

がん細胞免疫療法の治療成績向上のための要素技術開発：
樹状細胞体外大量増幅技術開発とセンダイウイルスによる免疫刺激療法

原田 結, 米満吉和*

**New Technologies for Immunotherapy against Cancer:
Development of Cell Expansion Technology and Viruses as Immune Boosters**

Yui HARADA and Yoshikazu YONEMITSU*

*Kyushu University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, R&D Laboratory for Innovative
Biotherapeutics, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

(Received July 20, 2010)

Dendritic cells (DCs) play a crucial role in maintaining the immune system. Although DC-based cancer immunotherapy has been suggested as a potential treatment for various kinds of malignancies, clinical efficacies have been still unsatisfactory. To improve the clinical outcome of DC-based cancer immunotherapy, we are now focusing on 1) increase of numbers of therapeutic immune cells, i.e., DCs, and 2) the development of new methods for stimulating them. We have recently established a possible breakthrough, a simple cytokine-based culture method to realize a log-scale order of functional myeloid-type murine/human DCs. Moreover, we demonstrated that DCs activated by replication-deficient recombinant Sendai virus (rSeV) were highly effective than that seen in the use of current DC vaccine stimulated by conventional cytokines *etc.*, for immunotherapy against malignancies. Therefore, our study strongly suggests that these improvements could overcome the current limitations of DC-based immunotherapy for malignancies.

Key words—dendritic cell; cell expansion; Sendai virus; cancer; immunotherapy

1. はじめに

現在がんはわが国の国民死亡原因の第一位であり、今なお増加傾向にある。厚生労働省保健医療局地域保健・健康増進栄養課生活習慣病対策室人口動態統計月報年計によれば、最近数年は「がん死」は常に死因別死亡数の約30%を超えており、がん死亡率の低下は国民福祉の向上のために必須である。

がん治療成績は最近20年間に大幅に向上しており、それは現在の3大標準治療である手術、放射線療法、化学療法に支えられている。しかしながら、外科手術と放射線療法は局所治療であり、転移を有する進行がんに残る選択肢は化学療法のみとなる。最近では多くの臨床的エビデンスが集積し、化学療法のみで完全寛解へ至るがん種も増えているが、一方で再発することも少なくなく、またその際には既

使用剤への薬剤耐性により別種の化学療法剤への変更が余儀なくされる。これを繰り返すうちに次第に効果は減弱し、選択肢は狭められていく。

がんの治療へ人間が本来具有する免疫システムを利用しようとする試みは40年以上前から行われており、わが国ではピシバニールなどの細菌抽出物、レンチナンなどの菌藻類などが開発されてきた(第1世代)。しかしその臨床効果は限定的であり、その後臨床現場での使用頻度は次第に低下した。免疫学及び分子生物学的知見の集積により、1980年代にはがんに対する免疫反応の分子基盤が明らかにされ、その一翼を担うサイトカイン製剤が試みられるようになる(第2世代)。サイトカイン製剤は一部の悪性腫瘍に有効であることが明確にされたが、一方で多くの場合は依然有効性を示すことはできず、一方で副作用も多いためにその使用は限定的である。1990年代になるとがんを攻撃する作用を持つリンパ球などエフェクター細胞の大量培養技術が開発され、活性化リンパ球など養子免疫療法が試みられてきた(第3世代)。しかしながら養子免疫療法の治

九州大学薬学研究院革新的バイオ医薬創成学(〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

*e-mail: yonemitsu@med.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウムS19で発表したものを中心に記述したものである。

療効果も依然限定的であり、多くのがん種では治療効果が明確になっていない。

以上の免疫療法は、いずれも「非特異的免疫療法剤」と呼称されており、特定のがん種に対する特異的免疫の誘導法ではない。1990年代後半になると「がん抗原」が発見されるとともに、免疫システムの高次基盤が明らかにされ、がん特異免疫の誘導技術の開発が始められてきた。このがん特異免疫誘導技術は、非特異免疫と区別するために「がんワクチン」と呼ばれている（第4世代）。

現在「がんワクチン」は、手術・放射線・化学療法に続く「がん治療における第4の選択肢」として期待されている。これは後述するように、理論的には、(1) 今あるがんを抑え込むこと、(2) 転移巣を抑えること、そして(3) 再発させないこと、これらすべてに有効であり、特に「再発させない」というコンセプトは重要であり、三大がん治療技術にはない、全く新しい概念となる。

がんを攻撃する免疫系細胞には様々なものがあり、異物貪食作用を発揮するマクロファージ、直接攻撃する lymphokine activated killer cells (LAK), natural killer cell (NK), natural killer T cell (NKT), cytotoxic T lymphocyte (CTL), などが想定されている。しかし特定の抗原に対しワクチン効果を示すためには、それらに指示を出す役割を担う樹状細胞 (dendritic cell: DC) を目的に合わせて効率よく刺激することが最も有効であると考えられている。

現在、がんワクチンは世界中で試みられており、がん抗原としてペプチドを用い、アジュバントと一緒に投与する「がんペプチドワクチン」、そして患者からアフエレーシスによって得られた単球を体外で培養することで DC を誘導し、患者のがん組織あるいは人工ペプチド抗原でパルスをし、再び体内に戻すという手法（いわゆる「樹状細胞ワクチン (DC ワクチン)」）が主に用いられている (Fig. 1)。¹⁾ いずれが有効であるかについては直接的比較試験はなく、現在はいずれも臨床試験段階にあるものの、前者は品質管理 (QC: quality control) がし易いこともあり、複数の製薬企業が治験を進めている。一方、後者は製造工程が複雑であることもあり、現在わが国では先進医療・高度医療、あるいは自由診療として患者へ提供されている段階である。

1996年に最初の DC ワクチンが B 細胞リンパ腫

に対して実施され、²⁾ 1998年にはステージ IV のメラノーマ患者に対して奏効率 30% という報告がなされた。³⁾ それ以降、多くの報告がなされ、DC ワクチンは悪性腫瘍に対する特異的抗腫瘍免疫誘導に有用であると考えられているが、臨床効能についてはいまだ十分とは言えない。2004年に報告された米国 NCI (National Cancer Institute) における集計結果ではその臨床的有効性は 7.1% 程度 (standard oncologic criteria による判定法) と報告された。⁴⁾ 腫瘍特異的 T 細胞の増加や Interferon- γ (IFN- γ) の産生、腫瘍の一部崩壊などを含めるとその報告例は多数存在するが、残念ながら腫瘍退縮に至る症例は少ない。この DC ワクチンを標準治療にするためには以下の条件を最適化する必要があるとされた。すなわち、DC の種類、DC の活性化方法、投与 DC の数、抗原提示させる方法、投与ルート、投与頻度及び投与間隔である。⁵⁾ われわれはこれらの問題を克服すべく、ワクチン効果を決定するパラメータの探索を行ってきた。その結果、投与細胞数と DC 活性化方法が治療成績を左右する最も重要なファクターであることを明らかにした。本稿ではこの2点に焦点を当て、DC ワクチンの効果を飛躍的に向上させることを可能とする2つの要素技術開発について述べる。

2. DC 大量増幅

われわれは悪性腫瘍に対する DC 療法の成績が DC の投与量依存的であることを実験的に示した [Fig. 2(a)].⁶⁾ 動物モデルと同様の十分な抗腫瘍効果をヒトで得るためには、体重比で計算すると 10^6 DCs/30g が必要であることから1回投与当たりおよそ 1×10^9 の数が必要となる。これは臨床で用いられる量の 10-100 倍であり、現行の方法でそれだけの DC を得ることは、患者への負担を考えると実質的に不可能である。そこで、本技術開発はその必要量を賄うため現行の 100 倍以上の DC を作製することを目的として行った。われわれはヒトでの応用の前段階として、まずマウスを使って DC 増幅技術を開発した [Fig. 2(b)].⁷⁾ マウス骨髄細胞を材料とし、サイトカインカクテル (FS36: Flt3-ligand (Flt3-L), Stem cell factor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), IL-6) で増幅後、Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF) 及び IL-4 (GM/IL-4) に切り替える2段階培養法を用いて通

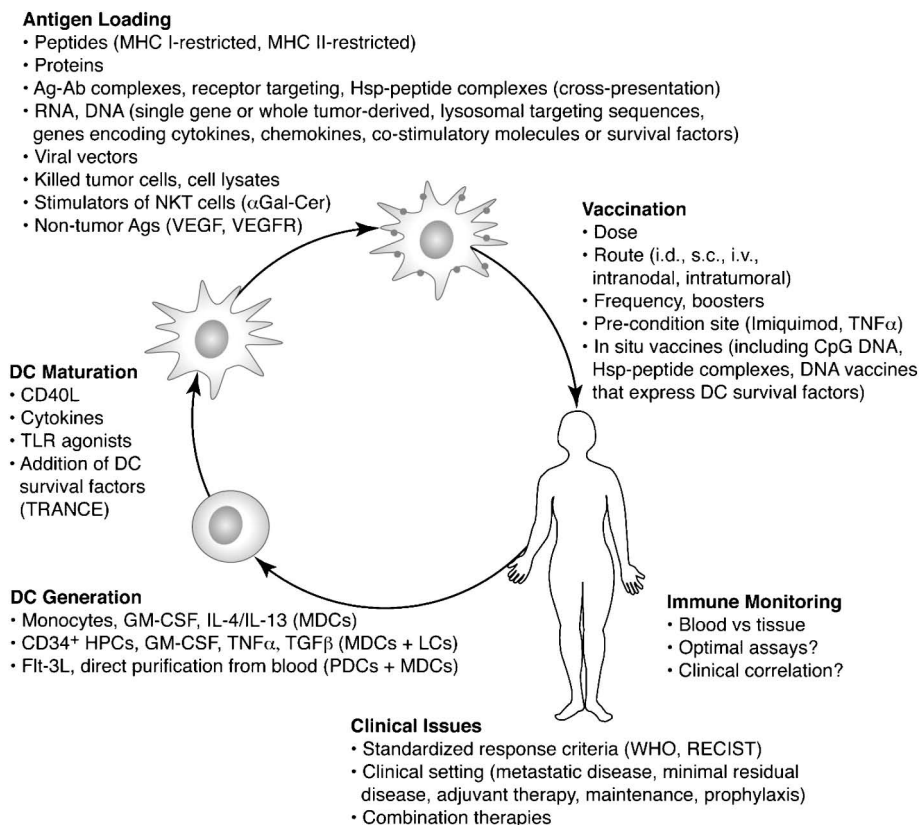


Fig. 1. Approach for the Preparation and Use of DC Vaccines to Treat Cancer

DCs may be prepared *ex vivo* following 3 general methods (lower left), each of which results in a different mixture of cells. DCs may be matured and loaded with antigens using a variety of techniques. Some of these techniques include the addition of DC survival factors, the use of substances that induce cross-presentation, or the use of stimulators of other innate immune cells such as NKT cells. DCs loaded with RNA or DNA can take advantage of sequences encoding cytokines, chemokines, or DC survival factors. Numerous variables such as antigen dose, cell dose, and route of administration also need to be optimized. In addition, less costly and labor-intensive approaches that stimulate and load DCs with antigen *in situ* are being explored. There are many unresolved issues regarding the monitoring of immune responses and in correlating these responses with clinical outcome. DC vaccines may prove to be most effective in the adjuvant setting or in combination with other treatments. This figure is adapted from Ref. 1.

常法のおよそ 1000 倍以上の DC を得る簡便な技術を確認させた。本技術で増幅された DC は通常の myeloid 系 DC と全く同様の生物学的・免疫学的形質を有し、実際に高い抗腫瘍効果を発揮することを示した。

次に、ヒト DC 大量増幅技術の開発に当たり、ヒト CD34 陽性細胞を材料とし、同様に最適化されたサイトカインカクテルを用いた増幅を行った (Harada ら, 投稿準備中)。すなわち、臍帯血 CD34 陽性細胞を hGM-CSF 及び hSCF (GM/SCF) の存在下で 5 週間に渡り拡大培養, あるいは同様に 4 週間拡大培養し, サイトカインカクテルを hGM-CSF 及び hIL-4 の組み合わせ (GM/IL-4) に切り換えてさらに 1 週間培養を行った。臍帯血 CD34 陽性細胞を GM/SCF 存在下で培養を行うと, 5 週間でおよそ 100,000 倍に増幅され, その期間中に DC の指

標である CD11c 陽性率は徐々に上昇し, 5 週目では 80% 以上に達した。4 週目で GM/IL-4 に切り替えることで, 以降の増幅は停止するが, 同様に高い CD11c 陽性率でかつ後述するような高い Th1 誘導能の期待できる DC を得ることが可能となった。つまり, 10^5 個の CD34 陽性細胞から 10^{10} 個の CD11c 陽性細胞が得られた [Fig. 2(c)]。これら増幅 CD11c 陽性細胞は樹状突起を発現し, 通常法で作製された DC と同様に各種抗原提示に必要な分子や接着因子, ケモカインレセプター等の発現が確認された。また, 各種炎症性サイトカイン/ケモカインの産生も確認されたが, 重要なことに, Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 及び Th1 誘導に強力に働く IL-12p70 は GM/IL-4 に切り替えることで初めて産生がみられるようになった。また, allogeneic mixed lymphocyte reaction (alloMLR) に

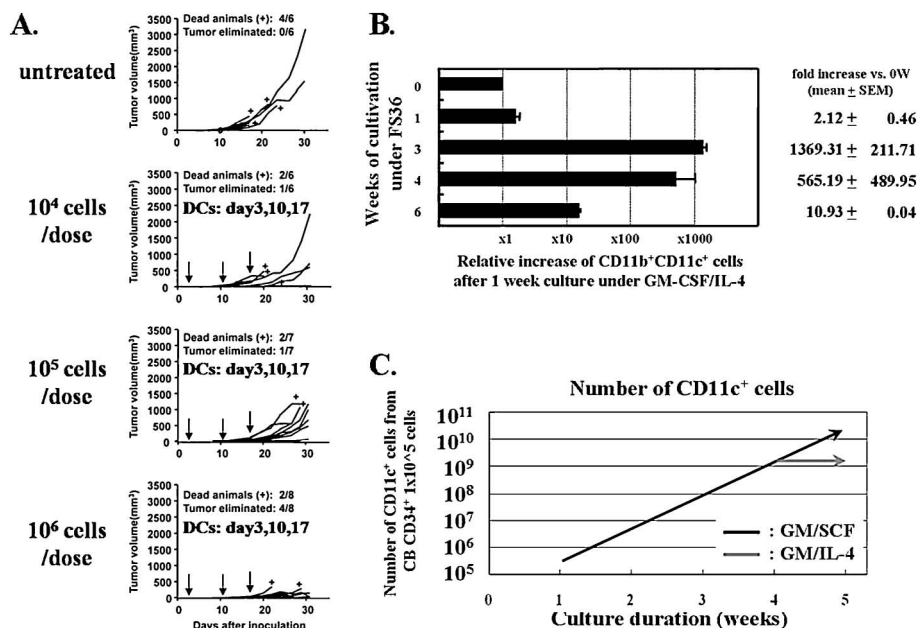


Fig. 2. Dose-dependent Efficacy of DCs for Therapeutic Vaccination

A: Three days after intradermal inoculation of B16F10 melanoma, various amounts of ts-rSeV/dF-DCs were injected weekly *via* an intratumoral route. Thereafter, the tumor volume was measured. Lines on the panels indicate time courses of tumor volume in individual animals. Apparent dose-efficacy response was seen in the tumor volume, and 4 of 8 animals that received 10⁶ DCs per dose showed complete tumor elimination. The + indicates animals that died during observation. This figure is adapted from Ref. 6. B: Log-scale expansion of murine DCs; bar graph indicating relative increase of CD11b⁺CD11c⁺ DCs yielded after 1-week cultivation under GM/IL-4 in use of expanded hematopoietic progenitors at each time point. The data include three independent experiments. Note that 3-weeks' expansion was optimal, over 3 logs, for efficient production of CD11b⁺CD11c⁺ DCs. This figure is adopted from Ref. 7. C: Log-scale expansion of human DCs; kinetics of the number of CD11c⁺ cells from 1 × 10⁵ cord blood CD34⁺ cells under GM-CSF and SCF (black line) and under GM-CSF and IL-4 (gray line). The figure is under preparation.

より、いずれの増幅 CD11c 陽性細胞についても通常法 DC と同様に T 細胞への増殖刺激能を持つことが確認された。以上の結果より、増幅 CD11c 陽性細胞は myeloid 系 DC に酷似した、治療に用いるのに必要と考えられる性質を保持している DC であることが確認された。さらに、末梢血単核球からの DC 大量増幅技術を現在開発中であり、現行法の 100 倍以上の増幅が可能となりつつある（データ未公開、特許申請済み）。

3. ウイルスによる活性化

DC の活性化方法は DC の性質に大きく影響するため、その選択は非常に重要である。従来の研究では、DC ワクチンの抗腫瘍効果には細胞性免疫が重要であると考えられており、DC の活性化をいかに Th1 系へ制御するかに関心が置かれてきた。これまでサイトカインや toll like receptor (TLR) に対するリガンド等が用いられてきているが、DC の活性化状態を含め、いまだ最適化はなされていない。

われわれは従来とは全く異なる発想の下、組換え Sendai virus ベクター (rSeV) が DC に高効率に感染し、強力に活性化させることに着目し、DC 療法

への応用技術の開発を進めている。rSeV は感染効率が極めて高く、感染後のゲノム複製、転写すべてが完全に細胞質内で行われる 'cytoplasmic RNA vector' である。⁸⁾ 九州大学で行ってきた本ベクターを用いた遺伝子治療の臨床試験では既に重症虚血肢に対する血流改善効果が確認されている。既に 12 例へ投与されたが安全性の問題は検出されていない。この rSeV により活性化された DC は、特に human leukocyte antigen DR (HLA-DR) や co-stimulatory molecules の 1 つである CD80 の発現レベルが高く、lipopolysaccharide (LPS) や Poly (I:C) で活性化させた場合よりも高値であった。その活性化メカニズムは、rSeV に UV 照射を行うことで完全に活性化能がキャンセルされることから、RIG-I を介したものであることが想定された。⁹⁾ すなわち、感染後に細胞質でウイルスゲノムの複製時に生じる 2 本鎖 RNA を、caspase recruitment domain (CARD) を持つ RIG-I が認識し、IRF 及び NF-κB 等を介して活性化が起こる。実際に RIG-I のドミナントネガティブである RIG-IC 搭載型 rSeV を用いるとその活性化がキャンセルされることを確認し

た. 本技術によって得られた強力な腫瘍抑制効果について以下に述べる.

3-1. 今あるがんを抑え込む これまで, 腫瘍が十分に成長し血管が豊富になった後に治療を開始して, 再現性よく腫瘍の増殖を抑制することを証明したモデルは全く存在しない. われわれは rSeV で強力に活性化された DC (SeV/DC) を用いて, がんワクチンの目的の 1 つである『今あるがんを抑える』ことに成功した.^{10,11)} rSeV で活性化させた DC を投与することで, B6 マウスの約 7-9 mm 大の悪性黒色腫 (B16) のうち 88% で完全消滅がみられた. また, 小児がんの神経芽腫の治療モデルにおいても著明な治療効果が得られたが, 悪性黒色腫と比較すると十分なものではなく, 神経芽細胞腫は免疫療法に対する抵抗性が高いことが考えられる.

腫瘍細胞が免疫から逃れる典型的なメカニズムに

は, 腫瘍抗原の欠損, T 細胞不活化サイトカインの分泌, Major histocompatibility complex (MHC) class I の異常・発現低下などが想定される. 一般に神経芽細胞腫の MHC class I 発現は低く, さらに *N-myc* 遺伝子の増幅がそれを助長することが明らかになっている.¹²⁾ われわれはマウスにおいてもヒトにおいても *IFN-β* によってこの発現が大幅に回復することを明らかにし, *IFN-β* 遺伝子搭載 rSeV によって活性化した *IFN-β* 産生型 DC によって神経芽細胞腫に対する SeV/DC の抗腫瘍効果を強力に増強することに成功した. 加えて, *IFN-β* 遺伝子非搭載型 rSeV によって活性化された SeV/DC についても, 投与前に放射線照射を行うことでその抗腫瘍効果を飛躍的に向上させることに成功した (62.5% で完全消滅).

3-2. 転移巣を抑える 次に, SeV/DC による

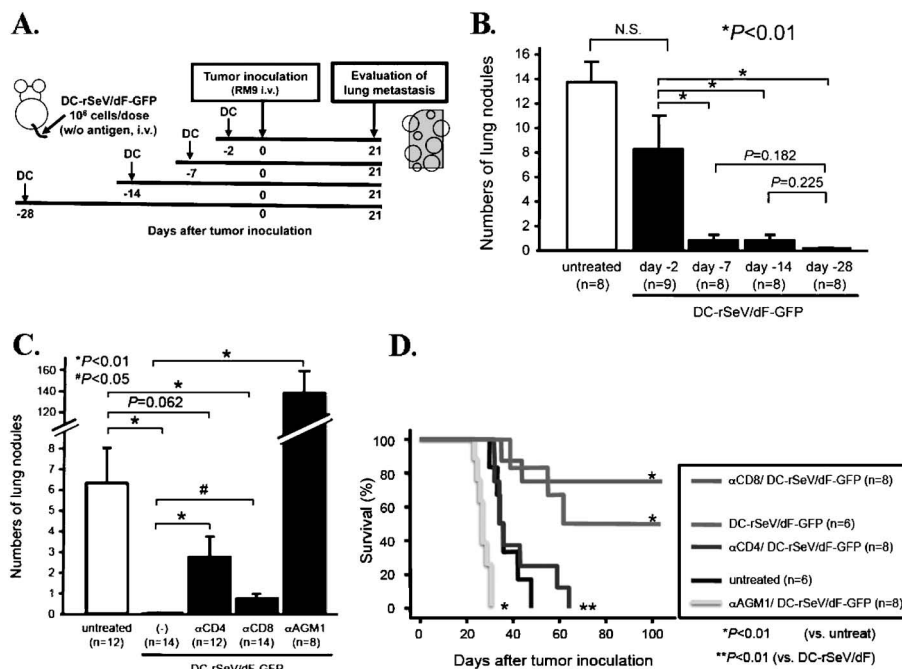


Fig. 3. Timing of Administration of DC is Critical to Optimize the Prevention of Lung Metastasis and Determination of Effector Cell Subsets for Preventing Lung Metastasis

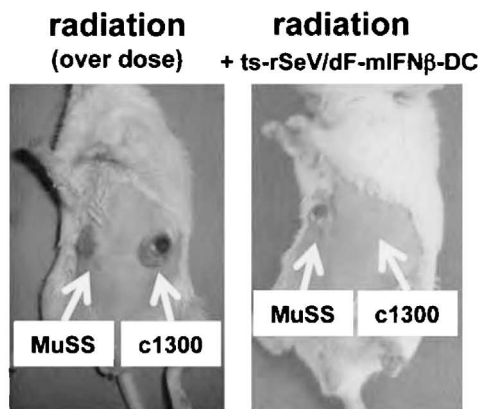
A: Treatment regimen. DCs, 10^6 cells of immature DC (iDC) or rSeV/dF-GFP/DC, were i.v. administered via the tail vein at day -28, -14, -7, or -2. On day 0, 10^5 RM-9 tumor cells were inoculated i.v. Twenty-one days later, the animals were sacrificed and the numbers of metastatic nodules on the pleural surface of bilateral lungs were evaluated macroscopically. B: Timing of administration of DC-rSeV/dF-therapy is critical to optimize the prevention of lung metastasis of RM-9 prostate cancer. The number of metastatic nodules of each group is given. C: Effects of effector cell depletion (for NK cells: rabbit anti-asialoGM1 polyclonal Ab = anti-AGM1, for $CD4^+$ T-lymphocytes: anti-CD4 mAb from hybridoma GK1.5 = anti-CD4, and for $CD8^+$ T-lymphocytes: anti-CD8 mAb from hybridoma TIB105 = anti-CD8) for the prevention of lung metastasis of RM-9. Anti-asialo GM1 was given i.p. (100 μ g/dose) for NK cell depletion on days -8, -6, -4, 0, and 3 after tumor inoculation. $CD4^+$ or $CD8^+$ cells in the mice were eliminated by i.p. injection of mAbs on days -8, -6, -4, 0, and every 3 or 4 days until sacrifice after tumor inoculation. FACS analyses confirmed $>98\%$ depletion of the target cells in peripheral blood from the tail vein for at least 7 days after injection in animals. Treatment with α AGM1 dramatically increased the number of metastatic nodules. Note that both mAbs, anti-CD4 and anti-CD8, significantly impaired the preventive effect of DC-rSeV/dF-mediated antimetastatic activity, and anti-CD4 showed a more pronounced effect ($p < 0.01$) than that seen with anti-CD8 ($p < 0.05$). D: Another set from the same experiment as c assessing long-term survival. The survival curve was determined using the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was used to compare curves among groups. Treatment with anti-AGM1 on days -8, -6, -4, 0, and 3 significantly accelerated death, even though DC-rSeV/dF was given 28 days before tumor inoculation ($p < 0.01$). Administration of anti-CD8 did not impair the survival of DC-rSeV/dF-treated mice; in contrast, injection of anti-CD4 almost completely abolished the effect of DC-rSeV/dF ($p < 0.01$). These A-D figures are adopted from Ref. 12.

転移巣に対する抗腫瘍効果について述べる。われわれはラットを使った肺転移モデルを作製し、SeV/DC ワクチンによる高い肺転移抑制効果を示してきた。¹³⁾ 腫瘍接種 15 日前より 7 日毎に計 3 回の SeV/DC を静脈投与 (3×10^6 cells/dose) することにより、尾静注された前立腺がん細胞 AT6.3 (5×10^5 cells) による肺への腫瘍転移を強力に抑制することに成功した。さらに、マウスを用いた実験から、同様の SeV/DC による肺転移抑制効果を発揮するには SeV/DC 投与は 1 回でよく、その効果は 4 週間以上に渡って保持されることが明らかとなった [Figs. 3(a) and (b)]. また、この抗腫瘍効果は抗 asialoGM1 抗体でキャンセルされることから、その主なエフェクターが NK 細胞であることが示唆された (Figs. 3(c) and (d)).¹⁴⁾ 本ワクチン効果発揮のメカニズムはウイルス由来ヘマグルチニンが NKp46 を介して NK 細胞を強く活性化することによると考えられる。¹⁵⁾

3-3. 再発を予防する また、再発を予防するという観点から、SeV/DC によるがんに対する終生免疫を成立させることを目的とし、一度 SeV/DC によって腫瘍の消失を起こした個体には同一腫瘍は生着しないということを確認した。⁶⁾ まずマウス神経芽細胞腫 c1300 を皮下接種し、形成された腫瘍に対して放射線のみ、あるいは放射線+SeV/DC で治療を行い、腫瘍消失個体に対して 184 日目に c1300 又は線維性組織球腫細胞 (Fibrous histiocytoma) MuSS による 2nd チャレンジを行った。放射線のみで治療を行った群では c1300, MuSS ともに腫瘍生着率が 100% であった。放射線+SeV/DC で治療を行った群では MuSS 生着率は 100% であったが c1300 は 0% であった (Fig. 4)。つまり、SeV/DC により長期に渡って抗腫瘍免疫が成立することが明らかになった。

4. DC 療法の新規パラダイム

従来、動物モデルで評価されてきた樹状細胞療法



Summary of 2nd challenge

	Total examined	2nd challenge (c1300 and MuSS)			
		Alive (tumor free)	used for 2nd challenge	rejection of c1300	rejection of MuSS
untreat	4	0	-	-	-
radiation (4 Gy x 3)	3	0	-	-	-
radiation (over dose: 34 Gy x 3)	4	3	3	0	0
ts-rSeV/dF-mIFN β -DC	4	1	1	0	0
radiation (4 Gy x 3) + ts-rSeV/dF-mIFN β -DC	4	3	3	3	0

Fig. 4. Combination Therapy of Irradiation and rSeV/dF-mIFN β -DC Induces Long-lasting and Tumor-specific Protective Immunity

Seven days after subcutaneous c1300 tumor inoculation into the left thigh, the tumors were irradiated 3 times daily at 4 Gy/day. At day 10, 10^6 cells of ts-rSeV/dF-DCs with exogenous mIFN- β expression were injected weekly *via* the intratumoral route. Four animals with completely eliminated tumors *via* overdose irradiation (34 Gy \times 3 for 3 days) were also included. On day 184, live animals without primary tumor formation were subjected to a second challenge, simultaneous tumor inoculation with c1300 and MuSS (third party) on the abdominal wall. Fifteen days later, tumor formation was determined. The figure is adopted from Ref. 6.

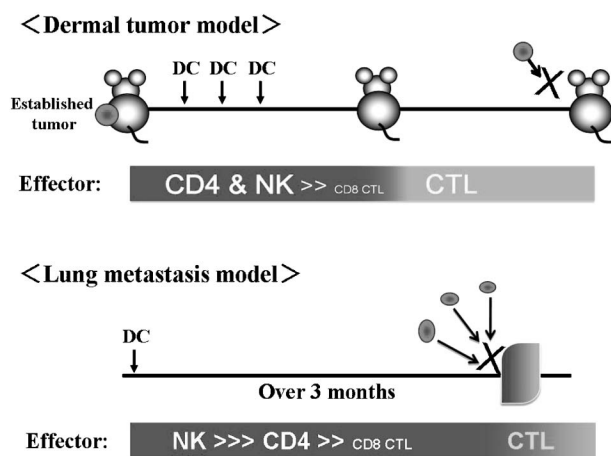


Fig. 5. A New Paradigm of DC-based Immunotherapy for Cancer

はエフェクターを CTL と想定し、対象の多くが皮下腫瘍であり、腫瘍接種以前に DC を投与するあるいは腫瘍が小さい段階での投与であった。しかし臨床においては腫瘍は DC 投与以前に成長し、その多くは皮下ではなく内臓に存在している。そのため臨床的な状況に mimic した系での評価が必要になると考えられてきた。われわれの知見を基にすれば、既に存在する腫瘍に対する DC 療法のエフェクターとしては CD8 陽性 T 細胞よりもむしろ CD4 陽性 T 細胞及び NK 細胞が重要であり、再発予防には CTL が重要である (Tanaka ら, 投稿準備中)^{6,10)} また、肺転移抑制モデルにおける主なエフェクターは NK 細胞及び CD4 陽性 T 細胞であり、CTL の貢献度は相対的に低いものであると考えられる (Fig. 5)¹³⁾

5. おわりに

われわれは先に述べた DC 療法において最適化すべき条件：DC の種類、DC の活性化方法、投与 DC の数、抗原提示させる方法、投与ルート、投与頻度及び間隔において、サイトカインカクテルによる DC の大量増幅技術の開発と免疫刺激型ウイルス療法への DC 療法への応用技術の開発により、活性化及び投与 DC 数の問題を解決することに成功した。これらの技術により、治療成績の向上、アフレーシス回数削減による低侵襲化、そして適用範囲の拡大が期待される。

また、本シンポジウム後、2010 年 4 月 29 日には米国 FDA により米国 Dendreon 社の前立腺がん治療用ワクチン『PROVENGE』の製造販売が承認さ

れた。これは、がん DC ワクチン療法の悪性腫瘍に対する有効性が正式に認められた点で重要であり、がんワクチン療法が今後第 4 の治療法となる上で大きな 1 歩と言える。今後のさらなる進展に向けて研究を進めていきたい。

REFERENCES

- 1) O'Neill D. W., Adams S., Bhardwaj N., *Blood*, **104**, 2235–2246 (2004).
- 2) Hsu F. J., Benike C., Fagnoni F., Liles T. M., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E. G., Levy R., *Nat. Med.*, **2**, 52–58 (1996).
- 3) Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D., *Nat. Med.*, **4**, 328–332 (1998).
- 4) Rosenberg S. A., Yang J. C., Restifo N. P., *Nat. Med.*, **10**, 909–915 (2004).
- 5) Figdor C. G., de Vries I. J., Lesterhuis W. J., Melief C. J., *Nat. Med.*, **10**, 475–480 (2004).
- 6) Tatsuta K., Tanaka S., Tajiri T., Shibata S., Komaru A., Ueda Y., Inoue M., Hasegawa M., Suita S., Sueishi K., Taguchi T., Yonemitsu Y., *Gene Ther.*, **16**, 240–251 (2009).
- 7) Harada Y., Ueda Y., Kinoh H., Komaru A., Fuji-Ogawa T., Furuya A., Iida A., Hasegawa M., Ichikawa T., Yonemitsu Y., *PLoS One*, **4**, e6674 (2009).
- 8) Yonemitsu Y., Kitson C., Ferrari S., Farley R., Griesenbach U., Judd D., Steel R., Scheid P., Zhu J., Jeffery P. K., Kato A., Hasan M. K., Nagai Y., Masaki I., Fukumura M., Hasegawa M., Geddes D. M., Alton E. W., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 970–973 (2000).
- 9) Kato T., Ueda Y., Kinoh H., Tsukada K., Ichikawa T., Yonemitsu Y., *Front. Biosci.*, **3**, 133–137 (2008).
- 10) Shibata S., Okano S., Yonemitsu Y., Onimaru M., Sata S., Nagata-Takeshita H., Inoue M., Zhu T., Hasegawa M., Moroi Y., Furue M., Sueishi K., *J. Immunol.*, **177**, 3564–3576 (2006).
- 11) Yoneyama Y., Ueda Y., Akutsu Y., Matsunaga A., Shimada H., Kato T., Kubota-Akizawa M., Okano S., Shibata S., Sueishi K., Hasegawa M., Ochiai T., Yonemitsu Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 129–135 (2007).
- 12) Sugio K., Nakagawara A., Sasazuki T., *Can-*

- cer*, **67**, 1384–1388 (1991).
- 13) Kato T., Ueda Y., Kinoh H., Yoneyama Y., Matsunaga A., Komaru A., Harada Y., Suzuki H., Komiya A., Shibata S., Hasegawa M., Hayashi H., Ichikawa T., Yonemitsu Y., *Neoplasia*, 2010. (in press)
- 14) Komaru A., Ueda Y., Furuya A., Tanaka S., Yoshida K., Kato T., Kinoh H., Harada Y., Suzuki H., Inoue M., Hasegawa M., Ichikawa T., Yonemitsu Y., *J. Immunol.*, **183**, 4211–4219 (2009).
- 15) Mandelboim O., Porgador A., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 1147–1150 (2001).