

Cancer Immunotherapy with Chimeric Immune Receptors (CIRs) : A Renewed Focus on Their Gene Constructions

Hirotoomo SHIBAGUCHI, Motomu KUROKI, Tetsushi KINUGASA
and Masahide KUROKI

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Abstract : The use of cellular immunotherapy has been limited to date mostly due to the poor immunogenicity of tumor cells, based on a downregulation and/or dysfunction of the major histocompatibility complex that is essential for tumor cell recognition by the cellular immune system. On the other hand, the application of tumor specific monoclonal antibodies have given rise to major obstacles in the effective cytotoxicity of tumor cells by the humoral immune system because of their slow tumor penetration and short half-life. In the past two decades, various strategies have been which combine the advantages of antibody-based and T cell-based immunotherapy by grafting cytotoxic T lymphocytes (CTLs) or natural killer (NK) cells with chimeric immune receptors (CIRs) in order to improve the efficacy of adoptive cellular cancer immunotherapy. CIRs are usually made up of antibody fragments of anti-tumor antibodies and cellular activation domains of antigen-recognizing receptors on CTLs or NK cells. Recently, the details of the intracellular signaling pathways of CTLs or NK cells has gradually become clear, and based on such information, modifications of the CIRs to enhance the effector function have thus been carried out.

Key words : Chimeric immune receptor, Cancer immunotherapy, Activation signaling, Intracellular domain

キメラ免疫受容体 (CIR) を利用したがんの免疫療法 — 遺伝子再構築を中心に —

芝口 浩智 黒木 求 衣笠 哲史
黒木 政秀

福岡大学医学部生化学

要旨 : がんの免疫療法として、細胞性免疫の増強をめざすワクチン療法や活性化自己リンパ球移入療法と液性免疫の強化に基づく抗体療法が試みられている。細胞性免疫においては、腫瘍細胞が免疫系に捕捉されるために必須である主要組織適合性抗原 (ヒトでは HLA) の腫瘍細胞表面上における欠損や機能不全がしばしば問題となる。一方抗体療法においては、抗体ががん組織深部へ到達するのに時間がかかることやその半減期が短いことなどが障害となっている。近年、T細胞やNK細胞を活性化するための細胞内シグナル経路の詳細が明らかになるにつれ、これらの免疫系細胞を活性化する遺伝子組換え分子を利用したがん免疫療法が試みられている。とくに注目を集めているのは、HLA非依存的に腫瘍細胞に対する細胞性免疫を増強する方法として、腫瘍抗原に対する抗体分子の抗原結合部位とT細胞やNK細胞における抗原認識分子の細胞内シグナル領域とを融合したキメラ免疫受容体による免疫療法である。

キーワード : がん免疫療法, キメラ免疫受容体, 活性化シグナル, 細胞内ドメイン

は じ め に

ウイルスや寄生虫などの感染防御では、好中球やマクロファージあるいは NK 細胞が初期防御を行い、その後 T 細胞とくに細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) による特異免疫系が、死滅し貪食された抗原情報を抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) から受けることでウイルス感染細胞などの標的細胞を攻撃する (図 1 A)。一方で、生体内における腫瘍細胞の排除には、CTL や NK 細胞などの細胞性免疫がきわめて重要な役割を担っていることが知られている。しかしながら、腫瘍細胞は主要組織適合性抗原 (ヒトの場合は HLA) あるいは共刺激シグナルを入力するための B7 ファミリーなどの発現低下や欠損あるいは機能不全を起こし、しばしばこれら免疫系の監視システムを免れている (図 1 B)。したがってワクチン療法や活性化自己リンパ球移入療法など細胞性免疫を賦活するがん免疫療法が行われているが、活性化した免疫細胞でも攻撃対象を認識しがたいことを意味し、期待したほどの効果は得られない結果になっている。

一方で、がん免疫療法のもう一つの柱で液性免疫の強化に基づく抗体療法は、日本でも Herceptin や Rituxan あるいは Mylotarg が実際に臨床応用されるようになり期待を集めている。しかし、抗体療法もまた、癌組織全体への到達速度が遅いことや半減期が短いことから、単独では十分な効果が得られない結果となっている。

これらの問題に対して、HLA を欠いた腫瘍細胞を、HLA 非依存的に免疫系細胞が認識して攻撃できるよう

にする方法が考案され、我々の教室でも取り組んできた^{1)~6)}。これらの HLA 非依存的ながん免疫療法のうち、特にキメラ免疫受容体 (chimeric immune receptor; CIR) を用いた CTL や NK 細胞の活性化について、最近の戦略を紹介する。

1. T 細胞活性化と標的傷害のメカニズム

腫瘍排除の主役を担う CTL の活性化は、APC 上に提示される HLA クラス II 分子と癌抗原ペプチドの複合体を T 細胞受容体 (T-cell receptor; TCR) が認識することで起こる (図 2)。このとき細胞内では、CD4 の細胞内領域に結合しているチロシンキナーゼ p56^{lck} (Lck) やチロシンキナーゼ p59^{fyn} (Fyn) による TCR (主に CD3ζ) の ITAM と呼ばれる領域のリン酸化が起こり、引き続き ZAP70 やさらに下流の PLC-γ や Ras の活性化といった一連のシグナルカスケードが惹起される。その結果 NF-AT, AP-1, NF-κB などの遺伝子転写因子が誘導されパーフォリン放出などによる標的傷害に結びつくとともに、細胞増殖や IL-2, IFN-γ などのサイトカイン産生といった CTL の活性化がもたらされる。

他方、CTL 表面の CD28 分子を始めとする共刺激シグナルは、TCR を介したシグナルとともに CTL の活性化に必須のシグナルであり、この CD28 による共刺激シグナルが入力されない場合には、CTL はアナジーやアポトーシスに陥る。共刺激なしに抗原と反応した CTL がアナジーに陥る理由の一つとして、TCR のみへの刺激では転写因子のうち NF-AT が優位に誘導されることが挙げられる。NF-AT が核に移行すると 3 種のユビキチンリガーゼ (E3) が発現する。これらは

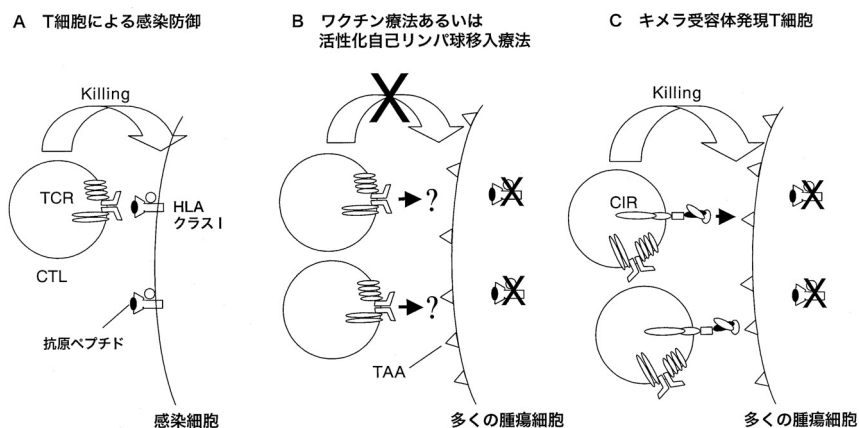


図 1 キメラ受容体発現 CTL の標的認識機構
ウイルス等の感染細胞では、抗原ペプチドが HLA 分子で提示され、CTL がそれを認識して攻撃をすることができる (A) が、多くの腫瘍細胞では HLA が働かないため攻撃することができない (B)。キメラ受容体を発現させた CTL は、腫瘍細胞膜上の腫瘍関連抗原 (TAA) を認識して攻撃するため、この問題を回避できる (C)。

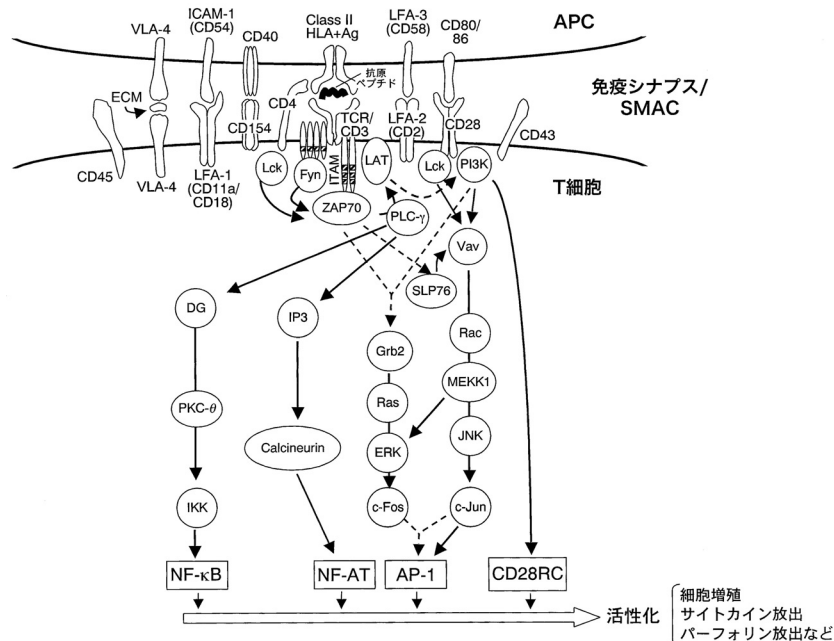


図2 APC と CTL の間で相互作用する分子群と CTL の活性化シグナル伝達
 AP-1, activator protein-1; CD28RC, cluster of differentiation 28-responsive complex; DG, diacylglycerol; ECM, extracellular matrix; ERK, extracellular signal related antigen; ICAM-1 (CD54), intracellular adhesion molecule-1; IKK, I κ B kinase; IP3, inositol-triphosphate; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LAT, linker of activated T cells; LFA, lymphocyte function associated antigen; MEKK1, MAP/ERK kinase kinase 1; NF-AT, nuclear factor of activated T cells; NF- κ B, nuclear factor κ B; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC- θ , protein kinase C- θ ; PLC- γ , phospholipase C- γ ; SLP76, SH 3 domain containing leukocyte protein of 76 kDa; SMAC, supramolecular activation clusters; VLA-4, very late antigen-4; ZAP70, ζ chain associated protein of 70 kDa

HLA と抗原ペプチドと TCR を中心とした種々の分子が集めた免疫シナプスあるいは SMAC と呼ばれる構造を維持するのに必要なタンパク (PLC- γ , PKC- θ および PI3K) をユビキチン化し、直ちに分解する。そのため CTL は持続的な抗原刺激のための構造を維持できず、アナジーに陥る。CD28 からのシグナルは、E3 のプロテアソームでの分解を促し、SMAC 構造を維持することで強いシグナルを入力でき、結果としてアナジーを防ぐ。しかし、同じように共刺激シグナルを欠いた場合に、何がアナジーとアポトーシスとなる運命を分けているのか、という詳しいメカニズムについてはまだ十分には解明されていない。

2. T 細胞におけるキメラ受容体 (CIR)

活性化された CTL が腫瘍細胞を傷害するには、HLA クラス I 分子と抗原ペプチドを TCR で認識することが必須であるが、初めに述べたように腫瘍細胞においては、しばしば HLA クラス I 分子が欠損したり機能不全や発現低下に陥る。そこで近年、抗体と T 細胞受容

体を融合させた CIR が、免疫系細胞を腫瘍細胞やウイルス感染細胞に集積させる方法として注目されてきた⁷⁾。CIR は遺伝子工学を用いて作製された人工的な免疫受容体であり、癌細胞膜上の腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen; TAA) に特異的な抗体の可変領域のみを利用した単鎖抗体 (scFv) に、膜貫通領域と細胞内の ITAM 領域を融合させてある。したがって CIR を発現した T 細胞は、標的細胞の HLA クラス I / 抗原ペプチド複合体を自身の TCR で認識する必要がなく、腫瘍細胞表面上に TAA が発現していれば、TAA に CIR が結合することで、活性化シグナルを入力できる (図 1 C)。このように HLA クラス I と抗原ペプチド認識の過程をバイパスすることで、多くの腫瘍細胞で見られるように、仮に HLA クラス I を欠損したとしても、TAA を発現した標的細胞を認識して攻撃することができる。図 3 に T 細胞に用いられる主な CIR の構築を模式的に示した。以下各構築上のドメインの意義について述べる。

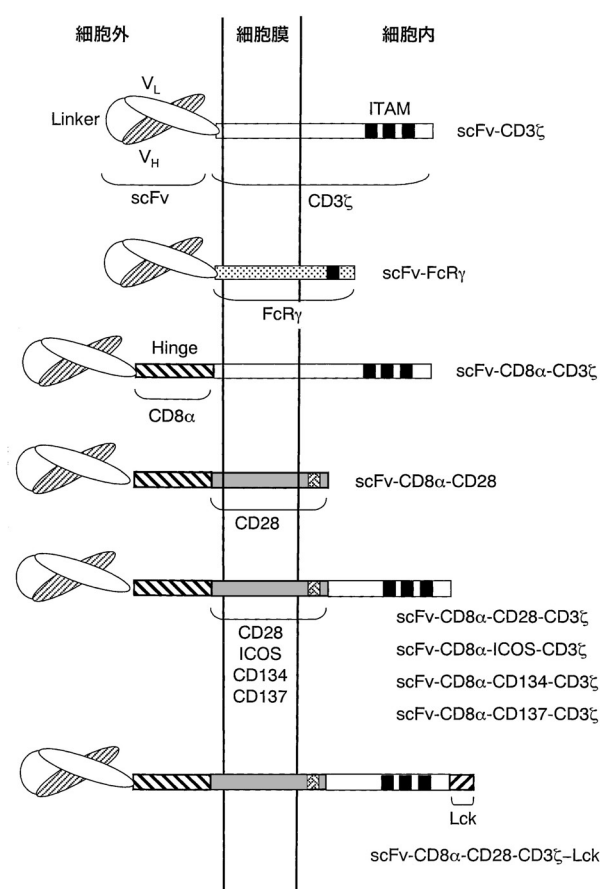


図3 CTLに発現させる代表的なキメラ受容体(CIR)の模式図
ICOS, inducible costimulator; scFv, single-chain variable fragmented antibody

1) 活性化シグナル領域(CD3ζ または FcεRIγ)

初期の CIR は、2つの領域からなっていた⁷⁾。すなわち細胞外には TAA の認識部分があり、他方は細胞内の ITAM 領域である。TCR 複合体において細胞内に活性化シグナルを伝える ITAM 領域を持つ CD3 分子は、分子量 25kD の γ、20kD の δ、20kD の ε、23kD の η および 16kD の ζ の各成分から成っているが、ζ と η が細胞内シグナルを伝えるのに重要とされている。また T 細胞で機能的な TCR を形成するのに、ζ 成分の存在が必須である。さらに、腸管上皮内など粘膜内の T 細胞では ζ 鎖の代わりに Fc レセプターの γ (FcRγ) 鎖を用いているものも多く見られる。これらの情報を基にこれまで CIR の ITAM として、これら CD3 分子の細胞内領域がそれぞれ検討されたが、最近では CD3ζ もしくは FcεRIγ を用いるのが一般的となっている(図3)^{8)~11)}。

2) CD28 による共刺激シグナル

T 細胞がアナジーに陥ることなく活性化するために、TCR による抗原シグナルのみならず共刺激シグナルが

必要であることは上述の通りである。さらに、休止期の T 細胞が TCR シグナルのみを受けると、T 細胞の増殖因子である IL-2 の産生が誘導されないことと、Bcl-x_L や Bcl-2 といった抗アポトーシス分子が発現しないため T 細胞がアポトーシスに陥る。T 細胞の生存を支持するこの共刺激シグナルの入力を担っている APC 上の CD28 リガンドは、B7 ファミリーとして知られている B7-1 (CD80) と B7-2 (CD86) である。これら B7-1 と B7-2 は、APC 以外の細胞には発現がなく、このことが活性化された T 細胞の腫瘍局所におけるアナジーやアポトーシスにつながる。そこで我々を含め、最近の報告では CIR に CD28 の細胞内領域を融合させ、CD28 による共刺激シグナルを同時に入力させる遺伝子構築が主流になっている(図3)^{5)8)11)~13)}。

3) CD28 以外の共刺激シグナル

最近では、CD28 の他にも T 細胞を共刺激する分子が T 細胞上に発現していることがわかっている。その代表である ICOS は、T 細胞の活性化に伴って発現してくる CD28 類似のレセプターで、主に B 細胞に発現している B7RP-1 (B7-related protein-1) ないし B7H-2 (B7 homolog-2) をリガンドとしている。CD28 と違い ICOS は、活性化刺激後 24~48 時間ですべてのヘルパー T (Th) 細胞にその発現が誘導され、また IL-12 存在下ではその発現低下が起こることなどから、CD28 非依存的に Th2 細胞への分化など、T 細胞に特殊な機能を付与する働きを持つと考えられる^{14)~18)}。Finney らは、CD28 に代わる共刺激シグナルを T 細胞内に入力する分子として ICOS、CD134 (OX-40)、CD137 (4-1BB) を試みている(図3)¹⁹⁾。

一方、CD134 や CD137 はともに TNF 受容体 (TNFR) のひとつであり、ICOS 同様に活性化 T 細胞に発現するが、その構造は CD28 や ICOS とは異なる²⁰⁾。CD134 への刺激は、T 細胞の増殖やサイトカイン産生、活性化を促していると思われる。さらに、CD28 と同様に Bcl-x_L や Bcl-2 の産生により CD4⁺ T 細胞の長期生存を助ける働きも持つ^{20)~27)}。CD137 の活性化では、TCR の刺激入力と相まって、CD4⁺ と CD8⁺ の両方の T 細胞の増殖、生存やサイトカイン産生を増強し、CTL への分化と免疫原性の弱い腫瘍の拒絶を増強することも報告された(図3)^{28)~32)}。Finney らによれば、CD28 を含めたこれら共刺激シグナルの中では、in vitro の細胞傷害活性において ICOS と CD3ζ の組み合わせが最も効果があったという¹⁹⁾。

このように、最近では CD28 のみならず、さまざまな共刺激シグナルと ITAM を組み合わせる試みが始まっている。

4) 細胞内リン酸化修飾領域

ひとたび SMAC が形成され、活性化の信号が細胞

内に入力されると、前述のようにT細胞内では Lck や Fyn による ITAM のチロシンリン酸化が起こる。これが引き金となり ZAP70 以下に続くT細胞活性化のシグナルカスケードが始まる。この一連のシグナルカスケードの引き金となるリン酸化を促進し、活性化シグナルを増強することを目的に Lck を結合した CIR の作製も行われ、in vitro の細胞傷害活性において一定の成果が得られている（図3）³³⁾³⁴⁾。T細胞内での活性化シグナルのカスケードはまだ十分に解明されていないところもあり、たとえば、ZAP70 と Syk (Spleen tyrosine kinase) はいずれも ITAM 領域に結合しT細胞の活性化シグナルを下流に伝えるが、ZAP70 が Lck や Fyn に依存するのに対し、Syk はそれらに依存しない。また ZAP70 が活性化T細胞のアポトーシスを惹起しているのに対し、Syk の関与は低いと思われるなど極めて複雑に入り組んでいる³⁵⁾。しかしこのように、徐々に明らかになりつつあるこれら細胞内シグナルカスケードを制御し、CIR に応用する試みは今後ますます広がるものと思われる。

3. NK 細胞活性化と標的傷害のメカニズム

T細胞とともに腫瘍免疫の一方の主役を担う NK 細胞は、T細胞に特異的な特異マーカー（TCR, CD3, CD4, CD8 など）やB細胞に特異的な特異マーカー

(Ig, CD19, CD20 など)のいずれも発現せず、CD16 (Fc γ RIII) と CD56 を発現し、あらかじめ活性化しなくてもある種の腫瘍細胞を傷害する細胞群として見いだされた。CTL が SMAC を形成して活性化され HLA 依存的に細胞傷害活性を示すのに対して、NK 細胞は特異抗原を認識することなく細胞傷害性を示す。しかしながら、どんな細胞も攻撃する訳ではなく、自己の HLA クラス I 分子を発現していない細胞や、発現量の低下した細胞が攻撃対象となる。

NK 細胞の受容体は、活性化受容体と抑制性受容体の二つに大別されるが、それぞれのグループには構造の異なる Ig スーパーファミリーに属する KIR あるいは LIR (leukocyte Ig like receptor) と総称される受容体と、糖鎖に結合するC型レクチンファミリーに属する NKR-P1 や NKG2, Ly-49 よりなる受容体群に大別される（図4）。活性化受容体はいまだ不明な点が多いが、いずれの場合も ITAM を持つシグナル伝達分子 DAP12 分子などと会合して存在している（図4）。標的分子を認識すると DAP12 の ITAM のチロシン残基がチロシンキナーゼ（Lck が候補として挙げられる）によってリン酸化され、次いで Syk や ZAP70 などのチロシンキナーゼが結合し、細胞傷害性を発現する活性化シグナルが伝達される。この点は TCR/CD3 のシグナル伝達に類似する。一方、抑制性受容体は、いずれも

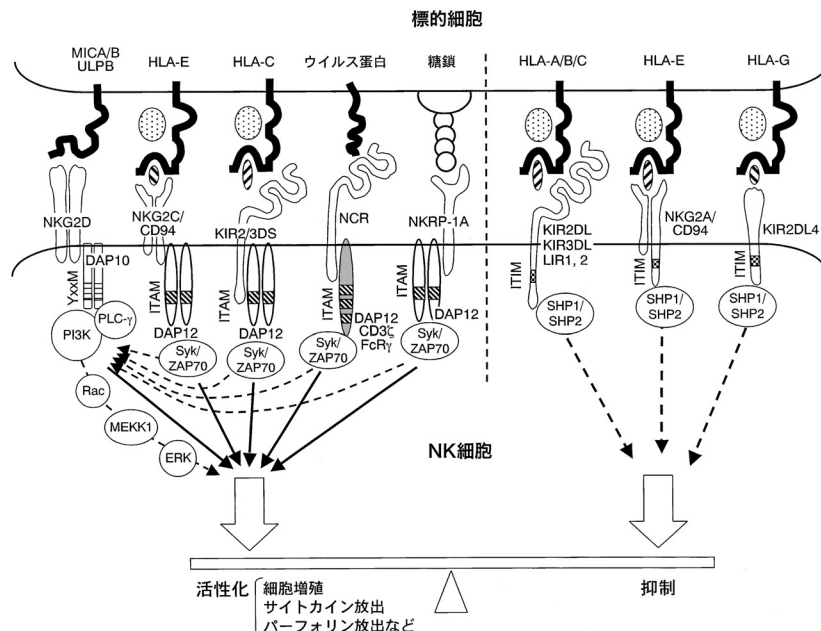


図4 NK細胞の主要な活性化/抑制性受容体とその標的分子
DAP10, DNAXactivating protein of 10 kDa; DAP12, DNAX-activating protein of 12 kDa; ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; KIR, killer inhibitory receptor; MICA/B, MHC class I chain related A/B; NCR, natural cytotoxicity receptor; ULBP, UL16 binding protein

自己の HLA クラス I 分子を認識すると、分子内で会合している ITIM のチロシン残基のリン酸化を介して、SHP-1 や SHP-2 などのホスファターゼによって抑制性のシグナルが入力される (図 4)。

NKG2 ファミリーには、NKG2A/B、NKG2C、NKG2D、NKG2E/H および NKG2F が存在する。NKG2A/B は細胞内領域が長く、ITIM 領域を有し CD96 分子と会合して抑制性受容体として働く。一方、NKG2C と NKG2D は細胞内領域が NKG2A/B に比して短く ITIM 領域がない。NKG2C はやはり CD94 とヘテロダイマーを形成しているが、さらに DAP12 と会合しその ITAM によって活性化シグナルが伝えられる。NKG2D はホモダイマーを形成し、DAP12 ではなく DAP10 と会合している。これらのうち NKG2D は T 細胞の活性化にも用いられる。DAP10 は ITAM 領域を持たないが、YxxM (x は分子によって異なるアミノ酸となる) モチーフと呼ばれる PI3K 結合領域を持ち、ERK や MEKK1 あるいは PLC- γ などの一連の分子の活性化によりパーフォリン放出などによる標的傷害に結びつく (図 4)。NK 細胞の活性化と細胞傷害性を検討した最近の報告によれば、NKG2D と DAP10 の細胞内シグナルは、主に PLC- γ 2 を経由して細胞傷害活性を持つことが報告されている³⁶⁾。NKG2D リガンドである MICA/B は、すでに述べたように、感染細胞やストレス細胞、腫瘍細胞などにおける発現の亢進が認められており、がん免疫療法の標的分子としての応用も期待されている³⁷⁾。

NK 細胞は、これらの正負双方のシグナルのバランスによって細胞傷害性が決定される³⁸⁾。したがって、HLA クラス I 分子が高発現している細胞は抑制性シグナルが勝り、細胞障害を受けないことになる³⁷⁾。

4. NK 細胞におけるキメラ受容体 (CIR)

NK 細胞の抗原認識受容体は多岐にわたり、かつ複雑であるため、その詳細はまだ十分に解明されていないが、いくつかの活性化シグナルを伝える分子を利用して T 細胞の場合と同様に、NK 細胞を腫瘍細胞特異的に活性化させる試みが始まっている (図 5)。以下 T 細胞における CIR の構築では触れなかったドメイン部分について概説する。

1) DAP10

DAP10 は NK 細胞において、活性化受容体に会合している分子で、ITAM 領域を持つため、活性化シグナルの入力が期待される。Imai らによって細胞外に CD19 に対する単鎖抗体を持つ分子の細胞内領域として検討されたが、NK 細胞の活性化シグナルの入力分子としては、T 細胞でないにもかかわらず CD3 ζ や CD3 ζ と 4-1BB (CD137) の組み合わせに及ばなかつ

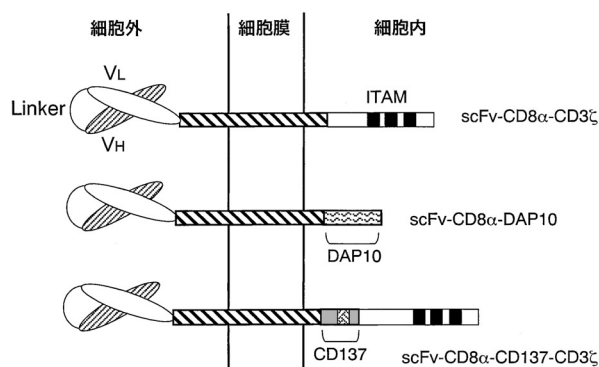


図 5 NK 細胞に発現させる代表的なキメラ受容体の模式図

た³⁹⁾。CTL においても、同様の結果が得られていることから⁴⁰⁾、DAP10 あるいは DAP12 などの ITAM 分子は、単独では十分な活性化シグナルが発生しない可能性がある (図 5)。

2) CD3 ζ と CD137

T 細胞を活性化する主要なシグナルの代表である CD3 ζ が、NK 細胞の活性化にも用いられている。NK 細胞と T 細胞の活性化のシグナルカスケードには多くの類似点があることはこれまで見てきた通りで、例えば CD3 ζ や Fc ϵ RI γ も最近 NCR の一つである NKp30 や NKp46 にそれぞれ ITAM として会合していることが分かっている³⁸⁾。したがって、NK 細胞においても CD3 ζ あるいは CD137 を結合させて細胞内領域に用いることで、強力な活性化シグナルを入力できるようなのである (図 5)³⁹⁾。

ま と め

がん免疫療法として、腫瘍細胞を攻撃するエフェクター細胞として重要な働きを担っている T 細胞や NK 細胞を、HLA 非依存的に腫瘍細胞特異的に集積させる手段として近年注目されているキメラ受容体について、最近の報告を中心にまとめた。細胞内のシグナルカスケードは、依然不明な点が残されているものの次第に明らかになりつつあり、これらの分子の遺伝子を単独、あるいは組み合わせることで、目的とする腫瘍細胞を攻撃するために、エフェクター細胞に特異的かつ最適な活性化シグナルを入力できるキメラ受容体が開発される日も遠からず訪れるはずである。しかしながら、生体内では種々のサイトカイン、ケモカインがさまざまな細胞群から放出され、それらが免疫系を正負双方に制御し、また腫瘍細胞も時々刻々とその状態を変化させていることは想像に難くない。そのために、キメラ受容体を発現させたエフェクター細胞の単独投与が、がん局所での微小環境によっては思わしい効果を現さないことも起こりうる。したがっ

て、がんの免疫療法を行う場合には、これらキメラ受容体を発現したエフェクター細胞に加えて、代表的な活性化サイトカインである IL-2 の併用など、がんのステージや患者の状態に合わせて一つの方法に拘泥することなく、最適と思われる方法や組み合わせを検索、応用していくことが、ますます重要と思われる。

文 献

- 1) Kuwahara M, Kuroki M, Arakawa F, Senba T, Matsuoka Y, Hideshima T, Yamashita Y and Kanda H : A mouse/human-chimeric bispecific antibody reactive with human carcinoembryonic antigen-expressing cells and human T-lymphocytes. *Anticancer Res* 16 : 2661-2667, 1996.
- 2) Liao S, Khare PD, Arakawa F, Kuroki M, Hirose Y, Fujimura S, Tomita Y and Kuroki M : Targeting of LAK activity to CEA-expressing tumor cells with an anti-CEA scFv/IL-2 fusion protein. *Anticancer Res* 21 : 1673-1680, 2001.
- 3) Arakawa F, Shibaguchi H, Xu Z and Kuroki M : Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity. *Anticancer Res* 22 : 4285-4289, 2002.
- 4) Ueno A, Arakawa F, Abe H, Matsumoto H, Kudo T, Asano R, Tsumoto K, Kumagai I, Kuroki M and Kuroki M : T-cell immunotherapy for human MK-1-expressing tumors using a fusion protein of the superantigen SEA and anti-MK-1 scFv antibody. *Anticancer Res* 22 : 769-776, 2002.
- 5) Gyobu H, Tsuji T, Suzuki Y, Ohkuri T, Chamoto K, Kuroki M, Miyoshi H, Kawarada Y, Katoh H, Takeshima T, et al. : Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T-cell receptor. *Cancer Res* 64 : 1490-1495, 2004.
- 6) Kuroki M, Kuroki M, Shibaguchi H, Badran A, Hachimine K, Zhang J and Kinugasa T : Strategies to endow cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells with antibody activity against carcinoembryonic antigen. *Tumour Biol* 25 : 208-216, 2004.
- 7) Gross G, Waks T and Eshhar Z : Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 10024-10028, 1989.
- 8) Heuser C, Hombach A, Losch C, Manista K and Abken H : T-cell activation by recombinant immunoreceptors : impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Ther* 10 : 1408-1419, 2003.
- 9) Sheen AJ, Sherlock DJ, Irlam J, Hawkins RE and Gilham DE : T lymphocytes isolated from patients with advanced colorectal cancer are suitable for gene immunotherapy approaches. *Br J Cancer* 88 : 1119-1127, 2003.
- 10) Willemsen RA, Debets R, Chames P and Bolhuis RL : Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. *Hum Immunol* 64 : 56-68, 2003.
- 11) Friedmann-Morvinski D, Bendavid A, Waks T, Schindler D and Eshhar Z : Redirected primary T cells harboring a chimeric receptor require costimulation for their antigen-specific activation. *Blood* 105 : 3087-3093, 2005.
- 12) Haynes NM, Trapani JA, Teng MW, Jackson JT, Cerruti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ and Darcy PK : Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood* 100 : 3155-3163, 2002.
- 13) Moeller M, Haynes NM, Trapani JA, Teng MW, Jackson JT, Tanner JE, Cerutti L, Jane SM, Kershaw MH, Smyth MJ, et al. : A functional role for CD28 costimulation in tumor recognition by single-chain receptor-modified T cells. *Cancer Gene Ther* 11 : 371-379, 2004.
- 14) Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I and Kroczeck RA : ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397 : 263-266, 1999.
- 15) Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, et al. : The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13 : 95-105, 2000.
- 16) Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, Gutierrez-Ramos JC and Bachmann MF : Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192 : 53-61, 2000.
- 17) McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, et al. : Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165 : 5035-5040, 2000.
- 18) Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH and Flavell RA : ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409 : 97-101, 2001.
- 19) Finney HM, Akbar AN and Lawson AD : Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors : costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol* 172 : 104-113, 2004.
- 20) Watts TH : TNF/TNFR family members in costimu-

- lation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23 : 23-68, 2005.
- 21) Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M and Lane P : CD4 T cell cytokine differentiation : the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* 188 : 297-304, 1998.
- 22) Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M and Croft M : Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161 : 6510-6517, 1998.
- 23) Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P and Delespesse G : OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 92 : 3338-3345, 1998.
- 24) Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killeen N and Croft M : The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol* 165 : 3043-3050, 2000.
- 25) Maxwell JR, Weinberg A, Prell RA and Vella AT : Danger and OX40 receptor signaling synergize to enhance memory T cell survival by inhibiting peripheral deletion. *J Immunol* 164 : 107-112, 2000.
- 26) Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, Morris A, Ramstad T, Vetto JT, Urba WJ, Alvord G, Bunce C and Shields J : Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity. *J Immunol* 164 : 2160-2169, 2000.
- 27) Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N and Croft M : OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15 : 445-455, 2001.
- 28) Hurtado JC, Kim YJ and Kwon BS : Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158 : 2600-2609, 1997.
- 29) Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, Mittler RS and Chen L : Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3 : 682-685, 1997.
- 30) Takahashi C, Mittler RS and Vella AT : Cutting edge : 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162 : 5037-5040, 1999.
- 31) Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R, Pearson TC and Larsen CP : 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163 : 4859-4868, 1999.
- 32) Wen T, Bukczynski J and Watts TH : 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4 and CD8 T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol* 168 : 4897-4906, 2002.
- 33) Nguyen P and Geiger TL : Antigen-specific targeting of CD8+ T cells with receptor-modified T lymphocytes. *Gene Ther* 10 : 594-604, 2003.
- 34) Zhang T, He X, Tsang TC and Harris DT : Transgenic TCR expression: comparison of single chain with full-length receptor constructs for T-cell function. *Cancer Gene Ther* 11 : 487-496, 2004.
- 35) Zhong L, Wu CH, Lee WH and Liu CP : Zeta-associated protein of 70 kDa (ZAP-70), but not Syk, tyrosine kinase can mediate apoptosis of T cells through the Fas/Fas ligand, caspase-8 and caspase-3 pathways. *J Immunol* 172 : 1472-1482, 2004.
- 36) Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Billadeau DD and Leibson PJ : The isoforms of phospholipase C-gamma are differentially used by distinct human NK activating receptors. *J Immunol* 175 : 213-218, 2005.
- 37) Seliger B, Abken H and Ferrone S : HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol* 24 : 82-87, 2003.
- 38) Vivier E, Nunes JA and Vely F : Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306 : 1517-1519, 2004.
- 39) Imai C, Iwamoto S and Campana D : Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106 : 376-383, 2005.
- 40) Zhang T, Lemoi BA and Sentman CL : Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. *Blood* 106 : 1544-1551, 2005.

(平成18. 2. 8受付, 18. 4. 4受理)