T細胞により認識されるヒトメラノーマ抗原の 単離同定と免疫遺伝子治療への応用

河上 裕

米国立癌研究所外科

Identification of human melanoma antigens recognized by T cells and their use for immuno-gene therapy

Yutaka Kawakami

Surgery Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health

Human melanoma antigens and their epitopes recognized by T cells have been identified using a variety of methods. These antigens are classified as 1) melanocyte specific melanosomal proteins (MART-1, gp100, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2), 2) proteins expressed in testis and a variety of cancers (MAGE-1, MAGE-3, BAGE and GAGE), 3) tumor specific mutated proteins (β -catenin, MUM-1 and CDK4), and 4) others (p15, GnT-V, PRAME). The HLA-A2 binding unmutated melanosomal epitopes were found to have a tendency to contain non-dominant anchor amino acids and have relatively low HLA-A2 binding affinity, suggesting that these epitopes are likely to be subdominant or cryptic self determinants. In addition, a variety of mechanisms for generating T cell epitopes on growing tumor cells have been discovered. Since a significant correlation between vitiligo development and tumor regression in the IL2 based immunotherapy was observed, autoreactive T cells specific for these self peptides may be involved in *in vivo* melanoma regression. Adoptive transfer of CTL recognizing these epitopes into patients resulted in tumor regression. Immunization with the MART-1, gp100 or tyrosinase peptides in conjunction with incomplete Freund adjuvant or GM-CSF also resulted in tumor regression in some patients. These observations suggest that these molecules may function as tumor rejection antigens.

Melanoma reactive CTL were efficiently induced from PBL of patients by *in vitro* stimulation with PBMC pulsed with these epitopes and may be useful for the adoptive transfer protocol for treatment of melanoma patients. Therefore, these identified antigens may be useful for development of new immunotherapies for melanoma patients as well as for understanding the mechanisms of T cell recognition of autologous tumor cells.

Key words : melanoma antigens, T-lymphocytes, tolerance, autoimmunity, immuno-gene therapy

は じ め に

多くの動物の腫瘍モデルおよびヒトでは、メラノーマで T 細胞が腫瘍の拒絶に重要な役割を果たすことがわかっている。メラノーマでは、多くの患者から腫瘍反応性 CD8+ T 細胞を誘導することが可能であり、過去10年間その T 細胞が認識する抗原を同定する努力がされてきた。腫瘍抗原を分子として明らかにすることは、T 細胞による自己腫瘍細胞の認識機序を解明するだけでなく、同定された腫瘍抗原を用いた新しい免疫療法の開発を可能とする。またメラノーマ以外の癌に対する T 細胞応答の研究の基盤となりえる。

T 細胞で認識される腫瘍抗原の単離同定法

腫瘍反応性 T 細胞が樹立できる場合は、癌細胞に特異的に、あるいは高発現される蛋白、組織特異的蛋白、癌遺伝子産物、抗体で認識される蛋白、ウイルス蛋白、抗体や T 細胞受容体のイディオタイプ等の、抗原の候補となる蛋白の認識を調べることができる。その場合、癌に高発現される蛋白や組織特異的蛋白は cDNA サブトラクション法で、自己抗体により認識される癌抗原は SEREX 法¹⁾で、新たに単離することができる。腫瘍反応性 T 細胞をスクリーニングに用いて、癌細胞上の HLA に結合しているペプチドを分離精製して T 細胞に認識されるペプチドを単離しアミノ酸配列を決定する方法、また、DNA 発現クローニング法を用いて、腫瘍抗原をコードする遺伝子をまず単離する方法があり、特に今まで cDNA クローニング法を用いて多くの T 細胞認識メラノーマ抗原が単離されている^{2)~4)}。腫瘍反応性 T 細胞が得られない場合は候補蛋白に対する T 細胞を誘導して、その T 細胞が癌細胞を認識することを確認することにより、腫瘍抗原であることを証明する方法も可能である。

T 細胞で認識されるヒトメラノーマ抗原

表1のように、メラノーマ抗原として 1)メラニン合成の場であるメラノソームに存在する組織特異的蛋白であるメラノソーム蛋白群、2)メラノーマだけでなく各種癌細胞および正常精巣細胞にも発現される MAGE 関連蛋白群、3)腫瘍特異的アミノ酸変異をもつペプチド、4)その他の蛋白、が今までに同定されている²⁾。

メラノソーム蛋白

メラノソーム蛋白として、MART-1, gp100, tyrosinase, TRP1, TRP2が T 細胞に認識されることが証明されている。メラノソーム蛋白は各種 HLA に提示され免疫原性が強く、多くの患者で T 細胞応答が認められる。これはメラノソーム蛋白がメラノソームと同じ起源をもち、MHC クラス II 提示抗原のプロセスに重要な役割を果たすライソソームに輸送されるためか、またメラノソームが、ケラチノサイトに取り込まれるように、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞にも取り込まれ、効率よく T 細胞に提示されるからかもしれない。MART-1および gp100では、多くの患者から誘導された HLA-A2拘束性 T 細胞に認識される高免疫原性共通抗原エпитープが見つかった⁵⁾⁶⁾。メラノソーム蛋白を認識する T 細胞を患者に投与した患者では、腫瘍退縮を認める場合があり腫瘍拒絶抗原となる可能性がある。特に、gp100を認識する T 細胞の投与と腫瘍退縮効果に有意の相関が認められている³⁾⁶⁾。

MART-1や gp100や tyrosinase のペプチドで免疫する臨床試験では、少数の患者ではあるが明らかな腫瘍退縮を認めている⁷⁾⁸⁾。また、IL2を用いたメラノーマの免疫療法においては、皮膚白斑の出現と癌退縮に強い相関が認められており、メラノソーム蛋白のようなメラノサイト特異的蛋白に対する自己抗原反応性 T 細胞が癌拒絶に関係している可能性が示唆された⁹⁾。

メラノソーム蛋白から同定された T 細胞エпитープは、アミノ酸変異がない自己ペプチドであるが、比較的 MHC 結合親和性が低いものが多く、細胞表面上の密度が低い subdominant エピトープであることが推測された⁶⁾。そのため、通常では T 細胞の活性化も免疫寛容も起こらないが、腫瘍が発生したり IL2投与等の免疫操作を加えた場合に subdominant エピトープに対する T 細胞が活性化され、腫瘍反応性、あるいは自己メラノサイト反応性 T 細胞として検出されると考えられる。これらのエピトープのアミノ酸配列を見ると、MHC への結合には最適ではないアミノ酸が含まれている場合が多い。このような subdominant エピトープを治療に用いる場合、免疫効率が低くまた癌細胞表面での発現密度が低いいため、癌細胞認識効率も悪い等の問題が考えられるので、免疫法には抗原提示細胞上に高発現させ

表1 T細胞に認識されるヒトメラノーマ抗原

メラノーマ	抗原提示 MHC	エピトープ
A. メラノソーム蛋白		
gp100	HLA-A2	KTWGQYWQV
	HLA-A2	AMLGTHTMEV
	HLA-A2	MLGTHTMEV
	HLA-A2	ITDQVPFSV
	HLA-A2	YLEPGPVTA
	HLA-A2	LLDGTATLRL
	HLA-A2	VLYRYGSFSV
	HLA-A2	SLADTN S LAV
	HLA-A2	RLMKQDFS V
	HLA-A2	RLPRIFCSC
	HLA-A3	ALLAVGATK
	HLA-A24	VYFFLPDHL*
MART-1/Melan-A	HLA-A2	AAGIGILTV
	HLA-A2	ILTVILGVL
TRP1 (gp75)	HLA-A31	MSLQRQFLR
TRP2	HLA-A31	LLPGGRP P YR
	HLA-A33	LLPGGRP P YR
tyrosinase	HLA-A1	DAEKCDICTDEY
	HLA-A2	MLLAVCYLL
	HLA-A2	YMNGTMSQV
	HLA-B44	SEIWRDIDF
	HLA-A24	AFLPWHRLF
	HLA-DR4	QNILLSNAPLGPQFP
	HLA-DR4	SYLQSDPD S FDQ
B. 各種癌細胞および精巣に発現される蛋白		
MAGE-1	HLA-A1	EADPTGHSY
	HLA-Cw16	SAYGEPRKL
MAGE-3	HLA-A1	EVDPIGHLY
	HLA-A2	FLWGPRALV
	HLA-B44	MEVDPIGHLY
BAGE	HLA-Cw16	AARAVFLAL
GAGE-1, 2	HLA-Cw6	YRPRRRY
C. 腫瘍特異的変異ペプチド		
β -catenin	HLA-A24	SYLD <u>S</u> GIHF
MUM-1	HLA-B44	EEKL <u>I</u> VVLF*
CDK4	HLA-A2	ACDP <u>H</u> SGHFV
D. その他		
a. GnT-V	HLA-A2	VLPDVFIRC*
b. p15	HLA-A24	AYGLDFYIL
c. PRAME	HLA-A24	LYVDSLFFL

アンダーライン(突然変異) *イントロンにコードされるペプチド

表2 自己T細胞に認識されるメラノーマ抗原エピトープ形成機序

機 序	抗 原
1. 正常自己ペプチド	MART-1, gp100, tyrosinase, TRP2, MAGE1, MAGE3, BAGE, GAGE1, GAGE2
2. 異なる open reading frame にコードされるペプチド	TRP1
3. 腫瘍特異的突然変異をもつペプチド	CDK4, β -catenin, MUM-1
4. 不完全スプライシングのためイントロンにコードされるペプチド	MUM-1, gp100
5. 異なるプロモーターによる発現	N-acetylglucosamyltransferase-V
6. Post translational modification	tyrosinase

る工夫が必要である。この他にメラノーマエピトープの形成機序として、gp100ではイントロンにコードされるペプチド¹⁰⁾、TRP1では通常とは異なる open reading frame にコードされるペプチド¹¹⁾、tyrosinase では蛋白翻訳後に脱アミン等の修飾を受けたペプチド等がエピトープとなることが見つっている¹²⁾ (表2)。

正常自己ペプチド反応性 T 細胞は、自己免疫疾患を引き起こす可能性があるが、NCI の臨床試験では皮膚の白斑以外にはメラノサイトの豊富なぶどう膜や、網膜の色素上皮細胞等の異常は認めておらず、正常組織と癌組織では、構造上や免疫学的な差異により T 細胞に対する感受性が異なる可能性があり、必ずしも自己抗原反応性 T 細胞が自己免疫疾患を起こすわけではない。しかしメラノソーム蛋白は癌細胞にとって必須な分子ではないので、抗原発現消失による癌細胞の免疫機構からのエスケープが起こりやすい可能性がある。実際、メラノーマの約20%にはメラノーム蛋白が発現されていないとの報告もある。

MAGE 蛋白群

MAGE 蛋白群のエピトープもアミノ酸変異のない自己ペプチドであるが、MAGE 蛋白の発現は正常組織では MHC を発現しない精巣細胞に限られているので腫瘍特異的共通抗原となる¹³⁾。それゆえ MAGE 抗原は、必ずしも免疫寛容が誘導されずに

subdominant エピトープである必要はないが、実際には MAGE 蛋白に対する T 細胞を誘導するのは難しいことがわかっている。MAGE 蛋白群はメラノーマ以外の癌にも発現されるので、多くの癌の免疫療法に使える可能性がある。MAGE3 の HLA-A1 結合ペプチドを用いた臨床試験では、アジュバンド等を併用せずにペプチド単独で少数例に腫瘍退縮を認めているが、その機序は MAGE3 特異的 T 細胞が腫瘍退縮に関係したかどうかも含めて解明されていない¹⁴⁾。

腫瘍特異的変異ペプチド

β -カテニン、CDK4、MUM-1由来の腫瘍特異的アミノ酸変異をもつペプチドが、メラノーマ抗原として単離された^{15)~17)}。 β -カテニン、CDK4で見つかった C $\rightarrow$ T 変異は、メラノーマの誘発因子である紫外線により起こる突然変異である。これら変異ペプチド抗原は治療後、予後の良い患者から得られた T 細胞によって単離されており、生体内での腫瘍拒絶や腫瘍の抑制に関与している可能性がある。動物の腫瘍モデルでは、アミノ酸変異をもつ腫瘍抗原は強い腫瘍拒絶を起こすことが多い。しかし、何らかの治療なしでは腫瘍は増殖するわけであり、癌細胞に検出される変異ペプチドが必ずしも高免疫原性とは限らない。 β -カテニンは多くのメラノーマ細胞に突然変異等による高発現が認められており、癌生成機序に関わっている可能性がある¹⁸⁾。メラノーマ抗原と

表3 メラノーマ抗原を用いる免疫遺伝子治療

受動免疫法	
1.	抗原ペプチドを用いて in vitro で誘導した腫瘍反応性 T 細胞の投与
能動免疫法	
1.	抗原蛋白, ペプチド投与 (MHC 高親和性ペプチド, アジュバンド, リポソーム, リポ蛋白, 熱ショック蛋白)
2.	専門的抗原提示細胞 (樹状細胞) の投与 (ペプチドパルス, 抗原遺伝子導入)
3.	癌抗原遺伝子 DNA (筋注, gene gun)
4.	癌抗原遺伝子を組み込んだリコンビナントウイルス (Adenovirus, Fowlpoxvirus, Vacciniavirus)
5.	癌抗原遺伝子を組み込んだリコンビナントバクテリア (BCG, Listeria, Salmonella)
6.	サイトカインによる免疫増強, 癌細胞認識増強 (IL2, IL12, GM-CSF, IFN γ)

して、単離された変異 CDK4 にもカインース活性の低下と p16 結合能消失が認められており、やはりメラノーマ発癌に関係している可能性がある¹⁶⁾。このように癌の生成増殖に重要である可能性のある分子の変異ペプチドが T 細胞エпитープとして見つかったことは、これら変異分子が癌細胞の存続に重要であるために簡単に抗原が消失せずに癌細胞に発現され続けたため、T 細胞抗原として検出できた可能性がある。逆に、癌細胞存続にとって重要でない抗原の場合は、免疫機構による選択により癌細胞から消失するか、抗原を発現する癌細胞が排除される可能性がある。また、細胞表面上の HLA の数はかぎられており、変異ペプチドが必ずしも適切にプロセッシングされ癌細胞上に提示されるわけではない。これらは、癌細胞には多くの突然変異が蓄積されているにもかかわらず、変異ペプチドに対する T 細胞があまり検出されていないことを説明する理由かもしれない。また、個々の患者に特有な変異ペプチドを治療に応用する場合は、共通な変異でないかぎり個々の患者ごとに異なる治療を行わなければならない。

その他のメラノーマ抗原

その他、メラノーマ抗原として GnT-V (N-acetylglucosamyltransferase-V), p15, PRAME 等が同定されている。GnT-V では、約 50% のメラノーマでイントロン中のシーケンズがプロモーターとして働き、癌細胞特異的にイントロンによりコードされるペプチドが発現され、腫瘍特異的共通抗原と

して T 細胞に認識されるが、多くのメラノーマ患者で GnT-V 特異的 T 細胞が誘導できるのかどうかは不明である¹⁹⁾。PRAME は、HLA-A24 拘束性 T 細胞に認識されるメラノーマ抗原として同定されメラノーマに高率に発現されるが、他の癌にも発現が認められる²⁰⁾。しかし、MAGE 関連抗原とは異なり白血球細胞等の血液系悪性腫瘍にも発現している。また、報告された PRAME 特異的 T 細胞は、Killer cell inhibitory receptor (KIR) を発現し、HLA-Cw7 を欠失した癌細胞しか細胞傷害を起こすことができないが、まだ、KIR を発現しない PRAME 特異的 T 細胞は検出されていない。

メラノーマに対する免疫遺伝子治療の開発

腫瘍抗原を同定せずに行える免疫療法として、サイトカイン等の遺伝子を組み込んで免疫原性を高めた腫瘍細胞や、腫瘍細胞から抽出したペプチドや RNA とともに培養して腫瘍抗原を発現するようにした樹状細胞や、腫瘍細胞から分離した腫瘍抗原ペプチドを結合した熱ショック蛋白で免疫する方法等が考えられており、一部臨床試験が始まっているがその効果は不明である。同定された腫瘍抗原を用いる免疫療法としては、表 3 のように受動的免疫療法として in vitro で腫瘍抗原ペプチドを用いて誘導した腫瘍特異的 T 細胞を用いる養子免疫移入療法、また、能動的免疫療法としては各種免疫法が考えられており、欧米では各種第 1 相臨床試験が開始されている。

MART-1, gp100, tyrosinase のペプチドをアジ

ユバントやサイトカインとともに投与するメラノーマの臨床試験が、米国 NCI とドイツで行われ、投与したペプチドに対する T 細胞応答の増強と、少数例で腫瘍退縮を認めている⁷⁾⁸⁾。GM-CSF, IL2, IL12 等のサイトカインの併用は免疫効率を上げ、また、エフェクター T 細胞の腫瘍細胞認識効率を上げる可能性があり、臨床試験で併用されている。一部の患者では、抗原を発現する転移巣の退縮と同時に抗原を消失した転移巣の増大が見られており、抗原に対する免疫応答が、腫瘍拒絶を引き起こした可能性を強く示唆している。アンカーアミノ酸を変えることにより MHC 結合高親和性とした、改良型 gp100 ペプチドの投与の臨床試験が現在、米国 NCI で進行中であるが、免疫効果が明らかに増強している²¹⁾。

NCI 外科では、MART-1 と gp100 を組み込んだワクチニアウイルス、フォウルボックスウイルス、アデノウイルスを作製し臨床試験を開始しており²²⁾、一部の患者に腫瘍退縮を認めたが、ワクチニアウイルスとアデノウイルスでは免疫前よりすでに抗ウイルス抗体が認められ、ウイルスの投与に従い抗体価が急速に上昇した。また、投与抗原に対する免疫能をモニターすると、ペプチド免疫の時ほど免疫効果が認められず、抗ウイルス免疫応答が腫瘍抗原に対する免疫を妨げている可能性が示唆された。腫瘍抗原遺伝子を含むプラスミド DNA を、筋注や genegun を用いて皮膚に投与し、腫瘍抗原を体内で発現させ免疫誘導する DNA 免疫法は、その一回の効果は弱い強い抗ウイルス反応がないので頻回に免疫することができ、最終的な免疫効果は組換えウイルスよりも期待できるかもしれない。また、効果的な抗原提示細胞である樹状細胞に、同定された腫瘍抗原ペプチドや腫瘍抗原遺伝子を導入して、患者を免疫する臨床試験も開始されている。メラノソーム蛋白のようなアミノ酸変異のない自己ペプチドの場合は、

体内で正常細胞による免疫寛容誘導が起こることが考えられ、癌細胞が消失するまで、頻回の継続した免疫が必要と考えられる²³⁾。

抗原特異的免疫療法では、抗原発現消失等による腫瘍エスケープが起こるので多数の抗原を併用した免疫が必要である。今までに T 細胞抗原認識に関わる分子の消失として、癌細胞において抗原、MHC、 $\beta 2$ -ミクログロブリン、TAP、LMP 等の抗原プロセッシングに関わる分子の欠失や異常が認められている。また、抗腫瘍免疫応答に抑制的に働く免疫機序、たとえば、癌細胞からの TGF- β 等の免疫抑制物質の分泌、Th1/Th2 サブセットの偏位、T 細胞シグナル伝達異常、T 細胞の免疫寛容誘導、癌細胞上の Fas リガンド発現による T 細胞のアポトーシス誘導等が、癌細胞の T 細胞応答からのエスケープを引き起こす可能性も示唆されており、今後どのような機序でどれくらいの頻度で腫瘍細胞のエスケープが起こるかを検討していくことが重要である。

おわりに

メラノーマでは、今後、同定された抗原を用いた各種免疫療法の結果が蓄積され、それをもとに免疫法が改良されていくであろう。現在の免疫療法では進行メラノーマ患者の約 10% に完全寛解を誘導できるが、今後、新しい免疫療法によってどこまで完全寛解率を増加させられるかが重要である。また、効果の期待できる患者群を予測する方法を見つけることが、臨床的には大変重要である。メラノーマ抗原として同定された組織特異的蛋白や MAGE 蛋白群等は、メラノーマ以外の癌においてもターゲットとなるはずである。ほんの少しの体内での抗原提示の差が、メラノーマを高免疫原性に行っているにすぎないとも考えられる。今後、メラノーマ以外の癌でも同様な解析が着実に進んでいくことを期待したい。

文 献

- 1) Tureci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Schmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Ramnensee HG and Pfreundschuh M: The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res* 56: 4766-4772 1996
- 2) Kawakami Y, Robbins PF, Wang RF and

- Rosenberg SA. Identification of melanoma antigens recognized by T lymphocytes and their use in the immunotherapy of cancer. In *Principle and practice of oncology, update*. Devita VT, Hellman S, and Rosenberg SA, editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. pp 1-20 1996
- 3) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR,

- AdemaGJ, Miki T and Rosenberg SA: Identification of a Human Melanoma Antigen Recognized by Tumor Infiltrating Lymphocytes Associated with in vivo Tumor Rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6458-6462 1994
- 4) Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Rivoltini L, Topalian SL, Miki T and Rosenberg SA: Cloning of the Gene Coding for a Shared Human Melanoma Antigen Recognized by Autologous T cells Infiltrating into Tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3515-3519 1994
 - 5) Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JB, Appella E and Rosenberg SA: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180: 347-352 1994
 - 6) Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang XQ, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E and Rosenberg SA: Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 associated with in vivo tumor regression. *J Immunol* 154: 3961-3968 1995
 - 7) Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F and Knuth A: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+cytotoxic-T-cell responses: Evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66: 470-476 1996
 - 8) Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, Barracchini KC, Rivoltini L, Restifo NP, Rpsenberg SA and Marincola FM: Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* 3: 37-44 1997
 - 9) Rosenberg SA and White DE: Vitiligo in patients with melanoma: Normal tissue antigens can be target for cancer immunotherapy. *J Immunother* 19: 81-84 1996
 - 10) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Fitzgerald E, Kawakami Y and Rosenberg SA: The intronic region of an incompletely-spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma reactive tumor infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 159: 303-308 1997
 - 11) Wang RF, Parkhurst M, Kawakami Y, Robbins PF and Rosenberg SA: Utilization of an alternative open reading frame of a normal gene in generating a novel human cancer antigen. *J Exp Med* 183: 1131-1140 1996
 - 12) Skipper JCA, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van Pel A, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL Jr, Boon T, Hunt DF and Engelhard VH: An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183: 527-534 1996
 - 13) Boon T and Van der Bruggen P: Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183: 725-729 1996
 - 14) Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, Canon J-L, Laurent C, Naeyaert J-M, Plagne R, Deraemaeker R, Knuth A, Jager E, Brasseur F, Herman J, Coulie PG and Boon T: Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. *Int J Cancer* 63: 883-885 1996
 - 15) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E and Rosenberg SA: A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183: 1185-1192 1996
 - 16) Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer Zum Buschenfelde K, HandBeach D: A p16INK 4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281-1284 1995
 - 17) Coulie PG, Lehmann F, Lethe B, Herman J, Lurquin C, Andrawiss M and Boon T: A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7976-7980 1995
 - 18) Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Prfiri E and Polakis P: Stabilization of beta-

- catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790-1792 1997
- 19) Guilloux Y, Lucas S, Brichard VG, Van Pel A, Viret C, De Plaen E, Brasseur F, Lethe B, Jotereau F and Boon T: A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanoma is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 183:1173-1183 1996
 - 20) Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, Van Baren N, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T and Coulie PG: 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
 - 21) Parkhurst MR, Salgaller M, Southwood S, Robbins P, Sette A, Rosenberg SA and Kawakami Y: Improved induction of melanoma reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A0201 binding residues. *J Immunol* 157:2539-2548 1996
 - 22) Zhai Y, Kawakami Y, Yang JC, Spiess P, Wadsworth SC, Cardoza LM, Couture LA, Smith AE and Rosenberg SA: Antigen-specific tumor vaccines: Development and characterization of recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 for cancer therapy. *J Immunol* 156:700-710 1996
 - 23) Matzinger P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045 1994