

Interferon- $\alpha$ -樹状細胞の成熟と細胞傷害性に与える

ピシバニールの役割

小屋 照継

金沢医科大学

再生医療学

(加藤 順也 教授)

平成 29 年 10 月 26 日

## 目次

1. 序論	3
2. 材料と方法	7
2-1. 樹状細胞の作製	
2-2. 樹状細胞の表現型解析	
2-3. <i>In vitro</i> 混合培養試験	
2-4. エンドサイトーシス活性の測定	
2-5. 産生サイトカインの測定	
2-6. 細胞傷害性試験	
2-7. 蛍光顕微鏡を用いた細胞傷害の観察	
2-8. DNA マイクロアレイ解析	
2-9. 統計解析	
3. 結果	11
3-1. ピシバニールと IFN-樹状細胞を用いた mIFN-樹状細胞の作製	
3-2. ピシバニールは IFN-樹状細胞の成熟を促す	
3-3. ピシバニールは IFN-樹状細胞の細胞傷害性を亢進させる	
3-4. mIFN-樹状細胞は CD56 発現と相関する細胞傷害性を示す	
3-5. mIFN-樹状細胞は TRAIL、Fas リガンド経路を介した細胞傷害性を示す	
4. 考察	15
4-1. mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞の表現型と機能の比較	
4-2. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性と作用機序	
4-3. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性と CD56 発現	
4-4. mIFN-樹状細胞の臨床応用に向けて	
4-5. 結論	
5. 図表	19
6. 謝辞	38
7. 参考文献	39

## 1. 序論

1973年にSteinmanらによりマウスのリンパ組織で発見された樹状細胞(Dendritic Cells, DC)は、免疫の獲得で中心的な役割を担う抗原提示細胞である(Steinman *et al.*, 1973)。体内に侵入した病原体やウイルスは、Natural Killer (NK)細胞、好中球、マクロファージなどに認識をされ、攻撃を受けて暴露された情報(抗原)は樹状細胞などに取り込まれる。皮膚、肺、胃、腸などに存在する樹状細胞は、抗原の貪食と分解を経て、リンパ管を通過して近傍のリンパ節に移動し、リンパ節に局在するT細胞に抗原を提示する(抗原提示)。樹状細胞の主要組織適合性複合体HLA-Class IとHLA-ClassIIを介して病原体やウイルスの抗原をT細胞に提示することで、抗体の産生や、病原体等に感染した細胞を排除する細胞傷害性T細胞を誘導する。この様に、樹状細胞は外来の病原体やウイルスへの免疫の獲得で中心的な役割を担っている(Banchereau and Steinman, 1998)(図1)。

興味深いことに、樹状細胞は病原体やウイルスへの免疫の獲得に寄与する一方で、体内で生じたがん細胞を排除するがん免疫の誘導に関与する。体内で日常的に発生するがん細胞は、第一にNK細胞などに発見をされて攻撃を受ける。攻撃により暴露されたがん細胞に特異的な抗原(がん抗原)は樹状細胞に取り込まれ(Iyoda *et al.*, 2002)、樹状細胞はがん抗原をT細胞に提示することで、がん細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性T細胞を誘導する(図2)。がん細胞を特異的に認識し、傷害する作用機序から、副作用が少ないと考えられており、樹状細胞によるがん免疫の獲得を活用したがん治療法として、樹状細胞ワクチン療法の開発研究が進められている(Anguille *et al.*, 2014; Kuwabara *et al.*, 2007; Nagayama *et al.*, 2003)。

樹状細胞ワクチンとは、医薬品の製造と品質の管理基準の下で、*in vitro*で大量に樹状細胞を作製し、人工的に合成したがん抗原を取り込ませた免疫細胞製剤である。患者さんの腋窩、鼠径部に投与された樹状細胞ワクチンは、周辺のリンパ管を通過してリンパ節に移動し、リンパ節に局在するT細胞にがん抗原を提示することで、がん細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性T細胞を誘導する。樹状細胞ワクチンを投与することで、がん免疫を生体内で能動的に誘導する技術により、副作用が少なく、がん細胞の増殖や転移に抑制効果が期待されている。がん細胞を攻撃する細胞傷害性T細胞の誘導には、樹状細胞の抗原提示能が重要である。体内に存在する樹状細胞は大きく二つのサブセットが存在し、骨髄系樹状細胞(myeloid dendritic cells, mDC: 表現型CD11c<sup>+</sup>HLA-classII<sup>hi</sup>)と形質

細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells, pDC: 表現型 CD11c<sup>-</sup>HLA-classII<sup>int</sup> CD123<sup>+</sup>)に分類される(Ganguly *et al.*, 2013)。形質細胞様樹状細胞はウイルスに応答して大量の IFN- $\alpha$ を産生し、抗ウイルス作用に優れるが抗原提示能は低く、一方で、骨髄系樹状細胞は高い抗原提示能を介して、効率的に細胞傷害性 T 細胞の誘導を行う。体内に存在する樹状細胞は末梢血中に僅か数%の細胞であり、がん治療に用いるには困難であった。1996年に Akagawa らにより、Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)と Interleukin-4 (IL-4)を用いてヒトの単球より未成熟な IL-4-樹状細胞(imature IL-4-DC, imIL-4-DC)を作成し、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )を用いて高い抗原提示能を有する成熟型に改変する手法が報告された(Akagawa *et al.*, 1996)。その後、TNF- $\alpha$ に加えて、Lipopolysaccharide (LPS)、CD40 リガンド、ピシバニール(溶連菌の乾燥菌体制剤、別称: OK-432)等の免疫賦活剤を用いて、成熟型の樹状細胞に改変する手法が登場した。*In vitro* でヒトの単球より作製される樹状細胞は、骨髄系樹状細胞と同様の表現型 CD11c<sup>+</sup>HLA-classII<sup>hi</sup>を示し、高い抗原提示能を有することが報告されている(Lakomy *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003) (図 3)。特に樹状細胞ワクチン療法では、既に臨床で使用され、安全性の確認されているピシバニールを用いた樹状細胞ワクチンの製造手法が適用されている(Koid *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2015; Sakai *et al.*, 2015)(図 4)。はじめに、患者さんから樹状細胞の原料となる単球を分取するために、白血球を標的とした成分採血を実施する。成分採血により得られた単球とリンパ球を含む単核球を培養皿に播種し、数時間の培養後、非接着性のリンパ球を除去し、培養皿に接着した単球を培養に用いる(接着培養法)。GM-CSF と IL-4 の存在下で未成熟な imIL-4 樹状細胞へ分化誘導した後、ピシバニールと炎症性サイトカイン Prostaglandin E2 (PGE2)を用いて、成熟型の樹状細胞に改変する。HLA-ClassI に結合する人工的に合成したがん抗原を取り込ませて、樹状細胞ワクチンとして出荷される。これらの一連の製造作業は、医薬品の製造と品質の管理基準の下で行われ、製造に用いる原料、培養試薬等は臨床に応用可能な安全性が求められている。

樹状細胞ワクチンの製造で用いられるピシバニールは、ストレプトコッカス・ピオゲネス *Streptococcus pyogenes* (A 群 3 型) Su 株 (溶連菌の一種) をペニシリン処理し、増殖不能にした凍結乾燥の菌体制剤である。1975年に抗悪性腫瘍剤として国内で承認され、20年以上にわたり臨床で使用され、安全性が確認されている(Kikkawa *et al.*, 1993; Kitahara *et al.*, 1996; Maehara *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1984 Torisu *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 1987)。ピシバニールの皮下注射により、体内の NK 細胞、好中球、マクロファージ、樹状細胞、細胞傷害性 T 細胞などの免疫細胞が活性化され、抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。未成熟な imIL-4-樹状細胞にピシバニールを与えることで、T 細胞へ抗原を提示する

HLA-Class I、HLA-ClassII の発現や、抗原提示を促進する共刺激分子 CD80、CD86、樹状細胞の成熟マーカーCD83 発現が亢進され、高い抗原提示能を示す成熟型の樹状細胞に改変される(Hill *et al.*, 2008; Nakahara *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2003)。ピシバニールで成熟した樹状細胞は、細胞傷害性 T 細胞の誘導を亢進させる IFN- $\gamma$ 、IL12p70 などの産生を促進し、誘導に抑制的な IL-10, TGF- $\beta$ の産生に影響はなく(Hovden *et al.*, 2011)、細胞傷害性 T 細胞の誘導に優れたサイトカインの産生バランスが確認されている。また、ピシバニールと PGE2 を併用し、未成熟な IL-4-樹状細胞に刺激を与えることで、リンパ節への移動を促進する CD197 (CCR7)の発現が上昇し、効率的な細胞傷害性 T 細胞の誘導を発揮する(Sato *et al.*, 2003)。さらに、興味深いことに、ピシバニールで成熟した樹状細胞は、正常細胞を傷つけることなく、樹状細胞自身が直接的にがん細胞を攻撃する細胞傷害性を発揮することが報告されている(Hill *et al.*, 2008)。がん細胞の傷害の機構には、CD40 と CD40 リガンドを介したシグナル伝達が重要と考えられているが、細胞傷害に直接的に関与する細胞傷害性因子は未だ特定されていない(図 5)。

1990 年代より樹状細胞の特徴の一つとして、ある種のサイトカインや Toll like receptor (TLR)の刺激に応答し、がん細胞を攻撃する細胞傷害性が報告されている(Tel *et al.*, 2014)(図 6)。末梢血中の骨髄系樹状細胞は、Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) または IFN- $\gamma$ に応答し、TNF- $\alpha$ -related-apoptosis-inducing ligand, TRAIL 依存的にヒト急性 T 細胞性白血病細胞由来細胞株 Jurkat、ヒト卵巣がん由来細胞株 Ovarc-3、ヒト前立腺がん由来細胞株 PC-3、ヒト悪性黒色腫由来細胞株 WM793 に対する細胞傷害性を示す(Fanger *et al.*, 1999)。形質細胞様樹状細胞は、ヒト免疫不全ウイルス Human Immunodeficiency Virus (HIV) やダニ媒介性脳炎 Tick-borne Encephalitis (TBE)のワクチンに応答し、ヒト T リンパ球性白血病 SupT1 や、K562、バーキットリンパ腫 Daudi に対する細胞傷害性を発揮する(Hardy *et al.*, 2007; Tel *et al.*, 2012)。また、*in vitro* でヒトの単球より分化誘導される未成熟な IL-4 樹状細胞に対し、Lipopolysaccharide (LPS)、CD40 リガンド、ピシバニールなどの免疫賦活剤(アジュバント)の刺激は、がん細胞に対する細胞傷害性を誘導する(Hill *et al.*, 2008; Lakomy *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2002)。がん細胞を攻撃する樹状細胞の細胞傷害機構として、細胞表面の TNF family (TNF- $\alpha$ , Fas リガンド, TRAIL)や、ペルオキシ亜硝酸、一酸化窒素 NO などの関与が報告されている。一方で、GM-CSF と IL-4 を用いた古典的な樹状細胞の作製方法ではなく、GM-CSF と Interleukin-15 (IL-15)や Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )の存在下で、ヒトの単球より分化誘導される IL-15-樹状細胞や、Interferon- $\alpha$ -樹状細胞(IFN-樹状細胞, IFN-DC)でも、がん細胞に対する細胞傷害性が報告されている。既に IFN-樹状細胞は臨床で使用され、安全性と一部で有効性が示唆されている(Korthals *et al.*, 2007;

Papewalis *et al.*, 2008)。これらの樹状細胞の示すがん細胞への細胞傷害性は、NK 細胞や細胞傷害性リンパ球の混入によるものと考えられたが、以下の観点から NK 細胞の影響が否定されている。第一に、NK 細胞やリンパ球の混入による細胞傷害性が影響するには、少なくとも細胞傷害の試験系に 10%以上の混入が必要であると報告されている(Stary *et al.*, 2007)。これまでの樹状細胞の細胞傷害性の測定では、NK 細胞やリンパ球の混入は 1%以下であり、これらの細胞による細胞傷害性の可能性は否定されている(Anguille *et al.*, 2012; Hill *et al.*, 2008; Papewalis *et al.*, 2008)。また、NK 細胞が細胞傷害性を示すヒトリンパ腫由来細胞株 U937 に対し、樹状細胞の細胞傷害性は全く効果を示さない点や(Anguille *et al.*, 2012)、NK 細胞や細胞傷害性リンパ球による細胞傷害性に関与しない一酸化窒素 Nitric oxide や(Salyucci *et al.*, 1998)、ペルオキシ亜硝酸などを介して、樹状細胞はがん細胞に対する細胞傷害性を発揮する(Lakomy *et al.*, 2011)。これらの報告により、NK 細胞等の混入による細胞傷害ではなく、樹状細胞の特徴の一つとして、がん細胞を攻撃する細胞傷害性が認知されている。

樹状細胞の細胞傷害性を誘導するサイトカインやアジュバントの中でも、既に臨床で使用され安全性の確認されているピシバニールと IFN-樹状細胞を用いた樹状細胞ワクチンは、抗原提示能を介した細胞傷害性 T 細胞の誘導と、がん細胞を自ら攻撃する細胞傷害性から、優れた抗腫瘍効果が予測される。しかしながら、IFN-樹状細胞に与えるピシバニールの影響や、ピシバニールで成熟した樹状細胞によるがん細胞の傷害機構は十分に解明されていない。本研究では、IFN-樹状細胞の成熟と細胞傷害性に与えるピシバニールの役割を検討し、ピシバニールを用いた樹状細胞によるがん細胞の傷害機構の解明を目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 樹状細胞の作製

患者のインフォームド・コンセントを得て、成分採血(アフエレーシス)より採取した末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)を原料として、樹状細胞 (dendritic cell: DC)の作製を行った(医倫理審査番号: 2107)。Interferon- $\alpha$ -樹状細胞(IFN-樹状細胞, IFN-DC)、mature IFN-樹状細胞(mIFN-樹状細胞、mIFN-DC)の作製では、CD14 マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いて単核球から純化した単球を用いた。日常的に 95%以上の純度で単球を精製し、GM-CSF (1,000 U/ml; Miltenyi Biotec)と IFN- $\alpha$  製剤の PEGINTRON (1  $\mu$ g/ml; MSD, Tokyo, Japan)を含む AIM-V medium (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)に  $2-4 \times 10^6$  cells/ml で懸濁し、非接着性の培養皿 (Hydrocell, Cell Seed, Tokyo, Japan)に播種し、3 日間の培養を行って IFN-樹状細胞を作製した。続いて、作製した IFN-樹状細胞にピシバニール (10  $\mu$ g/ml; streptococcal preparation, Chugai Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan)と Prostaglandin E2 (10 ng/ml; Daiichi Fine Chemical Co, Ltd, Toyama, Japan)を用いて 18-24 時間の培養を行って mIFN-樹状細胞を作製した。一方で、未成熟な immature IL-4-樹状細胞 (imIL-4-樹状細胞、imIL-4-DC)の作製は、これまでの古典的な接着培養法を用いた(Koid *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2015; Sakai *et al.*, 2015)。AIM-V 培地を用いて単球の割合で  $2-4 \times 10^6$  cells/ml に単核球を懸濁し、培養皿 BD Primaria™ Cell Culture Dish (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)に播種し、30 分後に非接着細胞を除去し、翌日に GM-CSF (50 ng/ml; Gentaur, Brussels, Belgium)および IL-4 (50 ng/ml; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)を添加した AIM-V 培地に交換し、5 日間の培養を行って未成熟な imIL-4-樹状細胞を作製した。続いて、成熟化のために、10  $\mu$ g/ml のピシバニールと 50 ng/ml の PGE2 を含む AIM-V 培地に懸濁し、さらに 18-24 時間の培養を行って mature IL-4-樹状細胞(mIL-4-樹状細胞, mIL-4-DC)を作製した。

### 2-2. 樹状細胞の表現型解析

FITC または PE の付加された CD11c, CD80, CD86 と HLA-ABC (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、CD14, CD40, CD83 と HLA-DR (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD197 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)の抗体を樹状細胞の指標として用いた。NK 細胞の表現型の指標に APC-conjugated CD56 (BD Pharmingen)

を用いた。細胞表面の細胞傷害性因子の検出では、PE の付加された TNF- $\alpha$ , Fas リガンド (eBioscience) と TRAIL (BD Phamingen) 抗体を用いて細胞を染色し、フローサイトメーター BD FACSCant II flow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析を行った。

### 2-3. *In vitro* 混合培養試験

HLA-A\*02:01 の患者から作製した樹状細胞を用いて、MART-1 26-35 A27L (ELAGIGILTV) ペプチド (MBL, Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan) 20  $\mu\text{g/ml}$  を 37°C で 1 時間パルスし、洗浄後に mitomycin C (MMC; 25  $\mu\text{g/ml}$ ; Kyowa Hakko Kogyo Co, Ltd, Tokyo, Japan) で 1 時間処理し、AIM-V 培地で 2 回洗浄を行った。調製した樹状細胞  $1 \times 10^6$  と末梢血リンパ球 (Peripheral Blood Lymphocytes: PBL) を 1:10 の割合で混合し、IL-2 (2.5 U/ml; Imunace, Shionogi, Pharmaceutical, Osaka, Japan)、IL-7 (5 ng/ml; R&D Systems)、IL-15 (10 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) を添加した AIM -V 培地で 3-5 日間の培養を行った。続いて、細胞の増殖に応じて、FBS (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan) 10% 含有の AIM-V 培地を補充し、さらに 2-3 日の培養を行って細胞を回収した。CD8-FITC (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA), CD3-APC (eBioscience), T-select HLA-A\*0201 MART-1 tetramer-ELAGIGILTV-PE (MBL) で細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて MART-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞の検出を行った。

### 2-4. 抗原貪食能と抗原分解能の測定

抗原貪食能を調べるために、FBS (Thermo Scientific) 10% 含有の AIM-V 培地を用いて、FITC で標識された dextran (M.W. = 40,000, Molecular Probes, Eugene OR, USA) を 250  $\mu\text{g/ml}$  に調製し、 $1 \times 10^6$  cells/ml の細胞と混合して、37°C で 3 時間反応を行った。AIM-V 培地で 2 回洗浄を行った後、フローサイトメーターを用いて細胞の蛍光強度の測定を行った。抗原分解能を明らかにするために、FBS 10% 含有の AIM-V 培地に DQ Ovalbumin (Molecular Probes) を 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加し、37°C で 30 分間の反応を行って、AIM-V 培地で 2 回洗浄し、フローサイトメーターを用いて細胞の蛍光強度の測定を行った。それぞれの試験において、4°C で反応させた細胞を negative control に使用し、37°C で得られた mean fluorescent intensity (MFI) から差し引いた値 ( $\Delta\text{MFI}$ ) を、抗原貪食能、抗原分解能の値として用いた。



## 2-5. 産生サイトカインの測定

AIM-V 培地を用いて樹状細胞を  $2 \times 10^5$  cells/ml に懸濁し、24 well plate に播種し、24時間の培養を行った。培養上清を回収し、 $500 \times g$  で5分の遠心を2回行って、サイトカインの測定に用いた。IL-12 (p70), IFN- $\gamma$  (R&D Systems)と TNF- $\alpha$ , IL-6 と IL-10 (BD Bioscience)の ELISA kit を用いて商業のプロトコル通りに反応を行って、MULTISKAN FC (Thermo Scientific) 分光光度計を用いてサイトカインの測定を行った。

## 2-6. 細胞傷害性試験

がん細胞を蛍光標識し、フローサイトメーターを用いて死細胞を測定する方法を基本として(Korthals *et al.*, 2007)、一部の変更を行って細胞傷害の測定を行った。がん細胞株の慢性骨髄性白血病株 K562(ATCC, Mianassas, VA, USA)、ヒト卵巣癌由来細胞株 Ovcara-3、ヒト膵臓癌由来細胞株 MiaPaCa2 と Panc-1、ヒト乳癌由来細胞株 MCF7、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT-116 (RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)を carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE;  $5 \mu\text{M}$ ; Molecular Probes)を添加した FBS 0.1%含有 PBS に  $1 \times 10^6$  cells/ml で懸濁し、 $37^\circ\text{C}$  で10分反応を行った後、AIM-V 培地で洗浄を行った。FBS 10%含有 AIM 培地を用いて、 $5 \times 10^5$  の樹状細胞 (Effector)と CFSE で染色したがん細胞株 (Target)を E:T = 50:1 の割合で混合し、 $37^\circ\text{C}$  で18時間の反応を行った。FACS flow で2回洗浄し、 $2 \mu\text{g/ml}$  の propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich Co. LLC., Tokyo, Japan)で5分間の染色を行って、フローサイトメーターを用いて死細胞の検出を行った。自然死細胞を除いた CFSE 陽性細胞中の PI 陽性細胞の割合を細胞傷害性(% cytotoxicity)として評価した。Negative control として、それぞれの未染色のがん細胞株を Effector として、CFSE で染色したがん細胞株(Target)を E:T = 50:1 で混合し、 $37^\circ\text{C}$  で18時間の反応を行った。細胞接触の阻害試験では、 $0.4 \mu\text{m}$  孔径のトランスウェルメンブレンを手順書の通りに用いた(Corning Inc., Corning, NY, USA)。ブロッキング抗体を用いた細胞傷害試験では、 $10 \mu\text{g/ml}$  の抗 TRAIL 抗体または抗 Fas リガンド (BioLegend, San Diego, CA, USA)抗体を含む 10%FBS 含有 AIM-V 培地で細胞を2時間インキュベーションし、CFSE で標識したがん細胞を混合して、さらに18時間の反応を行って、フローサイトメーターを用いて解析を行った。

## 2-7. 蛍光顕微鏡を用いた細胞傷害の観察

商業の手順書の通りに PKH26 ( $2 \mu\text{M}$ ; Sigma Aldrich)で染色した IFN-樹状細胞または mIFN-樹状細胞を用いて、CFSE で染色した K562 細胞に 1:1 の割合で混合

し、10%FBS 含有 AIM-V 培地で 18 時間の反応を行った後に、DAPI (1.5  $\mu$ M; Molecular Probes)で 5 分間の染色を行って、蛍光顕微鏡下(BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan)で観察を行った。

## 2-8. DNA マイクロアレイ解析

作製した樹状細胞から RNA を抽出し、Affymetrix GeneChip WT PLUS Reagent Kit User Manual に従ってビオチン標識し、Human Gene 2.0 ST array GenChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)を用いたハイブリダイゼーション/スキャン/数値化アルゴリズム解析後、GeneSpring version 13 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて発現変動を分析し、HeatMap 上に表示した。

## 2-9. 統計解析

グループ間の違いを検証するために、Bonferroni の補正を行った wilcoxon signed rank test を用いた。CD56 発現と細胞傷害性の相関、有意差の検定では、Spearman's rank-order correlation を用いた。統計解析には、IBM SPSS Advanced Statistics ver 23.0 (IMB Japan, Tokyo, Japan)を用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. ピシバニールと IFN-樹状細胞を用いた mIFN-樹状細胞の作製

古典的な IL-4-樹状細胞の作製では、成分採血で分取した単核球を培養皿に播種し、リンパ球などの非接着性の細胞を除去した後に、GM-CSF と IL-4 を用いて接着した単核球を樹状細胞に分化誘導させる接着培養法が用いられる(Akagawa *et al.*, 1996)。しかし、接着培養法を用いた樹状細胞の回収には、スクレーピングによる細胞の剥離が必要であり、生細胞率や回収率の低下に課題があった。そこで、ピシバニールと Interferon- $\alpha$ -樹状細胞(IFN-樹状細胞, IFN-DC)を用いた mature IFN-樹状細胞(mIFN-樹状細胞, mIFN-DC)の作製では、抗 CD14 抗体の付加されたマイクロビーズを用いて、単核球より単核球を純化し、GM-CSF および IFN- $\alpha$ 製剤(PEGINTRON)を添加した AIM 培地に純化した単核球を懸濁し、非接着性の培養皿で培養を行う非接着培養法を構築した(図 7)。一方で、古典的な IL-4-樹状細胞の作製には、古典的な接着培養法を用いて、未成熟な imIL-4-樹状細胞を誘導し、続いてピシバニールを与えて成熟した matureIL-4-樹状細胞 (mIL-4-樹状細胞, mIL-4-DC)を作製した。位相差顕微鏡による観察の結果、成熟型の mIL-4-樹状細胞と同様に、mIFN-樹状細胞は細胞が凝集したクラスターを形成し、典型的な成熟型の樹状細胞の表現型が確認された(図 7、右パネル)。接着培養法を用いた古典的な mIL-4-樹状細胞の作製では 1 週間の培養期間が必要であるが、mIFN-樹状細胞は 4 日間で製造が可能であり、mIL-4-樹状細胞と比較して、生細胞率、収率が有意に高いことが明らかになった(図 8)。

#### 3-2. ピシバニールは IFN-樹状細胞の成熟を促す

IFN-樹状細胞にピシバニールを与えて作製した mIFN-DC の表現型と機能を調べるために、IFN-樹状細胞、未成熟な imIL-4-樹状細胞、成熟型の mIL-4-樹状細胞を用いた比較解析を行った。フローサイトメーターを用いた表現型解析の結果、IFN-樹状細胞と比較して、mIFN-樹状細胞は、T 細胞への抗原提示を亢進させる共刺激分子 CD40、CD80、CD86 や、リンパ節への移動を促進させる CD197(CCR7)、抗原を提示する HLA-DR で発現の上昇が認められた(図 9)。また、以前の報告の通りに(Mohty *et al.*, 2003; Tosi *et al.*, 2004)、IFN-樹状細胞は imIL-4-樹状細胞と同等に CD40、CD80、CD86、CD197 の発現が低く、未成熟な樹状細胞の表現型が観察された。これらの結果より、ピシバニールは IFN-樹状細胞の表現型を成熟型に移行させることが明らかになった。mIL-4-樹状細胞

と mIFN-樹状細胞の表現型を比較した場合、mIFN-樹状細胞の CD80、CD86、HLA-ABC 発現は mIL-4-樹状細胞と同等であり、T 細胞に抗原を提示する HLA-DR に高い発現が確認された。一方で、CD40、CD197 および CD83 は、mIL-4-樹状細胞が有意に高く、これらの表現型の違いが、抗原提示能、抗原貪食能、抗原分解能や、サイトカインの産生に与える影響を以下の実験系を用いて検討を行った。抗原提示能を調べるために、MART-1 ペプチドと樹状細胞を用いた *in vitro* 混合培養試験を行った。ヒト悪性黒色腫細胞に特異的ながん抗原である MART-1 抗原を取り込ませた樹状細胞を作製し、T 細胞を含む末梢血リンパ球と一週間の混合培養を行って、それぞれの樹状細胞で誘導される Mart-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞の割合を検討した(図 10)。パネル内の数値は、CD3 および CD8 陽性細胞中の MART-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞の割合を示す。IFN-樹状細胞の 1.9%と比較して、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞の細胞傷害性 T 細胞の誘導は 4.9%に増加を示し(図 10A)、成熟型の mIL-4-樹状細胞と同等の細胞傷害性 T 細胞の誘導が確認された(図 10B)。また、FITC-dextran の取り込みから抗原貪食能を検討し、DQ-Ovalbumin を用いた解析から抗原分解能を検証した。図 11A に示すように、IFN-樹状細胞と未成熟な imIL-4-樹状細胞で見られる高い抗原貪食能と抗原分解能は、ピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞で顕著に低下し、成熟型の樹状細胞の機能が観察された。続いて、細胞傷害性 T 細胞の誘導に関与するサイトカイン (IL-12 p70、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10 および IL-6) の産生を調べるために ELISA 法を用いた産生サイトカインの測定を行った(図 11B)。細胞傷害性 T 細胞の誘導を亢進させる IL-12p70 および IFN- $\gamma$  は、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞で同等の産生を示し、腫瘍壊死因子である TNF- $\alpha$  の産生に変動は見られなかった。また、細胞傷害性 T 細胞の誘導を抑制する IL-10 は、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞で同等の産生を示した。興味深い点に、炎症性サイトカイン IL-6 は、mIFN-樹状細胞で有意に高い産生が確認された。さらに、DNA マイクロアレイを用いてサイトカインの遺伝子発現を調べたところ (図 12)、IFN-樹状細胞と比較して、mIFN-樹状細胞では、細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進する Th1 サイトカインの IL-12(p40)や、IFN- $\gamma$ の発現が上昇し、反対に IL-4, TGF- $\beta$ などの細胞傷害性 T 細胞の誘導を抑制する Th2 サイトカインの遺伝子発現に減少が認められ、細胞傷害性 T 細胞に適した Th1/Th2 のサイトカインの遺伝子発現のバランスが観察された。これらの表現型と機能解析より、ピシバニールは IFN-樹状細胞の成熟を促し、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えて作製した mIFN-樹状細胞は、古典的な成熟型の mIL-4-樹状細胞と同等の抗原提示能、抗原貪食能と抗原分解能を示すことが明らかになった。

### 3-3. ピシバニールは IFN-樹状細胞の細胞傷害性を亢進させる

未成熟な imIL-4-樹状細胞にピシバニールを与えることで、がん細胞を攻撃する細胞傷害性を発揮すると報告されている(Hill *et al.*, 2008)。しかしながら、ピシバニールが IFN-樹状細胞の細胞傷害性に与える影響は未だ検討されていない。ピシバニールを用いて樹状細胞を作製し、K562 細胞株を標的とした細胞傷害性試験を行った。IFN-樹状細胞の 17.1%の活性に比べて、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞の細胞傷害性は 40.3%に上昇を示した(図 13A)。未成熟な imIL-4-樹状細胞にピシバニールを与えた場合は、mIL-4 樹状細胞の細胞傷害性と比較して僅かに上昇が観察されたが、有意な差は得られなかった。これまでに報告のある作製方法との違いとして(Hill *et al.*, 2008)、ピシバニールを用いた培養期間や、PGE2 の併用の有無があり、これらが細胞傷害性に影響した可能性が考えられる。興味深いことに、mIL-4-樹状細胞と比較して、mIFN-樹状細胞は、顕著に高い細胞傷害性が明らかになった(mIFN-DC 40.3%, mIL-4-DC 10.3%) (図 13B)。種々のがん細胞株で検証を行ったところ、K562 細胞株と同様に、卵巣がん Ovar-3、膵がん MiaPaCa2、Panc-1 でも、mIFN-樹状細胞は mIL-4-樹状細胞より有意に高い細胞傷害性を示した(図 14)。一方で、乳癌(MCF-7)や大腸がん(HCT-116)由来のがん細胞株に対しては、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞による細胞傷害性は認められなかった。これらの結果より、ピシバニールは IFN-樹状細胞の細胞傷害性を亢進し、mIFN-樹状細胞は mIL-4-樹状細胞より優れた細胞傷害性を示すことが明らかになった。

### 3-4. mIFN-樹状細胞は CD56 発現と相関する細胞傷害性を示す

IFN-樹状細胞は細胞接着に関与する CD56 の発現を示し(Hammerman *et al.*, 2005; Moretta *et al.*, 2002)、CD56 陽性の IFN-樹状細胞では高い細胞傷害性が報告されている(Korthals *et al.*, 2007; Papewalis *et al.*, 2008)。また、ピシバニール刺激で成熟した IL-4-樹状細胞は、がん細胞上の CD40 と IL-4-樹状細胞上の CD40 リガンドの結合を介しシグナルを伝達することで細胞死を誘導すると考えられている(Hill *et al.*, 2008)。作製した樹状細胞の CD56 発現を調べたところ、imIL-4-樹状細胞や mIL-4-樹状細胞の CD56 発現は極めて低く大きな変動は認められなかった。しかし、IFN-樹状細胞の CD56 発現は、ピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞で有意な上昇を示した(図 15A)。また、mIFN-樹状細胞の CD56 発現の強度( $\Delta$ MFI)と細胞傷害性に弱い相関が認められた(図 15B,  $r = 0.477$ )。細胞接着に関与する CD56 発現を示し、ピシバニール刺激後に CD56 発現の上昇を認めたことから、mIFN-樹状細胞の細胞傷害性に細胞接触が重要であるのか検討を行った。細胞傷害性試験の開始から 18 時間後に、蛍光顕微鏡を用いて細胞の状態を観察

したところ、CFSE で緑色に標識した K562 は、赤い蛍光を示す PKH26 陽性の mIFN-樹状細胞と混在して、顕著にクラスターを形成し、クラスター内部には、青色の DAPI で染色された複数の K562 の死細胞が観察された(図 16A、白矢印)。一方で、IFN-樹状細胞と K562 細胞によるクラスター形成は小さく、DAPI 陽性細胞が僅かに観察された。さらに、トランスウェルを用いて細胞接触を阻害した場合(図 16B)、K562 に対する mIFN-樹状細胞の細胞傷害性は有意に減少し (median, 10.8%)、IFN-樹状細胞と同等の割合を示した(median, 9.5%)。MiaPaCa2 でも同様の傾向が認められ (IFN-樹状細胞: median, 17.0%; mIFN-樹状細胞: median, 19.7%)、mIFN-樹状細胞の細胞傷害性には細胞接触が重要であることが明らかになった。

### 3-5. mIFN-樹状細胞は TRAIL、Fas リガンド経路を介した細胞傷害性を示す

樹状細胞の細胞傷害性に関与する因子として、TNF family (TNF- $\alpha$ , Fas リガンド, TRAIL)(Chapoval *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Raftery *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001), パーフォリン/グランザイム(perforin/granzymeB) (Kim *et al.*, 2013), 一酸化窒素, Nitric Oxide, NO (Huang *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2007), ペルオキシ亜硝酸, peroxyinitrites (Fraszczak *et al.*, 2010) などが報告されている。ピシバニールで成熟した IL-4 樹状細胞の細胞傷害の機構として、がん細胞上の CD40 と IL-4-樹状細胞上の CD40 リガンドの結合によるシグナルを介した細胞死の誘導が示唆されている(Hill *et al.*, 2008)。IFN-樹状細胞にピシバニールを与えて作成した mIFN-樹状細胞の細胞傷害性には、がん細胞との接触が重要であることから、細胞表面の TNF family の発現に変動が見られるのか検討を行った。IFN-樹状細胞、imIL-4-樹状細胞にそれぞれピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞では、細胞表面の TRAIL、FAS リガンドの発現に上昇が認めれた(図 17A)。また、興味深いことに、mIFN-樹状細胞の TRAIL 発現は、mIL-4-樹状細胞より有意に高く、Fas リガンドは同等の発現が観察された(図 17A)。続いて、TRAIL, Fas リガンドが mIFN-樹状細胞の細胞傷害性に関与するのかを明らかにするために、K562 (TRAIL 感受性)(Hill *et al.*, 2008), MiaPaCa2(Fas リガンド感受性)(Yuan *et al.*, 2011)を標的として、TRAIL, Fas リガンドのブロッキング抗体を用いた細胞傷害性試験を行った。K562 を標的とした場合、抗 TRAIL 抗体で処理した mIFN-樹状細胞の細胞傷害性は有意に低下し(図 17B 左)、MiaPaCa2 を標的とした細胞傷害性試験では、抗 Fas リガンド抗体で処理した mIFN-樹状細胞の細胞傷害性に有意な低下が認められた(図 17B 右)。これらの結果より、mIFN-樹状細胞は TRAIL, Fas リガンドを介して細胞傷害性を発揮することが明らかになった。

## 4. 考察

### 4-1. mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞の表現型と機能の比較

GM-CSF と IFN- $\alpha$  を用いてヒトの単球より分化誘導される IFN-樹状細胞に対して、ピシバニールを与えて作製した mIFN-樹状細胞の表現型と機能をまとめて示した(表 1)。古典的な成熟型の樹状細胞として、未成熟な imIL-4-樹状細胞にピシバニールを与えて作製した mIL-4-樹状細胞を対照に用いた。単球を培養皿に接着し樹状細胞への分化誘導を行う古典的な mIL-4-樹状細胞と比べて、mIFN-樹状細胞の培養期間は短縮され、非接着性の環境下で培養することで、生細胞率、収率が向上し、NK 細胞の指標となる CD56 発現に特徴的な表現型が認められる。細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進させる共刺激分子 CD80、CD86 の発現は、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞で同等である一方で、抗原提示能を促進させる共刺激分子 CD40 やリンパ節への移動に重要な CD197 (CCR7) や、成熟した樹状細胞の指標とされる CD83 は mIFN-樹状細胞で低い発現を示す。In vitro 種々の実験系を用いて、これらの表現型の違いが機能的に影響を与えるのか検討を行った結果、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞は同等の抗原貪食能と抗原分解能を有し、また、mIFN-樹状細胞は成熟型の mIL-4-樹状細胞と同等の抗原提示能を発揮する。細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進させる IL-12p70、IFN- $\gamma$  の産生や、誘導を負に制御する IL-10 の産生に違いはなく、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞は同様に細胞傷害性 T 細胞の誘導に適したサイトカインの産生を示す。一方で、mIL-4-樹状細胞と比較して、mIFN-樹状細胞はがん細胞株を直接的に攻撃する細胞傷害性に優れており、mIFN-樹状細胞の細胞傷害性と CD56 発現に弱い相関が認められる。樹状細胞の指標である CD86、HLA-DR に加えて(Butterfield *et al.*, 2011)、mIFN-樹状細胞に特徴的な表現型として、CD56 は有用なマーカーになると考えられ、臨床提供への出荷基準として有用であることが示された。

### 4-2. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性と作用機序

未成熟な imIL-4-樹状細胞にピシバニール刺激を与えることで、がん細胞を攻撃する細胞傷害性を獲得すると報告されているが(Hill *et al.*, 2008)、IFN-樹状細胞に与えるピシバニールの影響は明らかではなかった。IFN-樹状細胞と比較して、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞では、細胞傷害性が有意に上昇し、ピシバニールは IFN-樹状細胞の細胞傷害性を亢進させることを

明らかにした。これまでに樹状細胞によるがん細胞の傷害機構として、TNF family、NO、グランザイム、peroxynitritesなどが報告されている(Chapoval *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Raftery *et al.*, 2001; Vidalain *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2007; Fraszczak *et al.*, 2010)。mIFN-樹状細胞はがん細胞と混在してクラスターを形成し、細胞傷害性に細胞接触が重要であることから、細胞表面の細胞傷害性因子の関与が予測された。IFN-樹状細胞または imIL-4-樹状細胞にピシバニールを与えることで、mIFN-樹状細胞と mIL-4-樹状細胞の細胞表面の TRAIL, Fas リガンドの発現が上昇し、そらのブロッキング抗体を用いた試験から、mIFN-樹状細胞は TRAIL, Fas リガンドを介して細胞傷害性を発揮することを見い出した。単核球をピシバニールで刺激することで、Fas リガンド発現の上昇の報告があるが(Toda *et al.*, 1996)、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えた mIFN-樹状細胞の TRAIL、Fas リガンドの発現の上昇の報告は初めてである。また、IFN-樹状細胞と imIL-4-樹状細胞とともに TRAIL と Fas リガンドの発現の上昇を認めたことから、ピシバニールはこれらの細胞傷害性因子の発現を亢進させる作用が明らかになった。一方で、mIL-4-樹状細胞と比較して、mIFN-樹状細胞の細胞表面の TRAIL 発現は有意に高く、がん細胞と混在してクラスターを形成し、がん細胞を傷害をする際に、有意に働くと推察される。また、mIFN-樹状細胞の細胞傷害性は、トランスウェルを用いた細胞接触の阻害や、抗 TRAIL や抗 Fas リガンドのブロッキング抗体を用いた場合でも完全に抑制をされない。mIFN-樹状細胞による細胞傷害の機構として、TRAIL および Fas リガンド経路を介した細胞傷害だけでなく、IFN-樹状細胞で報告されているグランザイム B などの可溶性因子を介した傷害機構が存在すると考えられる(Korthals *et al.*, 2007)。これらの複合的な細胞傷害の機序により、mIFN-樹状細胞は mIL-4-樹状細胞よりも優れた細胞傷害性を発揮すると考えられる。

#### 4-3. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性と CD56 発現

mIFN-樹状細胞の細胞傷害性は CD56 発現と弱い相関を示し、TRAIL、Fas リガンドを介して細胞死を誘導する。体内に存在する形質細胞様樹状細胞では、ヒト免疫不全ウイルス Human Immunodeficiency Virus (HIV)の刺激により TRAIL 発現が上昇し、TRAIL を介した細胞傷害性を発揮することが報告されている(Hardy *et al.*, 2007)。また、ダニ媒介性脳症炎 Tick-born Encephalitis (TBE)ワクチンに応答した形質細胞様樹状細胞では、CD56 および TRAIL を含む細胞傷害性因子の発現が亢進し、細胞接触に依存的な細胞傷害を発揮する(Tel *et al.*, 2012)。IFN-樹状細胞にピシバニールを与えて作製した mIFN-樹状細胞による細胞傷害



性の獲得では、形質細胞様樹状細胞が病原体に応答する際と同様の現象によるものと推察される。これらの現象は mIL-4-樹状細胞では認められないことから、IFN-樹状細胞にピシバニールを与えることが、CD56 発現と相関を示す mIFN-樹状細胞の細胞傷害性に重要と考えられる。

mIFN-樹状細胞は mIL-4-樹状細胞より優れた細胞傷害性を発揮するが、mIFN-樹状細胞が TRAIL, Fas リガンドを介した細胞傷害性をどのように獲得するのか、そのメカニズムの解明は課題である。特に、mIFN-樹状細胞は、mIL-4-樹状細胞と比較して、TRAIL 発現が有意に高い(図 17A)。形質細胞様樹状細胞の HIV 応答による TRAIL 発現の上昇では、TLR7 を介したシグナル伝達が重要であり(Hardy *et al.*, 2007)、IFN-樹状細胞では、imIL-4 樹状細胞と比較して有意に高い TLR7 の発現が報告されている(Mohty *et al.*, 2003)。IFN-樹状細胞は TLR7 を介してピシバニール刺激を伝達し、TRAIL 発現を亢進させる作用が働いていると推察される。

#### 4-4. mIFN-樹状細胞の臨床応用に向けて

*In vitro* の細胞傷害性 T 細胞の混合培養試験や、がん細胞に対する細胞傷害性試験から、mIFN-樹状細胞は mIL-4-樹状細胞と同等の抗原提示能を有し、かつ、がん細胞を直接攻撃する高い細胞傷害性を示し、臨床応用で優れた抗腫瘍効果が期待される。しかしながら、個体に投与された mIFN-樹状細胞がリンパ節へ移動し、効率的に細胞傷害性 T 細胞を誘導出来るのかは検証が必要である。imIL-4-樹状細胞にピシバニール刺激を与えた mIL-4-樹状細胞は、細胞傷害性 T 細胞の誘導に必要なリンパ節への移動を促進する CD197(CCR-7)に高い発現を示すが、mIFN-樹状細胞はピシバニール刺激による CD197 発現の上昇は僅かであり、mIL-4-樹状細胞より低い発現を示す(図 9)。IFN-樹状細胞と imIL-4-樹状細胞は、ピシバニールの刺激を伝達する TLR の発現に違いがあると推察され、それぞれの樹状細胞で異なった表現型と機能が獲得されたと推察される。また、細胞傷害性 T 細胞の誘導に加えて、mIFN-樹状細胞を担癌モデルマウスに投与することで、腫瘍の増殖と転移に抑制効果が認められるのか検証が必要である。個体に投与された mIFN-樹状細胞がリンパ節に移動するのか、または腫瘍局所に浸潤するのかなどの生体内の挙動を明らかにするために、レポーター遺伝子を導入した mIFN-樹状細胞を投与し、動物内での動きのモニタリングが必要と考えられる。

mIFN-樹状細胞が抗腫瘍効果を発揮する上で重要な機能として、腫瘍局所に移動し、がん細胞を直接的に攻撃する細胞傷害性と、がん細胞を攻撃する細胞傷害性 T 細胞を誘導する抗原提示能がある。ここで、期待される抗腫瘍効果のモ

デル図を示す(図 18)。mIFN-樹状細胞はリンパ節に移動するのではなく、投与後に腫瘍局所に移動し、TRAIL および Fas リガンドを介してがん細胞を傷害した後に、がん抗原を取り込んで、CD8 T 細胞を介して、細胞傷害性 T 細胞を誘導する可能性が考えられる。IFN-樹状細胞の産生する IP-10/CXCL10 は、CXCR3 陽性の活性化した CD8 T 細胞を誘引し、細胞傷害性 T 細胞を誘導する作用が報告されている(Padovan *et al.*, 2002)。また、形質細胞様樹状細胞を用いた実験では、がん細胞を攻撃した後に、暴露されたがん抗原を取り込むことで、がん細胞を特異的に攻撃する細胞傷害性 T 細胞を誘導する作用が報告されている(Tel *et al.*, 2013)。また、mIFN-樹状細胞は IL-6 の高い産生を示すが、IL-6 は制御性 T 細胞 regulatory T cell (T-reg) を抑制することで(Pasare *et al.*, 2003)、細胞傷害性 T 細胞の誘導を亢進させる。T-reg の混在する傾向にある腫瘍局所でも(Woo *et al.*, 2001)、mIFN-樹状細胞の IL-6 産生により T-reg の作用を抑制し、細胞傷害性 T 細胞の誘導に有意に働くと推察される。担癌モデルマウスや、ヒトの免疫を有するヒト化免疫マウス等を用いた *in vivo* における mIFN-樹状細胞の抗腫瘍作用のモデルの検証が必要である。

ピシバニールで成熟した mIFN-樹状細胞の細胞傷害性には、TRAIL および Fas リガンドを介した細胞死が関与する。TRAIL による細胞傷害は正常細胞への影響が少ない一方で(Griffith *et al.*, 1998, 1999; Walczak *et al.*, 1999)、Fas リガンドを介した細胞傷害は、肝細胞や(Lacronique *et al.*, 1996)、免疫細胞の恒常性、免疫寛容に関与することから(Askenasy *et al.*, 2005)、自己免疫疾患などの副作用を引き起こす可能性があり、mIFN-樹状細胞の投与には適切なレジメが必要と考えられる。また、がん細胞の TRAIL および Fas リガンドの感受性を高める抗がん剤の併用は(Iwase *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004)、mIFN-樹状細胞の細胞傷害性を促進すると期待される。

#### 4-5. 結論

本研究により、IFN-樹状細胞に与えるピシバニールの役割として、IFN-樹状細胞の成熟と、細胞傷害性を亢進させる役割を明らかにした。IFN-樹状細胞にピシバニールを与えて作製した mIFN-樹状細胞は、成熟型の mIL-4-樹状細胞と同等の抗原提示能を有し、CD56 発現と相関する細胞傷害性を示し、TRAIL および Fas リガンド経路を介した細胞傷害の機構を見出した。モデルマウスを用いた *in vivo* の mIFN-樹状細胞の研究の発展により、優れた抗腫瘍効果を示す樹状細胞ワクチンの開発に繋がると期待される。

## 5. 図表

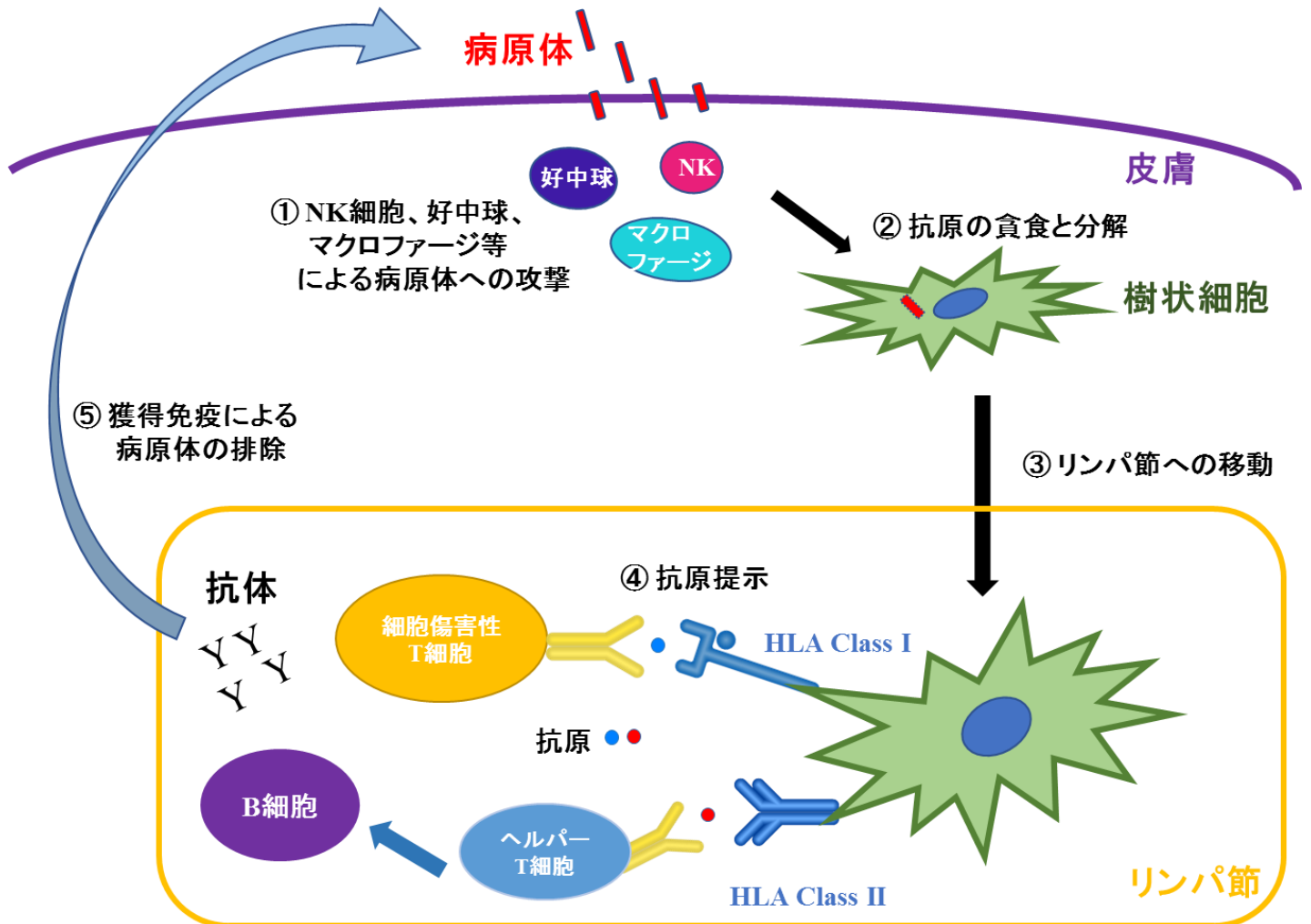


図 1. 病原体等への免疫の獲得

体内に侵入した病原体やウイルスは、①Natural killer (NK)細胞、好中球、マクロファージなどに認識をされて攻撃を受ける。②攻撃によって暴露された病原体の情報(抗原)は、樹状細胞に取り込まれて分解される。③抗原を取り込んだ樹状細胞は、近傍のリンパ管を通して、リンパ節に移動する。④樹状細胞は主要組織適合性複合体 HLA-Class I、HLA-Class II を介して、細胞傷害性 T 細胞とヘルパー T 細胞に病原体の情報を提示する(抗原提示)。細胞傷害性 T 細胞は、病原体に感染した細胞を排除し、ヘルパー T 細胞が B 細胞を活性化することで、病原体を認識する抗体が産生される。⑤樹状細胞を中心として獲得した免疫により病原体を排除する。

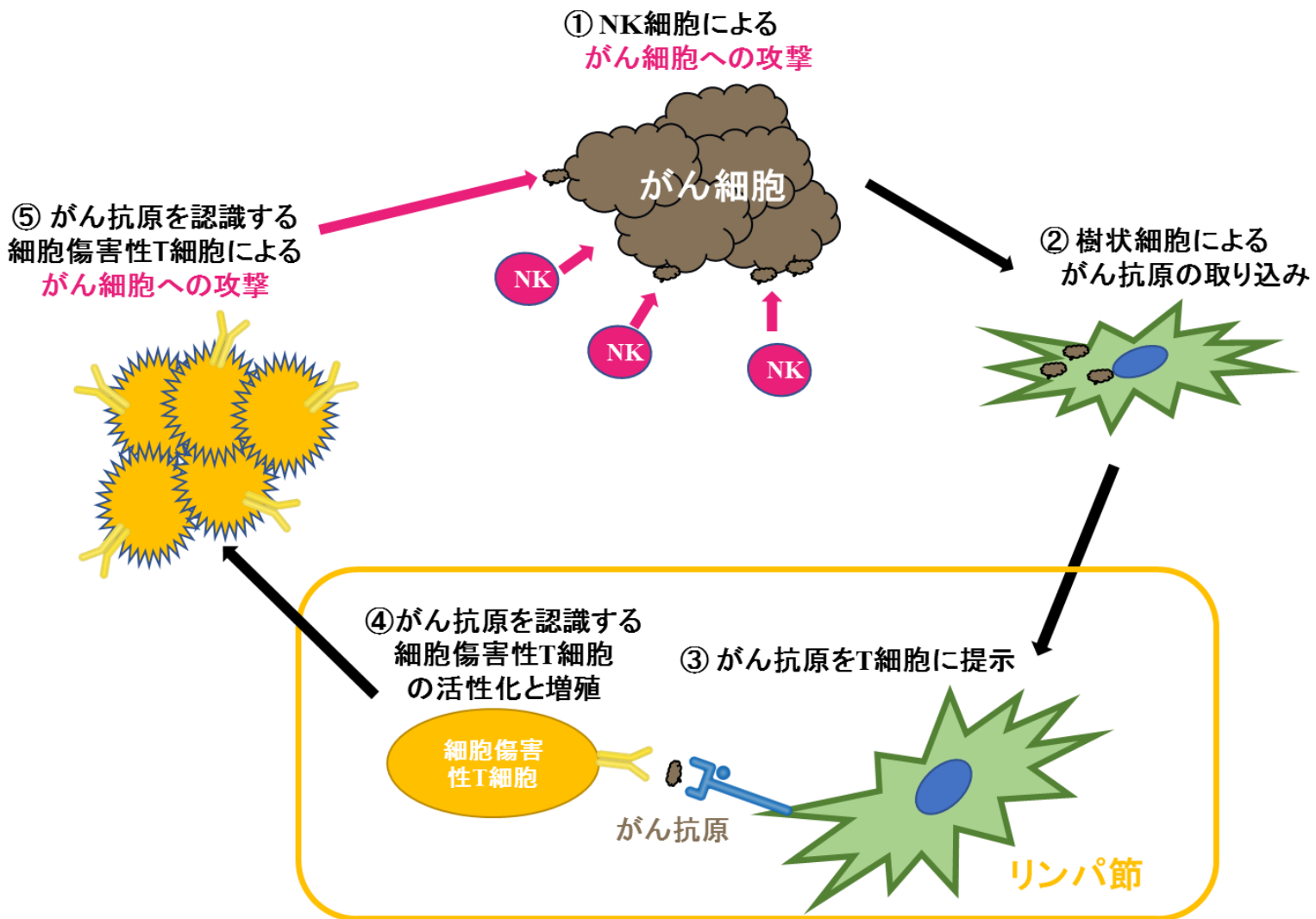


図 2. がん免疫の獲得

①生体内で生じたがん細胞は、第一にNK細胞の攻撃を受ける。②樹状細胞は、NK細胞の攻撃により暴露されたがん細胞に特異的な抗原(がん抗原)を貪食する。③リンパ節に移動した樹状細胞は、がん抗原を細胞傷害性T細胞に提示し、細胞傷害性T細胞の活性化と増殖を促す。⑤がん抗原を特異的に認識する細胞傷害性T細胞は、正常細胞を傷つけることなく、がん細胞を特異的に傷害する。

	ヒト骨髄系樹状細胞	ヒト形質細胞様樹状細胞	ヒト単球由来樹状細胞
表現型	CD11c <sup>+</sup> HLA-Class II <sup>hi</sup>	CD11c <sup>-</sup> HLA-Class II <sup>int</sup> CD123 <sup>+</sup>	CD11c <sup>+</sup> HLA-Class II <sup>hi</sup>
抗原提示能	高い	低い	高い
サイトカイン産生	IL-12, IFN-γ	IFN-α	IL-12, IFN-γ

### 図 3. 樹状細胞の種類

ヒトの体内に存在する樹状細胞は大きく 2 種類に分類される。病原体等に  
 応答して IFN-γ などのサイトカインを産生し、抗原提示能の高い骨髄系樹状細胞  
 と、ウイルスに  
 応答し大量の IFN-α を産生する形質細胞様樹状細胞がある。

抗原提示能に優れた骨髄系樹状細胞は、CD11c<sup>+</sup>(陽性) HLA-Class II<sup>hi</sup>(高い発  
 現)を示し、形質細胞様樹状細胞は CD11c<sup>-</sup>(陰性) HLA-Class II<sup>int</sup>(中間の発現)を  
 示し、CD123<sup>+</sup>(陽性)の特徴的な表現型を示す。*In vitro* でヒトの単球を用いて、  
 GM-CSF と IL-4 の存在下で分化誘導されるヒト単球由来樹状細胞は、骨髄系樹  
 状細胞と同様の表現型とサイトカイン産生を示し、高い抗原提示能を示す。

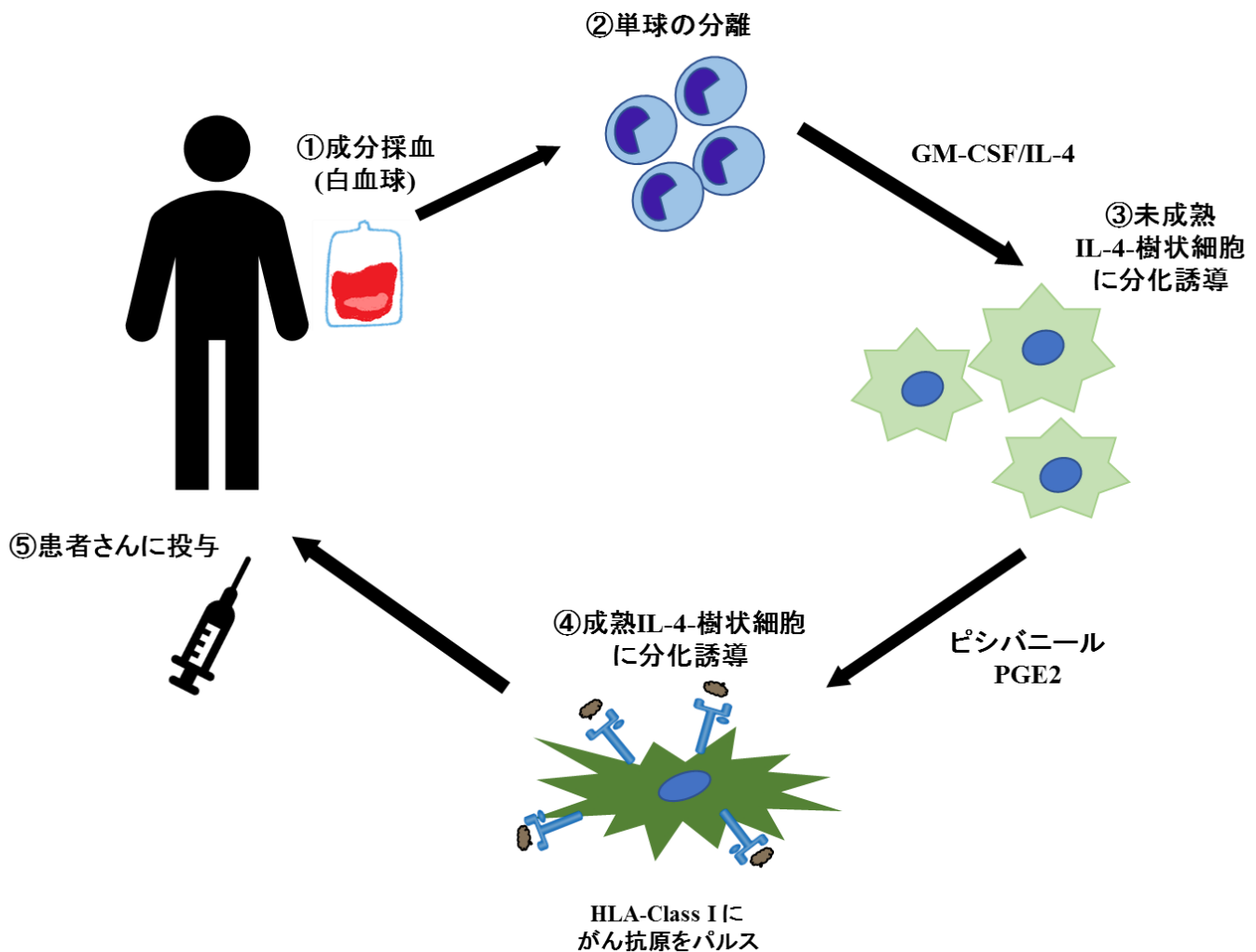


図 4. 樹状細胞ワクチン療法の流れ

①患者さんより白血球を標的とした成分採血を実施し、単球とリンパ球を含む単核球を採取する。②単核球を接着用の培養皿に播種し、浮遊した非接着性のリンパ球を除去し、接着により分離した単球を培養に用いる(接着培養法)。③GM-CSFとIL-4存在下で5日間の培養により、単球から未成熟なIL-4樹状細胞に分化誘導を行う。④ピシバニールとPGE2を添加し、成熟型のIL-4樹状細胞に改変し、人工的に合成したがん抗原を取り込ませて、樹状細胞ワクチンを作製する。⑤患者さんのリンパ節の近傍の腋窩、鼠径部付近に樹状細胞ワクチンの投与を行う。

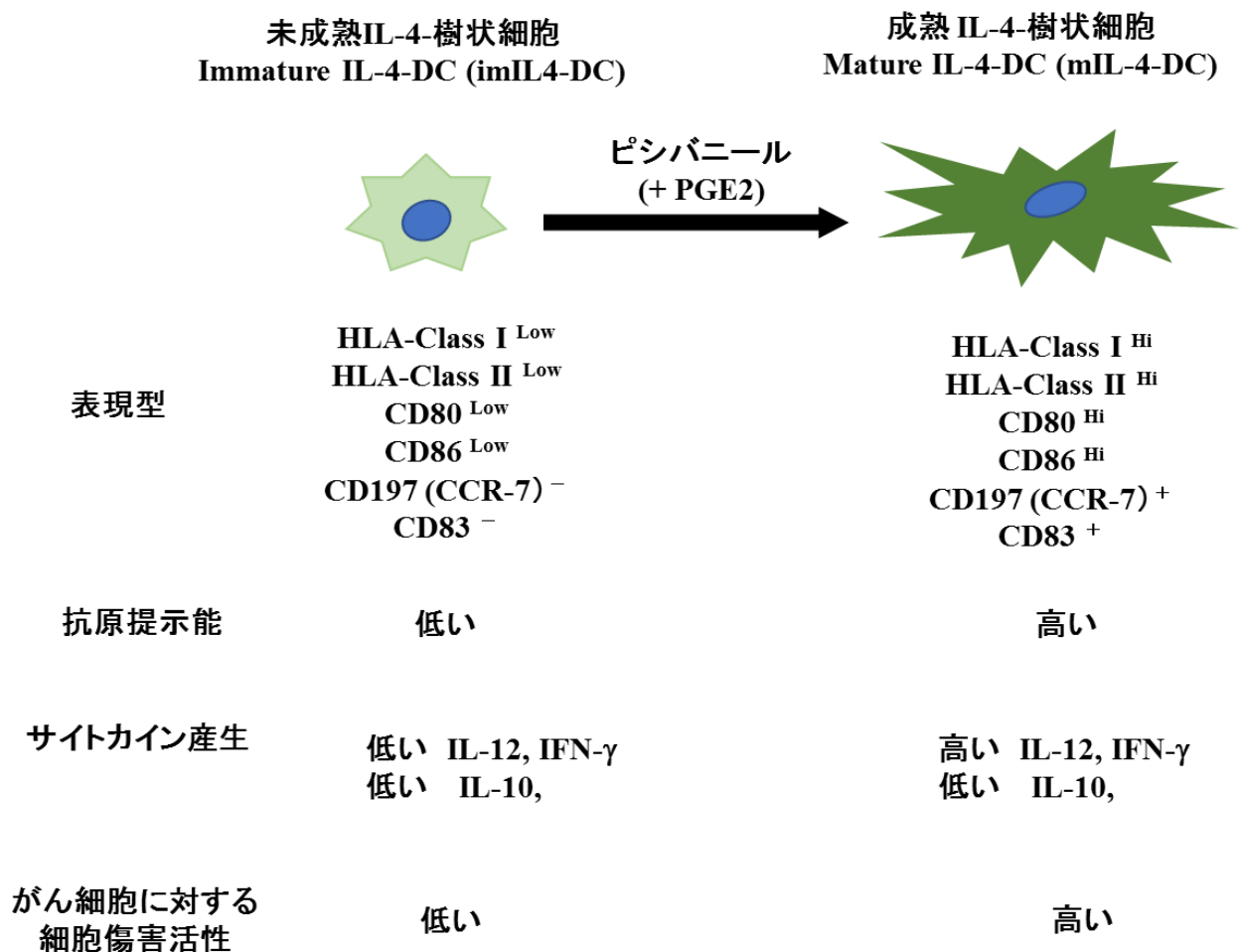


図 5. 未成熟な imIL-4-樹状細胞に与えるピシバニールの働き

GM-CSF および IL-4 を用いて、ヒトの単球より分化誘導される未成熟な imIL-4 樹状細胞に対し、ピシバニールは成熟を促す。抗原を提示する HLA-Class I、HLA-Class II や、細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進する共刺激分子 CD80、CD86 の発現を亢進させる。また、ピシバニールと PGE2 の併用の刺激は、リンパ節への移動を促進する CD197 (CCR-7) 発現を上昇させる。成熟した mIL-4-樹状細胞は抗原提示能が高く、細胞傷害性 T 細胞の誘導を促進する IL-12, IFN- $\gamma$  の産生が高い。近年、ピシバニールで成熟した IL-4-樹状細胞は、がん細胞に対する細胞傷害性を発揮することが報告されている。細胞傷害性にはがん細胞上の CD40 と IL-4-樹状細胞上の CD40 リガンドを介したシグナル伝達が重要と考えられているが、詳細な機構は明らかではない。

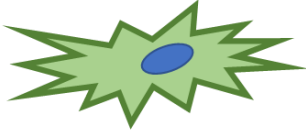

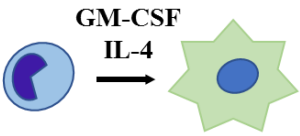

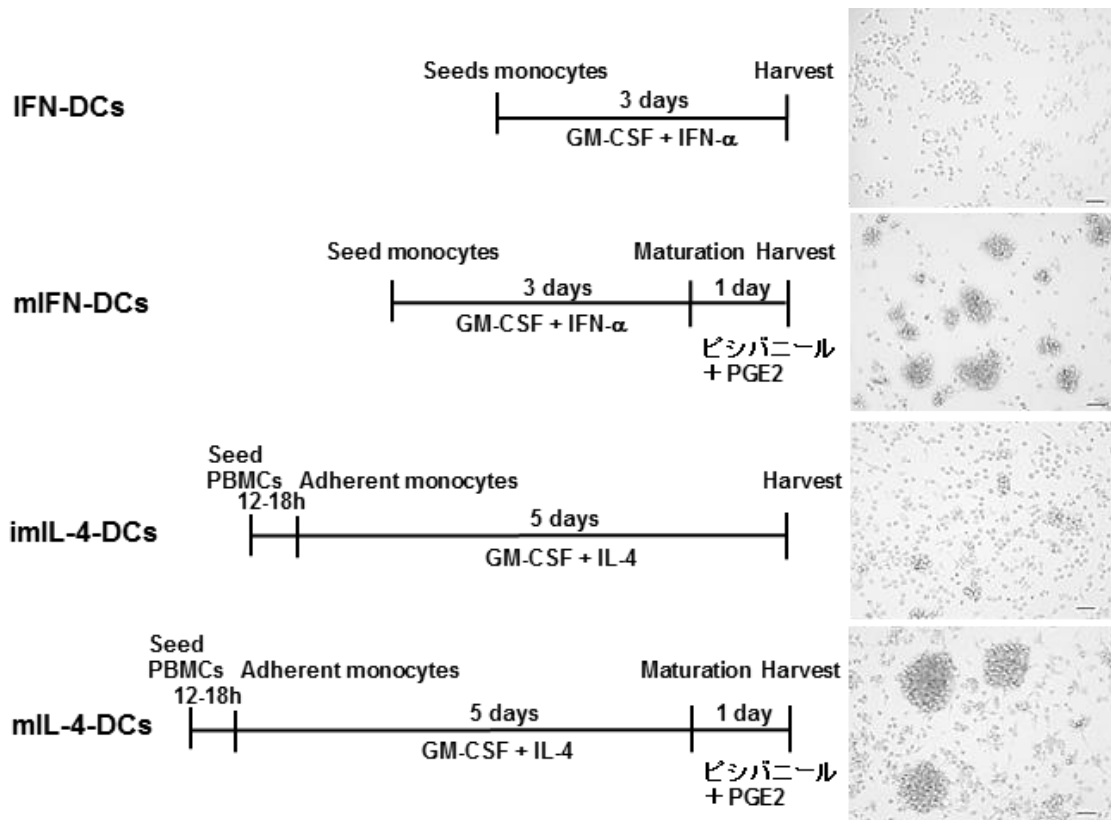
細胞の種類	刺激	標的がん細胞株	作用機序
ヒト骨髄系樹状細胞 	IFN- $\alpha$ /IFN- $\gamma$	Jurakt (急性T細胞白血病) OVCAR3 (卵巣がん) PC-3 (前立腺がん) WM793 (悪性黒色腫)	TRAIL
ヒト形質細胞様樹状細胞 	HIV	SupT1 (Tリンパ球性白血病)	TRAIL
	TBE(※) vaccine	K562 (慢性骨髄性白血病) Daudi (バーキットリンパ腫)	Not determined
ヒト単球由来樹状細胞 (未成熟なIL-4樹状細胞) 	LPS	MCF7 (乳がん) Hela (子宮頸がん)	ペルオキシ亜硝酸
	CD40 ligand	PCI-13 SSCHN (頭頸部がん)	TNF- $\alpha$ , TRAIL, Fas ligand
	ピシバニール	T2 (リンパ芽球融合株) K562 EJ (膀胱がん) 253J (膀胱がん)	細胞接触依存
ヒト単球 	GM-CSF/IFN- $\alpha$ GM-CSF/IL-15	K562	可溶性TRAIL Granzyme B

図 6. がん細胞に対する樹状細胞の細胞傷害性

体内に存在するヒト骨髄系樹状細胞と形質細胞様樹状細胞は、INF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ などのサイトカインや、HIV、TBE ワクチンに応答し、がん細胞を攻撃する細胞傷害性を獲得する。また、*in vitro* でヒトの単球より誘導される未成熟な imIL-4樹状細胞は、LPS、C40 リガンド、ピシバニールなどの刺激により、がん細胞を攻撃する細胞傷害性を獲得する。また、ヒトの単球を GM-CSF と IL-15 や IFN- $\alpha$ 存在下で 3 日間の培養を行って得られる IL-15-樹状細胞や、IFN-樹状細胞も、がん細胞を攻撃する細胞傷害性が報告されている。これらの樹状細胞による細胞傷害の機構として、TNF-family(TNF- $\alpha$ , TRAIL, Fas リガンド)や、ペルオキシ亜硝酸、GranzymeB などが確認されている。

(※) ダニ媒介性脳症炎: Tick-born Encephalitis (TBE)





## 図 7. 樹状細胞の作製

IFN-樹状細胞の作製では、抗 CD14 抗体の付加されたマイクロビーズを用いて単核球より精製した単球を原料として GM-CSF および IFN- $\alpha$  製剤である PEGINTRON を添加した AIM-V 培地を用いて 3 日間の培養を行った。続いて、ピシバニールと PGE2 を添加し、さらに 1 日の培養を行って mIFN-樹状細胞を作製した。一方で、古典的な imIL-4-樹状細胞、mIL-4-樹状細胞の作製では接着培養法を用いた。単核球を培養皿に播種し、12-18時間後にリンパ球を含む非接着細胞を除去し、接着した単球を用いて GM-CSF と IL-4 の存在下で 5 日間の培養を行って、未成熟な imIL-4-樹状細胞に分化誘導を行った。続いて、ピシバニールと PGE2 を併用し、さらに 1 日の培養を行って mIL-4-樹状細胞を作製した。位相差顕微鏡で回収直前の細胞形態の観察を行った(右パネル)。黒のスケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

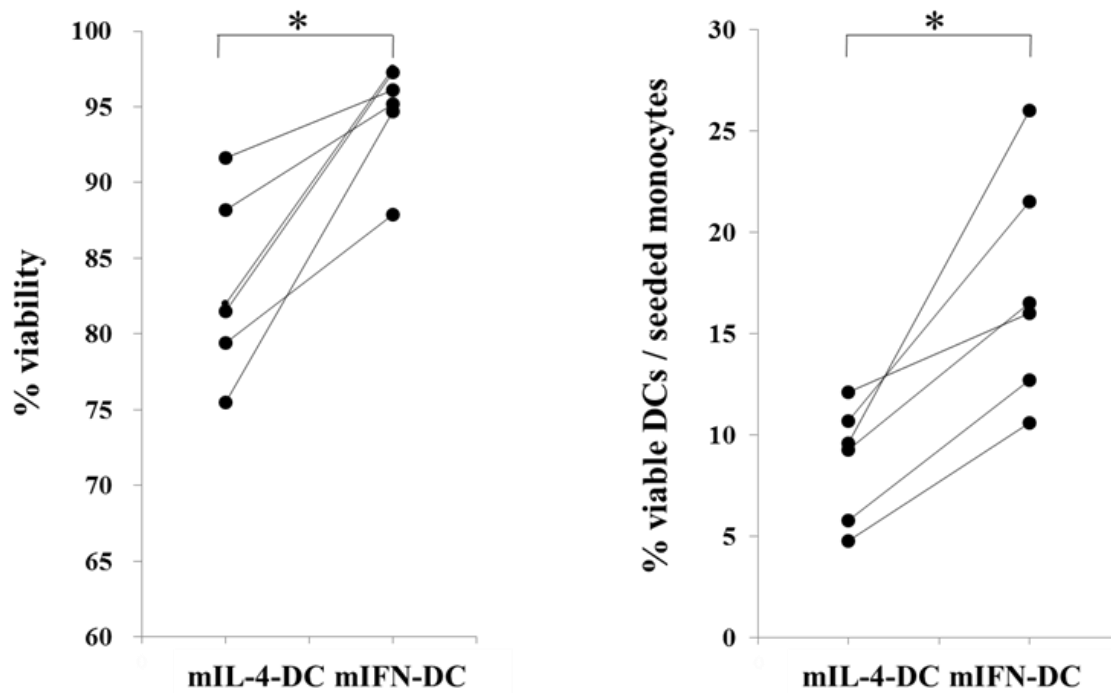


図 8. mIL-4-樹状細胞と mIFN-樹状細胞の生細胞率と収率の比較

imIL-4-樹状細胞または IFN-樹状細胞にそれぞれピシバニールを与えて作製した mIL-4-樹状細胞と mIFN-樹状細胞の生細胞率、収率の比較を行った(N = 6)。培養開始時の播種単球数に対して、最終的に得られた生細胞の樹状細胞数から収率を算出した。\*  $p < 0.05$

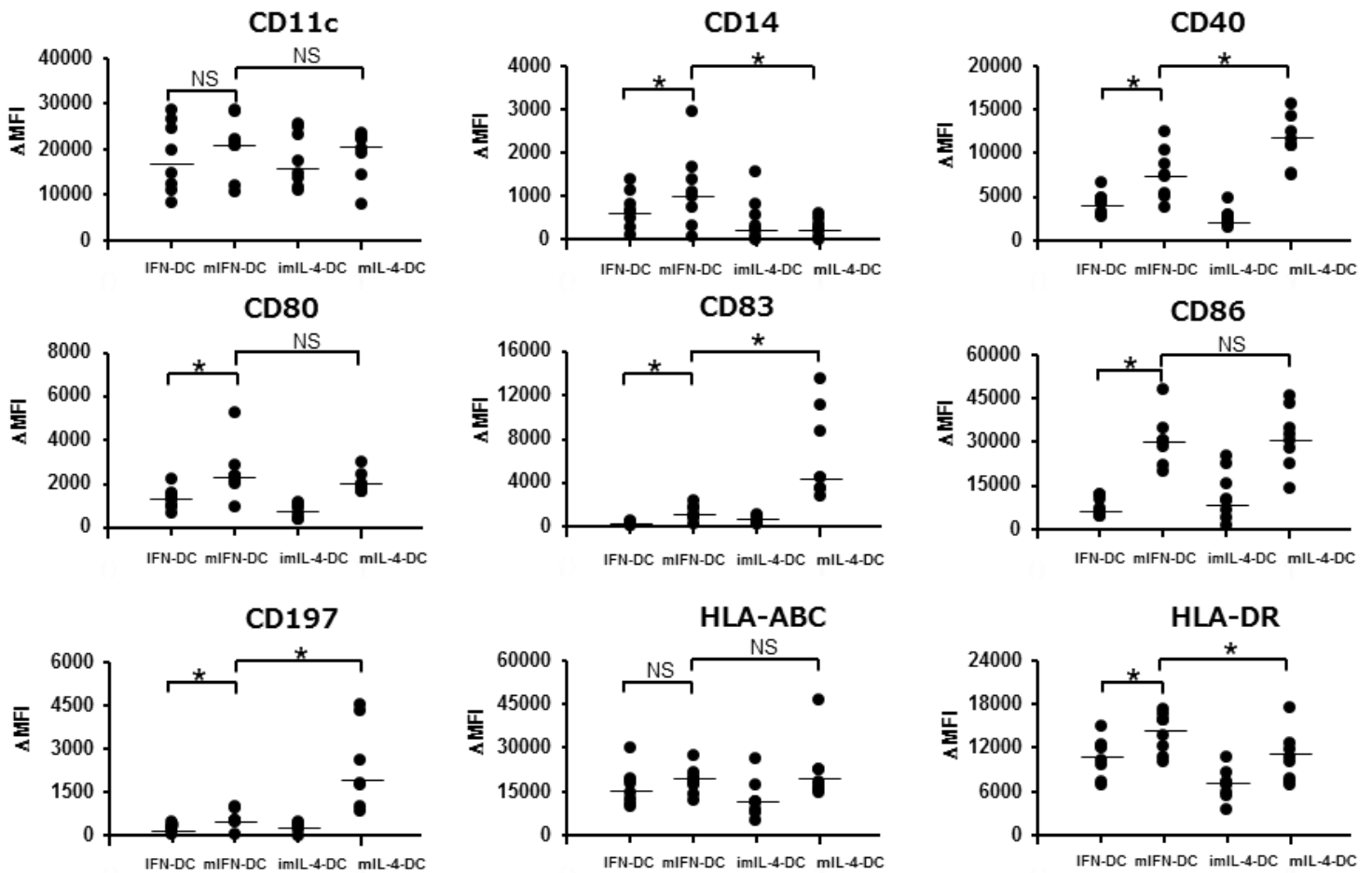


図 9. 樹状細胞の表現型の比較

作製した樹状細胞を用いて、樹状細胞の指標となる抗体で染色し、フローサイトメーターによる解析から得られた蛍光強度を示した(N=8)。ΔMFIは各サンプルからアイソタイプコントロールを差し引いた蛍光強度の値を示す。

\*  $p < 0.05$ ; NS, not significant を示す。

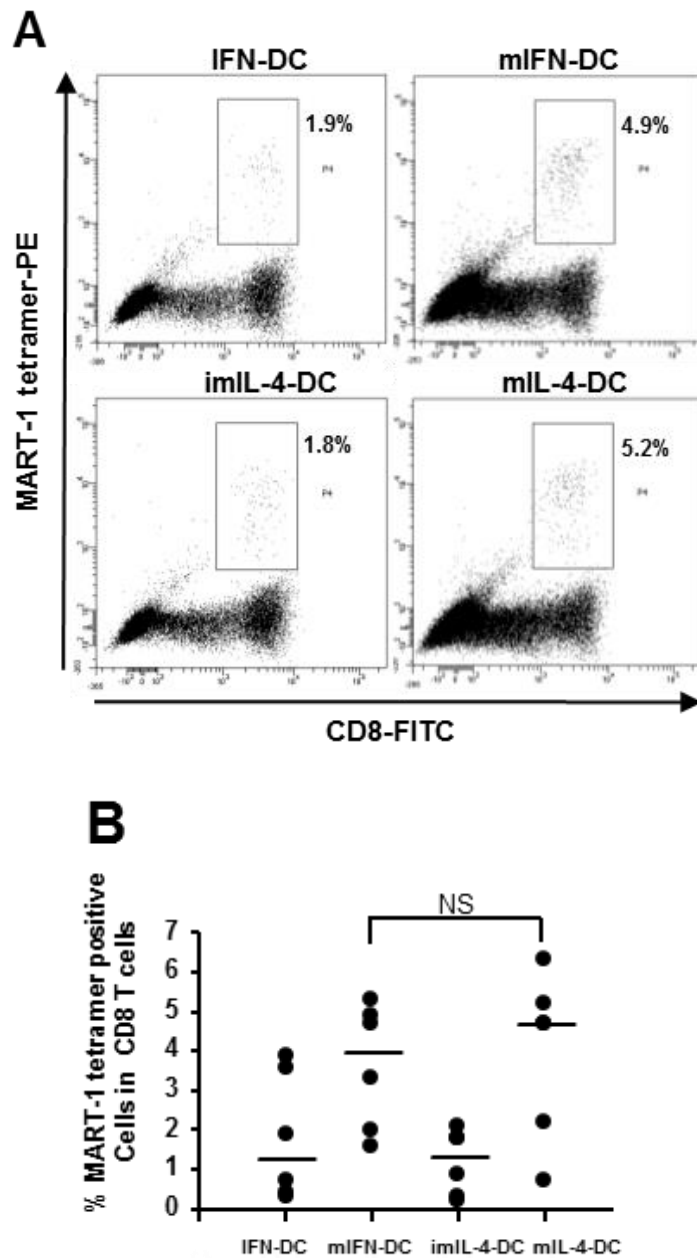


図 10. 樹状細胞の抗原提示能の比較

(A) MART-1 ペプチドを取り込ませた樹状細胞を用いて *in vitro* 混合培養試験を行った。CD3、CD8、MART-1 tetramer-PE を用いて細胞を染色し、フローサイトメーターにより MART-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞を検出した。N=6 の代表データを示す。パネル内の数値は CD8 T 細胞中の MART-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞の割合を示す。(B) それぞれの樹状細胞により誘導された MART-1 特異的な細胞傷害性 T 細胞のまとめを示した(N = 6)。

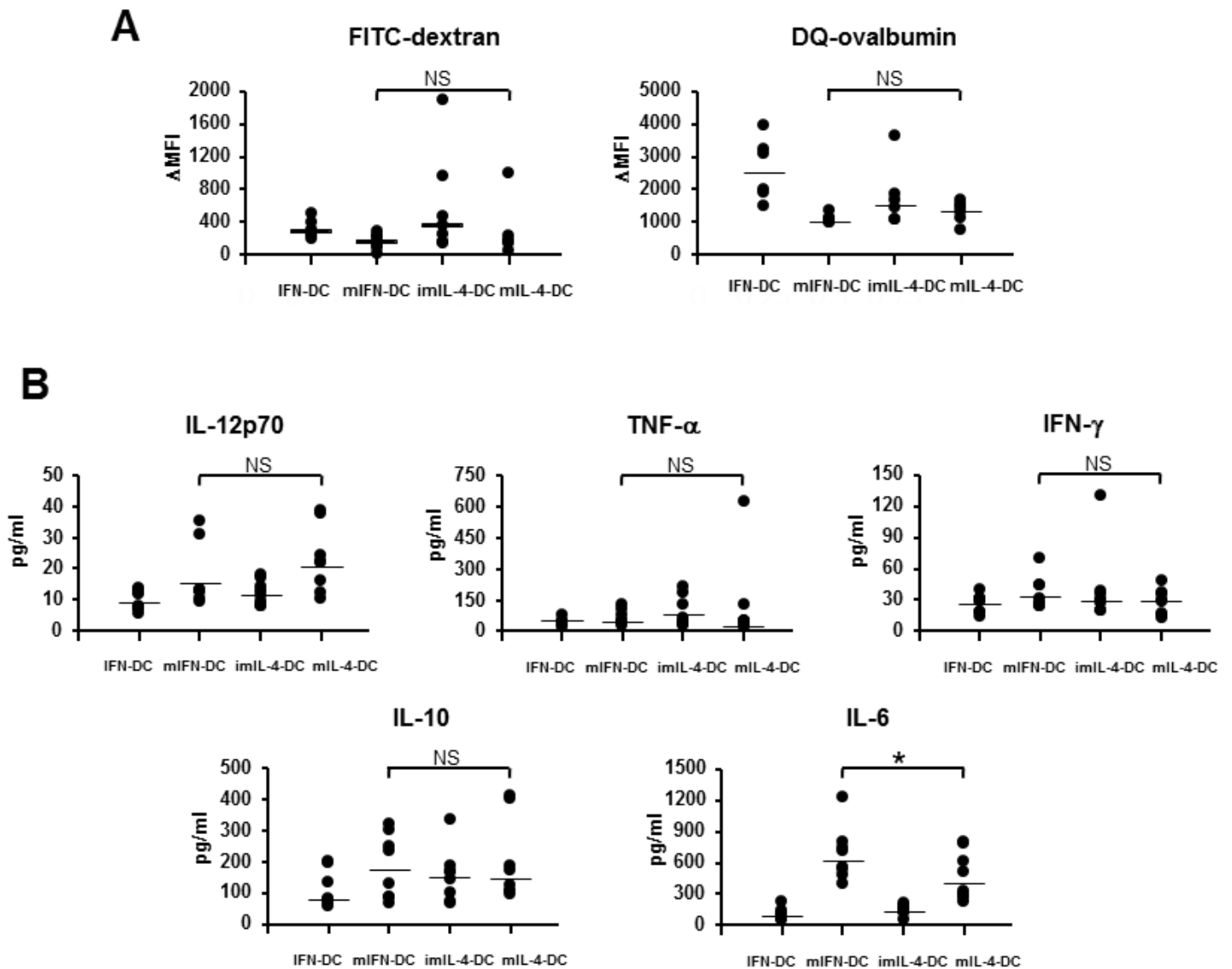


図 11. 樹状細胞の抗原貪食能、抗原分解能、産生サイトカインの比較

(A) 抗原貪食能を調べるために、樹状細胞と FITC-dextran を 37°C でインキュベーションし(図左、N=6)、抗原分解能を明らかにするために、樹状細胞を DQ-ovalbumin と混合し 37°C で反応を行って、フローサイトメーターを用いて解析を行った(図右、N=6)。4°C で反応を行ったネガティブコントロールの値をサンプルから差し引いた $\Delta$ MFI の値をプロットした。(B) 作製した樹状細胞を AIM-V 培地に懸濁し、24 時間の培養を行った上清をサンプルとして、ELISA kit を用いて表記のサイトカインの産生を調べた(N=8)。

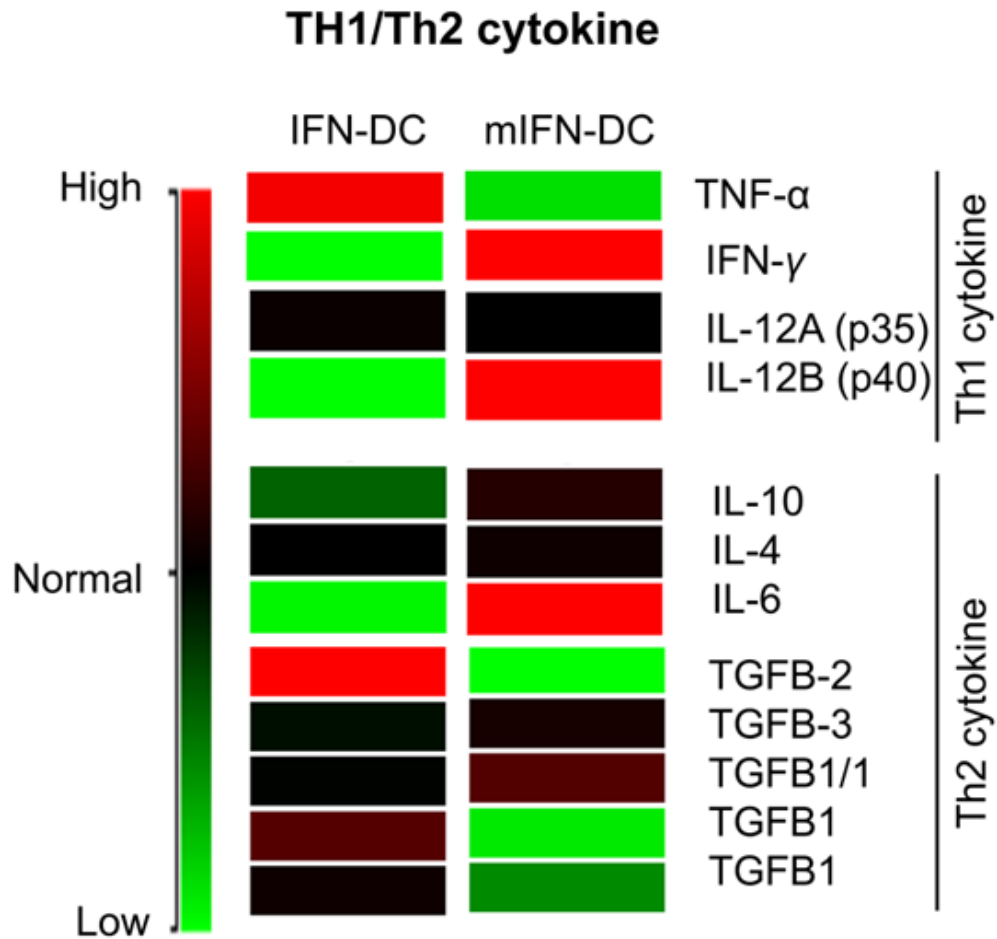


図 12. IFN-樹状細胞と mIFN-樹状細胞の Th1/Th2 サイトカインの遺伝子発現の比較

IFN-樹状細胞と mIFN-樹状細胞から RNA を抽出し、Human Gene 2.0 ST array GenChip を用いた DNA マイクロアレイ解析を行った。GeneSpring version 13 を用いて Th1/TH2 サイトカインの遺伝子発現パターンを分析し、HeatMap 上に表示した(N=1)。

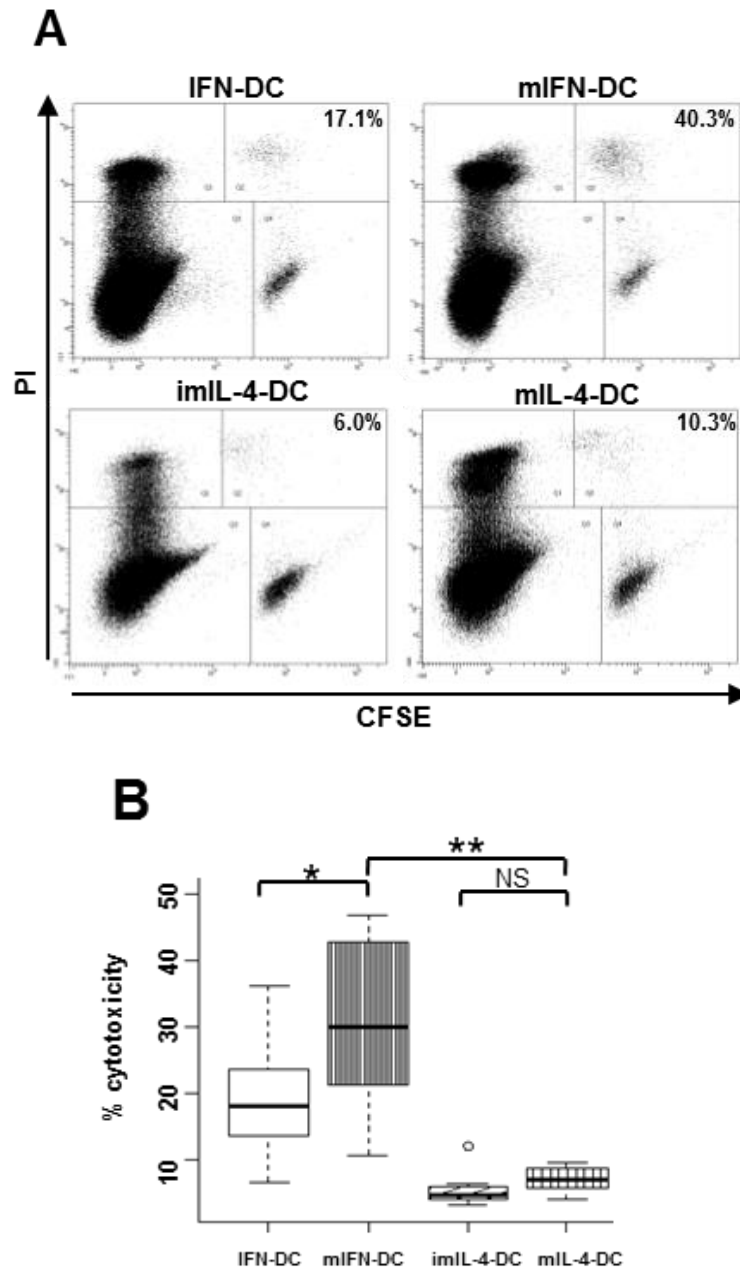


図 13. 樹状細胞の細胞傷害性の比較

(A)CFSE で標識した K562 細胞株と未染色の樹状細胞を 1:50 の割合で混合し、37°C5%CO<sub>2</sub> の条件下で 18 時間の反応を行った。AIM 培地で洗浄後、PI 染色を行って、フローサイトメーターで K562 の死細胞の測定を行った。FSC、SSC の値からシングルセルをゲーティングし、CFSE と PI で展開した代表例を示した。パネル内の数値は K562 の死細胞の割合を示す。(B)それぞれの樹状細胞の K562 に対する細胞傷害性のボックスプロットを示す(N = 11)。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  を示す。

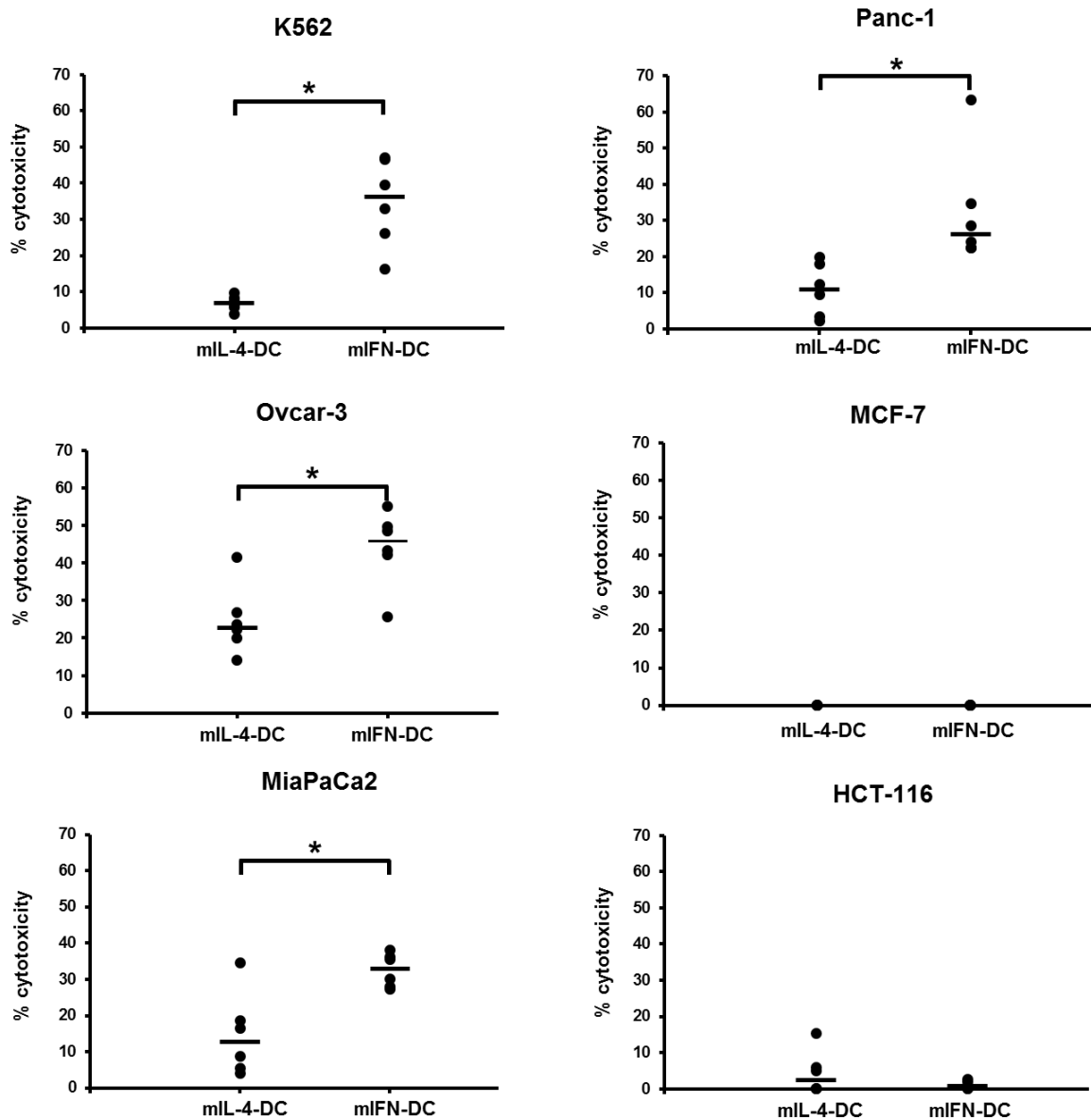


図 14. がん細胞株に対する mIL-4-樹状細胞と mIFN-樹状細胞による細胞傷害性の比較

mIL-4-樹状細胞または mIFN-樹状細胞と CFSE で標識を行ったそれぞれのがん細胞株を 50:1 の割合で混合し、18 時間の反応後にフローサイトメーターを用いて細胞傷害性の検出を行った(N = 6)。



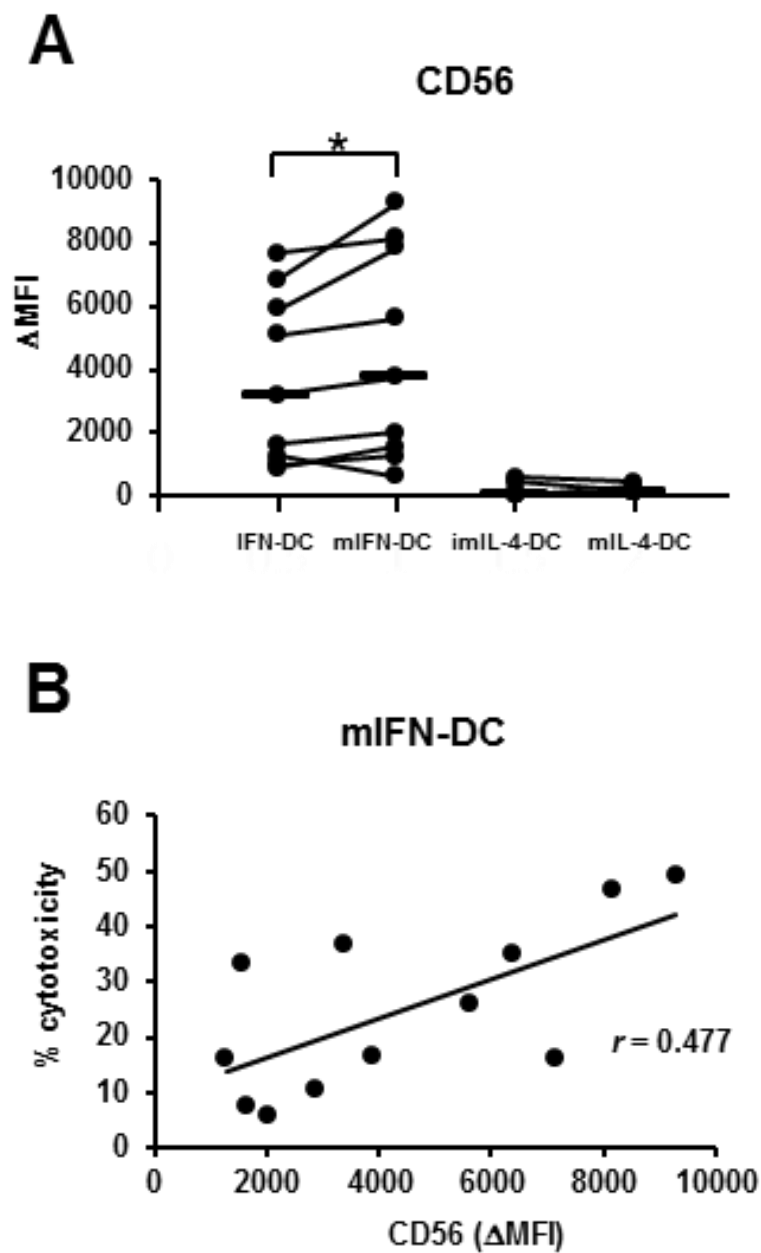


図 15. mIFN-樹状細胞は CD56 発現と相関する細胞傷害性を示す

(A) フローサイトメーターを用いて、樹状細胞の CD56 発現の蛍光強度を測定した(N = 12)。(B) mIFN-樹状細胞の CD56 発現と細胞傷害性の相関を示した(N = 12)。

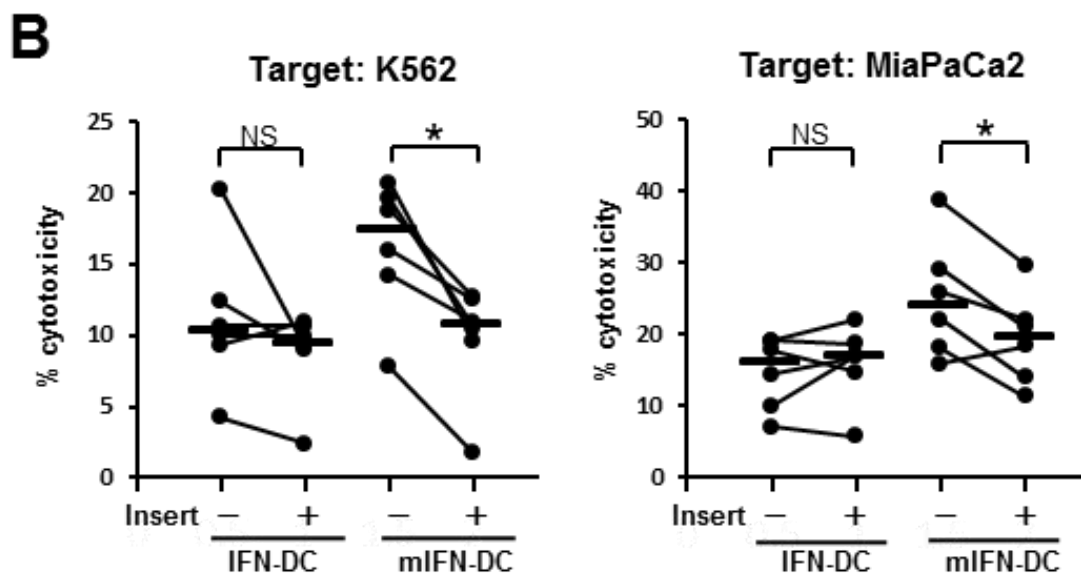
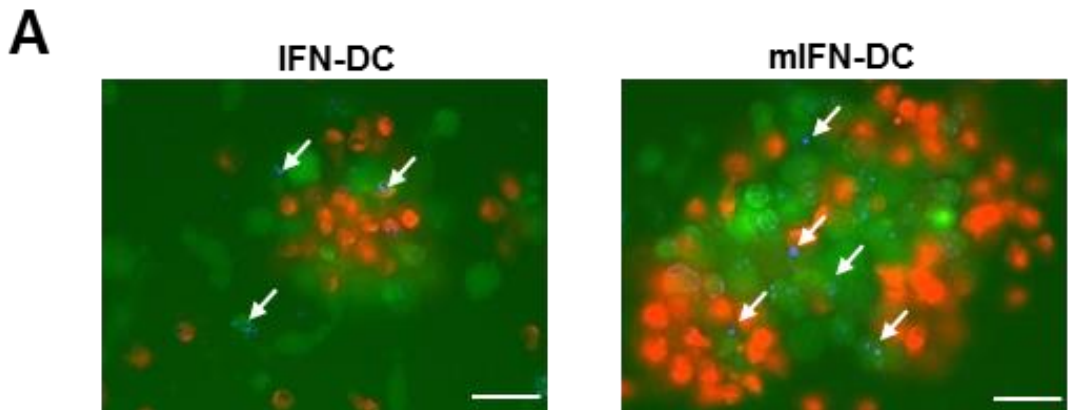


図 16. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性には可溶性因子と細胞接触が関与する

(A) CFSE (緑)で染色を行った K562 細胞株と、PKH 26 (赤)で染色した樹状細胞を 1:1 の割合で混合し、18 時間の反応後に DAPI で染色を行った。白い矢印は死細胞の K562 細胞株を示す。白のスケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。(B) IFN-樹状細胞または mIFN-樹状細胞を用いて、K562 細胞株または MiaPaCa2 細胞株を標的とした細胞傷害性試験を行った。樹状細胞とがん細胞株を 50:1 の割合で混合し、細胞接触を阻害するインサートメンブレンの有無で 18 時間の反応を行って、細胞傷害性の検出を行った(N = 6)。

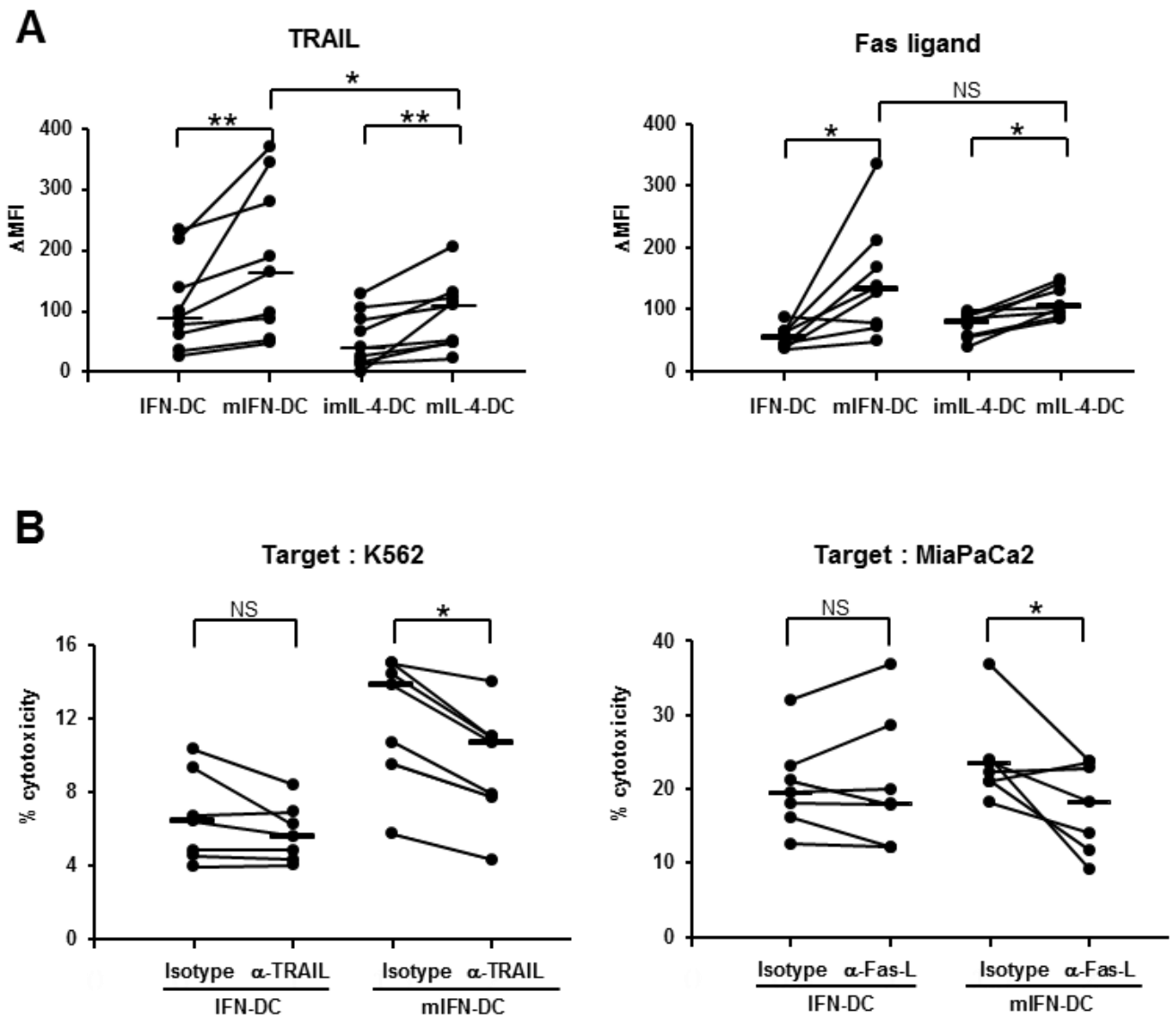


図 17. mIFN-樹状細胞の細胞傷害性には TRAIL と Fas リガンド経路が関与する (A) 樹状細胞の細胞表面の TRAIL または Fas リガンドの発現強度のまとめを示した (TRAIL, N = 9; Fas リガンド, N = 8)。 (B) 抗 TRAIL または抗 Fas リガンドのブロッキング抗体と樹状細胞を 2 時間インキュベーションし、K562 または MiaPaCa2 と 50:1 の割合で混合し 18 時間の反応後、細胞傷害性の検出を行った (N = 7)。

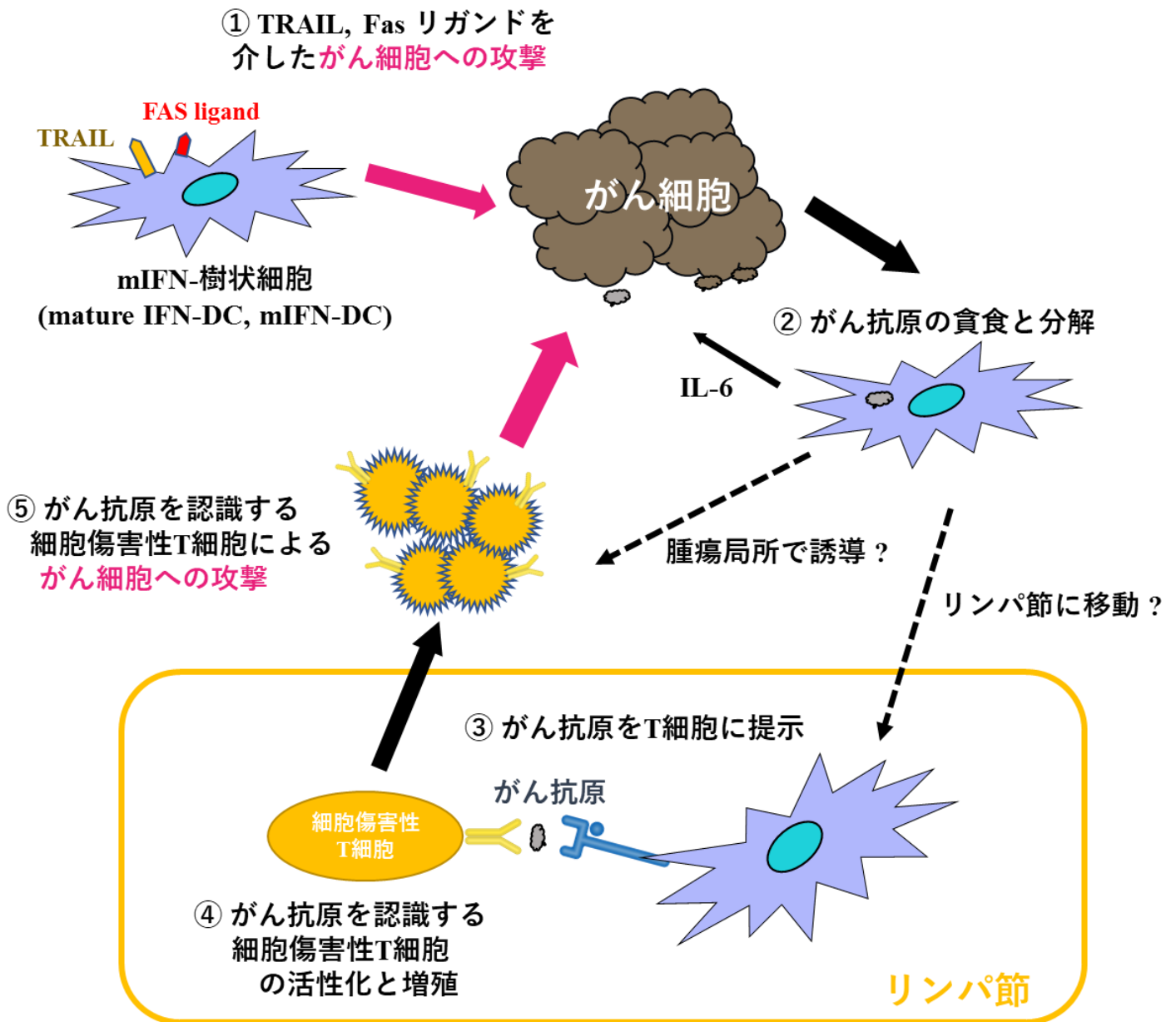


図 18. mIFN-樹状細胞の抗腫瘍作用(モデル図)

①細胞表面の TRAIL および Fas リガンドを介して、mIFN-樹状細胞はがん細胞を攻撃する。②mIFN-樹状細胞の攻撃により、がん細胞から暴露されたがん抗原は取り込まれて分解される。③がん抗原を取り込んだ mIFN-樹状細胞はリンパ節に移動または腫瘍局所に局在し、④がん抗原を細胞傷害性 T 細胞に提示し、細胞の増殖と細胞傷害性の活性化を促す。⑤がん抗原を覚えた細胞傷害性 T 細胞は、がん細胞への攻撃を行う。

表 1. ピシバニールを用いた樹状細胞の比較

1. 培養方法	非接着培養法	接着培養法
2. 培養期間	4 日	7 日
3. 表現型	CD11c+, CD14+, CD40+, CD56+, CD80+, CD83+, CD86+, CD197+, HLA-ABC+, HLA-DR++	CD11c+, CD14-, CD40++, CD56-, CD80+, CD83++, CD86+, CD197++, HLA-ABC+, HLA-DR+
4. 生細胞率	中央値: 95.7%	中央値: 81.8%
5. 収率	中央値: 16.3%	中央値: 9.5%
6. 抗原貪食・抗原分解	同等の成熟型の樹状細胞の機能を有する。	
7. 抗原提示	同等の成熟型の樹状細胞の機能を有する。	
8. サイトカイン産生	IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 産生は同等 (mIFN-樹状細胞の IL-6 産生は有意に高い)	
9. 細胞傷害性	中央値: 30.0%	中央値: 6.9%
10. CD56 と細胞傷害性	弱い相関	Not determined
11. 細胞傷害の機構	TRAIL, FAS リガンド 可溶性因子	Not determined

## 6. 謝辞

論文博士の主査をお引き受け頂き、研究の礎をご教授頂いた腫瘍細胞生物学研究室の加藤順也先生に御礼申し上げます。叱咤激励を頂いた加藤規子先生に御礼を申し上げます。本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導を頂きました金沢医科大学、再生医療学、下平滋隆先生に謹んで感謝申し上げます。終始研究のアドバイスを頂きました信州大学医学部附属病院、先端細胞治療センター、柳沢龍先生に感謝申し上げます。研究の機会を頂きました横川潔先生に深謝致します。信州大学医学部附属病院、先端細胞治療センターの先生方、看護師、臨床検査技師、事務の皆様、輸血部のスタッフの皆様に感謝致します。発表の機会を頂きました川市正史先生、別所康全先生、審査を頂きました先生方に御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

Akagawa, K. S., Takasuka, N., Nozaki, Y., Komuro, I., Azuma, M., Ueda, M., Naito, M., & Takahashi, K. (1996). Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood* 88, 4029–4039.

Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., van Tendeloo, V. F., & Berneman, Z. N. (2014). Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology* 15, e257–e267.

Anguille, S., Lion, E., Tel, J., de Vries, I. J. M., Couderé, K., Fromm, P. D., van Tendeloo, V. F., Smits, E. L., & Berneman, Z. N. (2012). Interleukin-15-induced CD56(+) myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential. *PloS One* 7, e51851.

Askenasy, N., Yolcu, E. S., Yaniv, I., & Shirwan, H. (2005). Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* 105, 1396–1404.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.

Butterfield, L. H., Palucka, A. K., Britten, C. M., Dhodapkar, M. V, Håkansson, L., Janetzki, S., Kawakami, Y., Kleen, T. O., Lee, P. P., Maccalli, C., Maecker, H. T., Maino, V. C., Maio, M., Malyquine, A., Masucci, G., Pawelec, G., Potter, D. M., Rivoltini, L., Salazar, L. G., Schendel, D. J., Slingluff, C. L. Jr., Song, W., Stroncek, D. F., Tahara, H., Thurin, M., Trinchieri, G., van Der Burg, S. H., Whiteside, J. M., Marincola, F., Khleif, S., Fox, B. A., & Disis, M. L. (2011). Recommendations from the iSBTc-SITC/FDA/NCI Workshop on Immunotherapy Biomarkers. *Clinical Cancer Research* 17, 3064–3076.

Chan, C. W., Crafton, E., Fan, H.-N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T. W., Stins, M. F., Lanier, L. L., Pardoll, D. M., & Housseau, F. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nature Medicine* 12, 207–213.

Chapoval, A. I., Tamada, K., & Chen, L. (2000). In vitro growth inhibition of a broad

spectrum of tumour cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 95, 2346-2351.

Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research* 15, 5323–5337.

Fanger, N. A., Maliszewski, C. R., Schooley, K., & Griffith, T. S. (1999). Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *The Journal of Experimental Medicine* 190, 1155–1164.

Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., & Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine* 5, 405–411.

Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J., & Melief, C. J. M. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine* 10, 475–480.

Fraszczak, J., Trad, M., Janikashvili, N., Cathelin, D., Lakomy, D., Granci, V., Morizot, A., Audia, S., Micheau, O., Laqrost, L., Katsanis, E., Solary, E., Larmonier, N., & Bonnotte, B. (2010). Peroxynitrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells. *Journal of Immunology* 184, 1876–1884.

Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., & Reizis, B. (2013). The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 13, 566–577.

Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., & Kubin, M. Z. (1998). Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Journal of Immunology* 161, 2833–2840.

Griffith, T. S., Wiley, S. R., Kubin, M. Z., Sedger, L. M., Maliszewski, C. R., & Fanger, N. A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *The Journal of Experimental Medicine* 189, 1343–1354.



Georgopoulos, N. T., Steele, L. P., Thomson, M. J., Selby, P. J., Southgate, J., & Trejdosiewicz, L. K. (2006). A novel mechanism of CD40-induced apoptosis of carcinoma cells involving TRAF3 and JNK/AP-1 activation. *Cell Death and Differentiation* 13, 1789–1801.

Hamerman, J. A., Ogasawara, K., & Lanier, L. L. (2005). NK cells in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 17, 29–35.

Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M., & Herbeuval, J. P. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- $\alpha$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17453–17458.

Hill, K. S., Errington, F., Steele, L. P., Merrick, A., Morgan, R., Selby, P. J., Georgopoulos, N. T., O'Donnell, D. M., & Melcher, A. A. (2008). OK432-activated human dendritic cells kill tumor cells via CD40/CD40 ligand interactions. *Journal of Immunology* 181, 3108–3115.

Hovden, A. O., Karlsen, M., Jonsson, R., Aarstad, H. J., & Appel, S. (2011). Maturation of monocyte derived dendritic cells with OK432 boosts IL-12p70 secretion and conveys strong T-cell responses. *BMC Immunology* 12, 2.

Huang, J., Tatsumi, T., Pizzoferrato, E., Vujanovic, N., & Storkus, W. J. (2005). Nitric oxide sensitizes tumor cells to dendritic cell-mediated apoptosis, uptake, and cross-presentation. *Cancer Research* 65, 8461–8470.

Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T., & Nishimura, T. (2004). The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Science* 95, 697–703.

Iwase, M., Watanabe, H., Kondo, G., Ohashi, M., & Nagumo, M. (2003). Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to FAS-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. *International Journal of Cancer* 106, 619–625.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M., & Inaba, K. (2002). The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset selectively

endocytoses dying cells in culture and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 195, 1289–1302.

Kalb, M. L., Glaser, A., Stary, G., Koszik, F., & Stingl, G. (2012). TRAIL(+) human plasmacytoid dendritic cells kill tumor cells in vitro: mechanisms of imiquimod- and IFN- $\alpha$ -mediated antitumor reactivity. *Journal of Immunology* 188, 1583–1591.

Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* 3, 984–993.

Kikkawa, F., Kawai, M., Oguchi, H., Kojima, M., Ishikawa, H., Iwata, M., Maeda, O., Tomoda, Y., Arii, Y., et al. (1993). Randomised study of immunotherapy with OK-432 in uterine cervical carcinoma. *European Journal of Cancer* 29A, 1542–1546.

Kim, S. K., Yun, C.-H., & Han, S. H. (2013). Enhanced anti-cancer activity of human dendritic cells sensitized with gamma-irradiation-induced apoptotic colon cancer cells. *Cancer Letters* 335, 278–288.

Kitahara, S., Ikeda, M., Inouye, T., Matsunaga, T., Yamaguchi, K., Takayama, E., Healy, G. B., & Tsukuda, M. (1996). Inhibition of head and neck metastatic and/or recurrent cancer by local administration of multi-cytokine inducer OK-432. *The Journal of Laryngology and Otology* 110, 449–453.

Koido, S., Homma, S., Okamoto, M., Takakura, K., Mori, M., Yoshizaki, S., Tsukinaga, S., Odahara, S., Koyama, S., Imazu, H., Uchiyama, K., Kajihara, M., Arakawa, H., Misawa, T., Toyama, Y., Yanagisawa, S., Ikegami, M., Kan, S., Hayashi, K., Komita, H., Kamata, Y., Ito, M., Ishida, T., Yusa, S., Shimodaira, S., Gong, J., Sugiyama, H., Ohkusa, T., & Tajiri, H. (2014). Treatment with chemotherapy and dendritic cells pulsed with multiple Wilms' tumor 1 (WT1)-specific MHC class I/II-restricted epitopes for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research* 20, 4228–4239.

Korthals, M., Safaian, N., Kronenwett, R., Maihöfer, D., Schott, M., Papewalis, C., Diaz Blanco, E., Winter, M., Czibere, A., Haas, R., Kobbe, G., & Fenk, R. (2007). Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- $\alpha$  acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *Journal of Translational Medicine* 5, 46.

Kuwabara, K., Nishishita, T., Morishita, M., Oyaizu, N., Yamashita, S., Kanematsu, T., Obara, T., Mimura, Y., Inoue, Y., Kaminishi, M., Kaga, K., Amino, N., Kitaoka, M., Ito, K., Miyauchi, A., Noguchi, S., Uchimarui, K., Akagawa, E., Watanabe, N., Takahashi, T. A., Sato, K., Inazawa, T., Nakaoka, T., & Yamashita, N. (2007). Results of a Phase I Clinical Study Using Dendritic Cell Vaccinations for Thyroid Cancer. *Thyroid* 17, 53–58.

Lacronique, V., Mignon, A., Fabre, M., Viollet, B., Rouquet, N., Molina, T., Porteu, A., Henrion, A., Bouscary, D., Varlet, P., Joulin, V., & Kahn, A. (1996). Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Medicine* 2, 80–86.

Lakomy, D., Janikashvili, N., Fraszczak, J., Trad, M., Audia, S., Samson, M., Ciudad, M., Vinit, J., Vergely, C., Caillot, D., Foucher, P., Laqrost, L., Chouaib, S., Katsanis, E., Larmonier, N., & Bonnotte, B. (2011). Cytotoxic Dendritic Cells Generated from Cancer Patients. *The Journal of Immunology* 187, 2775–2782.

Larmonier, N., Fraszczak, J., Lakomy, D., Bonnotte, B., & Katsanis, E. (2010). Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunology Immunotherapy* 59, 1–11.

Liu, S., Yu, Y., Zhang, M., Wang, W., & Cao, X. (2001). The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *Journal of Immunology* 166, 5407–5415.

Lu, G., Janjic, B. M., Janjic, J., Whiteside, T. L., Storkus, W. J., & Vujanovic, N. L. (2002). Innate Direct Anticancer Effector Function of Human Immature Dendritic Cells. II. Role of TNF, Lymphotoxin- $\alpha$ 1 $\beta$ 2, Fas Ligand, and TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand. *The Journal of Immunology* 168, 1831–1839.

Maehara, Y., Okuyama, T., Kakeji, Y., Baba, H., Furusawa, M., & Sugimachi, K. (1994). Postoperative immunochemotherapy including streptococcal lysate OK-432 is effective for patients with gastric cancer and serosal invasion. *American Journal of Surgery* 168, 36–40.

Mohty, M., Vialle-Castellano, A., Nunes, J. A., Isnardon, D., Olive, D., & Gaugler, B. (2003). IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing

dendritic cells with potent functional activities. *Journal of Immunology* 171, 3385–3393.

Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology* 2, 957–964.

Nagayama, H., Sato, K., Morishita, M., Uchamaru, K., Oyaizu, N., Inazawa, T., Yamasaki, T., Enomoto, M., Nakaoka, T., Nakamura, T., Maekawa, T., Yamamoto, A., Shimada, S., Saida, T., Kawakami, Y., Asano, S., Tani, K., Takahashi, T. A., & Yamashita, N. (2003). 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 Research* 13, 521–530.

Nakahara, S., Tsunoda, T., Baba, T., Asabe, S., & Tahara, H. (2003). Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Research* 63, 4112–4118.

Nicolas, A., Cathelin, D., Larmonier, N., Fraszczak, J., Puig, P. E., Bouchot, A., Bateman, A., Solary, E., & Bonnotte, B. (2007). Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 179, 812–818.

Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Ahmed, S. U., Akashi, S., Miyake, K., Takeuchi, O., Akira, S., Moriya, Y., Matsubara, S., Ryoma, Y., Saito, M., & Sato, M. (2003). Involvement of Toll-like receptor 4 signaling in interferon- $\gamma$  production and antitumor effect by streptococcal agent OK-432. *Journal of the National Cancer Institute* 95, 316–326.

Oshikawa, T., Okamoto, M., Tano, T., Sasai, A., Kan, S., Moriya, Y., Ryoma, Y., Saito, M., Akira, S., & Sato, M. (2006). Antitumor effect of OK-432-derived DNA: one of the active constituents of OK-432, a streptococcal immunotherapeutic agent. *Journal of Immunotherapy* 29, 143–150.

Ott, P. A., Hodi, F. S., & Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. *Clinical Cancer Research* 19, 5300–5309.

Padovan, E., Spagnoli, G. C., Ferrantini, M., & Heberer, M. (2002). IFN-alpha2a induces

IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8<sup>+</sup> effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology* 71, 669–676.

Papewalis, C., Jacobs, B., Wuttke, M., Ullrich, E., Baehring, T., Fenk, R., Willenberg, H. S., Schinner, S., Cohnen, M., Seissler, J., Zacharowski, K., Scherbaum, W. A., & Schott, M. (2008). IFN- $\alpha$  skews monocytes into CD56<sup>+</sup>-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 180, 1462–1470.

Pasare, C., & Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299, 1033–1036.

Raftery, M. J., Schwab, M., Eibert, S. M., Samstag, Y., Walczak, H., & Schönrich, G. (2001). Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* 15, 997–1009.

Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martínez, D., Hernanz-Falcón, P., Rosewell, I., & Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899–903.

Saito, S., Yanagisawa, R., Yoshikawa, K., Higuchi, Y., Koya, T., Yoshizawa, K., Tanaka, M., Sakashita, K., Kobayashi, T., Kurata, T., Hirabayashi, K., Nakazawa, Y., Shiohara, M., Yonemitsu, Y., Okamoto, M., Sugiyama, H., Koike, K., & Shimodaira, S. (2015). Safety and tolerability of allogeneic dendritic cell vaccination with induction of Wilms tumor 1-specific T cells in a pediatric donor and pediatric patient with relapsed leukemia: a case report and review of the literature. *Cytotherapy* 17, 330–335.

Sakai, K., Shimodaira, S., Maejima, S., Udagawa, N., Sano, K., Higuchi, Y., Koya, T., Ochiai, T., Koide, M., Uehara, S., Nakamura, M., Sugiyama, H., Yonemitsu, Y., Okamoto, M., & Hongo, K. (2015). Dendritic cell-based immunotherapy targeting Wilms' tumor 1 in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Neurosurgery* 123, 989–997.

Salvucci, O., Kolb, J. P., Dugas, B., Dugas, N., & Chouaib, S. (1998). The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. *Blood* 92, 2093–2102.

Sato, M., Yoshida, H., Yanagawa, T., Yura, Y., Urata, M., Atsumi, M., Hayashi, Y., & Takegawa, Y. (1984). Effects of intradermal administration of streptococcal preparation OK-432 on interferon and natural killer cell activities in patients with oral cancer. *International Journal of Oral Surgery* 13, 7–15.

Sato, M., Takayama, T., Tanaka, H., Konishi, J., Suzuki, T., Kaiga, T., & Tahara, H. (2003). Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). *Cancer Science* 94, 1091–1098.

Strydom, G., Bangert, C., Tauber, M., Strohal, R., Kopp, T., & Stingl, G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 1441–1451.

Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine* 137, 1142–1162.

Steinman, R. M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology* 30, 1–22.

Taieb, J., Chaput, N., Ménard, C., Apetoh, L., Ullrich, E., Bonmort, M., Péquignot, M., Casares, N., Terme, M., Flament, C., Opolon, P., Lecluse, Y., Métivier, D., Tomasello, E., Vivier, E., Ghiringhelli, F., Martin, F., Klatzmann, D., Poynard, T., Tursz, T., Raposo, G., Yagita, H., Ryffel, B., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nature Medicine* 12, 214–219.

Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016295.

Tel, J., Smits, E. L., Anguille, S., Joshi, R. N., Figdor, C. G., & de Vries, I. J. M. (2012). Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 120, 3936–3944.

Tel, J., Schreiber, G., Sittig, S. P., Mathan, T. S. M., Buschow, S. I., Cruz, L. J., Lambeck, A. J., Figdor, C. G., & de Vries, I. J. M. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than

myeloid dendritic cell subsets. *Blood* 121, 459–467.

Tel, J., Anguille, S., Waterborg, C. E. J., Smits, E. L., Figdor, C. G., & de Vries, I. J. M. (2014). Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends in Immunology* 35, 38–46.

Toda, K., Shiraishi, T., Hirotsu, T., Fukuyama, K., Mineta, T., Kawaguchi, S., & Tabuchi, K. (1996). The cytotoxic activity of OK-432-activated mononuclear cells against human glioma cells is partly mediated through the Fas ligand/Fas system. *Japanese Journal of Cancer Research* 87, 972–976.

Torisu, M., Katano, M., Kimura, Y., Itoh, H., Takesue, M., Tanaka, J., & Machida, K. (1983). New approach to management of malignant ascites with a streptococcal preparation, OK-432. I. Improvement of host immunity and prolongation of survival. *Surgery* 93, 357–364.

Topalian, S. L., Hodi, F. S., Brahmer, J. R., Gettinger, S. N., Smith, D. C., McDermott, D. F., Powderly, J. D., Carvajal, R. D., Sosman, J. A., Atkins, M. B., Leming, P. D., Spigel, D. R., Antonia, S. J., Horn, L., Drake, C. G., Pardoll, D. M., Chen, L., Sharfman, W. H., Anders, R. A., Taube, J. M., McMiller, T. L., Xu, H., Korman, A. J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G. D., Gupta, A., Wigginton, J. M., & Sznol, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* 366, 2443–2454.

Tosi, D., Valenti, R., Cova, A., Sovena, G., Huber, V., Pilla, L., Arienti, F., Belardelli, F., Parmiani, G., & Rivoltini, L. (2004). Role of cross-talk between IFN- $\alpha$ -induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8<sup>+</sup> T cell responses against human tumor antigens. *Journal of Immunology* 172, 5363–5370.

Vidalain, P. O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., & Servet-Delprat, C. (2000). Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *Journal of Virology* 74, 556–559.

Watanabe, Y., & Iwa, T. (1987). Clinical value of immunotherapy with the streptococcal preparation OK-432 in non-small cell lung cancer. *Journal of Biological Response Modifiers* 6, 169–180.

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., & Lynch, D. H. (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature Medicine* 5, 157–163.

Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., & June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* 61, 4766–4772.

Yang, R., Xu, D., Zhang, A., & Gruber, A. (2001). Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *International Journal of Cancer* 94, 407–413.

Yuan, K., Jing, G., Chen, J., Liu, H., Zhang, K., Li, Y., Wu, H., McDonald, J. M., & Chen, Y. (2011). Calmodulin Mediates Fas-induced FADD-independent Survival Signaling in Pancreatic Cancer Cells via Activation of Src-Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK). *Journal of Biological Chemistry* 286, 24776–24784.

Zhu, H., Zhang, L., Huang, X., Davis, J. J., Jacob, D. A., Teraishi, F., Chiao, P., & Fang, B. (2004). Overcoming acquired resistance to TRAIL by chemotherapeutic agents and calpain inhibitor I through distinct mechanisms. *Molecular Therapy* 9, 666–673.