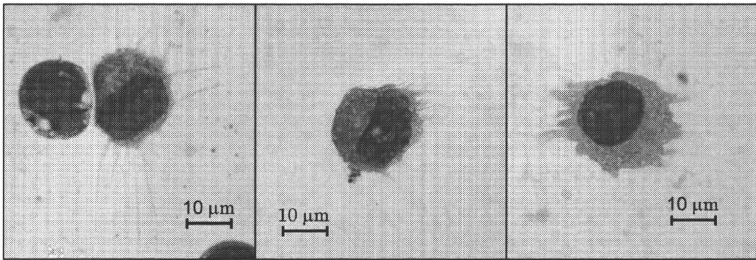
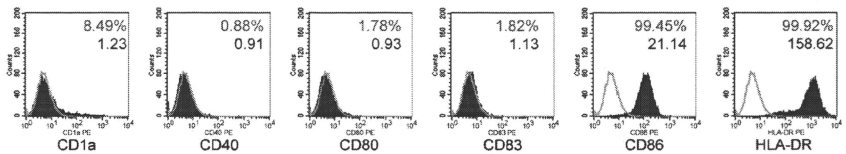


Fig. 1. Morphological changes of PMDC05 after culturing with LPS. PMDC05 cells were cultured with or without LPS for 24 h, cytospun on the slideglass and stained with May-Grünwald/Giemsa solution. Magnification: $\times 3000$.

no stimulation



LPS stimulation

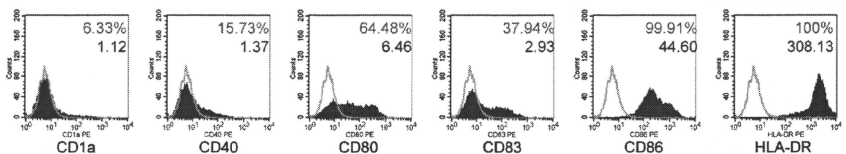


Fig. 2. Enhancement of antigen presentation associated molecules in PMDC05 stimulated with LPS. PMDC05 cells were cultured with or without 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 24 h and analyzed for the expression of antigen presentation associated molecules by flow cytometry.

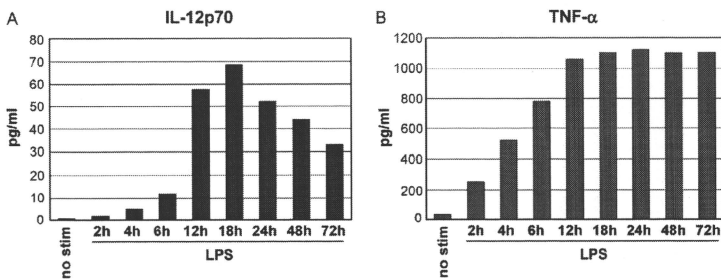


Fig. 3. Enhancement of IL-12p70 and TNF- α secretion in PMDC05 stimulated with LPS. PMDC05 cells were cultured with or without 0.1 μ g/ml LPS for up to 72 h and the concentration of IL-12p70 (A) and TNF- α (B) in culture supernatant was measured by ELISA.

leukemia blastic crisis cell line with HLA-A*2402 [13] as antigen presenting cells (APCs) instead of PMDC05, which did not produce WT1 tetramer⁺/CD8⁺ T cells up to 49 days (data not shown).

In the study of CMV-specific CD8⁺ T cells, CMV tetramer⁺/CD8⁺ T cells were less than one percent of lymphocytes in normal MNCs and CD8⁺ T cells before co-culturing. Co-culturing consisting of CMV peptide-pulsed PMDC05 and CD8⁺ T cells or MNCs generated considerable numbers of CMV tetramer⁺/CD8⁺ T cells after 14 days of culturing (Fig. 6A). The percentage values of CMV tetramer⁺/CD8⁺ T cells were increased and the duration of elevated CMV tetramer⁺/CD8⁺ T cells was longer in co-culturing consisting of CMV peptide-pulsed PMDC05 and CD8⁺ T cells compared with that of CMV peptide-pulsed PMDC05 and MNCs (Fig. 6B). Similar to WT1 peptide, CMV tetramer⁺/CD8⁺ T cells were not increased in the co-culturing consisting of CMV peptide-pulsed C2F8 cells and CD8⁺ T cells throughout the culture period (data not shown).

4. Discussion

In order to establish an efficient treatment modality using adoptive lymphocyte transfer for tumor or severe viral infection, induction and proliferation of antigen-specific T lymphocytes is necessary. Continuous supply and preparation of APCs of standardized quality is required for preparing a large number of CTLs for clinical application. Although autologous monocyte-derived DCs (mo-DCs) are widely used as APCs for this purpose, preparation

of enough numbers of mo-DCs by culturing PB monocytes with several cytokines is burdensome and the quality of mo-DCs varies from person to person, from whom mo-DCs are derived. Recently artificial APCs using either acellular [14–17] or cell-based systems (*Drosophila* cell line [18], mouse fibroblast cell line [19,20], human erythromyeloid cell line [21,22] or breast carcinoma cell line [23]) have been introduced to compensate for the drawbacks of mo-DCs. In cell-based artificial APCs, antigen presentation-associated molecules such as MHC class I [18–22], B7.1 (CD80) [18–20,22,23], ICAM-1 (CD54) [18–20,22], LFA-3 (CD58) [19,20,22] or CD83 [22] need to be expressed by cDNA transfection in order to bestow enough antigen presenting ability on these artificial APCs. On the other hand, a dendritic cell line with antigen presenting ability could be used for inducing anti-tumor or anti-viral CTLs without prior manipulation for antigen presentation molecules to be expressed. For this purpose there are three cell lines available including PMDC05 worldwide, which were derived from leukemia cells of pDC leukemia. One of them is a pDC line, GEN2.2, which requires a monolayer of irradiated (60 Gy) MS-5 feeder cells for growth [24], and another is a cell line named CAL-1, which was established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma [25]. Compared with GEN2.2, PMDC05 cells can proliferate in culture without any feeder cells, which is advantageous when apply PMDC05 for generating antigen-specific CTLs. Regarding GEN2.2, Asford et al. have reported that GEN2.2 could trigger high levels of tumor/viral antigen-specific and functional cytotoxic T cell responses in vitro and inhibit tumor growth in a humanized mouse in vivo model. In addition, they demonstrated that the GEN2.2 vaccine was more effective than conventional myeloid DC-based vaccines and suggested that an allogeneic pDC line-based vaccine could be a potential tool for clinical application in cancer treatment [26]. Regarding CAL-1 cells, this cell line is very similar to PMDC05 in morphology and surface phenotypes as well as the small amount of IFN- α production. However, there is no data concerning the antigen presenting ability of CAL-1 cells. Similar to normal pDCs, PMDC05 cells possessed a potent antigen presenting ability to naive T cells and could produce IFN- α by stimulation with CpG and influenza virus [7]. On the contrary, by stimulation with LPS, PMDC05 could produce IL-12p70, which implied that PMDC05 cells possess characteristics of mDC. In addition to IL-12p70 production, the antigen presenting ability of PMDC05 was markedly enhanced by stimulation with LPS. Therefore we tried to apply PMDC05 for generating antigen-specific CTLs in order to establish an efficient modality of adoptive transfer of antigen specific lymphocytes for patients with tumor or severe viral infection. PMDC05 cells could induce antigen-specific tetramer⁺/CD8⁺ T cells

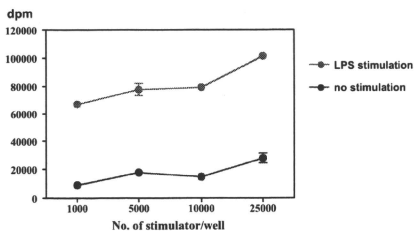


Fig. 4. Enhancement of antigen presenting ability in PMDC05 stimulated with LPS. PMDC05 cells were cultured with or without 0.1 μ g/ml LPS for 48 h and the antigen presenting ability was assayed by mixed leukocyte culture using ³H-thymidine incorporation consisting of graded numbers of PMDC05 cells as stimulator cells and 1×10^5 /well normal PB-MNCs as responder cells.