原	著
---	---

共刺激分子 CD 80 遺伝子導入による口腔癌に対する 細胞障害性 T 細胞の誘導に関する研究

茂 木 世 紀

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第二講座（主任：榎本昭二教授）

（1998 年 12 月 10 日 受付）

Studies on Generation of Cytotoxic T Lymphocytes against Oral Squamous Carcinoma by Gene-Transduction of a Co-stimulatory Molecule, CD80

Seiki Mogi

Second Department of Oral and Maxillo-facial Surgery, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief : Prof. Shoji Enomoto)

The effect of gene-transduction of a co-stimulatory molecule, CD80, on generation of cytotoxic T lymphocytes (CTL) against oral squamous cell carcinoma (SCC) was investigated. Long-term or primarily-established short-term cultured oral SCC cell lines were transfected with the human CD80 gene using a replication-deficient recombinant adenovirus (Ad). High levels of CD80 expression were obtained in most tumor cell lines examined. Allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMC) co-cultured with CD80-transduced tumor cells for 7 days elicited high cytotoxicity against melanoma (526mel) and neuroblastoma (IMR32) cells, but not against oral SCCs (HSC3 and Ca9-22). Addition of either IL-2 or IL-12 failed to induce specific cytotoxicity against oral SCC cell lines.

The combined effect of CD80-transduced tumor cells and cytokines, IL-2 and IL-12, on generation of CTL in allogeneic and autologous system was investigated. PBMC from three SCC patients elicited MHC-restricted and TCR-dependent cytotoxicity against autologous SCC, although the level of induced cytotoxicity varied. In contrast, allogeneic PBMC obtained from healthy donors exhibited non-specific cytotoxicity alone.

These results suggested that CD80-transduction may be effective in oral SCC for generating tumor specific CTL in an autologous system.

I. 緒 言

担癌生体において、宿主の癌細胞に対する免疫反応を増強させることにより治療を行う癌免疫療法が種々検討されてきた。しかしながら、癌細胞を特異的に障害する細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) の誘導は容易ではない。T 細胞の活性化には、抗原提示細胞の MHC class I あるいは class II 上のペプチド抗原を認識する T 細胞抗原受容体 (TCR) を介したシグナルに加えて、T 細胞と抗原提示細胞間の直接的な接触により伝達される TCR シグナルとは異なる補助シグナルが不可欠であることが近年明らかにされてきた^{1,2)}。最もよく解析が進み T 細胞の活性化に有力な補助シグナル分子が CD 28 分子である^{3,4)}。CD 28 分子は胸腺細胞およびほとんどの末梢 T 細胞に恒常的に発現が認められ、免

疫グロブリンスーパーファミリーに属するタイプ I 型膜タンパクで分子量 44 kD のホモ二量体として存在する³⁾。TCR シグナル存在下で、抗 CD 28 抗体を添加すると IL-2 mRNA の転写活性の安定化に由来する T 細胞増殖反応やサイトカイン産生を増強させることが報告されてきた⁵⁻¹⁰⁾。CD 28 のカウンターレセプターとしては、CD 80^{11,12)}および CD 86¹³⁻¹⁵⁾の 2 つが存在する。これらとともに、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタイプ I 型膜タンパクで、それぞれ分子量 50 kD, 70 kD の単量体として存在する。CD 80 および CD 86 分子は、抗原提示細胞である活性化 B 細胞、活性化単球、マクロファージ、樹状細胞に発現を認めるが、正常組織細胞における発現はほとんど認められない^{11,13,15-17)}。抗原提示細胞上の CD 80 あるいは CD 86 分子の T 細胞上の CD 28 分子への結合は、T 細胞の増殖、サイトカイン産

生および細胞障害活性発現といったエフェクター機能を有意に増強させることが多くの実験から証明されてきた¹⁸⁻²²⁾。特に、CD 80 と CD 28 の結合を介したナイーブ T 細胞への活性化シグナルは、急速な細胞障害活性発現に至ることが、遺伝子導入細胞を用いた *in vitro* の実験から証明されている^{18,22)}。

口腔癌を含む頭頸部癌においても、腫瘍特異的 CTL 誘導の試みが行われた²³⁻²⁶⁾。しかしながら、実際には癌患者リンパ球と癌細胞を混合培養するだけでは CTL の誘導は容易ではなく、また得られた CTL 活性も有効な治療効果を得るには十分ではない。また、CTL 誘導成功例のほとんどは細胞源として、腫瘍浸潤リンパ球を用いており、末梢血リンパ球からの CTL 誘導の報告はほとんどない^{24,27)}。口腔癌を含む多くの固型癌細胞において、CD 80 あるいは CD 86 分子の発現はほとんど認められない。多くの癌細胞が何らかの腫瘍抗原および MHC class I を発現しているにもかかわらず、癌細胞に対する T 細胞反応を惹起できない理由として、この CD 80 あるいは CD 86 分子の欠如が考えられる。本研究では、ヒト CD 80 遺伝子を口腔扁平上皮癌細胞に導入し、人為的に CD 80 分子を発現させることによる末梢血リンパ球からの腫瘍特異的 CTL 誘導の可能性につき検討した。

II. 材料および方法

1. 腫瘍細胞

口腔扁平上皮癌細胞 (OM 4, MO 702, MO 709) は、無菌下で手術切除標本から採取し約 1～2 mm の大きさに細切し、タイプ I コラーゲン処理フラスコにて DMEM 培地 (GIBCO) (10% FCS, 1 mM L-グルタミン, 10 mg/ml ゲンタマイシン含む) を用いて、初代培養を試みた²⁸⁾。実験には、トリプシン/EDTA 液を用いて約 4～7 代継代培養したものを使用した。培養細胞株である 526 mel (悪性黒色腫) は川上 裕博士より供与された。K 562 (慢性骨髄性白血病由来細胞株), Daudi (バーキットリンパ腫), IMR 32 (神経芽細胞腫) および 293 細胞 (ヒト腎細胞) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。長期継代培養口腔扁平上皮癌細胞株である NA, HSC 3, Ca 9-22 は当教室にて継代培養されているものを使用した。初代培養細胞を含む口腔扁平上皮癌細胞株および IMR 32, 293 細胞は DMEM 培地 (10% FCS, 1 mM L-グルタミン, 10 mg/ml ゲンタマイシン含む), 526 mel, K 562 および Daudi は RPMI 培地 (日水製薬) (10% FCS, 1 mM L-グルタミン, 10 mg/ml ゲンタマイシン含む) にて 5% CO₂, 37℃ インキュベータ内で培養した。

2. モノクローナル抗体およびフローサイトメトリー

Phycoerythrin (PE) 標識抗 CD 86 (IT 2.2), 抗

CD 80 (L 307), 抗 CD 54 (HA 58) および Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 HLA-ABC (G 46-2.6), 抗 HLA-DR (L 243) モノクローナル抗体は、ファーマンジェン社およびベクトンデッキンソン社から購入した。阻害実験に用いた抗 CD 3 (OKT 3), 抗 HLA-ABC (W 6/32) および抗 CD 8 (OKT 8) 抗体はハイブリードーマを ATCC より得て、腹水からカプリリック酸法を用いて精製し使用した。F(ab')₂ 抗 CD 3 抗体 (OKT 3) は固相化ペプシンビーズ (ファルマシア) を用いて作製した。細胞の免疫蛍光染色は、トリプシン/EDTA 液を用いて腫瘍細胞の浮遊液を採取洗浄後、マイクロチューブに 5×10⁵個ずつ分注し、至適濃度の蛍光標識モノクローナル抗体を混和し、氷上で遮光下 30 分間反応させた。リン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄後、FACSsort (ベクトンデッキンソン) を用いてフローサイトメトリーを行い、Cell Quest ソフトウェア (ベクトンデッキンソン) を用いてデータ解析を行った。

3. CD 80 アデノウイルスベクターの構築および遺伝子導入

5 型アデノウイルスゲノムを含んだ環状アデノウイルスプラスミド pJM 17 および外来遺伝子発現プラスミド pSCMV 1 は瀬戸口靖弘博士より供与された。ヒト CD 80 cDNA は pBJ/hB 7 発現プラスミド (L. L. Lanier 博士より供与) から EcoR I 断片として切り出し、pSCMV 1 のサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの下流に組み込み CD 80 発現プラスミド pSCMV-1-hCD 80 を作製した。精製した pSCMV 1-hCD 80 (2 μg) および環状アデノウイルスゲノム pJM 17 (2 μg) をリポフェクタミン (GIBCO) を用いて OPTI-MEM (GIBCO) 培地に溶解し混和後、293 細胞に co-transfection し相同組み換えを起こさせた (図 1)²⁹⁾。陰性対照として用いるために、CD 80 遺伝子を含まないアデノウイルスベクター (null-Ad) も同時に作製した。37℃ で 5 時間培養した後、DMEM 培地 (10% FCS 含) を添加し、14 日培養した後、293 細胞を培養上清とともに回収した。凍結融解を 5 回繰り返し細胞膜を破壊し、遠心後の上清を粗ウイルス液とした。組織培養用ディッシュ (15 cm, Nunclon) に大量培養した 293 細胞を、PBS にて洗浄後、粗ウイルス液 5 ml を添加し、37℃ で 1 時間反応させてウイルスを感染させた。感染させた 293 細胞へ DMEM 培地を加えさらに 4 日間培養した。293 細胞および培養上清から同様に粗ウイルス液を回収した。ウイルス液の精製は、2.2 M と 4.0 M の塩化セシウムによる比重遠心分離法を用い、中間層のウイルス層を回収後等量の飽和塩化セシウム/10 mM HEPES を加え、さらに 2 回目の塩化セシウム比重遠心を繰り返し、再度中間層のウイルス液を回収後、10% Glycerol/PBS にて透析しこれを精

図1 CD80 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製

製ウイルス液として用いた。精製ウイルス液は分注後、 -80°C に使用まで保存した。

腫瘍細胞へのヒト CD80 遺伝子導入は、50～70%飽和の培養細胞の上清を吸引、PBS にて洗浄後、血清無添加の DMEM 培地 1 ml をフラスコ (25 mm²) 全体に行き渡らせた後、CD80-Adあるいはnull-Adウイルス液 (5～10 ml) と 37°C で2時間反応させ感染させた。FCS を含む DMEM 培地を添加し、培養48時間後の細胞を回収し以下の実験に用いた。

4. 混合リンパ球腫瘍培養

口腔癌患者および健康人よりヘパリン血を採取し、PBS にて2～3倍に希釈後、リンパ球分離液 (比重: 1.077, SEPARATE-L, 武藤化学) を用いて比重遠心法にて中間層の末梢血単核球 (PBMC) を回収し、2回 PBS にて洗浄後、RPMI 培地に希釈しリンパ球浮遊液とした。必要に応じ、10%DMSO/90%FCS を用い、細胞保存用液体窒素タンクに凍結保存した。

PBMC (1×10^6 個/ml) と 80 Gy の放射線照射した CD80 遺伝子導入あるいは非導入腫瘍細胞 (1×10^5 個/ml) を 24 穴プレート (岩城硝子) にて共培養し、7日後あるいは14日後の細胞を回収し、細胞障害活性の測定に用いた。一部の実験では、リコンビナント IL-12 (50 U/ml, Genetics 社より供与) あるいは rIL-2 (50 U/ml, S-6820, 塩野義製薬より供与) を初期培養に添加した。また、自家癌を用いた実験では、初期培養に rIL-12 (50 U/ml) を添加し、5日間培養後、低濃度 IL-2 (20 U/ml)

を添加し 14 日間培養した。

5. 細胞障害性の測定

細胞障害活性の測定は、 ^{51}Cr 遊離試験法で行った。標的細胞に 50 μCi のクロム酸ナトリウム ($\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$, NEN ライフサイエンス) を添加し 37°C で2時間反応させ、培養液で2回洗浄し標識標的細胞を得た。種々の E/T (エフェクター細胞/標的細胞) 比になるよう調整したエフェクター細胞と標識標的細胞 (5×10^3 個/穴) を 96 穴 U 底プレート (コーニング) に3穴ずつ加え、 37°C , 5% CO_2 下で4時間反応させた。抗体による阻害実験では、精製 F(ab')₂ 抗 CD3 (OKT 3), 抗 HLA-ABC (W 6/32) あるいは抗 CD8 (OKT 8) 抗体を最終濃度が 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように、反応開始時に添加した。4時間の反応後、スカトロンセルハーベスターシステム (スカトロン) を用いて上清を回収し、上清中に放出された ^{51}Cr の放射活性をガンマーシンチレーションカウンターで測定した。

細胞障害活性 (% cytotoxicity) を次式で計算した。

$$\% \text{細胞障害活性} = \frac{\{(\text{実験遊離} - \text{自然遊離}) / (\text{最大遊離} - \text{自然遊離})\} \times 100}$$

最大遊離は標的細胞のみのウェルに 10% Triton-X-PBS を添加したウェル、自然遊離は標的細胞のみを培養したウェルからの計測値である。

表 1 長期培養癌細胞株における細胞表面抗原の解析

細胞株名	組 織 型	細胞表面抗原の発現*				
		CD 80 (B 7)	CD 86 (B 70)	CD 54 (ICAM-1)	MHC class I (HLA-ABC)	MHC class II (HLA-DR)
526 mel	悪性黒色腫	—	—	++	++	±
IMR 32	神経芽細胞腫	—	—	±	++	—
NA	口腔扁平上皮癌	—	±	++	++	—
Ca 9-22	口腔扁平上皮癌	—	—	+	++	±
HSC 3	口腔扁平上皮癌	±	±	++	++	±

*陰性対照群抗体の蛍光強度と比較して同程度の発現；(—), 1～2 倍程度の発現；(±), 2～10 倍程度の発現；(+), 10 倍以上の発現；(++)

表 2 短期培養口腔癌細胞の性状

症例	年齢	性別	原発	ステージ	組織型 (分化度)	細胞名	細胞表面抗原の発現*				
							CD 80 (B 7)	CD 86 (B 70)	CD 54 (ICAM-1)	MHC class I (HLA-ABC)	MHC class II (HLA-DR)
1	60	F	舌	II	SCC (高分化)	MO 702	—	—	+	+	±
2	21	M	下顎肉	III	SCC (中分化)	OM 4	—	±	+	+	—
3	66	F	口腔底	III	SCC (中分化)	MO 709	—	—	+	++	±

*発現レベルの評価は表 1 と同様の基準で行った。

III. 結 果

1. 腫瘍細胞表面の機能分子の解析

長期培養癌細胞株である口腔扁平上皮癌細胞株 (NA, Ca 9-22, HSC 3), 悪性黒色腫 (526 mel), 神経芽細胞腫 (IMR 32) 上の CTL 誘導に関連すると思われる細胞表面機能分子, CD 80 (B 7), CD 86 (B 70), CD 54 (ICAM-1), MHC class I (HLA-ABC), MHC class II (HLA-DR) の発現をフローサイトメトリーにて解析した。CD 80 および CD 86 の発現を明らかに認める細胞株は 1 例もなかった (表 1)。一方, CD 54 については IMR 32 で発現がやや低下しているものの, すべての細胞で高い発現を認めた。MHC class I はすべての細胞で高い発現を認めた。MHC class II に関しては, 明らかな発現を認める細胞は 1 例もなかった。3 症例の口腔癌患者手術材料より初代培養を経て樹立した短期培養口腔扁平上皮癌細胞では, 検索した 3 例すべてが CD 80 陰性で, CD 86 の発現もほとんど認められなかった (表 2)。一方, CD 54 および MHC class I においては明らかな発現を認めたが, MHC class II 発現はほとんど認められなかった。

2. アデノウイルスを使用した癌細胞への CD 80 遺伝子導入

増殖率の低い短期培養腫瘍細胞に対しても, 高効率で

図 2 遺伝子導入後の腫瘍細胞上の CD 80 発現
腫瘍細胞を CD 80-Ad (太線) および null-Ad (細線) で感染させ, 48 時間後の細胞を回収し, PE 標識抗 CD 80 モノクローナル抗体で染色し, フローサイトメトリーにて解析した。

十分量の CD 80 分子を発現させるために, ヒト CD 80 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (CD 80-Ad) を作製した。陰性対照として, CD 80 遺伝子を含まないアデノウイルスベクター (null-Ad) も同時に作製した。種々の長期培養癌細胞株および短期培養口腔癌細胞に

CD 80-Ad あるいは null-Ad を添加し、48 時間培養後の細胞表面上の CD 80 発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。CD 80-Ad 感染により、ほとんどの長期培養癌細胞株で高効率 (82~88%) で高い発現量の CD 80 をタンパクレベルで確認できたが、口腔癌のうち Ca 9-22 については、他の細胞株と比べて遺伝子導入効率が劣っていた (図 2)。短期培養口腔癌 (MO 702, MO 709, OM 4) においては、CD 80-Ad 感染により 3 例すべてにおいて、81% 以上の細胞に CD 80 分子を高発現させることができた。陰性対照の null-Ad 感染では、すべての癌細胞において CD 80 発現は認められなかった。

3. CD 80 遺伝子導入による CTL 誘導能の各種腫瘍細胞間での比較検討

ヒト腫瘍細胞上の CD 80 発現が、*in vitro* において抗腫瘍 CTL 誘導を増強させることができるかどうかを、まず、健康人同種リンパ球と長期培養腫瘍細胞株を用いて検討した。CD 80-Ad あるいは null-Ad 感染 48 時間後の 526 mel, IMR 32, Ca 9-22, HSC 3 細胞を回収し、健康人末梢血単核球 (PBMC) と 7 日間混合培養後の親細胞すなわち遺伝子非導入癌細胞に対する細胞障害活性を測定した。図 3 に、各癌細胞株に対する、それぞれ 2 ドナーの細胞障害活性を示す。CD 80 を発現していない null-Ad 感染癌細胞との共培養では明らかな細胞障害活性を誘導することはできなかったが、CD 80 発現癌細胞との共培養により、悪性黒色腫である 526 mel と神経芽細胞腫である IMR 32 に対しては、高い細胞障害活性を誘導することができた。これらの活性は、抗 F (ab')₂ CD 3 抗体、抗 CD 8 抗体あるいは抗 HLA-ABC 抗体添加により、効果的に阻害されたことから、MHC 拘束性の抗原特異的 CTL が誘導されていることが示された (図 4)。526 mel および IMR 32 と異なり、口腔扁平上皮癌細胞株である Ca 9-22 と HSC 3 に対しては CD 80 遺伝子導入によっても何ら細胞障害活性増強効果を認めなかった (図 3)。この結果は、HLA タイピングの異なるドナーリンパ球を用いても同じであった。

4. 口腔癌に対する CD 80 遺伝子導入と IL-2 および IL-12 添加による CTL の誘導効果の検討

IL-12^{30,31)} および IL-2 は T 細胞, NK 細胞の細胞障害活性を増強させる作用のあるインターロイキンとして知られている。そこで、CD 80 遺伝子導入では明らかな効果を認めなかった口腔扁平上皮癌に対して IL-12 および IL-2 を初期培養に添加することで、CTL が誘導可能であるかを検討した。リコンビナント IL-12 (50 U/ml) もしくはリコンビナント IL-2 (50 U/ml) を単独あるいは両者を培養初日より添加し、同様に 7 日培養後の細胞障害活性を測定した。IL-12 単独添加では、CD 80 遺伝子導入の有無にかかわらず、HSC 3 および NA に対して明ら

図 3 CD 80 遺伝子導入による同種リンパ球の細胞障害活性増強効果

健康人同種 PBMC と CD 80-Ad (●, ▲) あるいは null-Ad (○, △) 感染細胞株を 7 日間混合培養後の非感染親癌細胞株に対する細胞障害活性を⁵¹Cr 遊離試験法で測定した。おのおのの細胞株において、異なる 2 ドナーの結果を示す。

図 4 CD 80 遺伝子導入により誘導された細胞障害活性の抗体による阻害効果

コントロール抗体, F (ab')₂ 抗 CD 3 (OKT 3) 抗体, 抗 HLA-ABC (W 6/32) 抗体, あるいは抗 CD 8 (OKT 8) 抗体は、最終濃度が 10 μg/ml で培養開始時に添加した。E/T 比=50:1

図 5 IL-12 または IL-2 添加と CD 80 遺伝子導入との組み合わせによる口腔癌に対する細胞障害活性誘導効果

健康人同種 PBMC と CD 80-Ad あるいは null-Ad 感染細胞を無添加, IL-12 (50 U/ml) もしくは IL-2 (50 U/ml) 添加し、7 日後の細胞障害活性を図 3 と同様に測定した。

かな細胞障害活性の増強効果を認めなかった(図5)。一方、IL-2 単独添加では、CD 80 遺伝子導入なしでも、HSC 3 に対しては軽度の活性上昇、NA に対してはかなりの活性増強を認めたが、この活性は抗 CD 3 抗体添加により阻害されないこと(データ非提示)から MHC 非拘束性の非特異的キラー細胞によることが示された。

5. 口腔癌における CD 80 遺伝子導入とサイトカインの組み合わせによる自家癌障害性リンパ球の誘導

上記の結果から、同種リンパ球を用いての口腔癌に対する CTL 誘導は難易と思われたので、患者自己リンパ球を用いて CTL 誘導を検討することにした。あらかじめ採血し凍結保存しておいた患者末梢血単核球と同患者

の手術材料から初代培養として樹立した短期培養腫瘍細胞である MO 702, OM 4, MO 709 を以下の実験に用いた。CTL 誘導の培養条件としては、過去に報告した肺癌や前立腺癌に対する CD 80 遺伝子導入と IL-12 および IL-2 を用いた自家癌に対する CTL 誘導法と同様のプロトコール²⁹⁾を採用した。IL-12 (50 U/ml) 存在下に CD 80 遺伝子導入口腔癌細胞と同癌患者末梢血単核球(PBMC)を共培養し、5 日後に低濃度 IL-2 (20 U/ml) を添加し、誘導された CTL を増加させ、培養開始後 14 日目の遺伝子非導入腫瘍細胞に対する細胞障害活性を測定した(図6)。症例 1 (MO 702) では、患者リンパ球は自家癌に対しより高い細胞障害活性を示し、NA(同種

図6 患者 PBMC および健常人 PBMC から CD 80, IL-12 と IL-2 の組み合わせにより誘導された各種癌細胞に対する細胞障害活性

口腔癌患者あるいは健常人 PBMC と CD 80 遺伝子導入患者自家癌細胞を IL-12 (50 U/ml) 存在下で 5 日間培養し、さらに IL-2 (20 U/ml) を添加し 14 日後の非遺伝子導入自家癌細胞, NA, K 562, および Daudi に対する細胞障害活性を測定した。

表3 抗体による SCC に対する細胞障害活性阻害効果

エフェクター細胞		症例 1		症例 2		症例 3	
		患者 PBMC	健常人 PBMC	患者 PBMC	健常人 PBMC	患者 PBMC	
標的細胞	添加抗体	%細胞障害活性 (E/T 比=50:1)				(%抑制率)	
患者腫瘍	コントロール抗体	54.5	33.1	11.1	23.0	20.5	
	抗-CD 3 F(ab') ₂ 抗体	21.1 (61.3)	33.0 (0.0)	6.2 (45.6)	24.2 (0.0)	7.7 (62.4)	
	抗-CD 8 抗体	29.4 (46.1)	38.7 (-16.9)	4.1 (64.0)	19.3 (16.0)	7.5 (63.4)	
	抗-MHC-ABC 抗体	21.8 (60.0)	37.6 (-13.6)	5.5 (51.8)	18.8 (18.3)	8.1 (60.5)	
NA	コントロール抗体	43.4	37.3	43.4	31.7	29.7	
	抗-CD 3 F(ab') ₂ 抗体	50.8 (-17.0)	45.4 (-17.8)	50.8 (-17.1)	26.7 (15.7)	28.0 (0.1)	

口腔扁平上皮癌細胞株, LAK 細胞感受性標的細胞), K 562 (NK 細胞感受性標的細胞) および Daudi (LAK 細胞感受性標的細胞) に対しては, 中等度の活性を示した。健常人 PBMC より同様に誘導された MO 702 に対する障害活性は, E/T 比が 50:1 においては, 患者リンパ球のそれより低かったが, 他の E/T 比および NA, K 562 および Daudi に対する障害活性はやや優れていた。しかしながら, 阻害実験 (表 3) の結果から示されるように, 患者リンパ球の MO 702 に対するキラー活性が, 抗 F (ab')₂ CD 3 抗体, 抗 CD 8 抗体および抗 MHC-ABC 抗体添加により効果的に阻害されたのに対して, 健常人リンパ球によるキラー活性はこれらの抗体添加でほとんど抑制されていなかった。また, 患者および健常人リンパ球の両者にとって同種腫瘍細胞である NA に対する障害活性は, 抗 F (ab')₂ CD 3 抗体添加で抑制を認めなかった。以上の結果から, 患者リンパ球から, この方法で誘導されたエフェクター細胞には, 自家癌に対する腫瘍特異的 CTL が含まれていることが示された。症例 2 における自家癌に対する障害活性は非常に低く, NA, K 562 および Daudi などの細胞株に対してのみ比較的高い細胞障害活性を示した (図 6)。しかしながら, 症例 1 と同様に抗体阻害実験においてはその阻害効果を認めないことより, これらはすべて非特異的活性であることが示された (表 3)。症例 3 の患者リンパ球は自家癌に対し細胞障害活性を示し, この活性は抗 F (ab')₂ CD 3 抗体, 抗 CD 8 抗体および抗 HLA-ABC 抗体添加により有意に阻害された。これに対して, NA に対する障害活性は抗 F (ab')₂ CD 3 抗体添加で抑制されなかった。以上の結果から, 検索した 3 症例において, この方法で患者リンパ球から誘導された自家癌に対する障害活性の強さはさまざまであったが, 抗体阻害実験の結果から, 自家癌に対する抗原特異的 TCR 依存性の CTL が確かに誘導されていることが示された。

IV. 考 察

近年, 抗腫瘍 T 細胞反応を増強させる分子として, 多くのサイトカインや細胞表面膜分子が報告されている。本研究では, T 細胞に強力な活性化シグナルを伝達することで知られている CD 28 分子のリガンド CD 80 分子を癌細胞に遺伝子導入することによる CTL 誘導効果をヒト口腔癌において検討した。

健常人同種リンパ球と長期培養固型癌細胞を用いた検討では, 悪性黒色腫および神経芽細胞腫においてのみ, CD 80 遺伝子導入効果が認められ, 口腔扁平上皮癌においてはその効果は認められなかった。また, IL-2 添加によって非特異的な障害活性は増強するものの, 特異的障害活性の増強は認められなかった。口腔扁平上皮癌にお

いて, CD 80 遺伝子導入効果が認められなかったその第一の理由としては, 癌細胞上の標的抗原の違いが最も強く示唆される。悪性黒色腫に対する特異的 CTL の誘導は数多く報告されており, 本研究で用いたのと同様の同種リンパ球からの CTL 誘導も報告されている^{32,33)}。また, 近年では, HLA class I もしくは class II に拘束された腫瘍抗原ペプチドも悪性黒色腫を中心に同定されてきている³³⁻³⁶⁾。同様の検討を今までに, 悪性黒色腫 3 細胞株, 神経芽細胞腫 2 細胞株, 肺腺癌および扁平上皮癌 3 細胞株についても検討したが, 悪性黒色腫と神経芽細胞腫においてのみ CD 80 の効果が顕著に認められ, 口腔癌および肺癌においては同種リンパ球から CTL を誘導することはできなかった²⁹⁾。Chen らは, さまざまなマウス癌細胞株に CD 80 遺伝子を導入し, *in vivo* における腫瘍拒絶効果を検討した結果, CD 80 の効果がある腫瘍と CD 80 の効果がない腫瘍グループの 2 群に分かれることを示した³⁷⁾。おもしろいことに CD 80 の効果がみられなかった腫瘍細胞群は, 1 回目の腫瘍ワクチン接種後, 2 回目の腫瘍チャレンジに対し腫瘍を拒絶できない免疫原性のない腫瘍であったことを報告している。ヒトにおける腫瘍の免疫原性を実際に評価することはできないが, われわれの検討においても, CD 80 の効果がある腫瘍組織型と CD 80 の効果がない腫瘍組織型に二分されたことは, 腫瘍の発生過程における組織発生の違いからくる腫瘍細胞上の抗原性の強弱が関与していることが示唆される。マウス腫瘍細胞を用いた検討では, CD 80 単独では効果が認められなかった腫瘍細胞にさらに IL-2³⁸⁾, IL-6³⁹⁾, IL-12⁴⁰⁾, IL-7⁴¹⁾, GM-CSF⁴²⁾などのサイトカイン遺伝子を導入することで, 相加的な効果が認められている。なかでも IL-12 は T 細胞や NK 細胞の障害活性増強に効果的であることが示されているう^{30,31)}, CD 80 による T 細胞活性化シグナルを強化することが *in vitro*^{43,44)} および *in vivo*^{44,45)} の実験で報告されていたので, 本検討においても CD 80 による効果を増強可能なサイトカインとして IL-12 を用いた。以前報告したように²⁹⁾, IL-12 単独で障害活性が増強される肺癌細胞株もあるが, 今回検索した口腔癌細胞株 HSC 3 および NA においては IL-12 を添加することで明らかな細胞障害活性の誘導を認めなかった。また, IL-2 の添加は抗原非特異的なキラー細胞である NK 細胞や LAK (lymphokine activated killer) 細胞の誘導を促すが, 同種リンパ球からの腫瘍特異的 CTL 誘導には明らかに関与していないことが抗体による阻害実験から示された。

以上の検討から, 同種リンパ球を用いての口腔癌に対する特異的 CTL の誘導は, かなり困難と判断したので, 口腔癌患者末梢血リンパ球と同患者から樹立された短期培養癌細胞の組み合わせを用いて, 自己の系における

CD 80 遺伝子導入による特異的 CTL 誘導効果を検討した。プロトコールとしては、すでに CTL 誘導に成功している肺癌、腎癌、および前立腺癌に対する自己リンパ球からの CTL の誘導法²⁹⁾に準じた。この方法は、IL-12 を初期に添加することで CD 80 による CTL 誘導能を強化し、低濃度 IL-2 を遅れて添加することで非特異的キラー細胞である NK 細胞や LAK 細胞の誘導をできるだけ抑制することを期待している。短期培養口腔扁平上皮癌を用いて、患者自己末梢血リンパ球から CTL 誘導を試みたところ、キラー活性の強弱はあるものの、3 例すべてにおいて自家癌に対する TCR 依存性の特異的 CTL が誘導されていることが抗体による阻害実験より示された。しかしながら、E/T 比 50 において 50% 以上の強い活性は症例 1 で認められたのみであった。今回は 3 例のみについてしか検討を行っていないので、はっきりとは言及できないが、すでに報告した肺癌、前立腺癌、腎癌に比べて、口腔癌における特異的 CTL の誘導はやや劣っていると思われた。これに対して、非特異的エフェクター細胞である NK 細胞や LAK 細胞は遜色なく同様に誘導されていることから、特異的 CTL 誘導能の低下は、担癌患者リンパ球自体の宿主側の問題より、口腔癌そのものの特殊性から来るものと考えられた。頭頸部扁平上皮癌患者における免疫力低下については古くから報告されている^{46,47)}。腫瘍細胞による抗原感作が期待される所属リンパ節細胞あるいは腫瘍浸潤リンパ球を用いても、新鮮分離リンパ球は自己癌に対してわずかな細胞障害活性しか示さない。しかしながら、非特異的キラー活性に関しては、口腔癌患者リンパ球を *in vitro* で IL-2 存在下で刺激することにより、すべての患者リンパ球から誘導することが可能である^{48,49)}。このことから、生体外で適当なサイトカインが与えられ、担癌宿主環境において産生される抑制性サイトカインの影響から回避されれば、口腔癌患者の NK 細胞や T 細胞は *in vitro* では十分機能的に働くことが示唆される。扁平上皮癌は最も多い固型癌であるにもかかわらず、他の固型癌と比較すると CTL 誘導の報告例はきわめて少ない^{27,50,51)}。多くの抗原ペプチドが同定されている悪性黒色腫と異なり、現在、扁平上皮癌においては、2 つの腫瘍抗原ペプチド、変異 CASP 8⁵²⁾と SART-1⁵³⁾が同定されているのみである。このことから、扁平上皮癌細胞上には、CTL の認識エピトープとなりうる特異抗原ペプチドが少ないことが考えられる。Johnston らは、癌細胞に発現させた CD 80 を介した T 細胞への刺激により、通常では、CTL 誘導に至らないサイレントエピトープに対する CTL を惹起できることを、マウス T リンパ腫を用いた実験から証明している⁵⁴⁾。また、Mandruzzato らは、CD 80 遺伝子導入口腔扁平上皮癌で末梢血リンパ球を刺激することによって

腫瘍特異的な CTL 誘導に成功している⁵²⁾。今回の実験では、得られる患者リンパ球数に限りがあるため、直接 CD 80 遺伝子導入効果を比較検討することはできなかったが、全例において MHC 拘束性の自家癌特異的 CTL が実際に誘導されていることが確かめられた。この事実からは、口腔扁平上皮癌に対する CTL 誘導において癌細胞上の CD 80 が寄与したことが示唆される。

本研究では、CD 80 遺伝子導入の方法としてアデノウイルスベクターを用いた。通常のプラスミドやレトロウイルスベクターでは、増殖が遅い初代培養腫瘍細胞へ効率よい遺伝子導入を行うのは困難である。また遺伝子導入効率が悪いために薬剤による遺伝子導入細胞の選択が必要となり、最終的にかなりの発現率を持っている細胞分画を得るにはかなりの期間を必要とする。ヒト CD 80 アデノウイルスベクターを作製し、腫瘍細胞培養系へのウイルス液の添加により、48 時間後には約 80% 以上の細胞が CD 80 を高発現している分画を得ることができた。また、長期培養癌細胞株だけでなく、低増殖能の初代培養癌細胞においても高効率の遺伝子導入に成功しその有効性が示された。*in vivo* におけるアデノウイルスを用いた遺伝子導入においては、ベクターとしてのアデノウイルスそのものに対する宿主免疫反応が問題とされるが、本研究のように *in vitro* において使用された場合は問題とはならない。また、CD 80 による補助シグナルは CTL の誘導時に特に必要であって、CTL の標的細胞に対する効果発現時においては CD 80 を腫瘍細胞上にほとんど必要としないことが報告されている^{55,56)}。このことは、*in vitro* で CD 80 アデノウイルスを用いて誘導した CTL を養子免疫療法として細胞移入した場合、あるいは癌ワクチンとして CD 80 導入腫瘍を接種した場合において、CD 80 が発現されていない原発および転移巣における癌細胞に対して効果が発揮されることが期待される。

今回用いた方法により口腔癌患者末梢血リンパ球からも、MHC 拘束性 CTL の誘導が可能であることが示された。このような細胞を、養子免疫療法に応用するには、誘導された CTL 活性をいかに維持し、増殖させるかなど多くのさらなる検討が必要であると思われる。近年、CD 80 以外にも CTL 誘導に関わる多くの共刺激分子やサイトカインなどが発見されてきているので、これらをうまく組み合わせることによりさらに効果的な口腔癌に対する CTL 誘導が可能になるとと思われる。

V. 結 論

1. 長期培養口腔癌細胞および短期培養口腔癌細胞において、抗腫瘍免疫反応に関わる細胞表面抗原を調べたところ、MHC class I および CD 54 の十分な発現を認めたが、CD 80 および CD 86 の発現は欠如

していた。

2. アデノウイルスベクターを用いることにより、低増殖能の短期培養腫瘍細胞においても、短時間で高効率かつ十分量の CD 80 分子の発現を得ることができた。
3. 同種末梢血リンパ球からは、悪性黒色腫と神経芽細胞腫において CD 80 遺伝子導入の効果をみることができたが、口腔扁平上皮癌においては効果を認めることができなかった。
4. 同種末梢血リンパ球からは、CD 80 遺伝子導入と IL-2 および IL-12 を組み合わせても、非特異的なエフェクター細胞のみが誘導された。
5. 口腔癌患者末梢血リンパ球から、CD 80 遺伝子導入自家癌と IL-12 および IL-2 の組み合わせで、自家癌に対する腫瘍特異的 CTL を誘導することができた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ご校閲を賜りました本学歯学部口腔外科学第二講座 榎本昭二教授に深甚なる感謝の意を表します。また、国立小児病院小児医療研究センター免疫研究室において本研究を遂行する機会を与えてくださり、ご指導を賜りました国立小児病院小児医療研究センター免疫研究室 香坂隆夫室長に深甚なる感謝の意を表します。また始終、直接懇切なるご教示、ご指導とご校閲を賜りました国立小児病院研究センター免疫研究室 東みゆき博士に心より感謝いたします。また、貴重なプラスミドを頂きました順天堂大学 瀬戸口靖弘博士、また、貴重な細胞を頂きました慶応大学、川上 裕博士、徳島大学歯学部口腔外科学第一講座 鎌田伸之博士、本学歯学部口腔外科学第二講座、戸田ひとみ博士、また本研究の共同研究者であります国立小児病院小児医療研究センター 江端智彦先生に深く感謝します。

最後になりましたが、終始温かいご支援を賜りました国立小児病院小児医療研究センター免疫研究室の諸先生方、本学歯学部口腔外科学第二講座の諸先生方に心からの謝意を表します。

本研究の要旨は第 41 回日本口腔外科学会総会（1996 年 11 月、東京）、第 21 回頭頸部腫瘍学会（1997 年 6 月、福岡）、第 57 回癌学会総会（1997 年 9 月、京都）、第 27 回日本免疫学会総会（1997 年 10 月、札幌）、第 52 回口腔科学会（1998 年 4 月、愛媛）にて発表した。

文 献

- 1) Mueller, D. L., Jenkins, M. K. and Schwartz, R. H. : Clonal expansion versus functional clonal inactivation : A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann. Rev. Immunol.* 7 : 445-480, 1989.
- 2) Schwartz, R. H. : A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248 : 1349-1356,

1990.

- 3) June, C. H., Ledbetter, J. A., Linsley, P. S. and Thompson, C. B. : Role of the CD 28 receptor in T-cell activation. *Immunol. Today* 11 : 211-216, 1990.
- 4) June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. and Thompson, C. B. : The B 7 and CD 28 receptor families. *Immunol. today* 15 : 321-331, 1994.
- 5) Gimmi, C. D., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Sugita, K., Freedman, A. S., Morimoto, C. and Nadler, L. M. : B-cell surface antigen B 7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6575-6579, 1991.
- 6) Damle, N. K., Doyle, L. V., Grosmaire, L. S. and Ledbetter, J. A. : Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD 28 (Tp 44) molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140 : 1753-1761, 1988.
- 7) van Lier, R. A., Brouwer, M. and Aarden, L. A. : Signals involved in T cell activation. T cell proliferation induced through the synergistic action of anti-CD 28 and anti-CD 2 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18 : 167-172, 1988.
- 8) Lindsten, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G. and Thompson, C. B. : Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244 : 339-343, 1989.
- 9) Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M. and June, C. H. : CD 28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1333-1337, 1989.
- 10) Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K. and Ledbetter, J. A. : Binding of the B cell activation antigen B 7 to CD 28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173 : 721-730, 1991.
- 11) Freedman, A. S., Freeman, G., Horowitz, J. C., Daley, J. and Nadler, L. M. : B 7, a B cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol.* 139 : 3260-3267, 1987.
- 12) Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. : The T cell antigen, CD 28, mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen, B 7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 5031-5035, 1990.
- 13) Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Somoza, C. : B 70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD 28. *Nature* 366 : 76-79, 1993.
- 14) Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Gribben, J. G., Ng, J. W., Kim, J., Goldberg, J. M., Hathcock, K., Laszlo, G., Lombard, L. A., Wang, S., Gray, G. S., Nadler, L. M. and Sharpe, A. H. : Murine B 7-2, an alternative CTLA 4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 178 : 2185-2192, 1993.
- 15) Freeman, G. J., Gray, G. S., Gimmi, C. D., Lombard, D. B., Zhou, L.-J., White, M., Fingerhuth, J. D., Gribben, J. G. and Nadler, L. M. : Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation

- antigen B7. *J. Exp. Med.* 174 : 625-631, 1991.
- 16) Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J. and Steinman, R. M. : The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice : abundant expression on dendritic cells and some macrophages. *J. Exp. Med.* 180 : 1849-1860, 1994.
- 17) Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. and Hodes, R. J. : Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands : Expression and function. *J. Immunol.* 180 : 631-640, 1994.
- 18) Azuma, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. : CD 28 co-stimulation of T-cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer Suppl.* 7 : 33-35, 1992.
- 19) Chen, L., Ashe, S., Brady, W. A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Ledbetter, J. A., McGowan, P. and Linsley, P. S. : Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD 28 and CTLA-4. *Cell* 71 : 1093-1102, 1992.
- 20) Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo Jr, V. A., Lombard, L. S., Gray, G. S. and Nadler, L. M. : Cloning of B7-2 : A CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262 : 909-911, 1993.
- 21) Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Daley, J., Gray, G. and Nadler, L. M. : Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counter receptors that costimulate T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 11059-11063, 1993.
- 22) Lanier, L. L., O'Fallon, S., Somoza, C., Phillips, J. H., Linsley, P. S., Okumura, K. and Azuma, M. : CD 80(B7) and CD 86(B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production and generation of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 154 : 97-105, 1995.
- 23) Ishino, Y. and Ishikawa, T. : Generation of human cytotoxic T lymphocytes against fresh autologous and allogeneic solid tumors by mixed lymphocyte tumor cell culture with T cell growth factor. *Gann* 75 : 436-441, 1984.
- 24) Ichino, Y. and Ishikawa, T. : Generation of human cytotoxic T lymphocytes against autologous solid tumors by autologous mixed lymphocytes tumor cell culture with T cell growth factor. *Auris. Nasus. Larynx.* 12 : 226-233, 1985.
- 25) Maehara, T., Eura, M., Ikawa, T. and Ishikawa, T. : Differences of sensitivity to autologous cytotoxic lymphocytes between primary tumor and its cervical lymph node metastases. *Auris. Nasus. Larynx.* 14 : 187-198, 1987.
- 26) Toh, U., Yamana, H., Nakao, M., Imai, Y., Seki, N., Takasu, H., Kaneshige, T., Fujita, H., Shirouzu, K. and Itoh, K. : HLA class I-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from metastatic lymph nodes of esophageal cancers. *Cell. Immunol.* 177 : 137-143, 1997.
- 27) Yasumura, S., Hirabayashi, H., Schwartz, D. R., Toso, J. F., Johnson, J. T., Herberman, R. B. and Whiteside, T. L. : Human cytotoxic T-cell lines with restricted specificity for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer. Res.* 53 : 1461-1468, 1993.
- 28) Kamata, N., Chida, K., Rikimaru, K., Horikoshi, M., Enomoto, S. and Kuroki, T. : Growth-inhibitory effects of epidermal growth factor and overexpression of its receptors on human squamous cell carcinomas in culture. *Cancer Res.* 46 : 1648-1653, 1986.
- 29) Mogi, S., Ebata, T., Setoguchi, Y., Fujime, M., Heike, Y., Kohsaka, T., Yagita, H., Okumura, K. and Azuma, M. : Efficient generation of autologous peripheral blood-derived cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic human tumors using recombinant CD 80-adenovirus together with interleukin 12 and interleukin 2. *Clin. Cancer. Res.* 4 : 713-720, 1998.
- 30) Mehrotra, P. T., Wu, D., Crim, J. A., Mostowski, H. S. and Siegel, J. P. : Effects of IL-12 on the generation of cytotoxic activity in human CD 8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 151 : 2444-2452, 1993.
- 31) Chouaib, S., Chehimi, J., Bani, L., Genetet, N., Tursz, T., Gay, F., Trinchieri, G. and Mami-Chouaib, F. : Interleukin 12 induces the differentiation of major histocompatibility complex class I-primed cytotoxic T-lymphocyte precursors into allospecific cytotoxic effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 12659-12663, 1994.
- 32) Dohring, C., Angman, L., Spagnoli, G. and Lanzavecchia, A. : T-helper and accessory-cell-independent cytotoxic responses to human tumor cells transfected with a B7 retroviral vector. *Int. J. Cancer* 57 : 754-759, 1994.
- 33) Stevens, E. J., Jacknin, L., Robbins, P. F., Kawakami, Y., Gamil, M. E., Rosenberg, S. A. and Yannelli, J. R. : Generation of tumor-specific CTLs from melanoma patients by using peripheral blood stimulated with allogeneic melanoma tumor cell lines : Fine specificity and MART-1 melanoma antigen recognition. *J. Immunol.* 154 : 762-771, 1995.
- 34) Topalian, S. L., Rivoltini, L., Mancini, M., Markus, N. R., Robbins, P. F., Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. : Human CD 4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 9461-9465, 1994.
- 35) Houghton, A. N. : Cancer antigens : Immune Recognition of self and altered self. *J. Exp. Med.* 180 : 1-4, 1994.
- 36) Boon, T. and van der Bruggen, P. : Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183 : 725-729, 1996.
- 37) Chen, L., McGowan, P., Ashe, S., Johnson, J., Li, Y., Hellström, I. and Hellström, K. E. : Tumor Immunogenicity determinants the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J. Exp. Med.* 179 : 523-532, 1994.
- 38) Cayeux, S., Richter, G., Becker, C., Aicher, A., Pezzutto, A., Dorken, B. and Blankenstein, T. : Lack of correlation between rejection of tumor cells co-expressing interleukin -2 and B7.1 and vaccine efficiency. *Eur. J. Immunol.* 27 : 1657-1662, 1997.
- 39) Gajewski, T. F., Renauld, J.-C., Van Pel, A. and Boon, T. : Costimulation with B7-1, IL-6, and IL-12 is sufficient for primary generation of murine

- antitumor cytolytic T lymphocytes in vitro. *J. Immunol.* 154 : 5637-5648, 1995.
- 40) Fallario, F., Ashikari, A., Boon, T. and Gajewski, T. F. : Antigen-specific regression of established tumors induced by active immunization with irradiated IL-12-but not B 7-1-transfected tumor cells. *Int. Immunol.* 9 : 1259-1269, 1997.
 - 41) Cayeux, S., Beck, C., Aicher, A., Dorken, B. and Blankenstein, T. : Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B 7.1 genes induce CD 25 and CD 28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines. *Eur. J. Immunol.* 25 : 2325-2331, 1995.
 - 42) Sumimoto, H., Tani, K., Nakazaki, Y., Tanabe, H., Hibino, H., Hamada, H., Azuma, M. and Asano, S. : GM-CSF and B 7-1 (CD 80) costimulatory signals cooperate in the induction of effective anti-tumor immunity in syngeneic mice. *Int. J. Cancer* 73 : 556-561, 1997.
 - 43) Murphy, E. E., Terres, G., Macatonia, S. E., Hsieh, C.-S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G. M. K. and O'Garra, A. : B 7 and interleukin-12 cooperate for proliferation and IFN- γ production by mouse Th 1 clones that are unresponsive to B 7 costimulation. *J. Exp. Med.* 180 : 223-231, 1994.
 - 44) Zitvogel, L., Robbins, P. D., Storkus, W. J., Clarke, M. R., Maeurer, M. J., Cambell, R. L., Davis, C. G., Tahara, H., Schreiber, R. D. and Lotze, M. T. : Interleukin-12 and B 7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors. *Eur. J. Immunol.* 26 : 1335-1341, 1996.
 - 45) Coughlin, C. M., Wysocka, M., Kurzawa, H. L., Lee, W. M., Trinchieri, G. and Eck, S. L. : B 7-1 and interleukin 12 synergistically induce effective antitumor immunity. *Cancer Res.* 55 : 4980-4987, 1995.
 - 46) Wustrow, T. P. U. and Issing, W. J. : Immune defects in patients with head and neck cancer. *Anticancer Res.* 13 : 2507-2520, 1993.
 - 47) Yamanaka, N. : Immunomodulatory serum components in head and neck cancer. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer* 29 B : 103-106, 1993.
 - 48) 東みゆき : 口腔癌患者における IL-2 活性化キラー細胞の誘導に関する研究. *日口外誌* 34 : 438-450, 1988.
 - 49) 高橋雄三, 森 良之, 東みゆき, 富塚清二, 和気不二夫, 藤林孝司, 榎本昭二. インターロイキン 2 活性化口腔癌末梢血リンパ球の自己新鮮腫瘍細胞に対する細胞障害活性. *日口外誌* 35 : 341-360, 1989.
 - 50) Slingluff, C. L., Cox, A. L., Stover, J. M., Moore, M. M., Huntand, D. F. and Engelhard, V. H. : Cytotoxic T lymphocyte response to autologous human squamous cell cancer of the lung : Epitope reconstitution with peptide extracted from HLA-Aw 68. *Cancer Res.* 54 : 2731-2737, 1994.
 - 51) Nakao, M., Yamana, H., Imai, Y., Toh, Y., Toh, U., Kimura, A., Yanoma, S., Kakegawa, T. and Itoh, K. : HLA A 2601-restricted CTLs recognize a peptide antigen expressed on squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 55 : 4248-4252, 1995.
 - 52) Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T. and van der Bruggen, P. : A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.* 186 : 785-793, 1997.
 - 53) Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamamura, H. and Itoh, K. : A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187 : 277-288, 1998.
 - 54) Johnston, J. V., Malacko, A. R., Mizuno, M. T., McGowan, P., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., Marquardt, H. and Chen, L. : B 7-CD 28 costimulation unveils the hierarchy of tumor epitopes recognized by major histocompatibility complex class I-restricted CD 8+ cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183 : 791-800, 1996.
 - 55) Azuma, M., Cayabyab, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. : Requirements for CD 28-dependent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 150 : 2091-2101, 1993.
 - 56) Azuma, M. and Lanier, L. L. : The role of CD 28 co-stimulation in the generation of cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Topics. Microbiol. Immunol.* 198 : 59-74, 1995.