

日本財団補助金による

1998年度日中医学協力事業報告書

-在留中国人研究者研究助成-

1999年3月15日

財団法人 日中医学協会
理事長 中島章殿

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 研究者氏名 劉愛春
研究機関 新潟大学医学部 第一内科 研究指導者 相沢義房 職名 教授
所在地 新潟市旭町通 1-757 電話 (025)227-2185 内線

研究テーマ 造血器腫瘍細胞に対する免疫遺伝子治療の研究

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における口頭発表 有 ・ 無 (学会名・内容)

Masuihiro Takahashi, Aichun Liu, Ken Toba, Tadashi Koike, Zhiyin Zheng, Yasser Osman, Hidenobu Takahashi, Tatuo Furukawa, Miwako Narita, Sadao Aoki, Yoshifusa Aizawa
Applicability of class II transactivator (CIITA) gene for immunotherapy of HLA-DR negative hematological malignancies The 4th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy July 4th-5th 1998 (Tokyo)

高橋益広、劉愛春、真田雅好、高井和江、高橋英伸、青木定夫、小池正、相沢義房 樹状細胞前駆細胞の特徴を有する急性骨髄性白血病 (FAB分類 M5b) : myelodendritic leukemia 第9回樹状細胞研究会 平成10年11月7日 (東京)

劉愛春、高橋益広、オスマン・ヤーセル、鄭智茵、高橋英伸、鈴木訓充、新国公司、鳥羽健、青木定夫、小池正、橋本誠雄、古川達雄、相沢義房 K562 に対する CIITA 遺伝子導入による HLA-DR と MHC class I 両者の発現 第40回日本臨床血液学会総会 平成10年11月11-13日 (金沢)

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

1. Z. Zheng, M. Takahashi, S. Aoki, K. Toba, A. Liu, Y. Osman, R. Aizawa, N. Takahashi, S. Hashimoto, S. Maruyama, T. Furukawa, M. Narita, K. Kishi, T. Koike, Y. Aizawa : Expression of costimulatory molecules on cells derived from human hematopoietic malignancies. J Exp Clin Cancer Res 17 (3) 251-258 1998

2. Yasser OSMAN, Masuihiro TAKAHASHI, Tadashi KOIKE, Ken TOBA, Zhiyin ZHENG, Aichun LIU, Tatuo FURUKAWA, Sadao AOKI, Yoshifusa AIZAWA: Generation of bcr-abl specific cytotoxic T-lymphocytes by using dendritic cells pulsed with bcr-abl (b3a2) peptide: Its applicability for donor leukocyte transfusions in marrow grafted CML patients. Leukemia 13:166-174,1999

3. 今後の研究計画

G-CSF動員末梢血、骨髄、および臍帯血のCD34陽性細胞から樹状細胞へ誘導と応用

- 1 樹状細胞培養：G-CSF動員末梢血、骨髄および臍帯血の単核球から、MACS magnetic beads を用いて、CD34陽性細胞を純化する。種々サイトカインを組み合わせて添加培養することにより、CD34陽性細胞増殖と、CD34細胞から樹状細胞への分化について検討する。
- 2 CD34陽性細胞のレトロウイルスベクターの遺伝子導入：EGFP(enhanced green fluorescence protein) cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターをウイルス産生細胞に導入し、ウイルス価の高い上清を作成する。ウイルス培養上清をサイトカインで刺激したCD34陽性細胞に加え、遺伝子導入したのちサイトカインを加え、樹状細胞へ誘導培養する。樹状細胞に特徴的なmAb(CD83,CD1a など)を用いたFACS analysis行う
- 3 白血病に特異的な抗原のcDNAを組み込んだレトロウイルスベクターの作成：遺伝子導入したCD34陽性細胞からDCへの誘導できれば、同一レトロウイルスベクターに、白血病に特異的な抗原のcDNA(bcr-abl)を導入する。bcr-abl cDNAを組み込んだレトロウイルスベクター上清を作成し、CD34陽性細胞に遺伝子導入し、DCを培養する。このDCをstimulatorとして、同一人のリパ球を responderとするMLRを行い、抗原提示能について検討する。白血病に対する、DCを用いた免疫治療の応用性を検討する。

4. 研究指導者の意見

劉 愛春さんは、現在医学部大学院の1年次に在学しております。学業成績は優秀で、特に専攻している血液内科学の分野においては劉さん自身による研究成果を出しており、その研究成果は、内外の学会に発表しております。第一演者としての学会発表は、1) 劉 愛春、高橋益広、鳥羽健、ほか：血液細胞株における MHC class II と CIITA 発現の関連 第 60 回日本血液学会総会 平成 10 年 3 月 25 日 - 27 日 (大阪)、2) 劉 愛春、高橋益広、オスマン・ヤーセル、ほか：K562 に対する CIITA 遺伝子導入による HLA-DR と MHC class I 両者の発現 第 40 回日本臨床血液学会総会 平成 10 年 11 月 11-13 日 (金沢) の 2 つですが、3) 劉 愛春、高橋益広、鄭 智茵、ほか：骨髄、末梢血および臍帯血 CD34 陽性細胞からの樹状細胞の培養 第 61 回日本血液学会総会 平成 11 年 4 月 19 日 - 21 日 (東京) も、発表の予定です。その他共同演者として、日本造血細胞移植学会、The International Society of Hematotherapy and graft engineering、The Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy、樹状細胞研究会、The Annual Meeting of American Society of Hematology、癌特異的免疫療法研究会など 15 の学会発表を行っております。研究に対する態度は真剣で、最後まで粘り強く行い、関連する文献も主体的に検索し、研究に応用しております。研究手技の修得にも非常に熱心で、各種の細胞培養、腫瘍細胞蛋白や遺伝子 (DNA, RNA) の抽出、遺伝子増幅 (PCR 法)、細胞表面および細胞質内蛋白の解析 (FACS 法) それにヒト細胞への遺伝子導入など技術を駆使して研究を進めています。このように、劉さんは HLA-DR や樹状細胞を応用した腫瘍免疫学の研究に精力的に取り組んでおります。

研究指導者氏名

相沢義彦



5. 研究報告

別紙形式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい (枚数自由・ワープロ使用)

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会-日本財団補助金による旨を明記して下さい。

造血器腫瘍細胞に対する免疫遺伝子治療の研究

研究者 劉 愛春

指導者 相沢義房 新潟大学医学部第一内科 教授

要旨

樹状細胞は、強力な抗原提示細胞であり、ナイーブ T 細胞に抗原提示が可能な唯一の細胞とされている。最近、GM-CSF、IL-4、TNF- α 、SCF などのサイトカインを用いることにより、骨髓や末梢血の細胞から成熟樹状細胞を培養する方法が確立された。我々は、ヒト末梢血や臍帯血の付着細胞から単球由来の樹状細胞を培養し、その性状について検討した。培養した樹状細胞は特徴的な「星」のような形態を示し、表面抗原では CD83、CD1a、CMRF-44 が特徴的で、FITC 結合 dextran の取り込みが認められた。樹状細胞は、混合リンパ球培養において、少数でも強いアロ抗原刺激活性を示すだけでなく、KHL を加えた混合リンパ球培養においては、自己リンパ球に対しても刺激能が認められた。慢性骨髄性白血病の病因遺伝子と考えられている bcr-abl に由来する b3a2 ペプチドをパルスした正常ヒト末梢血付着細胞由来樹状細胞を加えて自己リンパ球を培養することにより、bcr-abl ペプチドをパルスした自己マクロファージや HLA 一致患者からの bcr-abl を発現する白血病細胞に対する細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が誘導された。同様の腫瘍抗原ペプチドに特異的に作用する CTL の誘導は、急性前骨髄球性白血病に特徴的にみられる PML-RARA (A) ペプチドをパルスした樹状細胞を用いた検討でも認められた。ペプチドでパルスした樹状細胞を用いた CTL の誘導においては、ペプチドと樹状細胞の間で MHC 拘束性が存在するものの、腫瘍細胞に対する特異性が高く、腫瘍の免疫療法に応用できるものと考えられた。特に骨髓移植後の白血病再発に対する DLT においては、GVH はそのまま GVL のみを増強することが期待され、良い適応になるものと思われた。緩解期の白血病症例や HLA 一致骨髓移植ドナーの末梢血から培養した樹状細胞に白血病細胞抽出液をパルスし、自己リンパ球と培養することにより、白血病細胞に対する CTL が誘導された。腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞を用いる腫瘍の免疫療法は、MHC 拘束性が無いことから、腫瘍症例に広く応用できるものと考えられた。本論文では、樹状細胞を用いた腫瘍に対する免疫 (遺伝子) 治療の現状と将来の展望についても述べた。

Key Words : 樹状細胞、bcr-abl ペプチド、腫瘍細胞抽出液、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) 、免疫 (遺伝子) 治療

1. 樹状細胞の培養とその性状

樹状細胞は、骨髓細胞、末梢血細胞、臍帯血細胞などから培養が可能である。骨髓細胞や臍帯血細胞からは、主に CD34 陽性細胞を分離し、GM-CSF、TNF- α 、SCF などのサイトカインを加えて培養すると、2~3 週間で樹状細胞の増殖がみられる。また、末梢血や臍帯血からの付着細胞を GM-CSF、IL-4、TNF- α などのサイトカインを加えて培養すると、10 日~2 週間で単球由来の樹状細胞が誘導される。末梢血から immunobeads 法などで分離した CD3 $^{-}$ 、CD11b $^{-}$ 、CD16 $^{-}$ 、CD4 $^{+}$ の細胞は、樹状細胞前駆細胞と考えられており、我々は、この細胞を GM-CSF (100 ng/ml)、IL-4 (10 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml) を加えて培養した。培養翌日から胞体に突起を有する樹状細胞が誘導された。細胞の由来や培養方法に関わらず、成熟した樹状細胞はその名の示すように樹状の細胞突起が多数認められ、浮遊状態の細胞でも星が光を四方に放っているように stellate 見える。

細胞表面抗原としては、CD1a、CD83、CMRF-44 などが樹状細胞に特徴的とされており、CD80

、CD86、CD40などの共刺激分子や、MHC class I、class IIは強陽性となる。単球やマクロファージと異なり、CD14は陰性であるが、顆粒球系抗原であるCD13やCD33、およびCD54(ICAM-1)やCD58(LFA-3)などの接着分子は陽性である。

我々は、正常ヒト末梢血付着細胞から培養した樹状細胞について、その成熟度と細胞表面抗原の発現の関連について検討した。その結果、GM-CSFとIL-4を加えて培養した樹状細胞に比し、GM-CSF、IL-4にTNF- α を加えて培養した樹状細胞ではCD83やCMRF-44などの成熟樹状細胞に特徴的な表面抗原が強い陽性となった。また、TNF- α を加えることにより、MHC class II (HLA-DQなど)のほか共刺激分子であるCD80やCD86も強陽性となった(図4)。このように、GM-CSFとIL-4により誘導された未熟樹状細胞は、TNF- α の作用により成熟樹状細胞となることが明らかとなった。

2. 樹状細胞の貪食能

樹状細胞がTリンパ球に抗原提示を行うには、樹状細胞が抗原となる蛋白質を取り込んで、細胞表面に存在するMHCの溝にはまりこむ適当な長さのアミノ酸配列のペプチドに断片化(trimming)する必要がある。我々は、IL-2(300 U/ml)を加えて培養した臍帯血リンパ球(NK細胞およびT/NK細胞)と臍帯血付着細胞にGM-CSF(100 ng/ml)、IL-4(10 ng/ml)およびTNF- α (10 ng/ml)を加えて培養した樹状細胞について、FITCの結合したdextranを加えて反応させた後、FACSで細胞質内のFITCを検出することにより、樹状細胞によるdextran分子の取り込みについて検討した。dextranを加えて0℃(水中)で反応させた細胞をコントロールとして、37℃で反応させた細胞の取り込みを検討したところ、リンパ球ではdextranの取り込みは全く認められなかったが、樹状細胞においては明らかな取り込みが観察された。

3. 同種および自己混合リンパ球培養における樹状細胞の抗原提示能

樹状細胞の抗原提示能の指標として、同種および自己のリンパ球に対する混合リンパ球培養(MLC)における樹状細胞のstimulatorとしての活性を検討した。正常ヒト付着細胞にGM-CSF、IL-4、TNF- α を加えて培養した成熟樹状細胞は、GM-CSFとIL-4のみで培養した未熟樹状細胞や、末梢血単核細胞に比し、少ない細胞数においても、同種末梢血非付着細胞をresponderとするMLCで、強い刺激活性が認められた。また、自己末梢血非付着細胞をresponderとするMLCにおいても、抗原蛋白としてKLH(keyhole limpet hemocyanin)を加える(100 μ g/ml)ことにより、付着細胞にGM-CSF、IL-4、TNF- α を加えて培養した成熟樹状細胞は、KHLの抗原提示による自己リンパ球に対する刺激作用が認められた。

4. 腫瘍ペプチドをパルスした樹状細胞による腫瘍特異的CTLの誘導

樹状細胞は、抗原となる蛋白質を取り込み、細胞質内でprocessingし、抗原ペプチドを細胞表面のMHCの溝に提示することにより、強力な抗原提示能を有することから、樹状細胞はいろいろな疾患の治療に応用できることが想定される。一方、腫瘍細胞は、腫瘍化の過程で正常細胞には存在しない腫瘍特異抗原を発現する。腫瘍細胞がこのような腫瘍特異抗原を有効にリンパ球に抗原提示することができれば、腫瘍細胞に対する細胞障害性免疫反応が起こるはずである。しかし多くの腫瘍細胞においては、抗原ペプチドをMHC上に提示しても、CD80やCD86などの共刺激分子の発現がないかまたは弱く、有効な腫瘍特異抗原の提示ができない。このような腫瘍に対して、抗腫瘍免疫反応を惹起させることによる効果的な免疫療法を確立する有力な方法の一つとして樹状細胞の応用が考えられる。我々は、造血器腫瘍の腫瘍抗原を提示させた樹状細胞を用いて、腫瘍細胞に対して反応する自己または組織適合抗原の一致した同種からの細胞障害性T細胞(CTL)を誘導し、抗腫瘍免疫療法に応用可能かどうかについて検討した。実際には、慢性骨髄性白血病(CML)におけるインターフェロンと併用した免疫療法の確立や血液幹細胞移植後の再発に対するdonor leukocyte transfusion(DLT)への応用を目的とし、bcr-ablペプチドでパ

ルスした樹状細胞で刺激することにより、bcr-ablペプチドに対し特異的に作用するCTLを誘導することができるかについて検討した。加えて、急性前骨髄球性白血病 (APL) に対する免疫療法の可能性を明らかにする目的で、本症に特徴的な遺伝子異常であるPML-RARAに由来するペプチドについても樹状細胞を用いた同様な検討を行った。

【材料と方法】

細胞：3名の正常人と1例のCML症例のHLA一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞（対象とした細胞のMHC class I, class IIは表1に示す）を用いた。

未熟樹状細胞の培養：末梢血付着細胞、またはdendritic cell kit (MACS: Miltenyi Biotec, Germany)を用いたimmunobeads法により末梢血単核細胞から分離した樹状細胞前駆細胞 (CD3⁻, CD11b⁻, CD16⁻, CD4⁺) をGM-CSF (100 ng/ml) とIL-4 (10 ng/ml) を加えて3日間培養した。培養は正常人においては自己血漿、骨髄移植ドナーにおいてはヒトAB血清をそれぞれ5%加えて行った。

bcr-ablまたはPML-RARAペプチドによる樹状細胞のパルス：12merのbcr-abl (b3a2) ペプチド (GFKQSSKALQRP) またはPML-RARA (A) ペプチド (SGAGEAAIETQS) を培養した未熟樹状細胞 ($1 \times 10^6/m1$) に培養3日目 (50 ng/ml) と5日目 (15 ng/ml) にパルスした。

成熟樹状細胞の培養：パルスした樹状細胞をGM-CSF、IL-4、TNF- α (10 ng/ml) を加えてさらに5日間培養した。

腫瘍抗原特異的CTLの誘導：自己末梢血非付着単核細胞 (リンパ球) をパルスした樹状細胞 (30Gyの放射線照射後) に加え (混合比10-200:1)、6日間培養した。

細胞障害性試験：正常人における検討では、自己末梢血付着細胞にM-CSF (50 ng/ml) を加えて誘導したマクロファージに、培養3日目にbcr-ablペプチドまたはPML-RARAペプチドをパルス (50 μ g/ml) した細胞をtargetとして用いた。また、CML症例のHLA一致骨髄移植ドナーからの樹状細胞を用いた検討では、CML症例の骨髄有核細胞をtargetとして用いた。いずれにおいても、樹状細胞で刺激したリンパ球をeffectorとして、target cellの⁵¹Cr放出による細胞障害試験を行い、CTLの誘導を評価した。

【結果】

正常人Aにおける検討では、bcr-abl (b3a2)ペプチドをパルスした樹状細胞は、単球由来及び樹状細胞前駆細胞由来にかかわらず、bcr-ablペプチドをパルスした自己マクロファージに対し強い障害作用のあるbcr-abl特異的CTLを誘導することができた。ただ、bcr-ablペプチドをパルスした自己マクロファージに対しては、パルスしていない樹状細胞と培養したリンパ球もある程度障害作用を示したが、これは、targetであるパルスしたマクロファージがbcr-ablペプチドを抗原提示することにより、effectorである自己リンパ球からCTLを誘導した可能性が考えられた。CML症例のHLA一致骨髄移植ドナーから培養し、bcr-ablペプチドをパルスした樹状細胞も、自己リンパ球にbcr-ablペプチドを抗原提示することにより、レシピエントであるCML症例の白血病細胞を障害するCTLを誘導することができた。しかし、正常人BおよびCにおける同様な検討では、bcr-ablペプチドをパルスした樹状細胞はbcr-ablをパルスしたマクロファージを障害するCTLを誘導することはできなかった。

PML-RARA(A)ペプチドをパルスした樹状細胞の自己CTL誘導に関するbcr-ablペプチドと同様な検討では、正常人AにおいてはPML-RARA(A)に対しても特異的に反応するCTLが誘導されたが、正常人Bにおいては、PML-RARA(A)に対するCTLの誘導は認められなかった。

【結論】

正常人およびHLA一致骨髄移植ドナーにおいて、12merのbcr-abl (b3a2) ペプチドでパルスした樹状細胞で刺激することにより、bcr-ablペプチドを提示する自己マクロファージまたはHLA一致患者白血病細胞に対し特異的に作用するCTLを誘導することができた。一方、このペプチドをパルスした樹状細胞による腫瘍抗原の提示についてはMHC拘束性が認められた。以上の結果より、予め症例のMHC拘束性についての検討や多種類のペプチドを用いることなどによ

り、CML における免疫療法や血液幹細胞移植後の再発に対する DLT への bcr-abl ペプチドと樹状細胞を応用した免疫療法の有用性が示唆された。特に、DLT への応用については、正常人の実験系で、ペプチドでパルスしないマクロファージを target とした場合は、ペプチドでパルスした樹状細胞により活性化された CTL (effector) は障害作用を示さないことから、ペプチドと樹状細胞を用いた本法は、DLT の際に問題となる GVH の増強を起こさずに、有効な GVL を誘導することができるものと考えられた。

また、12merのPML-RARA(A)ペプチドにおいても、MHC拘束性があるものの、樹状細胞を用いることにより、PML-RARAペプチドに対する特異的CTLが誘導されることから、APLに対しても、PML-RARAペプチドと樹状細胞を用いた免疫療法の有用性が示唆された。

5. 白血病細胞抽出液をパルスした樹状細胞による CTL の誘導

腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞を用いた CTL の誘導による腫瘍に対する免疫療法は、腫瘍に対する特異性が高く、有用な方法と考えられる。しかし、その応用に際しての問題点は、大部分の腫瘍細胞はその腫瘍特異的ペプチドが同定されていないことに加えて、ペプチドの MHC 拘束性が存在することにより、適用できる症例の数が少ないことである。我々は、腫瘍抗原ペプチドが同定されていない腫瘍に対しても樹状細胞を用いた免疫療法を応用するために、ペプチドの代わりに腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞に腫瘍細胞に対する CTL を誘導する作用があるかどうかについて検討した。

【材料と方法】

対象症例：3 例の AML 症例（初診時の芽球と寛解時の末梢血細胞および初診時の芽球と HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞の各組み合わせ）と 1 例の ALL 症例（再発時の芽球と HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血細胞の各組み合わせ）で行った。

未熟樹状細胞の培養：2 例の AML 症例では寛解時の、また各 1 例の AML 症例と ALL 症例では骨髄移植ドナーの末梢血付着細胞を GM-CSF と IL-4 を加えて 3 日間培養した。培養はヒト AB 血清を 5%加えて行った。

白血病細胞抽出液の調整：初診時もしくは再発時の骨髄単核細胞を ultrasonication した細胞抽出液に、使用直前に DOTAP (cationic liposome) を混ぜた。

白血病細胞抽出液による樹状細胞のパルス：白血病細胞抽出液を培養 3 日目の未熟樹状細胞に加え、2 時間反応させた後、洗浄した。

成熟樹状細胞の培養：パルスした樹状細胞を GM-CSF、IL-4、TNF- α を加えてさらに 5 日間培養した。

CTL の誘導：樹状細胞を培養した人と同一人の末梢血非付着単核細胞（リンパ球）を、パルスした樹状細胞（30Gy の放射線照射後）に加え（混合比 10-70 : 1）、6 日間培養した。

細胞障害性試験：白血病細胞抽出液を調整したと同じ骨髄単核細胞を target とし、樹状細胞で刺激したリンパ球を effector として、⁵¹Cr 放出による細胞障害試験を行った。

【結果】

自己の系における 2 例の AML 症例における検討では、白血病細胞抽出液でパルスした寛解期末梢血由来の樹状細胞は、自己の白血病細胞を障害する CTL を誘導することができた。各 1 例の AML 症例と ALL 症例における HLA 一致骨髄移植ドナーとレシピエントとの組み合わせによる検討では、症例の白血病芽球でパルスした HLA 一致骨髄移植ドナーの末梢血由来樹状細胞は、レシピエントの白血病細胞を障害する CTL を誘導することができた。

【結論】

自己または HLA 一致レシピエントの白血病細胞抽出液でパルスした正常人の末梢血付着細胞に由来する樹状細胞により、白血病細胞に障害性を有する CTL を誘導することができた。腫瘍細胞抽出液を用いる方法においては、樹状細胞に取り込まれた腫瘍抗原蛋白は、細胞質内でその細胞の HLA に適した腫瘍抗原ペプチドに trimming されるので、HLA 拘束性が問題にならないと考えられ、また腫瘍特異的ペプチドが同定されていない腫瘍に対しても適用することができ、免

疫療法としての応用範囲は広いと考えられる。しかし、DLT に応用した場合は、GVL 効果の他、minor MHC を介する GVH の増強も考えられることから、今後の検討が必要である。

6. 樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法の現状と考察

悪性腫瘍の治療成績を飛躍的に向上するためには、従来の化学療法、手術療法、放射線療法に加えて効果的な免疫療法の確立が重要である。そのためには、細胞に対し特異的に作用する CTL の誘導が不可欠である。従来行われてきた LAK や TIL などの免疫細胞を用いた方法は、腫瘍細胞に対する特異性が十分とはいえず、必ずしも癌治療成績の向上に寄与していない。腫瘍細胞に対する特異性を高める方法の 1 つとして、最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞の応用が考えられる。近年、樹状細胞に対する研究が進歩し、末梢血や骨髄、それに臍帯血からサイトカインを用いることにより効率的に樹状細胞を培養できるようになったことから、樹状細胞を応用した腫瘍に対する免疫療法についての研究は広範囲な広がりを見せている。最近になって、B 細胞リンパ腫に対してはハイブリドーマにより得られた腫瘍特異的イデオタイプ蛋白をパルスした樹状細胞を静注することによる⁷⁾、多発性骨髄腫に対しては骨髄腫細胞が産生しているモノクローナル抗体でパルスした樹状細胞を静注することによる、悪性黒色腫に対してはメラノーマ関連抗原ペプチドや腫瘍細胞抽出液でパルスした樹状細胞を鼠径部リンパ節に注入することによる、また前立腺癌に対しては癌特異的膜抗原ペプチドをパルスした樹状細胞を静注することによる¹⁰⁾臨床試験が開始されており、腫瘍特異的 CTL の誘導とその有効性についての予備的な報告が認められる。

白血病に対する免疫療法として樹状細胞を応用した臨床試験は未だ報告されていないが、白血病においては、染色体転座に伴う遺伝子再構成により正常細胞には存在しない腫瘍特異的蛋白質の発現がみられるものが存在し、これらの型の白血病は腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞を用いた免疫療法の最適な対象疾患になる可能性がある。このような染色体転座による腫瘍特異的蛋白質を発現する代表的な白血病は bcr-abl 融合蛋白質を発現する CML と PML-RARA 融合蛋白質を発現する APL である。今回の我々の検討では、bcr-abl ペプチドと PML-RARA ペプチドのいずれにおいても、MHC 拘束性はあるものの、これらのペプチドをパルスした樹状細胞は、これらのペプチドを細胞表面に提示することができ（予備的な検討であるが、FITC を結合した 12mer bcr-abl (b3a2) ペプチドを用いた FACS による検討でもこのペプチドの樹状細胞表面での提示を確認している）、bcr-abl ペプチドに特異的に反応する CTL を誘導することができた。特異的な CTL の誘導が可能なることから、CML においてはインターフェロン治療と組み合わせることにより、また APL では tretinoin (all-trans retinoic acid: ATRA) や地固め療法としての抗白血病剤治療と組み合わせることにより、残存する白血病細胞を根絶できる可能性が想定された。

一方、近年になって白血病や MDS に対する造血幹細胞移植後の再発に対する DLT の有用性が明らかにされている。また、最近では従来型の移植が困難な症例に対して、non-ablative conditioning regimen transplantation と DLT を組み合わせた治療法が検討されており、その有用性も最近になって報告され始めている。このように、DLT は今後の造血幹細胞移植にとってキーワードとなる方法論であるが、現状での DLT の効果は、対象疾患によっても異なり、必ずしも十分とは言えない。白血病に対する DLT の効果としては、GVL に基づく本来の目的とする抗白血病効果と、minor MHC の相違に基づくと考えられる治療上好ましくない GVH の増強効果が存在する。GVL を増強し、GVH を抑えるような理想的な DLT の方法は現在のところ存在しないので、GVL を増強するが GVH を増強しない方法論が、とりあえずは現実的な取り組みと考えられる。この目的に添ったものとしては、腫瘍抗原ペプチドと樹状細胞による DLT の改良が考えられ、パルスした樹状細胞を放射線照射してそのまま輸注するか、パルスした樹状細胞を用いて in vitro で誘導した腫瘍抗原特異的 CTL を輸注するかの検討は必要であるが、いずれにしても現実的に無理なく施行できる方法論として期待される。ペプチドを用いて行う場合に障害となる MHC 拘束性の克服については、アミノ酸の数が異なる多種類のペプチド断片を用いて樹状細胞をパルスすることにより、適応症例の拡大が可能と考えられる。

腫瘍細胞抽出液をパルスした樹状細胞を用いた腫瘍細胞特異的 CTL の誘導による腫瘍の免疫療法は、自己の系では殆ど全ての腫瘍に適用できると考えられるが、このような手技による自己免疫疾患の発症などの問題点を考慮する必要があるものと考えられる。また DLT への応用に関しては、GVL の増強効果が期待できる反面、minor MHC による GVH も顕著になる可能性が想定され、DLT に組み合わせる場合は、CTL への TK 遺伝子の導入とガンシクロピルの投与などの活性化 CTL を調節する方法の開発などを含めた十分な配慮が必要と考えられる。