O-グリコシド結合型糖鎖の発現抑制による 新しい免疫遺伝子療法の開発

日野田裕治・安達雄哉・今井浩三*

Development of a new immunogene therapy with suppression of O-glycan expression

UDP-GalNAc : polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc transferases) catalyze the initial reaction in *O*-linked (mucin type) oligosaccharide biosynthesis. To attempt to inhibit the synthesis of *O*-glycan, we transfected antisense cDNA of GalNAc transferase-type 1 (GalNAc-T1) into a human gastric cancer cell line, JRST. A decreased expression of GalNAc-T1 in the level of both mRNA and protein was observed in the resultant transfectants. They demonstrated a significantly increased sensitivity to NK and LAK cells *in vitro* compared with parental cells and mock transfectants. Although there was no significant difference in *in vitro* cell proliferation among parental cells, mock transfectants or antisense transfectants, *in vivo* growth rate of antisense transfectants using SCID mice was clearly lower than that of parental cells and mock transfectants.

From these results, we conclude that antisense suppression of GalNAc-T1 could increase the sensitivity of tumor cells to NK and LAK cells, suggesting that this strategy may be of use as a new immunogene therapy.

Yuji Hinoda · Takeya Adachi · Kohzoh Imai*

key words : GalNAc transferase, NK cell, gastric cancer, O-glycan

O-グリカンは、癌細胞において細胞の保護に重要な役割を果たすと考えられている^{1,2)}。たとえば、マウス乳癌細胞由来の TA3 細胞上に存在する癌関連ムチン型糖蛋白である epiglycanin は、細胞表面抗原を隠蔽することにより、免疫系から逃れている可能性がある³⁾。また、13762 ラット乳癌細胞株では、natural killer (NK) 細胞に対する抵抗性が、細胞表面シアロ糖蛋白である ASGP-1 の発現量とよく相関することが知られている⁴⁾。さらに、13762 細胞の高転移性クローンにおいては、ASGP-1 の発現量と転移能との間に正の相関が認められる⁵⁾。

ヒトのムチン型糖蛋白の一つであり、O-グリカンに富む MUC1 は、その抗接着作用により細胞障

害性リンパ球と標的細胞との相互作用を阻害することができる^{6,7)}。MUC1 を発現したメラノーマ細胞は、MUC1 陰性細胞にくらべて同種、あるいはインターロイキン-2 (IL-2) 刺激エフェクター細胞に対する感受性の低下することも知られている⁸⁾。

これらのムチン型糖蛋白による癌細胞保護作用は、その直線的で硬い構造に基づくものと考えられている。コア蛋白に結合する糖鎖の chain-stiffening effect は、主に最初にペプチドに結合する *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) とアミノ酸との間の立体化学的相互作用によるものであることが light scattering^{9,10)} や nuclear magnetic resonance¹¹⁾ を用いた研究によって明らかにされている。これらに加えて、シアル酸も癌細胞の保護作用に重要な役割を果たしている。シアル酸は O-結合型糖鎖付加の終了シグナルとして働き、強力

* First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Minami-1-jo Nishi-16-chome, Chuo-ku, Sapporo 060 札幌医科大学医学部内科学第一講座
Offprint requests to : Yuji Hinoda, M.D.

な陰性荷電を有するため、その荷電反撥性によって細胞間相互作用の阻害が生ずる¹²⁾。シアル酸を含めた末端糖鎖は、またセレクトインのリガンドとしても働き、転移過程において癌の進展に寄与すると考えられている¹³⁾。これらの事実は、ムチン型糖鎖蛋白の癌細胞保護作用において、O-グリカンがきわめて重要な役割を果たすことを示唆する。したがって、癌細胞におけるその生合成の阻害は、新しい癌治療法の一つとなる可能性がある。

O-グリカンの合成阻害法としては、GalNAcがムチンコア蛋白に結合する第一番目の糖残基であることから、主としてその構造類似体を使用されている。実際、癌細胞株をbenzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside(benzyl- α -GalNAc)存在下で培養すると、MUC1コア蛋白抗体に対する反応性の増強^{7,14)}、細胞間相互作用の増強¹⁵⁾、*in vitro*における浸潤能の減少¹⁶⁾、あるいは脾内移植後の肝転移の抑制¹⁷⁾などが認められる。しかし、benzyl- α -GalNAcの*in vivo*投与は、正常細胞への影響を考慮すると治療応用は困難であろう。最近、cell-targeting可能なレトロウイルスベクターが開発されつつあり¹⁸⁾、近い将来、細胞もしくは組織特異的な*in vivo*遺伝子導入が可能になると予想される。そこで本稿においては、GalNAc転移酵素、UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc transferase)^{19,20)}のcDNAを発現ベクターにアンチセンスに組み込むことによって、遺伝子導入による同酵素の発現抑制を行い、胃癌細胞株におけるO-グリカン合成抑制の影響について、主としてNKおよびlymphokine activated killer (LAK)細胞に対する感受性の面から検討を加えた筆者らの成績²¹⁾を紹介させていただきたい。

アンチセンス GalNAc transferase cDNA 導入細胞の確立

この研究を開始した当時は、まだウシのGalNAc transferase cDNAの情報¹⁹⁾しかなかったため、RT-PCR法によってヒトcDNAをcloningし、18q12の局在も明らかにした²²⁾。その後、つぎつぎに本酵素のファミリーメンバーが明らかにな

図1 アンチセンストランスフェクタントにおけるGalNAc-T1 mRNAの発現レベル

り、現在では4種の遺伝子が報告され、GalNAc-T1、-T4と発見順に番号がつけられている。筆者らの遺伝子はT1に相当する。

まず遺伝子導入細胞に用いる細胞株を決定するために、13種の胃および大腸癌細胞株におけるGalNAc-T1 mRNAの発現を、RT-PCR法を用いて検討した。その結果、細胞株間で発現レベルに差異を認めるものの、すべての細胞株でGalNAc-T1 mRNAの発現が認められた。そこで、これらのなかで相対的に中等度の発現レベルを示した胃癌細胞株JRSTを用いることとした。

つぎに、GalNAc-T1のアンチセンス抑制を行うために、GalNAc-T1の全長鎖cDNAをアンチセンスにpcDNA3のCMVプロモーターのコントロール下に組み込み、ヒト胃癌細胞株JRSTに導入し、数多くの安定なトランスフェクタントクローンを得た。

GalNAc-T1の発現を確認するために、まずRT-PCR法によってこれらクローンの内因性GalNAc-T1 mRNA発現の検討を行った。代表的な4クローンについての結果を図1に示す。この結果から、2クローンのアンチセンストランスフェクタント(AS-GNT1クローン4、およびクローン12)を以下の実験に用いることとした。pcDNA3-AS-GNT1を導入したクローンが実際にアンチセンスのmRNAを発現していることを確認するために、アンチセンスmRNAに特異的なプライマーを用いたRT-PCRを施行したところ、AS-GNT1クローン4およびクローン12に

図2 アンチセンストランスフェクタントにおけるGalNAc-T1蛋白の発現レベル

において明らかなバンドが検出された。

アンチセンス mRNA 発現が蛋白レベルの抑制にも有効であることを確認するために、Western blot 法を行った。その結果、図2に示すように、AS-GNT1 クローン4およびクローン12は、親細胞およびmockトランスフェクタントにくらべて、明らかなGalNAc-T1蛋白発現レベルの低下を示した。さらに、実際に細胞表面分子上の糖鎖量が減少していることも、種々のFITC標識レクチン flow cytometry を行い確認した。

免疫エフェクター細胞に対する感受性の変化

こうして作製したアンチセンストランスフェクタントの、抗腫瘍エフェクター細胞感受性を検討するために、まずNK細胞感受性試験を ^{51}Cr 遊離法により行った(図3)。その結果、AS-GNT1 クローン4では、親細胞およびmockクローン3と比較して、ヒト末梢血単核細胞に対する感受性が著明に増強した。さらに、AS-GNT1 クローン4におけるNK感受性は、O-結合型糖鎖合成阻害剤の一つであるbenzyl- α -GalNAc²³⁾で処理したJRST細胞と同程度となった。図には示さないが、

図3 アンチセンストランスフェクタントのNK細胞感受性

図4 アンチセンストランスフェクタントのLAK細胞感受性

他のクローンにおいても同様な結果が得られた。

末梢血単核細胞をIL-2刺激して同様の検討を行ったところ、図4に示すように、mockクローン3は親細胞と同程度の末梢血単核細胞に対する感受性を示したが、AS-GNT1クローン4は親細胞およびmockクローン3と比較して、LAK感受性の著明な増強を示した。さらにAS-GNT1クローン4におけるLAK感受性は、この場合もbenzyl- α -GalNAcで処理したJRST細胞と同程度であった。

In vivo 腫瘍増殖能への影響

試験管内での効果がin vivoでも発揮されるかどうかをつぎに検討した。10⁶個の親細胞、mockクローン3およびAS-GNT1クローン4を

図5 アンチセンストランスフェクタントの *in vivo* 造腫瘍能(A)と抗アシアロ GM1 抗体処理の影響(B)

SCID マウスの右大腿部に皮下移植し、原発巣のサイズを移植8週間後に測定した。親細胞および mock クローン3は同程度の *in vivo* 腫瘍増殖を示したのに対し、AS-GNT1 クローン4ではこれらの対照群にくらべて著明な腫瘍増殖の抑制が認められた(図5A)。同様の傾向は、mock クローン6とAS-GNT1 クローン12を 5×10^5 個移植した場合にも認められた。一方、*in vitro* における細胞増殖能をMTT assayによって検討した結果、親細胞、mock トランスフェクタントおよびアンチセンストランスフェクタントの間で有意な差は認められなかった。このことは、*in vivo* でみられたアンチセンス GalNAc-T1 トランスフェクタントの腫瘍増殖抑制が、細胞増殖活性の差によるものではないことを示唆する。

実験に用いた SCID マウスは、分化TおよびB細胞を欠如しているが、T細胞非依存性のマクロファージおよび正常なNK活性は保持している²⁴⁻²⁷。そこで、*in vivo* のNK細胞活性を抑制するために、マウスにあらかじめ抗アシアロ GM1 抗体を投与して、同様にトランスフェクタントの

図6 アンチセンストランスフェクタントのマウス脾細胞に対する感受性

腫瘍増殖を観察したところ、今度はアンチセンストランスフェクタント、mock、親細胞の三者間で増殖能に差を認めなかった(図5B)。このことは、図5Aで示したトランスフェクタント腫瘍の増殖作用が、NK細胞によってもたらされていたことを強く示唆する。

この点を確認するために、SCID マウス脾細胞をエフェクターとして *in vitro* でトランスフェクタントの感受性をみたところ、脾細胞は対照細胞に比較して、明らかにアンチセンストランスフェクタントを強く傷害した。さらに、脾細胞を抗アシアロ GM1 抗体で処理すると、この傷害活性は消失した(図6)。

アンチセンス GalNAc-T1 トランスフェクタントの免疫エフェクター細胞に対する感受性増大の機序

現時点で、GalNAc transferase ファミリーに属する4種のアイソザイム(GalNAc-T1, -T2, -T3, -T4)が cDNA クローニングによって同定され、報告されている^{19,20,28-31}。筆者らの検討では、樹立したトランスフェクタントにおいて GalNAc-T1 のみを抑制したにもかかわらず、著明なNKおよびLAK細胞感受性の増強が認められた。この理由として、GalNAc-T1 cDNA のアンチセンス導入が、他の GalNAc transferase の発現を抑制している可能性があげられる。GalNAc-T1 と-T2あるいは-T3の塩基配列における相同

性は、最大 41.7% または 33.3% である。しかし、GalNAc-T1, -T2 および -T3 は GalNAc-T1 のコドン 340-480, 560-760 および 850-1280 に相当する三つの領域に高い相同性をもつ。特に 850-1280 の領域には、61 アミノ酸からなり 80% 以上の相同性をもつ GalNAc transferase motif が含まれている。さらに、上記の三つの領域には、ヒトゲノムに対して特異的なシーケンスをもつ最小のオリゴヌクレオチドサイズとされる 15 塩基、またはそれ以上につき 80% 以上の相同性をもつ個所が 23 箇所存在する。これらの高い相同性をもつ部分の存在は、アンチセンス GalNAc-T1 mRNA が他の GalNAc transferase mRNA に影響を与える可能性を示唆する。現時点で、10 種以上の GalNAc transferase 遺伝子の存在が示唆されているが、いずれも相同配列を利用して RT-PCR クローニングで単離されているようであり、これらのファミリーメンバー間でも、T1-T3 にみられたのと同レベルの homology が認められる可能性が高い。もう一つの説明としては、GalNAc-T1 の基質特異性が T2, T3 にくらべ、腫瘍細胞の NK 感受性に優位に関与している可能性が考えられる。*in vivo* における合成ペプチドを用いた結果のみであるが、GalNAc-T1, -T2 および -T3 の間で基質特異性の差異が示されている³⁰⁾。

さて、O-glycan 生合成の抑制が、標的腫瘍細胞の NK 細胞に対する感受性増強を引き起こしていると仮定して、そのメカニズムはどのように考えればよいのであろうか。最近の研究によって、標的細胞上の MHC class I 分子が細胞に対し抑制的制御を行っていることが明らかになりつつある^{32,33)}。いまだ全体像は不明であるが、MHC class I に結合して負のシグナルを伝える killer cell inhibitory receptor (KIR) が注目される。KIR は、細胞外に 2 ないし 3 個の免疫グロブリン様ドメインを有し、class I 分子と結合すると考えられている。細胞質ドメインには、immune receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) とよばれるチロシン残基を含む共通配列が存在し、NK 細胞の活性化によってチロシン残基のリン酸化が起こり、これがホスファターゼをリクルートし殺

細胞活性を抑制する。これまで、KIR と HLA-A, B, C との結合が明らかにされているが、最近 NKG2 とよばれる受容体と HLA-G との結合も報告された。このような機構は、MHC class I を発現する正常細胞を、免疫エフェクター細胞による自己反応から保護するために存在すると推察されている。KIR は T 細胞にも発現し、T 細胞受容体を介したシグナルを負に調節することも報告されている。最近、メラノーマに対する HLA-A 拘束性 CTL が、同じ細胞株の HLA-C を欠損したクローンは傷害するが、欠損していないクローンは KIR の働きによって障害することができないことが示された³⁴⁾。NK および T 細胞の抗腫瘍作用における負のシグナルを、腫瘍細胞が class I 分子の発現を抑制することによって利用している可能性がある。このほかに、NK 細胞による標的細胞認識には、インテグリンや CD44 など補助的に関与することが報告されている³⁵⁾。ムチン型糖蛋白、特に上述の MUC1 ムチンなど大きな細胞外ドメインを有するものは、NK 細胞と標的細胞上の分子間相互作用を阻害することによって抑制的に働いている可能性が推測される。今回の筆者らの検討では、標的細胞はヒト胃癌細胞株であるが、エフェクター細胞がヒトでもマウスでも同様の結果が得られることから、O-glycan による非特異的阻害作用がメカニズムとしてはもっとも考えやすい。

MUC1 ムチンはさまざまな上皮性腫瘍や骨髄腫細胞に発現するが、そのコア蛋白エピトープを認識する cytotoxic T 細胞 (CTL) が誘導される^{35,36)} ことでも知られている。本 CTL は、MUC1 の反復するペプチドシーケンス上の個々のエピトープを同時に認識することによって、T 細胞レセプターの cross-linking を引き起こし、MHC 非拘束性に作用することが明らかにされてきた。また、MUC1 は癌ワクチンとして応用可能であることも示唆されている³⁹⁻⁴²⁾。筆者らは、標的腫瘍細胞を benzyl- α -GalNAc を用いて脱糖鎖することにより、MUC1 特異的 CTL 活性が著明に増強することを示した⁴³⁾。すなわち、脱糖鎖によって CTL がより一層 MUC1 ペプチドへアクセスしや

すくなるものと考えられる。

HLA 拘束性に反応する CTL の対応抗原ペプチドも、MAGE をはじめとして数多く明らかにされているが、このような CTL の反応性も O-glycan 生合成の抑制によって増強するものと予想される。

おわりに

O-glycan 生合成の抑制による免疫療法の可能性について述べた。ムチン分子は主として上皮細胞が産生するが、上皮由来の癌の多くは化学療法にも免疫療法にも感受性が低いことが知られている。Self-protection に働いている分子を標的とした本治療法は、これら難治性とされる癌に対する新しいアプローチであり、今後 *in vivo* での効果についてさらに検討を進める予定である。

文 献

- Jentoft N: Why are proteins O-glycosylated? Trends Biochem. Sci. 15: 291-294, 1990.
- Kozarsky K, Kingsley D, Krieger M: Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4335-4339, 1988.
- Codington JF, Haavik S: Epiglycanin—a carcinoma-specific mucin-type glycoprotein of the mouse TA3 tumor. Glycobiology 2: 173-180, 1992.
- Sherblom AP, Moody CE: Cell surface sialomucin and resistance to natural cell-mediated cytotoxicity of rat mammary tumor ascites cells. Cancer Res. 46: 4543-4546, 1986.
- Steck PA, Nicolson GL: Cell surface glycoproteins of 13762NF mammary adenocarcinoma clones of differing metastatic potentials. Exp. Cell. Res. 147: 255-267, 1983.
- Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilken J: Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. Cancer Res. 52: 2318-2324, 1992.
- Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K: Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. Jpn. J. Cancer Res. 87: 505-511, 1996.
- van de Wiel-van Kemenade E, Ligtenberg MJ, de Boer AJ, Buijs F, Vos HL et al.: Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. J. Immunol. 151: 767-776, 1993.
- Shogren R, Gerken TA, Jentoft N: Role of glycosylation on the conformation and chain dimensions of O-linked glycoproteins: light-scattering studies of ovine submaxillary mucin. Biochemistry 28: 5525-5536, 1989.
- Shogren RL, Jentoft N, Gerken TA, Jamieson AM, Blackwell J: Light-scattering studies of fractionated ovine submaxillary mucins. Carbohydr. Res. 160: 317-327, 1987.
- Gerken TA, Butenhof KJ, Shogren R: Effects of glycosylation on the conformation and dynamics of O-linked glycoproteins: carbon-13 NMR studies of ovine submaxillary mucin. Biochemistry 28: 5536-5543, 1989.
- Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litinov SV: Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. Trends. Biochem. Sci. 17: 359-363, 1992.
- Mannori G, Grottet P, Cecconi O, Hanasaki K, Aruffo A et al.: Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. Cancer Res. 55: 4425-4431, 1995.
- Burchell J, Taylor-Papadimitriou J: Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. Epithelial Cell. Biol. 2: 155-162, 1993.
- Magarian-Blander J, Domenech N, Finn OJ: Specific and effective T-cell recognition of cells transfected with a truncated human mucin cDNA. Ann. NY. Acad. Sci. 690: 231-243, 1993.
- Schwartz B, Bresalier RS, Kim YS: The role of mucin in colon-cancer metastasis. Int. J. Cancer 52: 60-65, 1992.
- Bresalier RS, Niv Y, Byrd JC, Duh QY, Toribara NW et al.: Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. J. Clin. Invest. 87: 1037-1045, 1991.
- Somia NV, Zoppé M, Verma IM: Generation of targeted retroviral vectors by using single-chain variable fragment: an approach *in vivo* gene delivery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7570-7574, 1995.
- Homa FL, Hollanders T, Lehman DJ, Thomsen DR, Elhammer ÅP: Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. J. Biol. Chem. 268: 12609-12616, 1993.
- Meurer JA, Naylor JM, Baker CA, Thomsen DR, Homa FL, Elhammer ÅP: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a human UDP-GalNAc: polypeptide, N-acetylgalactosaminyltransferase. J. Biochem. 118: 568-574, 1995.
- Adachi T, Hinoda Y, Nishimori I, Adachi M, Imai K: Increased sensitivity of gastric cancer cells to NK and LAK cells by antisense suppression of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. J. Immunol. 159: 2645-2651, 1997.
- Takai S, Hinoda Y, Adachi T, Imai K, Ohshima M: A human UDP-GalNAc: polypeptide, N-acetylgalactosaminyltransferase-type-1 gene is located at the chromosomal region 18q12.1. Hum. Genet. 99: 293-294, 1997.
- Kuan SH, Byrd JC, Basbaum C, Kim YS: Inhibition of mucin glycosylation by aryl-N-acetyl- α -

- galactosaminides in human colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 264 : 19271-19277, 1989.
- 24) Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA : Natural killer(NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency(SCID). *J. Immunol.* 134 : 3798-3801, 1985.
 - 25) Hackett J, Bosma GC, Bosma MJ, Bennet M, Kumar V : Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 3427-3431, 1986.
 - 26) Murphy WJ, Kumar V, Bennett M : Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency(SCID)-evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J. Exp. Med.* 165 : 1212-1217, 1987.
 - 27) Hasui M, Saikawa Y, Miura J, Takano N, Ueno Y et al. : Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency(scid) and athymic(nude) mice. *Cell. Immunol.* 120 : 230-239, 1989.
 - 28) Hagen FK, van Wuyckhuysse B, Tabak LA : Purification, cloning, and expression of a bovine UDP-GalNAc : polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268 : 18960-18965, 1993.
 - 29) White T, Bennett EP, Takio K, Sørensen T, Bonding N, Clausen H : Purification, and cDNA cloning of a human UDP-*N*-acetyl- α -D-galactosamine : polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 270 : 24156-24165, 1993.
 - 30) Bennet EP, Hassan H, Clausen H : cDNA Cloning and expression of a novel human UDP-*N*-acetyl- α -D-galactosamine polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase, GalNAc-T3. *J. Biol. Chem.* 271 : 17006-17012, 1996.
 - 31) Hagen FK, Hagen KG, Beres TM, Balys MM, VanWuyckhuysse BC, Tabak LA : cDNA cloning and expression of a novel UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine : polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* 272 : 13843-13848, 1997.
 - 32) Lanier LL : Natural killer cells : From no receptors to too many. *Immunity* 6 : 371-378, 1997.
 - 33) Leibson PJ : Signal transcription during natural killer cell activation : Inside the mind of a killer. 6 : 655-661, 1997.
 - 34) Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain J-F et al. : Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6 : 199-208, 1997.
 - 35) Jerome KR, Barnd DL, Bendt KM, Boyer CM, Taylor-Papadimitriou J et al. : Cytotoxic T lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res.* 51 : 2908-2916, 1991.
 - 36) Barnd DL, Lan M, Metzgar R, Finn OJ : Specific, MHC-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 7159-7163, 1989.
 - 37) Ioannides CG, Fisk B, Jerome KR, Irimura T, Wharton JT, Finn OJ : Cytotoxic T cell from ovarian malignant tumors can recognize polymorphic epithelial mucin core peptides. *J. Immunol.* 151 : 3693-3703, 1993.
 - 38) Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N et al. : Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J. Immunol.* 153 : 2102-2109, 1994.
 - 39) Jerome KR, Domenech N, Finn OJ : Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J. Immunol.* 151 : 1654-1662, 1993.
 - 40) Zhang S, Graeber LA, Helling F, Ragupathi G, Adluri S et al. : Augmenting the immunogenicity of synthetic MUC1 peptide vaccines in mice. *Cancer Res.* 56 : 3315-3319, 1996.
 - 41) Pecher G, Finn OJ : Induction of cellular immunity in chimpanzees to human tumor-associated antigen mucin by vaccination with MUC-1 cDNA-transfected Epstein-Barr virus-immortalized autologous B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 1699-1704, 1996.
 - 42) Goydos JS, Elder E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT : A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. *J. Surg. Res.* 63 : 298-304, 1996.
 - 43) Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, Imai K : Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol.* 9 : 791-798, 1997.