

細胞性製剤の設計・創製と細胞療法への展開

岡田直貴

Design and Creation of Cytomedicine for Application to Cell Therapy

Naoki OKADA

Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Nakauchi-cho,
Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received April 28, 2005)

Cells, which are the basic unit of life, are the most intelligent particles on earth. Recent advances in life science research encourage the development of cell therapy utilizing specialized functions of highly differentiated cells, the self-renewal and differentiation abilities of stem cells, and signal networks among various types of cells. Although cell therapy including *ex vivo* gene therapy, cellular immunotherapy, and regenerative therapy is expected to become the next generation of medical care for intractable disorders, the establishment of technology to prepare cells as medical supplies, namely, cytomedicine, is essential for the assurance of efficacy and safety in cell therapy. This review introduces our approach to the design and creation of cytomedicine for application to cell therapy against diabetes mellitus and cancer.

Key words—cytomedicine; cell therapy; APA-microencapsulation; dendritic cell-based immunotherapy; cell delivery systems

1. はじめに

生命体の基本単位である細胞は地球上で最もインテリジェントな粒子であり、機能的・形態的に異なる様々な細胞の有機的連関によって生命体の恒常性は形成維持されている。近年の生命科学の目覚ましい進展は、細胞間の協調的な増殖・分化制御機構や数多くの情報伝達ネットワークの詳細を解明し、細胞が本来的に有する種々の機能を利用した次世代医療システム、すなわち細胞療法の開発を推進する原動力となった。例えば免疫応答の制御機構に関する知見は、各免疫細胞サブセットの機能・役割を特定するとともに、それらの投与による免疫反応調節に基づいて癌や免疫疾患の治療を達成しようとする細胞免疫療法へと展開された。また、昨今注目を集めている再生医療の発展が、胚性幹細胞・組織幹細胞の発見とそれらの特性解析に大きく依存していることは言うまでもない。一方、薬剤学的観点から細胞療法を眺めてみると、細胞を医薬品化するための創剤

テクノロジーの確立が細胞療法の有効性並びに安全性を保証する上で不可欠であることに気付かされる。また、機能粒子素材・製剤素材として捉えた細胞の機能増強や細胞への新たな機能付与を行うためには、遺伝子導入法など細胞への物質送達技術（創薬テクノロジー）の開発・最適化も必要とされる。

本稿では、様々な分野の基盤技術に立脚した細胞性製剤の設計・創製に関する筆者らの取り組みを紹介するとともに、創製した細胞性製剤による細胞療法（次世代型薬物療法・ワクチン療法）の有用性及び将来性について概説する。

2. 細胞の DDS (Drug Delivery System) 的機能を基盤とする細胞療法

薬物治療の有効性、安全性及び信頼性に高い保証を与えると言う観点から、リポソームやマイクロカプセルあるいはナノパーティクル等を利用することで薬物徐放性等の機能を付与した DDS 製剤の開発が盛んに行われている。一方で、生命体を構成する細胞は厳密な時間的・空間的制御のもと、生体内外の刺激に反応してホルモンやサイトカインを始めとする生理活性物質を合成・分泌し、恒常性維持に最適な機能を発揮している。生理活性物質を薬物に見立てた場合、これはまさに「必要な時に、必要な場

京都薬科大学 (〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5 番地)

e-mail: okada@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

所で、必要な量の薬物を作用させる」ことを目的とした DDS を具現化したものであり、機能性・合理性と言う面から眺めると細胞は最も優れた DDS 粒子と言えよう。すなわち、内外環境の変化を察知（センサー機能）し、この変化に反応して生理活性物質を生合成・分泌（徐放機能）する細胞の能力を利用した細胞性製剤こそ究極の徐放化 DDS 製剤となり得る。

しかし、生体は生物学的な自己を識別する免疫系を高度に進化させ生体防御の中心的システムとしているため、同種異系 (allogeneic) あるいは異種 (xenogeneic) の機能性細胞を生体に直接投与すると、たちまちホストの免疫系により細胞性製剤は拒絶され短期間でその機能を失うことは必至である。また、例え自己由来 (autologous) 細胞を利用した場合においてさえ、遺伝子工学的・細胞工学的修飾が施されたことによる抗原性発現の可能性は否定できない。さらに、ホストと遺伝学的及び免疫学的に近縁な樹立化細胞 (cell line) を利用した場合には腫瘍原性も大きな問題となる。したがって、生理活性物質 (薬) の徐放機能を有する細胞性製剤を安定に機能させるためには、生体防御機構に不可欠な免疫系に影響を与えることなく、生体内で非自己の機

能性細胞を長期間生存させると言う矛盾した問題を解決しなければならず、その上で安全性をも考慮に入れた粒子設計が要求される。

2-1. マイクロカプセル型細胞性製剤の設計・創製
本観点から筆者らは、半透性の高分子物質を用いて機能性細胞を包括固定化し、物理的バリアーによって機能性細胞を宿主免疫系から隔離することで、生体内で長期間に渡って生理活性物質を分泌する細胞性製剤の開発が可能になると考えた (Fig. 1).¹⁻⁹⁾ この戦略に応用する高分子担体 (マイクロビーズ, マイクロカプセル) は、内部に封入した機能性細胞の生存・増殖・機能発現に不可欠な酸素/二酸化炭素のガス交換や栄養物/老廃物の透過を制限することなく、封入細胞が産生・分泌する生理活性物質を外部へ自由に透過させ、封入細胞の外部への漏出と宿主免疫細胞の内部への侵入をと同時に遮断する機能を有していなければならない。さらに、封入細胞への毒性・傷害性を示さず、生体内で分解を受けることなく長期間安定に存在し、生体適合性にも優れる等の条件を併せ持つ必要がある。

これらの条件を踏まえて筆者らは、アルギン酸とポリリジンからなる APA マイクロカプセルが免疫隔離能を付与した細胞性 DDS 製剤の設計・創製に

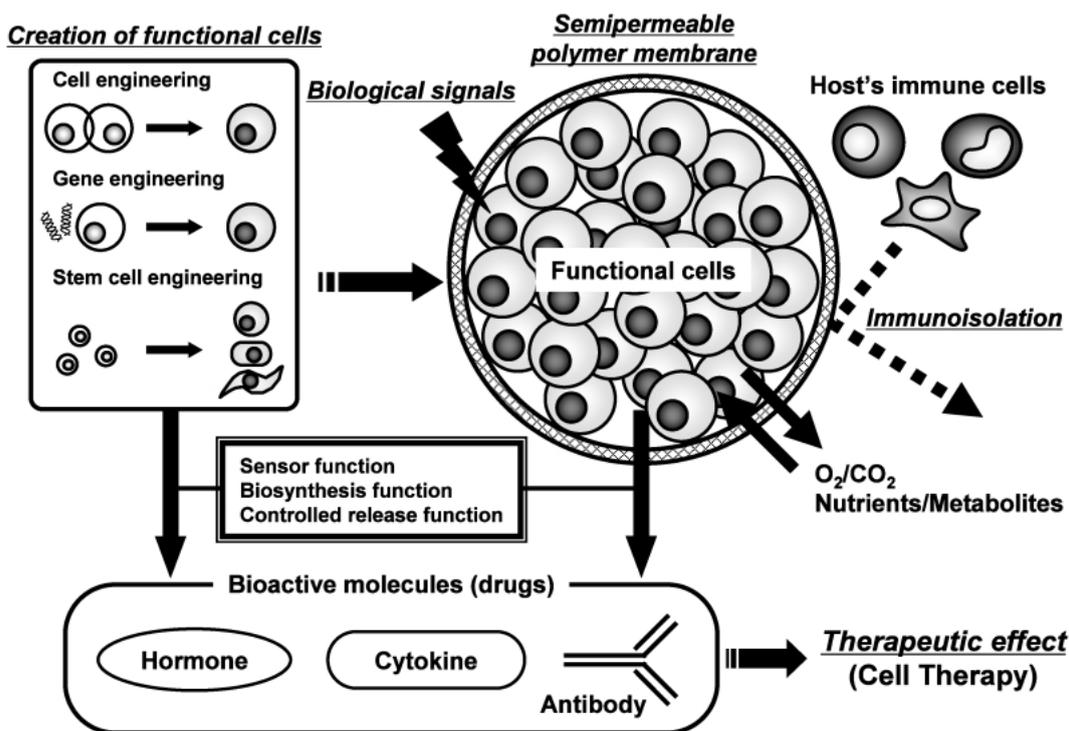


Fig. 1. A Conceptual Representation of Microencapsulation-based Cytomedicine to Apply DDS-function of Cells to Cell Therapy

優れた高分子担体であることを見出した。²⁻⁶⁾ アルギン酸はマンヌロン酸とグルロン酸からなるポリアニオンであり、グルロン酸がカルシウムイオンやアルミニウムイオンなどの2価・3価カチオンとキレート結合することによりゲル化する。したがって、アルギン酸溶液を塩化カルシウム溶液に滴下するだけで容易に固定化粒子が得られる。しかしながら、このアルギン酸マイクロビーズは培養液中あるいは生体内に存在する負荷電のリン酸イオン等によりキレート結合が解かれるとゲルが崩壊してしまう。この欠点を克服したのが APA マイクロカプセルである。上記の方法で作製したアルギン酸マイクロビーズをポリカチオンであるポリリジンの溶液に浸漬すると、静電的相互作用によりアルギン酸ゲル表面に強固なアルギン酸-ポリリジン膜を形成する。さらにこれをアルギン酸溶液に浸すことでポリリジンの過剰な正荷電を中和し、アルギン酸-ポリリジン-アルギン酸 (APA) の三層膜を形成させる。最後に、物質移動抵抗を低減させるとともに封入細胞の増殖スペースを拡大するために、クエン酸溶液に浸漬して内部のアルギン酸ゲル部分のキレート結合を解離させて APA マイクロカプセルとする。APA マイクロカプセルの粒子径・膜厚・膜強度・物質透過性は、調製に用いるポリリジンの分子量・濃度及びアルギン酸マイクロビーズをポリリジン溶液とアルギン酸溶液に浸漬する回数によって調節することが可能であり、①封入した機能性細胞が分泌する生理活性物質(薬)の分子サイズ、②封入細胞と宿主との遺伝学的・免疫学的背景の組み合わせにより要求される免疫隔離性、などの条件に併せて最適化することができる。このうち Fig. 2 に示すようなポリリジン(平均分子量: 22400)溶液とアルギン酸溶液に2回ずつ浸漬して調製した APA マイクロカプセルについて、封入細胞の生存性・生体内安定性・生体適合性並びに免疫隔離能を評価した。

APA マイクロカプセル内の細胞は *in vitro* 培養系において長期間培養することが可能であり、封入操作等による細胞傷害性は認められず、かつ生理活性物質の分泌機能も正常に保持されていた。^{2,6)} また、APA マイクロカプセルをマウスの腹腔内に投与したところ、投与後 90 日目においても投与量のほぼすべてを回収することが可能であり、それら APA

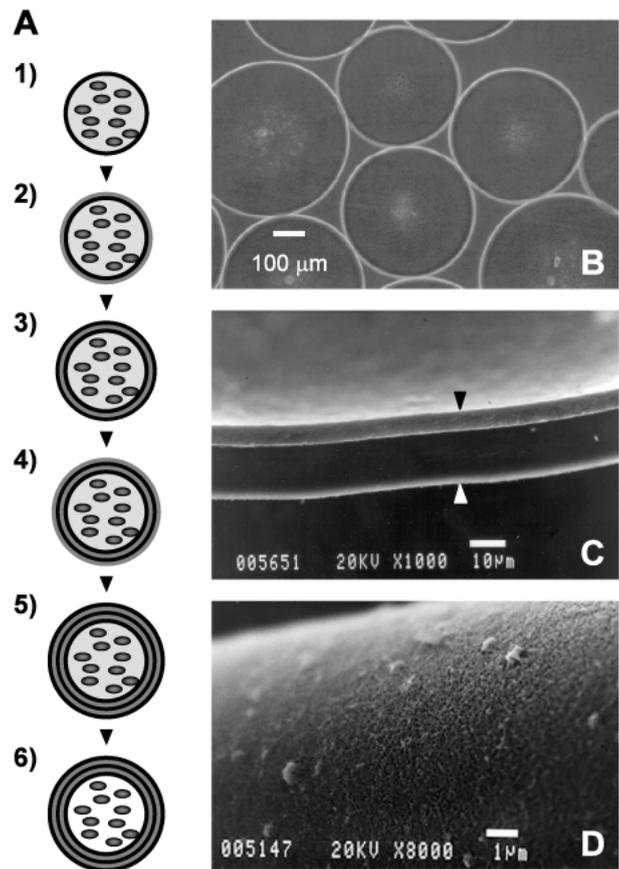


Fig. 2. Preparation Procedures (A) and Structure (B-D) of APA Microcapsules

(A): 1) Cell suspension with 1.8 (w/v) % sodium alginate/saline was extruded through a 22-gauge needle with an air jet into 100 mM CaCl_2 solution to form calcium alginate gel microbeads. 2) The microbeads were immersed into 0.1 (w/v) % poly(L)lysine/saline for 10 min to cross-link the negatively charged their surface with polycations. 3) After washed with saline, the microbeads were suspended in 0.03 (w/v) % sodium alginate/saline for 4 min. 4) and 5) To create a thicker membrane, the microbeads were resuspended in 0.1 (w/v) % poly(L)lysine/saline followed by 0.03 (w/v) % sodium alginate/saline using the same protocol as described above. 6) After washing, the microbeads were suspended in 55 mM sodium citrate for 5 min, then thoroughly washed with saline to remove excess citrate and liquefied alginate. (B): Empty APA microcapsules were photographed under phase contrast microscope. The diameter of the APA microcapsules was 400–600 μm . (C): A scanning electron microscopic image of the APA membrane section. Midpoint between two arrowheads shows thickness of APA membrane. (D): APA microcapsules under a scanning electron microscope revealed a smooth surface.

マイクロカプセル表面における fibrosis や投与に伴う腹水貯留・腹腔内への炎症細胞浸潤等の所見は認められなかった。⁶⁾ さらに、封入細胞と allogeneic な関係のマウスに投与した APA マイクロカプセルは、封入細胞に対する宿主免疫応答の誘導を抑制し、あらかじめ封入細胞に対する特異的免疫を成立させた宿主内においてさえ、封入細胞の形態・機能を正常に維持することができた。⁴⁾ これらの結果は、APA マイクロカプセルが、①細胞傷害性や起炎性

がないこと, ②細胞封入操作において過激な反応条件を伴わず操作が短時間で完了すること, ③物理的・化学的に安定であり, 生体内で容易に分解・破壊されないこと, ④物質の透過が制御可能であること, ⑤免疫反応による傷害から封入細胞を保護できること, 等の細胞性製剤を創製する上で備えるべき条件を満足する担体であることを示している。

2-2. 膵β細胞株封入 APA マイクロカプセルの糖尿病治療への応用 膵β細胞は血中のグルコース濃度を感知し, 必要量のインスリンを分泌することで血糖値を定常域に維持している。この膵β細胞が自己免疫疾患等により破壊され, 正常なインスリン分泌が行われず高血糖に陥る疾患が I 型糖尿病であり, 患者は生涯に渡りインスリン投与を必要とする。インスリンペンの登場によって頻回投与が簡便になったとは言え, 本治療法による血糖値コントロールは患者のコンプライアンスに依存しており, 糖尿病合併症やインスリン過剰投与による低血糖症の誘発と言う危険性を孕んでいる。したがって, I 型糖尿病における理想的なインスリン療法を達成するためには, 患者の負担を軽減し, 厳密かつ自動的に血糖値をコントロールし得る製剤の開発が切望されている。

近年, 膵β細胞のグルコース応答性インスリン分泌機構の解明が進められ, それらの研究の中で正常なグルコースセンサー機能を有する数種の膵β細胞株が樹立された。これらの膵β細胞株は, 培養維持の簡便性や大量調製が可能であるなど, 細胞性製剤の素材として利用するための大きなメリットを有している。そこで筆者らは, C57BL/6 マウス由来膵β細胞株である MIN6 細胞を APA マイクロカプセルに封入した細胞性製剤 (APA-MIN6) を創製し, その I 型糖尿病治療における有用性を評価した。⁶⁾ まず, APA-MIN6 の機能及び特性を *in vitro* 培養系で検討したところ, APA マイクロカプセル内で MIN6 細胞は良好な増殖を示し, 少なくとも 3 ヶ月間に渡って生存していることが明らかとなった。また, 種々の濃度のグルコースを含む緩衝液中において APA-MIN6 のインスリン分泌プロファイルを解析した結果, 生理的な血中グルコース濃度以下においては APA-MIN6 からインスリンはほとんど分泌されず, 正常血糖値を超えた範囲で初めて大幅なインスリン分泌亢進が観察された (Fig.

3)。この APA-MIN6 によるグルコース応答性インスリン分泌機能は, APA マイクロカプセルに封入していない MIN6 細胞における分泌機能と同等であり, APA マイクロカプセルへの封入操作が MIN6 細胞の機能特性に影響を与えないことを示している。

そこで次に, ストレプトゾトシンを投与することによって I 型糖尿病を誘発した BALB/c マウスに APA-MIN6 を腹腔内投与し, 経日的に血糖値をモニタリングすることにより APA-MIN6 の細胞性製剤としての有効性を検証した (Fig. 4)。血糖値が 400 mg/dl 以上を示す糖尿病マウスに APA-MIN6 を投与した場合, 投与後 4 日目には血糖値が正常値にまで低下し, 宿主と細胞性製剤が *allogeneic* な関係であるにも関わらず, わずか 1 回の投与で 2 ヶ月以上に渡って正常血糖値を維持することができた。またこの間, 低血糖症を示す個体は認められず, APA-MIN6 投与後 4 日目までの高血糖状態においては血中に高濃度のインスリンが検出されたが, 正常血糖値に到達した後の血中インスリン濃度は正常マウスと同等の約 1 ng/ml に維持されていた。さらに, 経口糖負荷試験における正常マウスと APA-MIN6 投与マウスの血中インスリン濃度推移を比較したところ, 糖負荷後の血中インスリン濃度の上昇

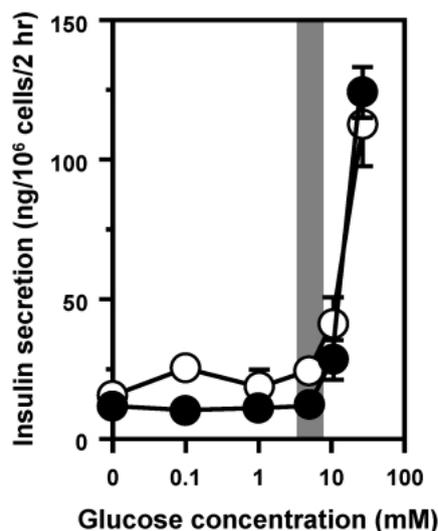


Fig. 3. Glucose-stimulated Insulin Secretion from MIN6 Cells and APA-MIN6 *In vitro*

MIN6 cells (○) or APA-MIN6 (●) were incubated for 2 h in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing glucose at various concentrations. Supernatants were collected and measured for insulin by ELISA. A gray range in the panel expresses physiological blood glucose level.

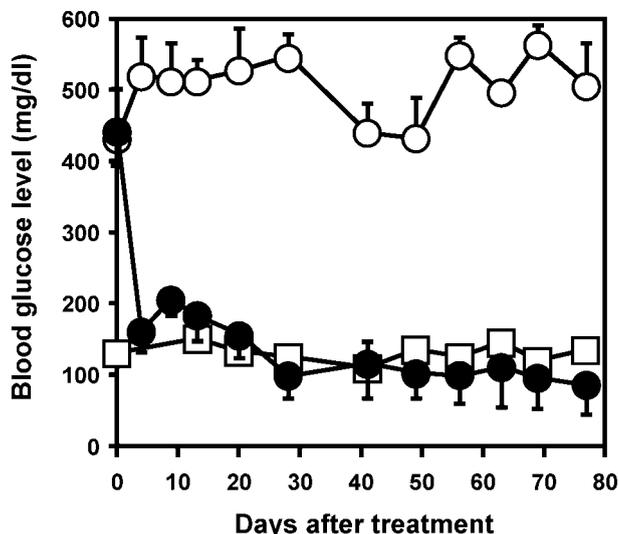


Fig. 4. Blood Glucose Level of Diabetic Mice Injected with APA-MIN6

APA-MIN6 containing 5×10^6 MIN6 cells (H-2^b) was intraperitoneally injected into BALB/c mice (H-2^d) with streptozotocin-induced diabetes. Blood glucose levels of normal (□) and diabetic mice (○), and of diabetic mice injected with APA-MIN6 (●) were measured by Glucose CII Test WAKO.

並びに血糖値低下に伴った減少が同様のパターンを示したことから、APA-MIN6は allogeneic な宿主体内においても正常なグルコース応答性インスリン分泌機能を保持していることが実証された。

以上に紹介した筆者らの成果は、細胞に備わった(あるいは付与した)DDS的機能を薬物治療へと展開できる可能性を示した好例であり、今後マイクロカプセル型細胞性製剤の免疫隔離性並びに安全性をさらに高める技術の蓄積によって、将来的には非自己の機能性細胞を免疫学的な壁を越えて応用可能な細胞療法の実現に結び付くものと期待している。

3. 遺伝子導入による細胞への機能付与を基盤とする細胞療法

細胞の分離・加工・培養技術が進歩したことにより、樹状細胞(DC)・T細胞などを用いた細胞免疫療法や、胚性幹細胞(ES細胞)・組織幹細胞を用いた再生医療が、難治性疾患に対する次世代治療戦略として注目を集めている。これらの細胞療法に使用する細胞性製剤は主として患者自身から分離した細胞を素材とするが、そのままの状態で生体に投与して疾病治療に有効であるケースは稀であり、増殖因子・分化因子による細胞の大量調製や分化制御はもちろんのこと、遺伝子・タンパク質等の細胞内送達によって機能の付与あるいは最適化を図るといった

細胞加工技術が必要とされる。

細胞への物質導入について水口らは、センダイウイルス由来のエンベロープタンパクを表面に有する膜融合リポソームを開発し、核酸・タンパク質・ペプチドに留まらずナノ粒子と言ったりリポソームに封入可能な物質であれば、ほぼすべての動物細胞へ効率よく導入できることを報告している。¹⁰⁻¹⁴⁾ 本技術は膜融合リポソームが細胞膜と融合することによって封入物質を細胞質内へ直接送達できることから、エンドサイトーシスを介して取り込まれる経路と異なり導入物質のエンドソーム/リソソーム系による分解を回避しつつ、さらには細胞内での物質徐放や細胞内オルガネラへの選択的物質送達をも達成できる可能性を秘めた細胞加工技術として有望である。^{13,14)} 一方、遺伝子治療研究におけるベクター技術の進展に伴って、これまで十分な外来遺伝子発現を誘導することが困難とされてきたある種の癌細胞、血球系細胞及び幹細胞への効率的な遺伝子導入を可能とする新規ベクターシステムが開発されてきた。今後、これらの基盤技術の応用によって新たに創製された機能性細胞の細胞療法への展開が飛躍的に拡充していくものと思われ、その一例として筆者らが進めている遺伝子改変DCの創製とその癌免疫療法への応用に関するアプローチを以下に紹介する。

3-1. DCへの遺伝子導入システムの構築

癌に対する免疫応答を細胞・分子レベルで解析する腫瘍免疫学の進展は、遺伝子変異を蓄積した癌細胞が質的・量的に正常細胞とは異なる分子を発現しており、これら腫瘍関連抗原(TAA)と呼ばれる分子に対する免疫監視機構が初期癌細胞の排除と言う生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかとした。しかし、癌細胞は本来的には自己の細胞であり、外界から侵入してくる異物(非自己)と比較すると免疫原性は非常に微弱であることから、免疫監視機構を潜り抜けて増殖・転移した癌細胞は生体機能を侵蝕することとなる。また、癌細胞自身が分泌する液性因子によって免疫機能が破綻を来すことも知られており、腫瘍として発見された疾患状態を生来の免疫力のみで回復させることは困難である。したがって、癌に対する免疫療法研究においては、患者の免疫系に癌細胞の特徴(正常細胞との差異)を増幅して効率よく認識させることのできるアジュバントの開発が極めて重要である。

近年、免疫系を構成する細胞の機能解明が急速に進んだことによって、DCがT細胞依存性の獲得免疫応答の始動及び増幅、さらには自然免疫応答の制御をも含めて、免疫監視機構を多方面から統御する抗原提示細胞であることが明らかとなり、癌や感染症を対象とした免疫療法開発における標的細胞として注目を集めている。骨髄幹細胞に由来するDCは未熟な状態で生体内に広く分布しており、旺盛な貪食能によって外界から侵入してきた病原体あるいは癌細胞やウイルス感染細胞の断片を捕食する。抗原を細胞内に取り込んだDCは成熟し、細胞表面に主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子・共刺激分子と言った抗原提示に必要な機能分子の発現を高めるとともに、取り込んだ抗原をMHC class I及びclass II分子とともに細胞表面に提示可能なペプチドにまでプロセッシングする。さらに、輸入リンパ管や血管を介して最寄りのリンパ組織へと遊走し、リンパ組織に存在するナイーブT細胞へ抗原提示することにより、抗原特異的T細胞依存性の初期免疫

応答を惹起する (Fig. 5).^{15,16)} このような免疫学的特性に基づいて、TAAを導入したDCを“nature’s adjuvant”として利用する細胞免疫療法が有望な新規癌治療戦略として活発に研究されており、DCの腫瘍免疫誘導能を最大限に発揮させる方法論の探索が進められている。¹⁷⁾ なかでも、生体に投与するDCへの効率のよいTAAデリバリー法の確立は、DC免疫療法の有効性に直結する重要な検討課題であり、持続的なTAA供給を可能とする観点から、DCへのTAA遺伝子導入は非常に魅力的なアプローチである。しかし、従来のいかなる遺伝子導入法によってもDCへの遺伝子導入効率は極めて低く、広範な種類の細胞・組織に最も効率よく遺伝子導入可能とされるアデノウイルス(Ad)バクターを用いてさえ、DCに外来遺伝子を十分に発現させることは困難とされてきた。¹⁸⁾ したがって、TAA遺伝子を導入したDCによる有効な癌免疫療法を開発するためには、細胞傷害性を示すことなく高い効率でDCに遺伝子導入できる新規バクターシステム

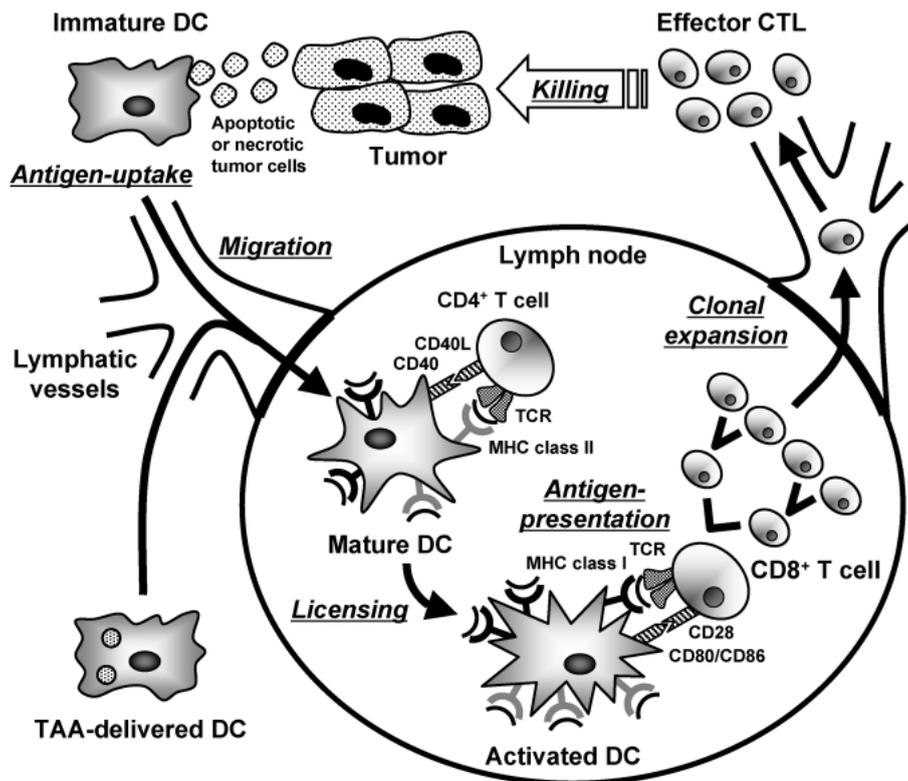


Fig. 5. A Schematic Representation of Roles of DCs for Induction of T Cell-dependent Tumor Immunity

Apoptotic or necrotic tumor cells containing TAAs are captured by immature DCs in tumor tissue and processed to form MHC-antigenic peptide complexes. As a consequence of antigen deposition and inflammation, DCs begin to mature, expressing large amounts of MHC-peptide complexes on their surface. Additionally, they up-regulate costimulatory molecules and migrate to regional lymph node where they prime and activate antigen-specific T cells. Clonally expanded CTLs distribute to peripheral tissues through lymph vessels and blood, and eliminate tumor cells by perforin-granzyme dependent manner or Fas-FasL death signaling pathway in tumor tissue. DC-based cancer immunotherapy is aimed for amplification of these serial immune reactions by administration of TAA-delivered DCs.

の開発が急務であった。

本観点から筆者らは、カチオニックリポソーム、膜融合リポソーム、細胞膜透過ペプチド、Ad ベクター等を利用した DC への遺伝子送達技術の最適化を試みた。¹⁹⁻²¹⁾ その結果、 α_v -integrin に親和性を有する RGD (Arg-Gly-Asp) 配列をカプシドタンパク質のファイバー領域に挿入した新規 RGD ファイバーミュータントアデノウイルス (AdRGD) ベクターを用いることにより、世界に先駆けて極めて効率に優れる DC への遺伝子導入システムを構築することに成功した。^{21,22)} 現在の遺伝子治療研究や遺伝子機能解析において用いられている Ad ベクターは 2 型あるいは 5 型ヒト Ad を基本骨格とし、252 個のカプソメアからなる正 20 面体構造の 12 個の頂点にはペントン (ファイバーとペントンベースからなる) と呼ばれる突起構造が存在する。Ad ベクター

が標的細胞内に侵入するには、ファイバー先端部が細胞表面上の coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) に結合し、その後ペントンベースの RGD モチーフが $\alpha_v\beta_3$ -あるいは $\alpha_v\beta_5$ -integrin に結合する、という 2 段階の過程が必要である。^{23,24)} そこで DC におけるこれら Ad 感染受容体の発現レベルを解析したところ、CAR の発現が非常に乏しいことが DC の Ad ベクター介在性遺伝子導入に対する抵抗性の原因であり、一方 α_v -integrins は DC にも豊富に発現していることが明らかとなった。^{21,22)} 本結果に基づいて、共同研究者の水口裕之博士 (医薬基盤研究所) らが開発した簡便なファイバーミュータント Ad ベクター構築法²⁵⁻²⁷⁾ に準拠して、ファイバーの HI loop に RGD ペプチドを挿入した α_v -integrin 指向性 AdRGD ベクターを作製した (Fig. 6)。レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク

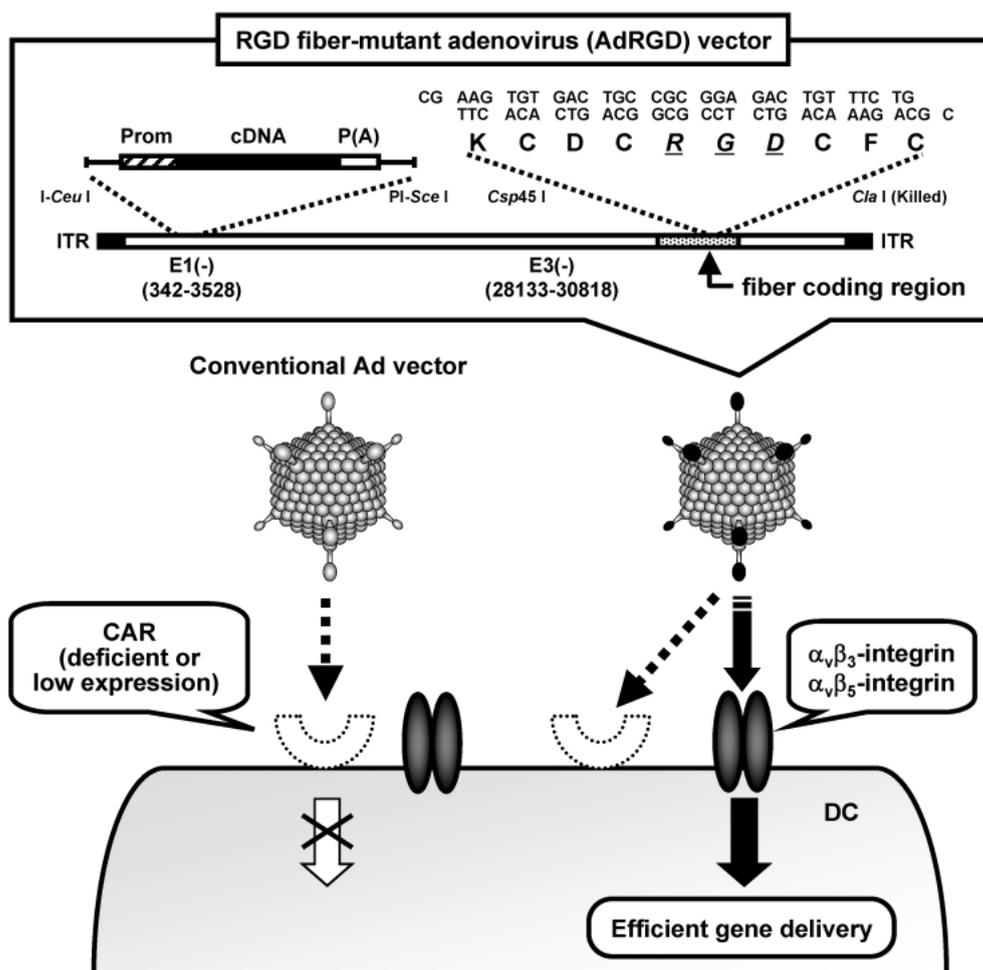


Fig. 6. A Schematic Representation of RGD Fiber-mutant Adenovirus (AdRGD) Vector
ITR: inverted terminal repeat, Prom: promoter, P(A): polyadenylation signal.

(EGFP) 遺伝子を搭載した AdRGD ベクター及び従来型 Ad ベクターをマウス骨髄由来 DC に適用したところ、従来型 Ad-EGFP では 10—15% の遺伝子導入効率しか得られない感染力価 (multiplicity of infection; MOI) において、AdRGD-EGFP は細胞傷害性を示すことなく 90% 以上の DC に外来遺伝子発現を誘導することができた (Fig. 7).²²⁾ また、ヒト末梢血単球由来 DC においても同様の結果が認められ、²¹⁾ さらに抗 α_v -integrin 抗体を用いた阻害実験により、当初の目的通り AdRGD ベクターは標的細胞への結合に α_v -integrin 指向性を有することが確認された。²⁸⁾

3-2. TAA 遺伝子導入 DC ワクチンの創製と癌免疫療法への応用 メラノーマは TAA 解析が進んでいる数少ない癌の 1 つであり、メラノサイトの分化並びにメラニン形成に關与する gp100, MART-1, tyrosinase, TRP などがメラノーマ関連抗原 (MAA) としてこれまでに同定されている。マウス及びヒトメラノーマで構成的に過剰発現している gp100 は、高い免疫原性を有することからヒトを対

象とした特異的免疫療法における重要な標的分子と考えられており、MHC class I 分子上に提示される gp100 ペプチドを用いた癌免疫療法の第 I / II 相臨床試験が既に試みられている。また、gp100 を含めた MAA を標的とする癌免疫療法の前臨床試験には、ほとんどのヒト MAA homolog を発現しているマウス B16 メラノーマモデルが広く用いられている。

そこで、DC への遺伝子導入効率における AdRGD ベクターの優位性が、TAA を標的とした DC 免疫療法の有効性向上に反映されるのかについて検討した。まず、AdRGD ベクターにより抗原遺伝子を導入した DC の免疫学的機能を *in vitro* 培養系で精査したところ、T 細胞に対する抗原提示能及び増殖刺激能ともに従来型 Ad ベクターを適用した DC と比較して大幅に改善されていることが判明した。^{21,22,29,30)} 次に、AdRGD ベクターあるいは従来型 Ad ベクターにより gp100 遺伝子を導入した DC (AdRGD-gp100/DC 及び Ad-gp100/DC) をマウスにワクチン接種し、その後攻撃接種した B16BL6 メラノーマに対する増殖抑制効果を比較した (Fig. 8).³⁰⁾ コントロールベクターである AdRGD-Null を適用した DC (AdRGD-Null/DC) を投与したマ

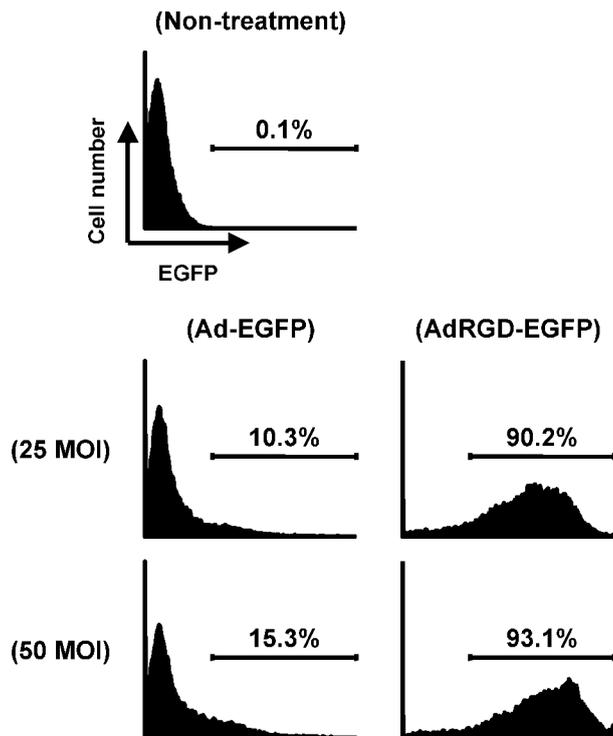


Fig. 7. EGFP Expression in Murine DCs Transduced with EGFP cDNA by AdRGD or Conventional Ad Vector

DCs were transfected for 2 h with Ad-EGFP or AdRGD-EGFP at 25 or 50 MOI. Two days later, EGFP expression in cells was evaluated by flow cytometric analysis. The % value expresses % of EGFP-positive DCs.

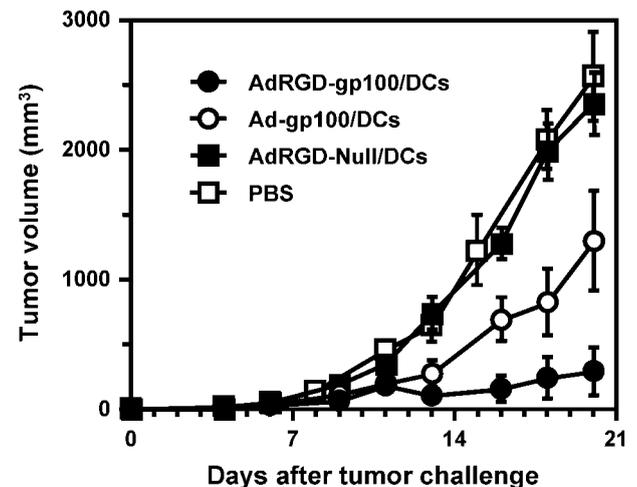


Fig. 8. Vaccine Efficacy of DCs Transduced with gp100 cDNA by AdRGD or Conventional Ad Vector against B16BL6 Melanoma Challenge

AdRGD-gp100/DCs, Ad-gp100/DCs, and AdRGD-Null/DCs were prepared using corresponding vectors at 50 MOI. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs into the right flank at 10^6 cells, and then 2×10^5 B16BL6 melanoma cells were inoculated into the mouse left flank after 1 week post-vaccination. The size of tumors was assessed using microcalipers three times per week, and the tumor volume was calculated by the following formula: (tumor volume; mm^3) = (major axis; mm) \times (minor axis; mm)² \times 0.5236.

ウスでは、vehicle 投与群と比較して腫瘍増殖抑制効果は全く認められなかったが、Ad-gp100/DC 投与群においては明らかな腫瘍増殖の遅延が観察された。さらに AdRGD-gp100/DC 投与群では、攻撃接種した B16BL6 腫瘍の増殖をより強力に抑制し、6 例中 4 例で腫瘍の完全拒絶が達成された。また、AdRGD-gp100/DC あるいは Ad-gp100/DC 投与による B16BL6 肺転移抑制効果を比較したところ、ワクチンプロトコール（DC 投与 1 週間後に B16BL6 細胞を尾静脈内投与）及び治療プロトコール（B16BL6 細胞を尾静脈内投与後、DC を 3 回投与）のいずれにおいても AdRGD-gp100/DC 投与群でより顕著な肺転移結節数の減少を認めた。³⁰⁾ これらの抗腫瘍効果に関与する免疫エフェクター細胞は、*in vivo* depletion assay の結果から CD8⁺T 細胞であることが明らかとなり、さらに AdRGD-gp100/DC をワクチン投与したマウスの脾細胞中には、Ad-gp100/DC 投与群よりも高い B16BL6 特異的傷害活性が検出されたことから、AdRGD-gp100/DC が効率よく腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化並びに増幅を誘導したことが実証された。³⁰⁾

これらの結果は、AdRGD ベクターを応用した TAA 遺伝子導入 DC ワクチンの創製が、これまで DC に対する低い TAA 導入効率によって制限されていた DC 癌免疫療法の有効性を飛躍的に改善できることを示すものである。また、AdRGD ベクターシステムは DC への抗原遺伝子デリバリーのみならず、従来の遺伝子導入法では困難とされてきた種々の機能修飾を目的とする遺伝子改変 DC の創製をも可能とする。^{31,32)} したがって、AdRGD ベクターを用いた DC への効率的な遺伝子導入は、臨床的に最適な DC ワクチンを設計・開発するためのブレークスルー的な手法になり得ると期待される。

4. 免疫細胞の体内動態制御を基盤とする細胞療法

細胞療法の有効性及び安全性を確保・向上するためには、生体に投与した細胞性製剤並びに細胞性製剤によって情報伝達された細胞を「必要な時に、必要な場所に、必要な量」送達できる“Cell Delivery System”とも言うべき新たな概念・方法論の確立が必要とされる (Fig. 9)。しかし、生体を構成する約 60 兆個の細胞の秩序を保った移動・分布・配列

等を制御する巧妙な仕組みに関する知見はいまだ乏しく、Cell Delivery System の構築へと展開できる基礎情報並びに基盤技術は限られている。現時点で Cell Delivery System への応用に最も利用価値の高い生命現象は、ケモカイン-ケモカインレセプター連関に基づいた免疫細胞の局所への遊走・浸潤制御機構であろう。

ケモカインは 8—14 kDa 程度の塩基性・ヘパリン結合性分泌タンパク群であり、種々の細胞接着分子と協調して炎症反応やリンパ球のホーミングを制御している。³³⁾ 現在、ヒトでは約 50 種類のケモカインが同定されており、それらは保存された 4 つのシステイン残基のうち N 末端の 2 個のシステインの位置から C ケモカイン、CC ケモカイン、CXC ケモカイン、及び CX3C ケモカインの 4 つのサブグループに分類されるスーパーファミリーを形成している。³⁴⁾ また、すべてのケモカインは 7 回膜貫通 G タンパク質共役型レセプターを介して作用し、同定されている約 20 種類のケモカインレセプターもスーパーファミリーを構築している。^{35,36)} ケモカインは当初、好中球や単球を遊走させるサイトカインの一群として発見され、主に炎症での役割が研究されてきた。これら炎症性ケモカインに対して、1990 年代後半より、バイオインフォマティクスを駆使して EST データベースを検索するという手法によって新しいケモカインが次々と発見され、リンパ球や DC などを標的細胞とする免疫系ケモカインの存在が明らかとなった。これによって、免疫細胞の生体内での移動や局在の制御機構に関する理解が急速に進展するとともに、ケモカイン-ケモカインレセプター連関を応用することによって免疫細胞の体内動態・体内分布を制御し得る新たな癌免疫療法の開発に足掛かりができた。

前述の通り AdRGD ベクターによる DC 遺伝子修飾法は、DC への効率のよい TAA 遺伝子デリバリーはもとより、DC に機能分子を強制発現させることでこれまでにない強力な DC ワクチン（細胞性製剤）の創製とその実証的解析を可能とする。このコンセプトに基づいて筆者らは、ケモカイン遺伝子あるいはケモカインレセプター遺伝子を搭載した AdRGD ベクターを応用することにより、生体に投与する DC ワクチン自身及び DC ワクチンに応答する免疫エフェクター細胞の体内動態を操作し、より

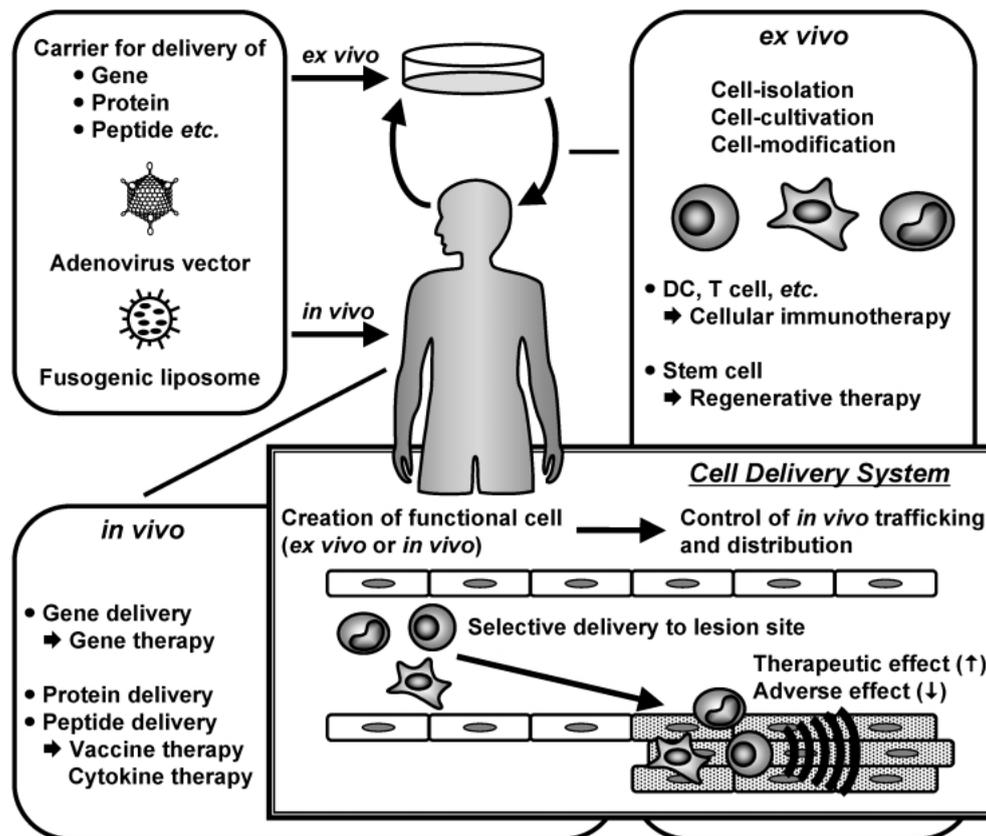


Fig. 9. “Cell Delivery System” Based on Manipulation of Cell-trafficking and Biodistribution in Cell Therapy

効果的な癌免疫遺伝子治療の開発へと発展させるという独自のアイデアを実践している。^{32,37,38)} その一例として、CCケモカインレセプター7 (CCR7) 遺伝子を導入することでリンパ組織指向性を増強したDCワクチンの創製とその癌免疫療法における有用性を紹介する。

4-1. リンパ組織指向性DCワクチンの設計・創製 生体に投与したDCワクチンは、投与部位から所属リンパ組織へ移行することによって初めてT細胞への抗原提示・感作を行い一連の初期免疫応答を惹起する。すなわち、患者に投与した抗原導入DCのリンパ組織集積性が、DC免疫療法の治療効果を規定する要因の1つとして考えられる。しかし現在のDC免疫療法では、投与部位からリンパ組織に移行させるための最適なDCコンディショニングについて十分な検討がなされていないため、投与DCワクチンのうちリンパ組織に集積するものはわずか0.1—1%程度とされている。^{39—41)} したがって、生体に投与するDCに高いリンパ組織移行能を付与することができれば、リンパ組織における免疫エフェクター細胞の活性化を増強することが可能で

あり、ひいてはDC免疫療法の有効性の飛躍的な改善に結びつくことが期待される。Gunnらは、CCケモカインリガンド21 (CCL21) の発現に欠損がある *plt/plt* マウスにおいて、DCの2次リンパ組織への遊走が阻害されることを報告した。⁴²⁾ またFörsterらは、CCR7ノックアウトマウスにおいても同様に、DCの2次リンパ組織への遊走阻害が起こることを報告している。⁴³⁾ これらの研究によって現在では、成熟に伴ってDCに発現誘導されるCCR7と、リンパ組織やリンパ管から構成的に産生・分泌されているCCL21との連関が、DCの末梢組織からリンパ組織への遊走制御において中心的な役割を果たすというコンセンサスが得られている。したがって、抗原導入とともにCCR7を十分に発現させたDCは、生体に投与したのちに積極的にリンパ組織へと移行して免疫系を効率よく活性化できることが強く予測され、この“リンパ組織指向性DC”とも言うべき新たなワクチンの創製手段としてDCへのCCR7遺伝子導入が挙げられる (Fig. 10).³²⁾

まず、新たに構築したAdRGD-CCR7を用いて

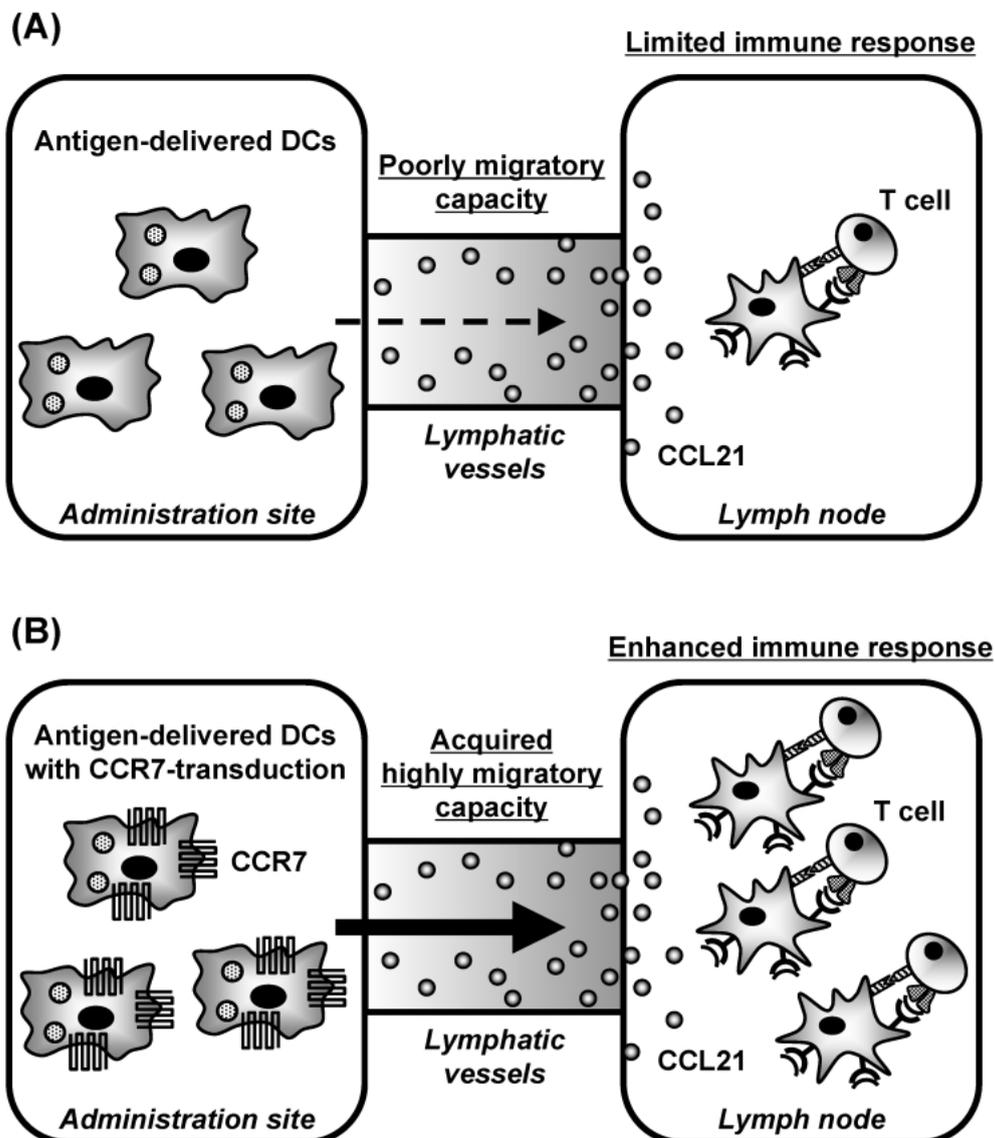


Fig. 10. A Conceptual Representation of “Lymphoid Tissue-directivity DC” Vaccine Created by CCR7 Gene-transduction

The migration of DCs from administration site to lymph node is critical for the priming of T cells in DC-based immunotherapy. However, poorly migratory capacity of antigen-delivered DCs limits the induction of potent immune response (A). On the other hand, DCs transduced efficiently with CCR7 gene may adequately respond to CCL21, which is constitutively released from lymphoid tissue, and acquire highly migratory capacity to lymph node (B). Consequently, antigen-delivered DCs with CCR7-transduction can enhance the initiation and amplification of T cell-dependent immune response.

遺伝子導入したマウス骨髄由来 DC (CCR7/DC) における CCR7 発現レベルを RT-PCR 及び flow cytometry により解析した結果、ベクター用量依存的に CCR7 mRNA の発現は増加し、50 MOI の感染力価で AdRGD-CCR7 を適用した際には 90% 以上の DC で細胞表面に豊富な CCR7 タンパク発現が確認された。また、*in vitro* chemotaxis assay において CCR7/DC は CCL21 (CCR7 のリガンド) の濃度に依存した遊走活性の上昇を示したことから、AdRGD-CCR7 を用いた遺伝子導入によって細胞膜上に発現した CCR7 タンパクは、CCL21 濃度を

感知して DC に遊走刺激を伝える本来の生物活性を保持したケモカインレセプターであることも判明した (Fig. 11 (A))。さらに、EGFP トランスジェニックマウス由来の DC から調製した CCR7/DC を野生型マウスの側腹部皮内に投与し、48 時間後における所属リンパ節 (鼠径部リンパ節) への集積性を flow cytometry 解析で検討したところ、CCR7/DC 投与群ではコントロール DC を投与した群と比較して 5—15 倍高いリンパ節への DC 集積が認められた (Fig. 11 (B))。これらの結果は、AdRGD システムを応用した DC へのケモカインレセプター遺

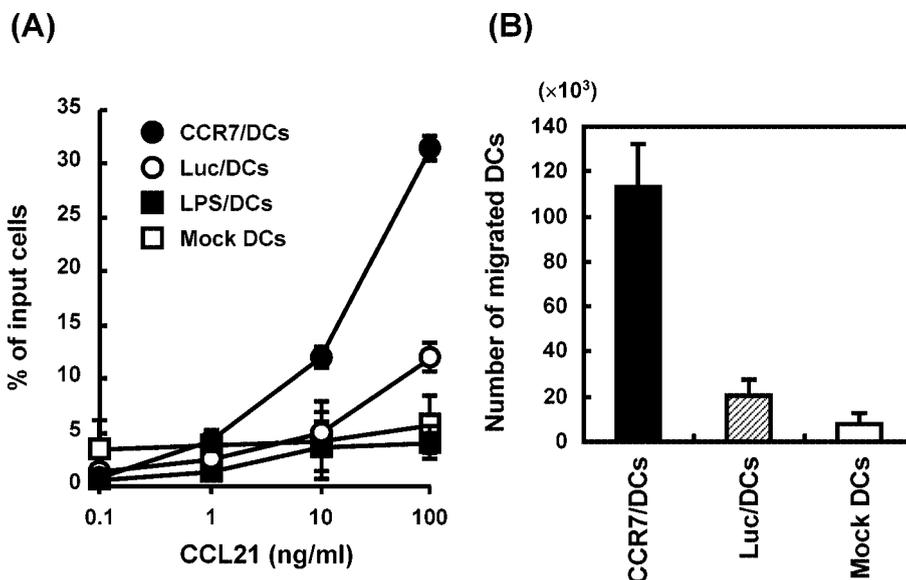


Fig. 11. *In vitro* Chemotaxis (A) and *In vivo* Migration (B) of CCR7/DCs

(A): *In vitro* chemotaxis assay was performed by a Chemotaxicell-24 installed on 24-well culture plate. CCL21 solution was added in the lower compartment at the indicated concentration, and CCR7/DCs transduced with AdRGD-CCR7 at 50 MOI, Luc/DCs transduced with AdRGD-Luc (control vector) at 50 MOI, LPS/DCs stimulated with $1 \mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide, or mock DCs were placed in the upper chamber at 10^6 cells. After 4 h-incubation, the number of cells that migrated to the lower compartment was counted. The chemotactic activity was expressed in terms of the percentage of the input cells calculated by the following formula: (% of input cells) = (the number of migrated cells) / (the number of cells placed in Chemotaxicell-24; 10^6 cells) $\times 100$. (B): DCs derived from EGFP-transgenic mice were transduced with AdRGD-CCR7 or AdRGD-Luc at 50 MOI, and then were intradermally injected into the left flank of C57BL/6 mice at 2×10^6 cells/ $50 \mu\text{l}$. Two days later, the draining inguinal lymph nodes were collected from these mice, and a single cell suspension was prepared. The abundance of EGFP-positive DCs was assessed by flow cytometric analysis acquiring 500000 events. The number of DCs that had migrated into draining lymph nodes was calculated by multiplying the EGFP-positive DC-frequency by the total number of isolated lymph node cells.

伝子の導入によって、DCのケモカイン応答性並びに生体に投与した際の体内挙動を改変できることを示している。また、CCR7/DCが*in vivo*において非常に優れたリンパ組織移行能を発揮するワクチン担体であることを示唆しており、これはDC免疫療法における効率のよい免疫エフェクター細胞の活性化と全身への迅速なエフェクター細胞の供給という面で非常に優れた利点になると考えられた。

4-2. リンパ組織指向性 DC ワクチンの癌免疫療法への応用 CCR7/DCの優れたリンパ組織集積性とDC免疫療法の有効性改善との関連性を検討するために、gp100遺伝子とCCR7遺伝子とを共導入したDC(gp100+CCR7/DC)を調製し、B16BL6腫瘍モデルにおけるワクチン機能を解析した (Fig. 12).³²⁾ Mock DCあるいはCCR7/DCを免疫投与した群と比較して、gp100遺伝子のみを導入したDC(gp100/DC)を投与したマウスにおいてはFig. 8と同様に攻撃接種したB16BL6腫瘍の顕著な増殖遅延が誘導された。またその抗腫瘍効果は、ワクチン接種するgp100/DC数に依存して増大した。一方、gp100+CCR7/DCを 2×10^5 cells/mouseで免

疫した群においては、 5×10^5 のgp100/DCを免疫したマウスと同等の抗腫瘍効果が観察され、さらに 5×10^5 cells/mouseでのgp100+CCR7/DCワクチン投与は、より強力にB16BL6腫瘍の増殖を抑制することができた。また、これらの遺伝子導入DCを投与したマウスにおけるCTL活性をEu-release assayにより比較したところ、B16BL6攻撃接種に対するワクチン効果の結果を反映して、gp100+CCR7/DCを投与したマウスの脾細胞中にはgp100/DC投与群を上回るB16BL6特異的傷害活性が検出された。したがって、DC免疫療法にTAA遺伝子とCCR7遺伝子とを共導入したDCを応用することで、従来のTAA遺伝子のみを導入したDCの適用と比較して、より少ない投与細胞数で効果的な腫瘍免疫を誘導できることが示された。

本成果は、積極的なリンパ組織移行能を付与したCCR7/DCワクチンのDC免疫療法への応用が、有効な治療効果を達成するために必要とされていたDC投与量を大幅に低減できることを示しており、①DC前駆細胞単離のために必要な患者の採血負担の軽減、②DCワクチン調製における労力・コスト

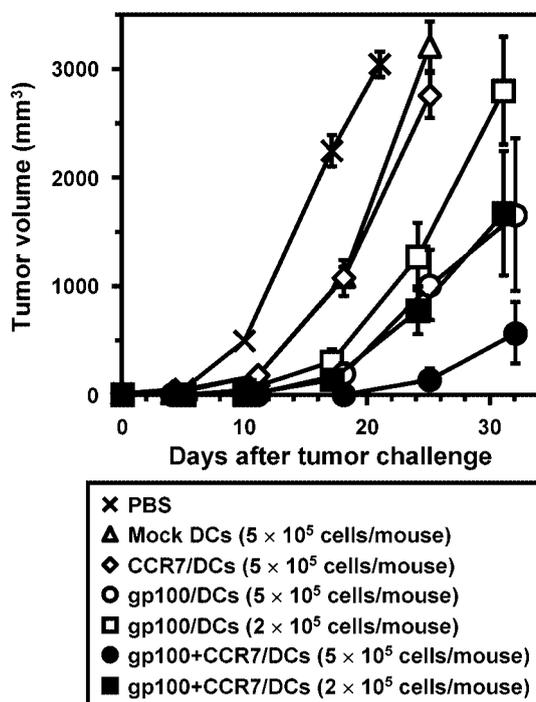


Fig. 12. Vaccine Efficacy of DCs Co-transduced with CCR7 and gp100 Gene against B16BL6 Melanoma Challenge

CCR7/DCs, gp100/DCs, and gp100+CCR7/DCs were prepared using corresponding AdRGD vectors at 25 MOI, and then cultured for 24 h. C57BL/6 mice were immunized by intradermal injection of transduced DCs or mock DCs into the left flank at the indicated cell dosage, and then 4×10^5 B16BL6 cells were inoculated into the right flank of the mice at 1 week post-vaccination. The tumor volume was assessed as described in Fig. 8 legend.

の削減，という観点から DC 免疫療法の臨床応用実現に大いに貢献するものと期待される。

5. おわりに

筆者らが推進する細胞性製剤に関する研究は，細胞が生体のホメオスタシスを維持するために営んでいる生命現象に学び，その生命現象を応用して臨床応用可能な細胞療法を開発しようとするものであり，これは病態改善・治癒を目的とした従来の輸血や臓器移植の概念・方法論を薬物治療やワクチン療法の分野へと応用・進化させたものである。米国 Drug & Market Development Publications による市場調査では，最近の幹細胞技術の進展やヒト ES 細胞の確立を受けて，細胞療法の市場が 2010 年までに 300 億ドル規模に達すると試算されている。また数多くのベンチャー企業が細胞療法の開発に参入しており，近未来的に細胞を“薬”として捉える医療システムが実現することに大きな期待が寄せられている。しかし，細胞療法はいまだ開発途上の技術であり，有効性並びに安全性を保証するためには乗り

越えなければならないハードルがいくつも残されている。目的作用を増強した機能性細胞の創製と，これら機能性細胞を“細胞性製剤”として目的的作用部位へ送達するための“Cell Delivery System”の開発が，より確かな細胞療法を実現するための一助となることを期待する。

謝辞 本研究を遂行するにあたり，御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました恩師真弓忠範先生（神戸学院大学長・大阪大学名誉教授）に心から感謝申し上げます。また有益な御助言及び多大な御支援を賜りました山本 昌先生（京都薬科大学薬剤学教室教授）並びに藤田卓也先生（京都薬科大学薬剤学教室助教授）に深謝致します。さらに，中川晋作先生（大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野教授）並びに水口裕之先生（医薬基盤研究所基盤研究部遺伝子導入制御プロジェクトプロジェクトリーダー）を始めとする共同研究者の先生方，及び実験に御協力頂きました大学院生・学生諸氏に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Okada N., Miyamoto H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *J. Control Release*, **44**, 195–200 (1997).
- 2) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Itoh N., Mizuguchi H., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1360**, 53–63 (1997).
- 3) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Katsume A., Saito H., Yorozu K., Ueda O., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 255–258 (1997).
- 4) Okada N., Miyamoto H., Yoshioka T., Sakamoto K., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**, 524–527 (1997).
- 5) Miyamoto H., Okada N., Yoshioka T., Suzuki R., Sakamoto K., Katsume A., Saito H., Tsutsumi Y., Kubo K., Nakagawa S., Ohsugi Y., Mayumi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 295–297 (1999).
- 6) Suzuki R., Okada N., Miyamoto H., Yoshio-

- ka T., Sakamoto K., Oka H., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Mayumi T., *Life Sci.*, **71**, 1717–1729 (2002).
- 7) Suzuki R., Yoshioka Y., Kitano E., Yoshioka T., Oka H., Okamoto T., Okada N., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Kitamura H., Mayumi T., *Cell Transplant.*, **11**, 787–798 (2002).
- 8) Yoshioka Y., Suzuki R., Oka H., Okada N., Okamoto T., Yoshioka T., Mukai Y., Shibata H., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Miyazaki J., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **305**, 353–358 (2003).
- 9) Yoshioka Y., Suzuki R., Okamoto T., Okada N., Mukai Y., Shibata H., Tsutsumi Y., Dohi N., Okada N., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1624**, 54–59 (2003).
- 10) Mizuguchi H., Nakagawa T., Nakanishi M., Imazu S., Nakagawa S., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 402–407 (1996).
- 11) Mizuguchi H., Nakanishi M., Nakanishi T., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 472–476 (1996).
- 12) Mizuguchi H., Nakagawa T., Toyosawa S., Nakanishi M., Imazu S., Nakanishi T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Hayakawa T., Ijuhin N., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 5725–5730 (1998).
- 13) Nakagawa S., Mayumi T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **18**, 223–229 (2003).
- 14) Kunisawa J., Masuda T., Katayama K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y., Akashi M., Mayumi T., Nakagawa S., *J. Control Release* (in press).
- 15) Banchereau J., Steinman R. M., *Nature*, **392**, 245–252 (1998).
- 16) Mellman I., Steinman R. M., *Cell*, **106**, 255–258 (2001).
- 17) Esche C., Shurin M. R., Lotze M. T., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 72–81 (1999).
- 18) Arthur J. F., Butterfield L. H., Roth M. D., Bui L. A., Kiertscher S. M., Lau R., Dubinett S., Glaspy J., McBride W. H., Economou J. S., *Cancer Gene Ther.*, **4**, 17–25 (1997).
- 19) Okada N., Saito T., Mori K., Masunaga Y., Fujii Y., Fujita J., Fujimoto K., Nakanishi T., Tanaka K., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1527**, 97–101 (2001).
- 20) Okada N., Tsujino M., Hagiwara Y., Tada A., Tamura Y., Mori K., Saito T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Br. J. Cancer*, **84**, 1564–1570 (2001).
- 21) Okada N., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Saito T., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173–179 (2001).
- 22) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Iiyama S., Mori N., Tsuda T., Matsubara A., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421–431 (2003).
- 23) Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A., Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L., Finberg R. W., *Science*, **275**, 1320–1323 (1997).
- 24) Wickham T. J., Mathias P., Cheres D. A., Nemerow G. R., *Cell*, **73**, 309–319 (1993).
- 25) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2577–2583 (1998).
- 26) Mizuguchi H., Kay M. A., *Hum. Gene Ther.*, **10**, 2013–2017 (1999).
- 27) Mizuguchi H., Koizumi N., Hosono T., Utoguchi N., Watanabe Y., Kay M. A., Hayakawa T., *Gene Ther.*, **8**, 730–735 (2001).
- 28) Okada Y., Okada N., Nakagawa S., Mizuguchi H., Takahashi K., Mizuno N., Fujita T., Yamamoto A., Hayakawa T., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 436–444 (2002).
- 29) Okada N., Saito T., Masunaga Y., Tsukada Y., Nakagawa S., Mizuguchi H., Mori K., Okada Y., Fujita T., Hayakawa T., Mayumi T., Yamamoto A., *Cancer Res.*, **61**, 7913–7919 (2001).
- 30) Okada N., Masunaga Y., Okada Y., Mizuguchi H., Iiyama S., Mori N., Sasaki A., Nakagawa S., Mayumi T., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **10**, 1891–1902 (2003).
- 31) Okada N., Iiyama S., Okada Y., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Cancer Gene Ther.*, **12**, 72–83 (2005).
- 32) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H.,

- Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A., *Gene Ther.*, **12**, 129–139 (2005).
- 33) Yoshie O., Imai T., Nomiya H., *Adv. Immunol.*, **78**, 57–110 (2001).
- 34) Zlotnik A., Yoshie O., *Immunity*, **12**, 121–127 (2000).
- 35) Bokoch G. M., *Blood*, **86**, 1649–1660 (1995).
- 36) Murphy P. M., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 593–633 (1994).
- 37) Okada N., Gao J., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 68–76 (2004).
- 38) Okada N., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Nakagawa S., Fujita T., Yamamoto A., (submitted).
- 39) Kupiec-Weglinski J. W., Austyn J. M., Morris P. J., *J. Exp. Med.*, **167**, 632–645 (1988).
- 40) Lappin M. B., Weiss J. M., Delattre V., Mai B., Dittmar H., Maier C., Manke K., Grabbe S., Martin S., Simon J. C., *Immunology*, **98**, 181–188 (1999).
- 41) Martin-Fontecha A., Sebastiani S., Hopken U. E., Ugucioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F., *J. Exp. Med.*, **198**, 615–621 (2003).
- 42) Gunn M. D., Kyuma S., Tam C., Kakiuchi T., Matsuzawa A., Williams L. T., Nakano H., *J. Exp. Med.*, **189**, 447–450 (1999).
- 43) Förster R., Schubel A., Breitfeld D., Kremmer E., Renner-Meller I., Wolf E., Lipp M., *Cell*, **99**, 23–33 (1999).