



Title	免疫原性の高いマウス乳がん細胞株4T1-Sの同定
Author(s)	阿部, 紘丈
Description	配架番号 : 2261
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12387号
Issue Date	2016-09-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12387
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63285
Type	doctoral thesis
File Information	Hirotake_Abe.pdf



学位論文

免疫原性の高いマウス乳がん細胞株 4T1-S の同定

(Identification of a Highly Immunogenic Mouse Breast
Cancer Sub Cell Line, 4T1-S)

2016 年 9 月

北海道大学

阿部 紘丈

学位論文

免疫原性の高いマウス乳がん細胞株 4T1-S の同定

(Identification of a Highly Immunogenic Mouse Breast
Cancer Sub Cell Line, 4T1-S)

2016 年 9 月

北海道大学

阿部 紘丈

目次

【発表論文目録および学会発表目録】	1 頁
【緒言】	2 頁
【略語表】	4 頁
【実験方法】	5 頁
【実験結果】	9 頁
【考察】	28 頁
【総括および結論】	32 頁
【謝辞】	33 頁
【引用文献】	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Hirotake Abe, Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Sayaka
Nakanishi, Yuu Usui, Takahiro Tsuchikawa, Toshiaki Shichinohe,
Satoshi Hirano and Ken-ichiro Seino
Identification of a Highly Immunogenic Mouse Breast Cancer Sub Cell
Line, 4T1-S
Human cell、2016 年、2 月

本研究の一部は以下の学会に発表した

1. 阿部紘丈、林えりか、山中弘之、武内慎太郎、和田はるか、平野聡、
清野研一郎
ワクチン効果の異なるマウス乳がん細胞株の比較・検討によるワクチ
ン効果増強因子の検索
第 18 回 日本がん免疫学会総会 2014 年 7 月 30 日～ 8 月 1 日 愛媛
2. Hirotake Abe, Haruka Wada, Muhammad Baghdadi, Ken-ichiro
Seino
A novel strategy to improve the therapeutic effects of cancer
vaccines by modulating its immunogenicity
第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18 日～11 月 20 日 札幌

緒 言

乳癌は若年女性において最も高頻度に認められる癌の一つである^{1,2}。その理想的な治療戦略は、他の癌種と同様に早期診断、外科的切除、術後全身補助療法である。近年、この診断から治療の過程は目覚ましい発展を遂げ、診断分野ではマンモグラフィ、エコー、**magnetic resonance imaging (MRI)** といった各モダリティの精度向上はもちろん、本邦では乳がん検診受診率の向上に向けた社会的取り組みが行われ、診断例が増加してきている。また、外科治療においても乳房温存手術やセンチネルリンパ節生検といった低侵襲手術の導入により、術後の **quality of life (QOL)** 維持が可能となり、化学療法、ホルモン療法、放射線療法などの非手術法も開発、改良が続けられている。しかし、いまだに乳癌による女性の癌死亡率はアメリカで第2位¹であり、日本では同第5位であるが死亡率・罹患率とも増加を続けており²、新たな治療戦略の開発導入が求められている。また、従来のホルモン療法や化学療法においては一定の効果が得られてはいる³ものの、長期の治療を要するため副作用による **QOL** の低下が問題となっている^{4,5}。

癌免疫療法は従来の化学療法に比べ、より癌に対する特異性が高いことから、副作用の少ない治療法として開発・研究が期待される治療法である⁶⁻⁸。最近、癌免疫に対する新たな視点である **cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4)** や **programmed cell death 1 (PD-1)**、**programmed cell death ligand 1 (PDL-1)** など、免疫チェックポイントを標的とした分子標的療法が開発され、顕著な効果を上げている。また、従来からの免疫療法として、癌に対する特異的な免疫誘導による癌ワクチン療法も研究が盛んに続けられている。実際に、**DNA** ワクチンやペプチドワクチン、全細胞ワクチンなどを用いたいくつかの免疫療法によって、腫瘍細胞に選択的に発現している抗原に対し特異的な免疫反応を引き起こすことができている。特に、全細胞ワクチンでは様々な腫瘍抗原を同時に標的とできるという点で、他のアプローチよりも優れていると報告されている^{6,7}。しかし、いくつかの前臨床研究や臨床研究では、全細胞ワクチンを用いた治療を行っても抗腫瘍免疫反応を誘導することができなかつたとされ^{7,8}、その原因として腫瘍細胞そのものの免疫原性が低いことや、癌の免疫修飾機構の作用が挙げられている。

癌の免疫学的不均一性は腫瘍の発生や成長にも大きな影響を与える⁹⁻¹¹。近年提唱されている癌の免疫修飾の段階的過程においては、免疫原

性の高い腫瘍細胞は最初の段階（elimination phase）で免疫細胞の作用により排除されてしまうが、その一方で、免疫細胞による排除から逃れるために自らの免疫原性を低下させる変化が生じ（equilibrium phase）、最終的には免疫原性の乏しい細胞集団が優勢となり、転移や浸潤といった能力を獲得する（escape phase）とされている¹²。臨床的に診断できる癌の大半はこの equilibrium ～ escape phase の状態にあると考えられており、major histocompatibility complex (MHC) クラス I や II といった抗原を欠失し、免疫原性が低い状態であるとされている¹³。すなわち、癌ワクチン療法の効果を増強するためには腫瘍の免疫原性を免疫抵抗性から免疫感受性へと変化させる必要がある。

最近の研究では、放射線照射により腫瘍の免疫学的細胞死を誘導することができるという報告されている¹⁴。細胞は放射線照射により DNA や細胞膜などが障害され、放射線誘導性アポトーシスを引き起こし、これがマクロファージなどの貪食細胞により貪食されるため、免疫系が賦活される。この放射線照射後の炎症反応を利用した癌の治療法として、放射線免疫療法の可能性が模索されている¹⁴。

マウスの乳がん細胞株である 4T1 は免疫原性の乏しい細胞株として知られているが、放射線照射後の免疫原性の獲得や免疫治療に対する反応性なども有しているという報告がある^{15,16}。今回、この免疫原性の乏しいとされる 4T1 細胞株の中にも予防ワクチンとしての効果を示す細胞集団 4T1-Sapporo (4T1-S) が存在すること、すなわち、放射線照射した 4T1-S をワクチンとして接種すると、その後の 4T1-S の生着を予防し得ることを見いだすことができた。そこで、この 4T1-S の免疫学的機構を検証することにより、癌の免疫修飾機構の調節因子を解明することができ、ひいては既存の癌免疫療法の効果改善に寄与する可能性を考え、免疫原性の乏しい 4T1 と 4T1-S の比較研究を行うこととした。

略 語 表

本文中及び図中で使用した略語以下のとおりである。

4T1-A	4T1-ATCC
4T1-S	4T1-Sapporo
ACT	Adoptive cell therapy
ATCC	American type culture collection
cDNA	complementary DNA
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4
DLN	Draining lymph node
iPS	induced pluripotent stem cell
MACS	Magnetic cell separation
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MHC	Major histocompatibility complex
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed cell death 1
PDL-1	Programmed cell death ligand 1
QOL	Quality of life
RLN	Remote lymph node
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell park memorial institute
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
MRI	Magnetic resonance imaging
SEM	Standard error of the mean
SNP	Single nucleotide polymorphism
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes

実験方法

1) 細胞株

マウス乳がん細胞株 4T1 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し (4T1-A)、研究室で培養を維持しワクチン効果を認めた細胞株を 4T1-S とした。細胞培地は ATCC の培養プロトコールに従い RPMI-1640 (WAKO) を用い、10% 牛胎仔血清 (Cell culture Bioscience) と 1% のペニシリン／ストレプトマイシン (Life technologies)、1% L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、1% 非必須アミノ酸 (Life technologies)、50 μ M 2-メルカプトエタノール (WAKO) を添加して培養した。4T1-A、4T1-S とともに定期的にマイコプラズマの非感染を確認した (Lonza)。免疫学的細胞死の誘導は 300 Gy の X 線照射を行った。

2) マウス

実験動物は BALB/c、BALB/c-*nu/nu* の 6-10 週齢の雌マウスを使用した。全てのマウスは Sankyo Labo Service Corporation (SLC) 社より購入した。

3) ワクチン実験モデル

放射線照射した 4T1 細胞 (2×10^6 個) を 200 μ l の phosphate buffered saline (PBS) に再懸濁し、マウスの右背部に皮下注射した。ワクチン接種 2 週間後に 5×10^4 個の増殖期の 4T1 細胞を左の乳腺に接種し生着させ、腫瘍ボリューム ($1/2 \times L \times W \times H$)、および生存期間を評価した。本動物実験は北海道大学の倫理委員会の承認を受けて行った (No. 11-0160)。

4) ワクチン治療実験モデル

マウスの左の乳腺に 5×10^4 個の増殖期の 4T1 細胞を接種。その後、治療用ワクチンとして放射線照射した 4T1 細胞 (2×10^6 個) を 200 μ l の PBS に再懸濁し、マウスの右背部に皮下注射した。治療スケジュールは腫瘍接種後 6 日目、9 日目、13 日目、20 日目の接種とし、腫瘍ボリューム、および生存期間を評価した。本動物実験は北海道大学の倫理委員会の承認を受けて行った (No. 11-0160)。

5) Cytotoxic assay

LDH Cytotoxicity Assay Kit (Cayman Chemical) を用い、製品プロトコールに従い細胞障害性を評価した。Effector 細胞としてはワクチン接種後のマウスより回収してきた脾臓、リンパ節、静脈血より Miltenyi Biotec 社の磁気細胞分離法 (magnetic cell separation; MACS) を用い、CD8 α マイクロビーズで製品プロトコールに従って CD8 陽性 T 細胞を分取して使用した。Target 細胞は、それぞれワクチンや腫瘍接種に使用した細胞株と同じ株を使用し評価した。Effector target ratio は 100: 1~1.5625: 1 まで各種条件を検討した。腫瘍生着後のマウスにおいても細胞障害性がみられるかを確認するため、増殖期にある 4T1 を接種した 10 日後のマウスから脾臓、リンパ節、腫瘍を摘出しフローサイトメトリーにて CD107 α を発現する CD8 陽性 T 細胞が存在するかを検証した。使用したフローサイトメトリーの機器・抗体はフローサイトメトリーの項に記載した通りである。

6) 免疫記憶の確認

ワクチン接種後のマウスにおいて免疫記憶を獲得しているかを検討するために、ワクチン接種後 2 週間目に乳腺に腫瘍を接種し、その 1 週間後に脾臓、リンパ節を回収しフローサイトメトリーを用いて CD3、CD8、CD62L を染色し評価した。使用したフローサイトメトリーの機器・抗体は次のフローサイトメトリーの項に記載した通りである。

7) フローサイトメトリー

4T1 接種後の反応を評価するためにリンパ節、腫瘍組織のタンパク 発現をフローサイトメトリーにより解析した。マウス細胞の染色に用いた蛍光抗体は以下の通りであり、それぞれ製品プロトコールに従って染色を行った。フローサイトメトリーは FC500 (Beckman Coulter) を用いて行い、解析は FlowJo software V7.6.5 を使用した。

anti-CD3, anti-CD8 , anti-CD107a, annexin V (eBioscience), anti-CD19, anti-CD25, anti-CD29, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD49b, anti-CD54, anti-CD56, anti-CD62L, anti-CD69, anti-CD86, anti-CD94, anti-CD95, anti-CD133, anti-CD147, anti-CD172a, anti-CD196, anti-CD324, anti-NK1.1, anti-TLR4, anti-I-A/E, anti-TER2, anti-Sox2, anti-Nanog, anti-Oct3/4 (Biolegend)

8) マイクロアレイ

4T1-A および 4T1-S より、RNeasy Plus mini (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、2100 Bioanalyzer を用いて抽出した RNA の精度確認を行った。Agilent 社のプロトコールに従い Cy3 標識とハイブリダイゼーションを行い、Mouse Gene Expression 4×44K Microarray kit (G4122F) を用いて解析した。アレイスキャナーは Agilent Technologies の Microarray scanner を使用し、データは JMP11 と Multi Experiment viewer (<http://www.tm4.org/>) を使用して解析した。本研究のマイクロアレイデータは Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 上でアクセス番号 GSE71926 にて開示されている。

9) Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RNeasy Plus mini を用いて抽出した RNA をもとに ReverTra Ace qPCR 5×RT master mix (Toyobo) とサーマルサイクラーを用いて complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的 Reverse transcription PCR のため、Power SYBR Green (Life Technologies) と以下のプライマーセットを用いた。解析には StepOne Real time PCR system (Applied Biosystems) を用い、comparative C_T method を用いて定量化した。

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>Gapdh</i>	5'-TCAAATGGGGTGAGGCCGGT-3'	5'-TTGCTGACAATCTTGAGTGA-3'
<i>Arrb1</i>	5'-AAGGGACACGAGTGTTCAGA-3'	5'-CCCGCTTTCCCAGGTAGAC-3'
<i>Cyp1b1</i>	5'-CACCAGCCTTAGTGACAGACAG-3'	5'-GAGGACCACGGTTTCCGTTG-3'
<i>Kif21b</i>	5'-CACGACAGCCCCATCAATG-3'	5'-CCGCCGTATGCTCCAGAAC-3'
<i>Ncam1</i>	5'-AGAAATCAGCGTTGGAGAGTCC-3'	5'-TCGTCATCATTCCACACCACT-3'
<i>Oas1a</i>	5'-GCCTGATCCCAGAATCTATGC-3'	5'-GAGCAACTCTAGGGCGTACTG-3'
<i>Thbs3</i>	5'-ATGGAGAAGCCGGAACCTTGG-3'	5'-AGTGAGTAAAGCTGTCCGAATCT-3'

10) クローニング・トランスフェクション

4T1-S より下記のプライマーと DNA Polymerase として KOD Plus neo (TOYOBO) を用いて各遺伝子の cDNA を合成し、Gateway cloning System (Invitrogen) を用いてクローニングした。発現ベクターには

pPyCAG ベクターを用い、4T1-A へエレクトロポレーションにより導入された。遺伝子発現確認は上記の RT-qPCR を用いて行った。

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>Arrb1</i>	5'-CACCATTTTCCAGCCTGGACGCTG-3'	5'-CCTTGGTAGAACTGGAAGAA-3'
<i>Cyp1b1</i>	5'-CACCCACGCTTCATCGCAGCATGG-3'	5'-CCATTCACTGCTGAGAGCTGA-3'
<i>Ncam1</i>	5'-CACCGCACTGAATTTACCGCGGC-3'	5'-GTTGCTTGGTACCCATCATGCT-3'
<i>Oas1a</i>	5'-CACCAAGGAAGCTCCAGACTTAGCA-3'	5'-CTGTGATTGGACAGGAGTCA-3'
<i>Thbs3</i>	5'-CACCGTAGTGAACCGGCTAAGCGG-3'	5'-GTGGCCACCTCCTCACACTCTTC-3'

11) 統計学的解析

統計学的解析は JMP11 を用いて行った。数値データは平均値± Standard error of the mean (SEM) で示し、F 検定を行いて等分散を確認した後に Student *t* 検定を用いて $P < 0.05$ を統計学的有意差ありとした。生存期間は腫瘍接種後から死亡日までの日数とし、Kaplan-Meier 法を用い log-rank test にて群間比較検定を行った。

実験結果

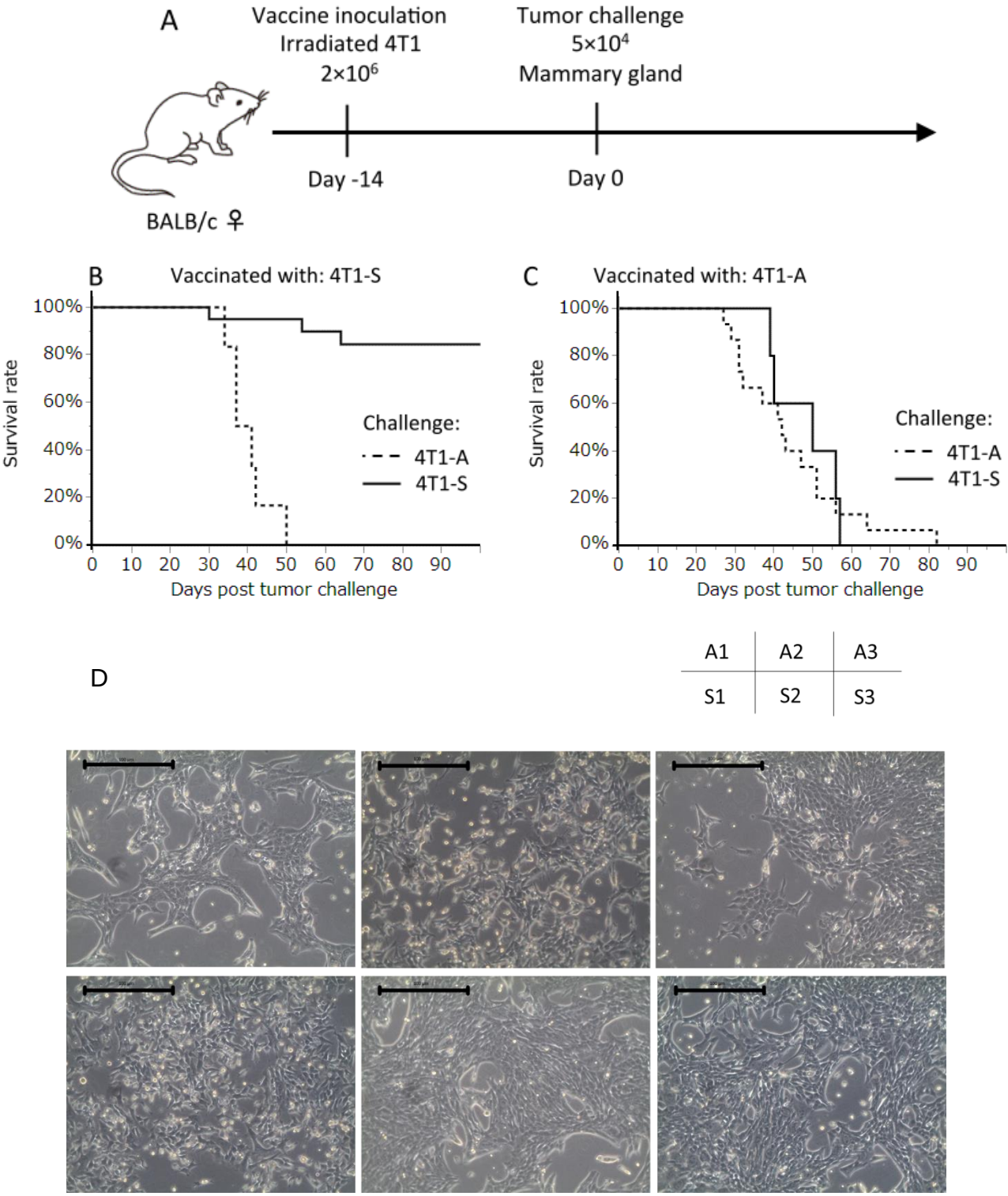
1) 4T1-S によるワクチン接種は 4T1-S に対する抗腫瘍効果を発揮し生存期間を延長させる

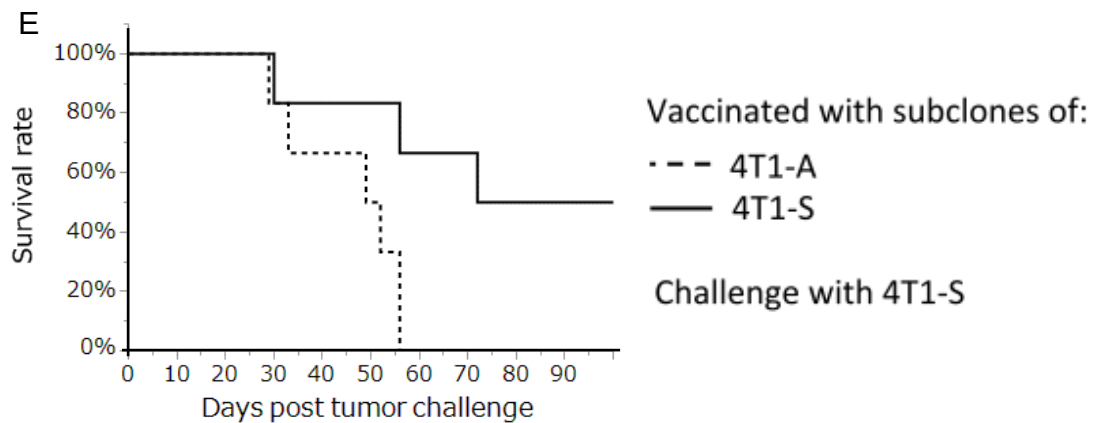
初めに研究室で数年間維持されてきたマウス乳癌細胞株 4T1 (4T1-S) をコントロール群として免疫原性の異なる細胞株同士でワクチン加療実験を行ったところ、免疫原性の乏しいと想定していた 4T1-S 接種群においても腫瘍の拒絶や生存期間の延長といったワクチン効果を示す結果が得られた。そこで改めてその事象を確認すべく、BALB/c マウスを用い、 2×10^6 個の 4T1-S 細胞を 300 Gy の放射線を照射した後に皮下に接種し、その 2 週間後に増殖期にある 4T1-S (5×10^4 個) を乳腺に接種した (図 1A)。

前実験で認めたように 4T1-S のワクチン接種により腫瘍生着が阻害され、生存期間の延長が確認された (図 1B 実線)。そこで、新たに ATCC より 4T1 を購入 (4T1-A) し、同様のワクチン実験を施行したところ 4T1-S によるワクチン接種は 4T1-A の腫瘍生着を阻害せず、生存期間の延長効果を認めなかった (図 1B 破線)。さらに、4T1-A を同様に放射線照射してワクチンとして用いたが、4T1-A/S とともに抗腫瘍効果を認めなかった (図 1C)。つまり、放射線照射した 4T1-S によるワクチン効果は同細胞株である 4T1-S に対してのみ発現している事が判明した。

4T1-S に対してさらなる検証をするため、限界希釈法を用いて 4T1-A/S それぞれより単細胞由来の亜株を樹立した。細胞形態では親株との明らかな差は確認されず (図 1D)、ワクチンせずに接種した場合、全ての細胞株において生着を認めることも親株と同様であり、その他の免疫原性の有する細胞の混在の可能性はほぼ除外された。この細胞亜株を使用し、同様のワクチン実験を施行したところ、4T1-S の 6 株中 3 株で腫瘍の生着を阻害し得た。一方で、4T1-A 由来の細胞株においては 6 株いづれでもワクチン効果は認められなかった (図 1E)。以上の結果より、4T1-S には放射線照射により免疫原性の誘導されるバリエーションが存在し、ワクチン接種により抗腫瘍効果をもたらしていると考えられた。

図 1 4T1-A/ S による予防ワクチン効果の検討



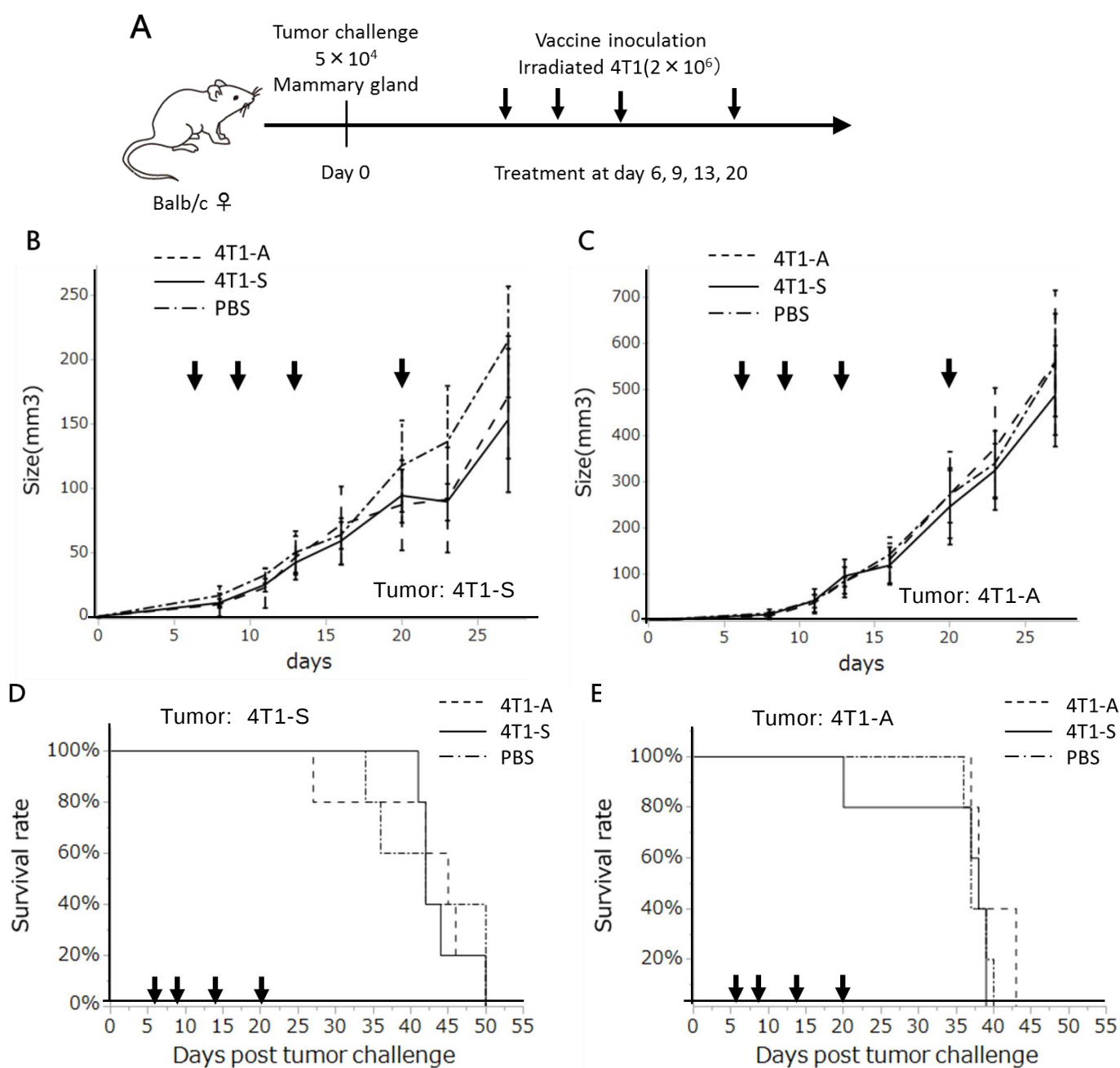


- A) ワクチン実験のシェーマを示す。BALB/c マウスは放射線照射 (300 Gy) した 4T1-A or S (2×10^6 個) を皮下に接種 (ワクチン) し、2 週間後に 4T1 (5×10^4 個) を乳腺に接種 (腫瘍チャレンジ) して腫瘍生着・増殖・生存期間を評価した。
- B) 放射線照射した 4T1-S によりワクチンされた群の腫瘍チャレンジ後の生存期間。4T1-S において有意に延長していることが確認された。
- C) 放射線照射した 4T1-A によりワクチンされた群の腫瘍チャレンジ後の生存期間。4T1-S で認められた生存期間延長効果は認められなかった。
- D) 4T1-A/ S をもとに限界希釈法により樹立した細胞亜株の顕微鏡像。いずれの株も紡錘形の接着性の増殖を示し、肉眼的な差は確認できなかった。
(Scale bar = 100 μ m)
- E) 4T1-A/ S をもとに限界希釈法により樹立した 6 細胞亜株を用いて同様のワクチン実験を施行した。4T1-S をもとにして作った細胞亜株においてのみ腫瘍の生着抑制をするものが確認された。

2) 4T1-S には治療ワクチンとしての効果は認められない

次に、4T1-S によるワクチンが治療ワクチンとして機能し得るかを確認することとした。マウス乳腺に腫瘍を接種した後に放射線照射した 4T1-A/ S もしくは PBS のみを、下図のスケジュールに従って皮下接種した (図 2A)。4T1-S を腫瘍として接種した場合 (図 2B・D) も、4T1-A を腫瘍として接種した場合 (図 2C・E) でも、腫瘍増殖・生存期間の延長など治療効果は認められなかった。

図 2 治療ワクチンとしての効果を検討



- A) 治療ワクチン実験のプロトコール。増殖期にある 4T1 を乳腺に接種した後、6 日目、9 日目、13 日目、20 日目（図内黒矢印）にそれぞれ治療ワクチンとして放射線照射した 4T1 もしくは PBS のみを投与した。
- B) 4T1-S を腫瘍として接種した後の腫瘍増殖を表す。いずれの治療群においても有意な差は認められなかった（各群 $n = 5$ ）。
- C) 4T1-A を腫瘍として接種した後の腫瘍増殖も B) と同様、いずれの群にも差は認められなかった（各群 $n = 5$ ）。

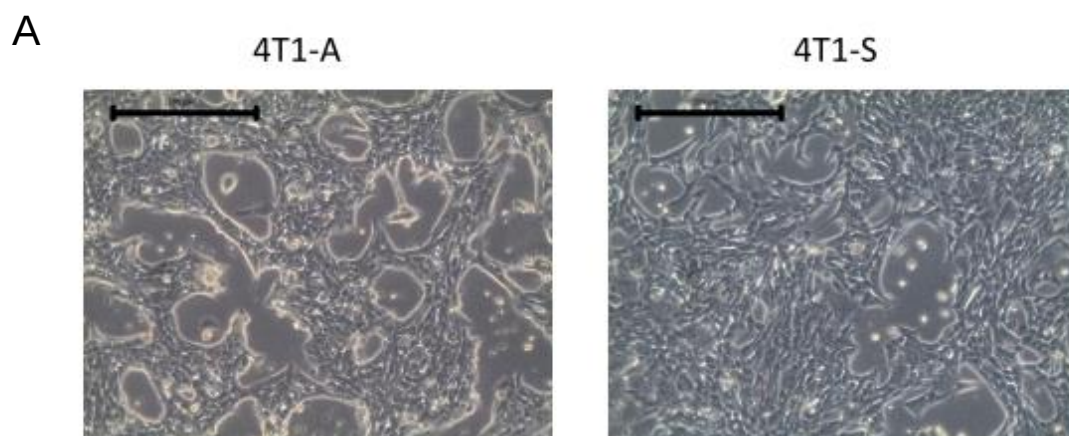
- D) B) の実験で用いたマウスの生存率を Kaplan-Meier にて評価したもの。
E) C) の実験で用いたマウスの生存率を Kaplan-Meier にて評価したもの。

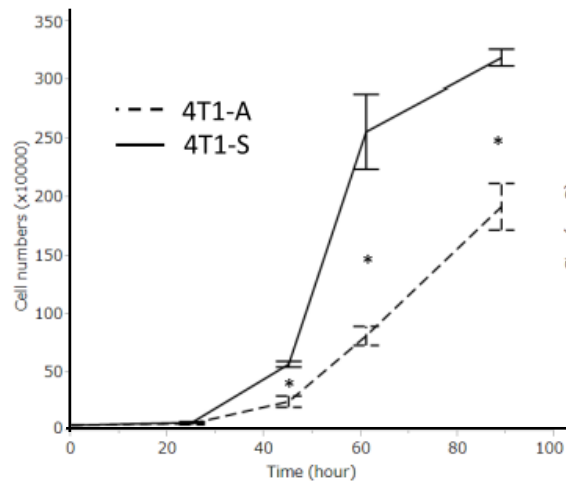
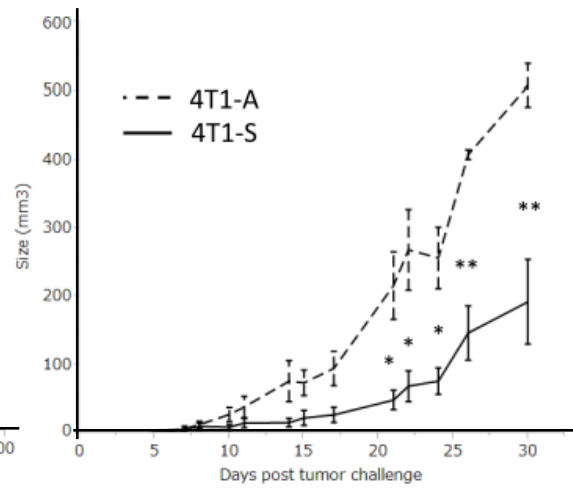
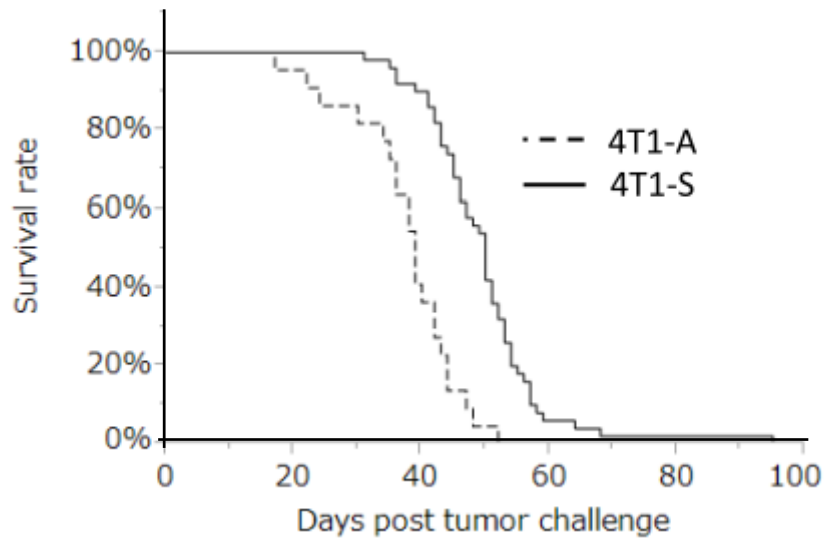
3) 4T1-S と 4T1-A は形態的には類似しているが *in vivo* と *in vitro* 環境下において異なる増殖率を示す

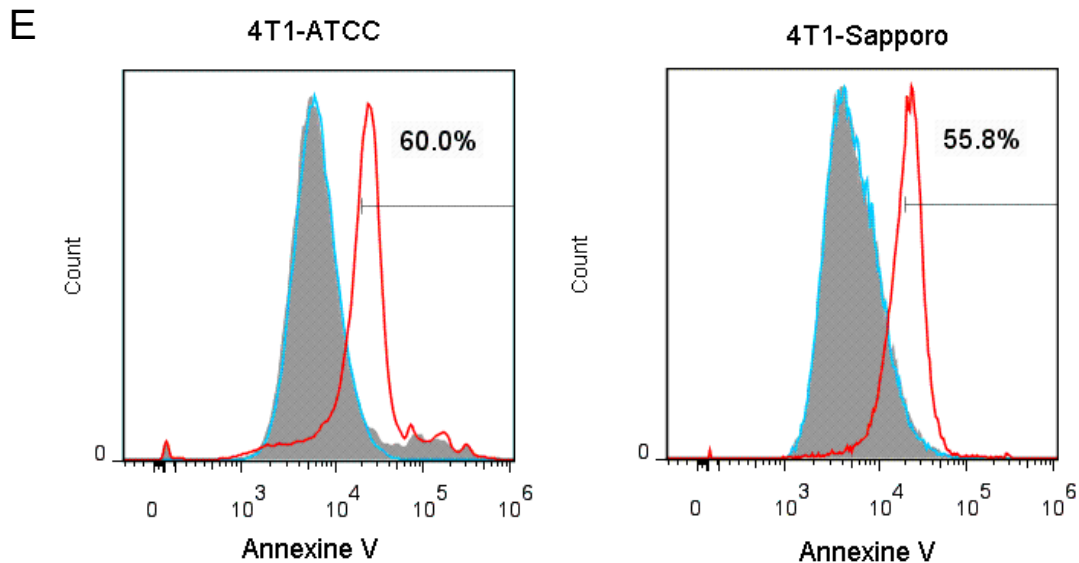
前述のとおり、4T1-S は予防的なワクチンとしての特性を有していることが予測された。そこで、4T1-A と 4T1-S の差異を検索すべく、細胞形態と細胞増殖の比較を行った。4T1-A/S とともに接着性の増殖を示し形態的にはほぼ同一であった (図 3A)。*in vitro* での増殖率は 4T1-S において有意に高かった (図 3B) が、*in vivo* において BALB/c の乳腺に腫瘍を接種した場合、その増殖は 4T1-A の方が有意に速かった (図 3C)。さらに、腫瘍接種後の生存期間においても 4T1-A を接種したマウスの方が 4T1-S を接種されたマウスよりも有意に短いことが確認された (図 3D)。以上より、4T1-S は免疫応答性の環境において宿主の免疫機構により、その腫瘍増殖が抑制されるのに十分な免疫原性を有していることが示された。

次に、放射線に対する感受性の差について検討を行った。全細胞ワクチンとして接種する際と同様に、300 Gy を照射した後にフローサイトメトリーを利用し annexin V の染色の割合を比較検討したところ、4T1-A/S の放射線感受性には差が認められなかった (図 3E)。

図 3 4T1-S と 4T1-A の形態的、生物学的比較



B**C****D**



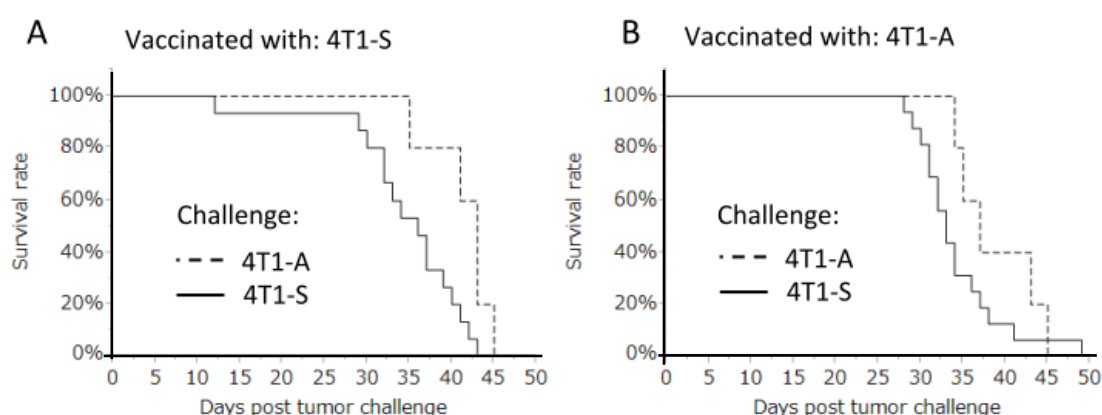
- A) 4T1-A と 4T1-S の培養時の形態学的観察結果。いずれも接着性の増殖を示し明らかな形態学的な差異を認めない。(Scale bar = 100 μ m)
- B) *In vitro* での腫瘍増殖曲線。培養 2 日目以降、4T1-S で有意に増殖率が高かった (4T1-A/ S 共に n = 6)。
- C) *In vivo* での腫瘍増殖曲線。当初より 4T1-A の方が腫瘍径の大きい傾向にあり、3 週目以降には有意差を認めた (4T1-A/ S 共に n = 6)。
- D) 腫瘍接種後の生存期間を Kaplan-Meier により評価。4T1-A の方が有意に生存期間が短かった ($P < 0.0001$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
- E) 放射線照射への感受性評価。灰色ヒストグラムは放射線未照射・annexine V 染色検体、青色ヒストグラムが 300 Gy 照射・未染色検体、赤色ヒストグラムが 300 Gy 照射・annexine V 染色検体を示す。放射線照射により A 株 S 株共に同程度のアポトーシスが引き起こされていることが確認された。

4) 放射線照射した 4T1-S によるワクチン効果は T 細胞依存性の反応である

癌ワクチン療法は T 細胞由来の抗腫瘍免疫反応を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮する。そこで、放射線照射した 4T1-S によるワクチン効果が T 細胞免疫に依存しているか否かを確認するため、前述のワクチン実験を胸腺の欠損した BALB/c-*nu/nu* マウスを使用して施行した。その結果、放射線照射した 4T1-S によるワクチン接種による生存期間の延長効果は認められなくなった (図 4A)。さらに、4T1-A を接種したマウスに

比べ、4T1-S を接種したマウスの生存期間が有意に短縮していた ($P=0.0195$) (図 4A)。同様に、4T1-A を用いたワクチン実験を行ったが生存期間の延長などのワクチン効果は認められなかった (図 4B)。このことから、放射線照射した 4T1-S により得られたワクチン効果は T 細胞の存在下にて生じていることが明示された。また、免疫不全環境においては *in vitro* での実験結果同様、4T1-S を接種したマウスの方が生存期間が短くなることも示された。

図 4 ノードマウスを用いたワクチン効果の検討



- A) BALB/c-*nu/nu* を使用し放射線照射後の 4T1-S でワクチンし、腫瘍チャレンジした後の生存期間。図 1B で認めていた 4T1-S によるワクチン効果は認められず、さらに 4T1-A よりも 4T1-S において生存期間が短くなっていた ($P=0.0195$)。
- B) BALB/c-*nu/nu* を使用し放射線照射後の 4T1-A でワクチンし、腫瘍チャレンジした後の生存期間。図 1C と同様、ワクチン効果は認められなかった。生存期間は 4T1-S の方が短い傾向にあった ($P=0.0729$)。

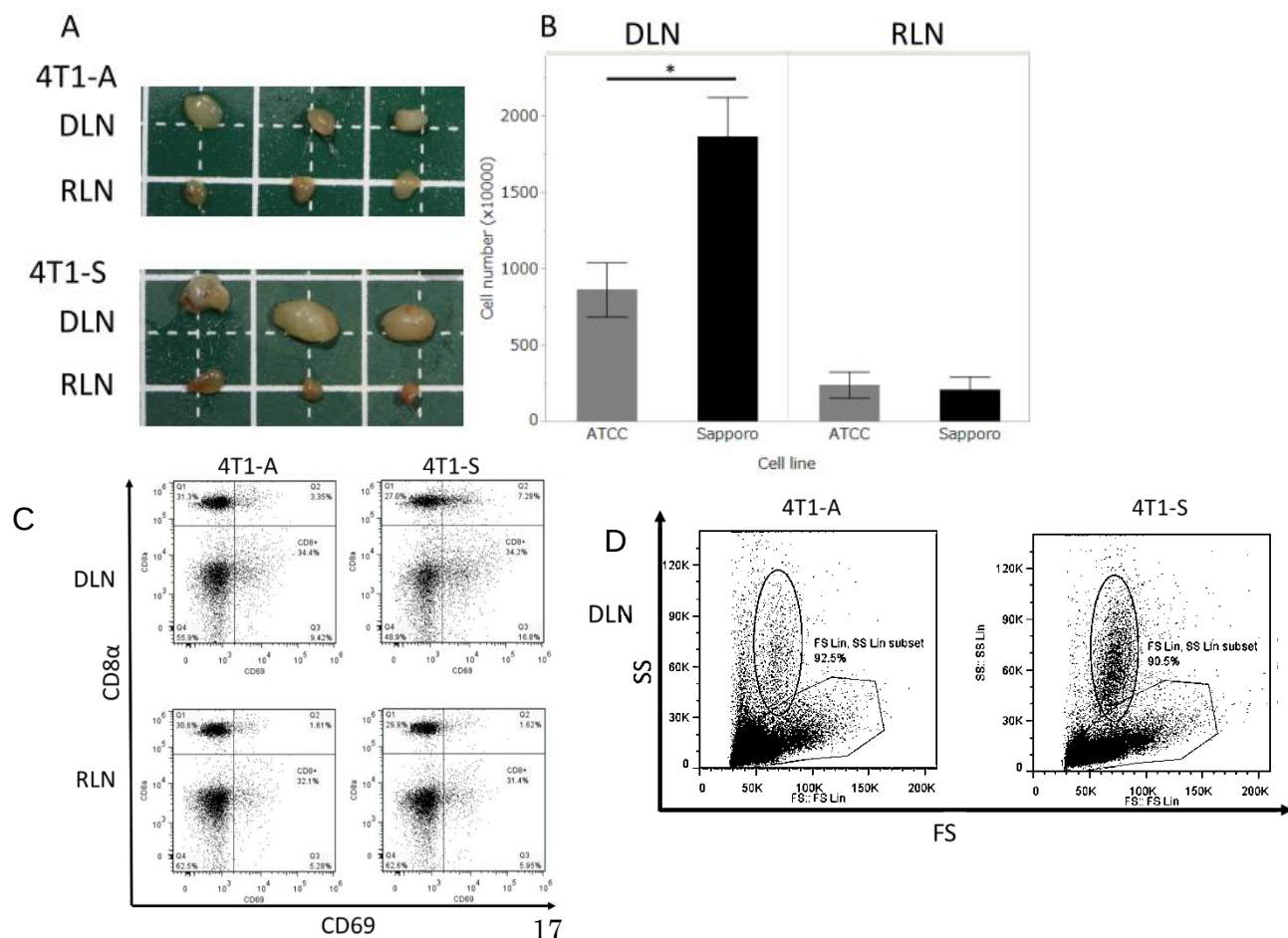
5) 4T1-S 接種は周囲リンパ節において活性化された CD8 T 細胞の割合を増加させる

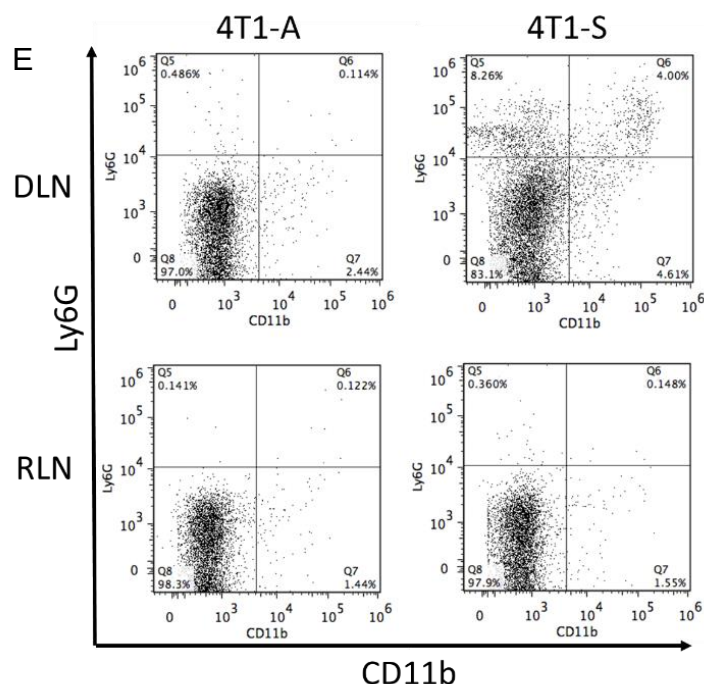
次に、4T1-S によるワクチン接種を受けたマウスで活性化された CD8 陽性 T 細胞が増加しているかどうかを検討することとした。4T1-S によりワクチン接種を受けたマウスは 4T1-S の腫瘍生着を認めず、腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TILs) の検出・比較ができないうえに、腫瘍接種後のマウスにおいて draining lymph nodes (DLNs) と remote lymph nodes (RLNs) の CD8 陽性 T 細胞の割合、活性化率

を比較することとした。

肉眼的な所見として、4T1-S を接種したマウスの DLNs は 4T1-A を接種したマウスのものと比較して著明に腫大していた。一方で、RLNs のサイズはいずれもほとんど差は認められなかった (図 5A)。さらに、DLNs における総細胞数も 4T1-S を接種した群において有意に多くなっていた (図 5B)。そこで、DLNs と RLNs においてフローサイトメトリーを使用し、活性化された細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞 (CD8 α ⁺、CD69⁺) の割合を検討したところ、4T1-S を接種したマウスにおいて有意な増加が確認された (図 5C)。また、4T1-S を接種したマウスの DLNs において前方側方散乱光で、特定の集団が増加していることを認め (図 5D)、さらにその細胞集団を解析したところ、CD11b と Ly6G というミエロイドマーカーの発現した細胞群であることを明らかにした (図 5E)。これらの結果から、4T1-S によるワクチンは抗腫瘍性の CD8 T 細胞反応を誘導し、さらに、ある種のミエロイド細胞集団の免疫反応を惹起することが示された。

図 5 4T1-S と 4T1-A が宿主免疫系に与える影響の比較





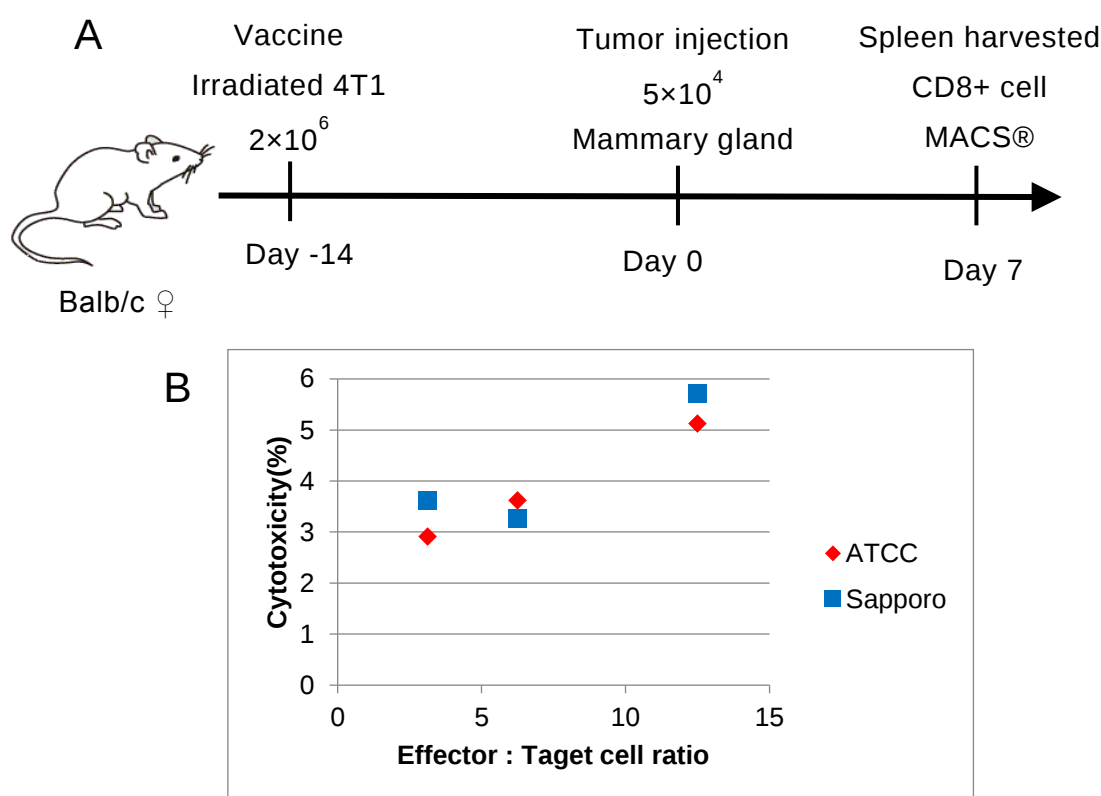
- A) 4T1-A もしくは 4T1-S を皮下接種 (2×10^6 個) した後の DLNs と RLNs の形態学的比較結果。いずれを接種した場合でも DLNs に腫大を認めるが明らかに 4T1-S を接種したマウスの方がサイズが大きかった。
- B) A) で回収されたリンパ節内の総細胞数の比較。4T1-S を接種されたマウスの DLNs で有意に細胞数が増加していた (* $P < 0.05$)。
- C) A) で回収されたリンパ節をフローサイトメトリーを用いて解析した。活性化型細胞障害性 CD8 陽性 T 細胞とされる $CD8\alpha^+ CD69^+$ の T 細胞 (CD3⁺ ゲート済み) が 4T1-S 接種後の DLNs において増加していた。
- D) A) で回収された DLNs において顆粒球としてとらえられる細胞集団が、4T1-S を接種したマウスにおいて著明に増加していることが確認された。
- E) A) で回収されたリンパ節を D) で認められた細胞集団が入るようにゲートしてフローサイトメトリーで解析した。CD11b、Ly6G を用いて染色。4T1-S を接種されたマウスの DLNs においてのみ CD11b⁺、Ly6G⁺ の集団の増加を認めた。

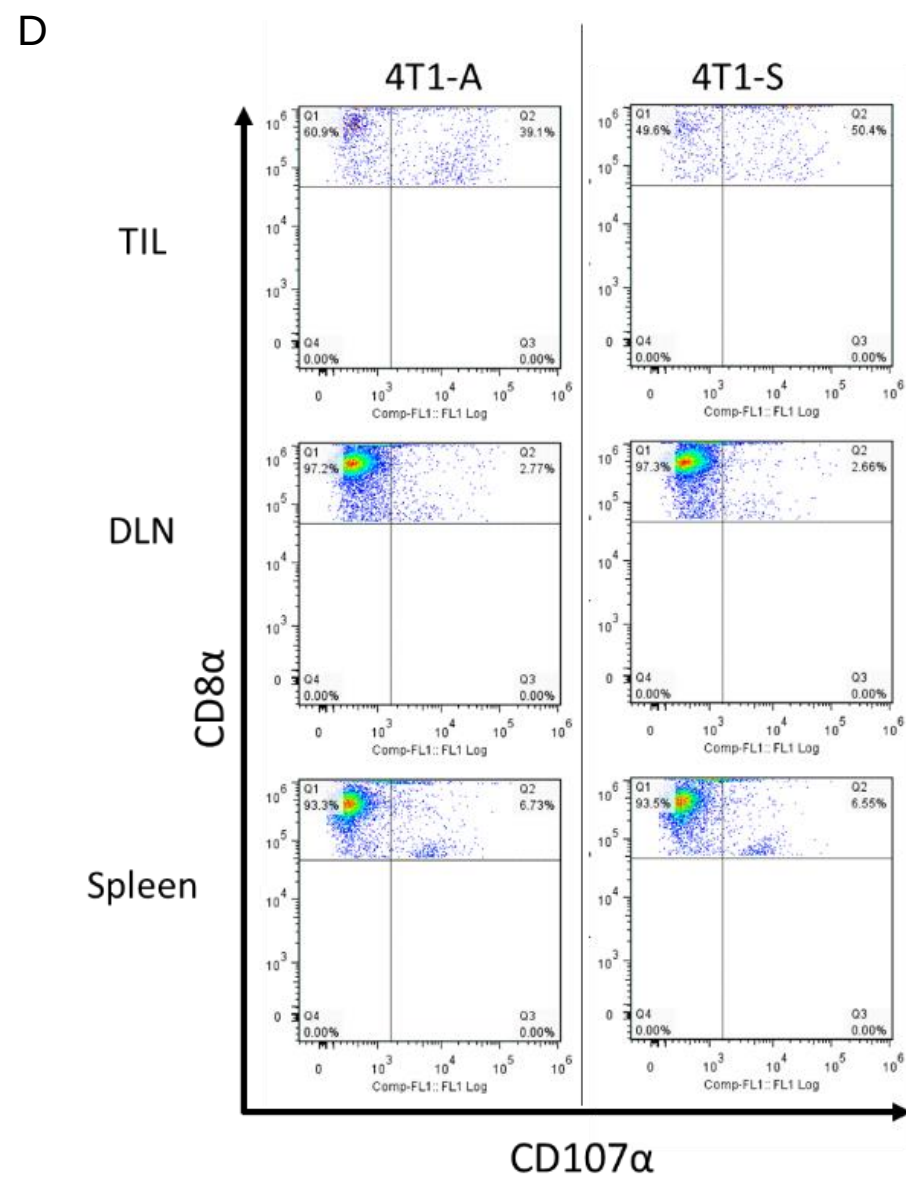
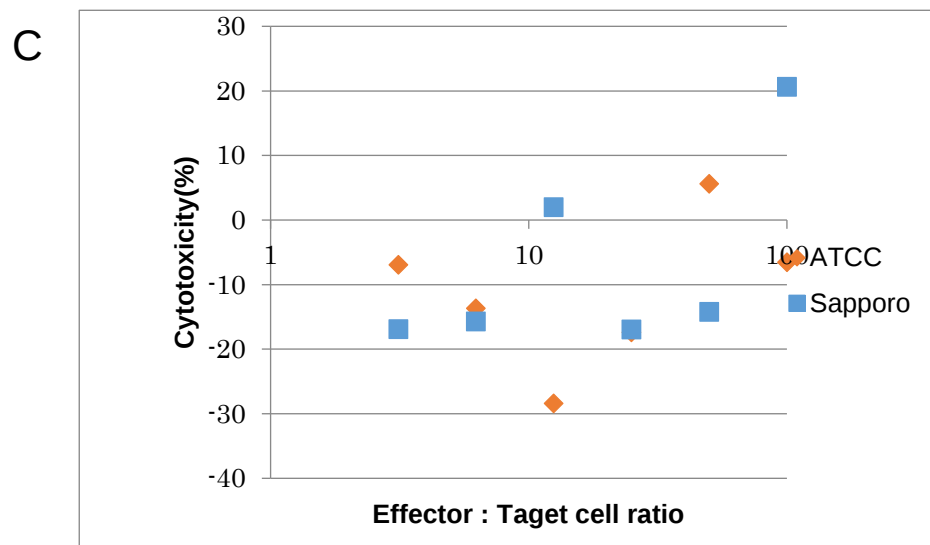
6) 4T1-S のワクチン接種により誘導された cytotoxic T lymphocyte (CTL) の細胞障害性の検証

次に、4T1-S のワクチン接種により誘導された CD8 陽性 T 細胞が

細胞障害性を有していることを確認するために **cytotoxicity assay** を行った。まず、ワクチン接種した 2 週間後のマウスに増殖期の腫瘍細胞を接種し、その一週間後に脾臓を摘出した。脾臓中の CD8 陽性 T 細胞を磁気細胞分離法 (MACS) を用いて抽出し、これを **effector** 細胞として実験を行った (図 6A)。E: T ratio 25: 1~1.5625: 1 までとして実験を行ったが細胞障害性を示す結果は得られなかった (図 6B)。そこで、E: T ratio を増加することにより細胞障害性が確認できる可能性を考え、同様の実験系を E: T ratio 100: 1 まで確認したが、やはり結果は同様であった (図 6C)。細胞障害性が確認できなかった原因として、生体内の免疫環境を実験環境下で再現できていない可能性が考えられた。そこで、生体内における細胞障害性を評価する目的で増殖期にある腫瘍を免疫応答性の宿主に接種し、10 日後に腫瘍、脾臓、DLN を摘出してフローサイトメトリーにより各臓器内の CD3⁺、CD8⁺、CD107α⁺ の細胞集団の割合を評価した。腫瘍は断片化してすりつぶし、単細胞化したのちにフローサイトメトリーにより解析し、CD3 陽性細胞を TILs として評価したが、この結果によっても細胞障害性を示すことはできなかった (図 6D)。

図 6 細胞障害性の検証



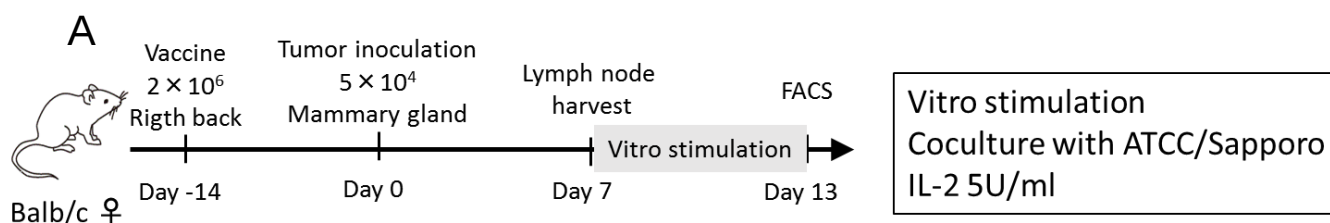


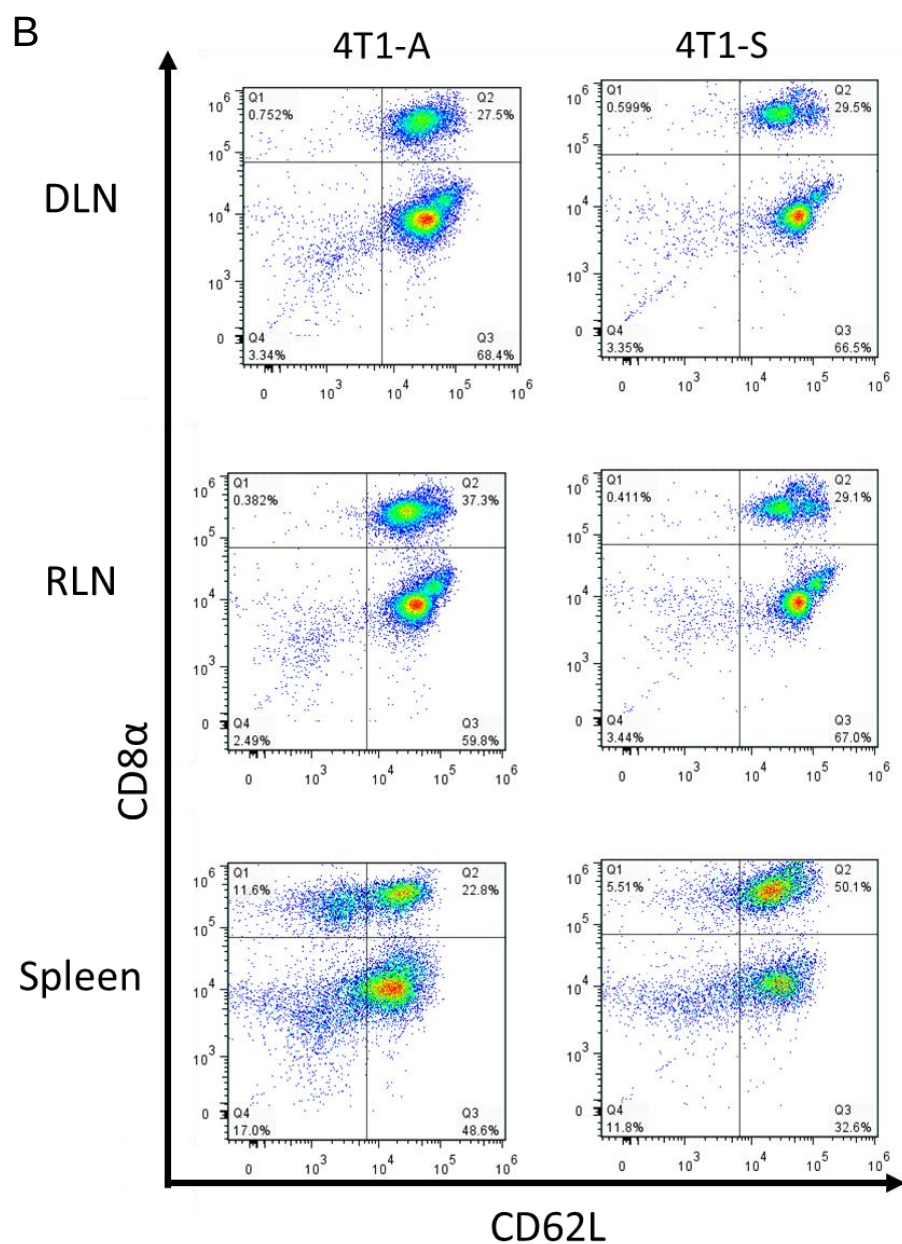
- A) Effector 細胞の回収プロトコールを示す。
- B) E: T ratio 25: 1~1.5625: 1 までの結果を示す。細胞障害性を示す結果は得られなかった。
- C) E: T ratio 100: 1~3.125: 1 まで変更し同様の実験を行ったが、やはり細胞障害性を示すデータは得られなかった。
- D) 腫瘍接種後 10 日目のマウスより摘出してきた腫瘍、DLN、脾臓をフローサイトメトリーを用いて解析した。CD3 陽性、CD8 陽性の細胞集団でゲート後、CD8 と CD107 α で展開した。いずれにおいても CD107 α の発現に明らかな差異を認めることはできなかった。

7) 4T1-S によるワクチン接種後には脾臓での免疫記憶が向上している

ワクチン接種後のマウスにおいて免疫記憶が存在しているかを確認するために、各臓器においてメモリー T 細胞が増加しているかどうかを検討した。リンパ節の解析プロトコールとしては図 7A にシェーマとして示した。ワクチン接種した 2 週間後に腫瘍を接種し、その 1 週間後にマウスから脾臓、DLN、RLN を摘出した。さらに *in vitro* での抗原刺激を追加するために、それぞれワクチンで使用したものと同一の細胞株と 6 日間共培養してからフローサイトメトリーにより CD8 陽性、CD62L 陽性の細胞集団を解析した。DLN や RLN には明らかな差異は認められなかったが、脾臓において 4T1-S ワクチンを接種したマウスで CD8 陽性、CD62L 陽性のメモリー T 細胞が増加していることが確認された (図 7B)。

図 7 免疫記憶の解析



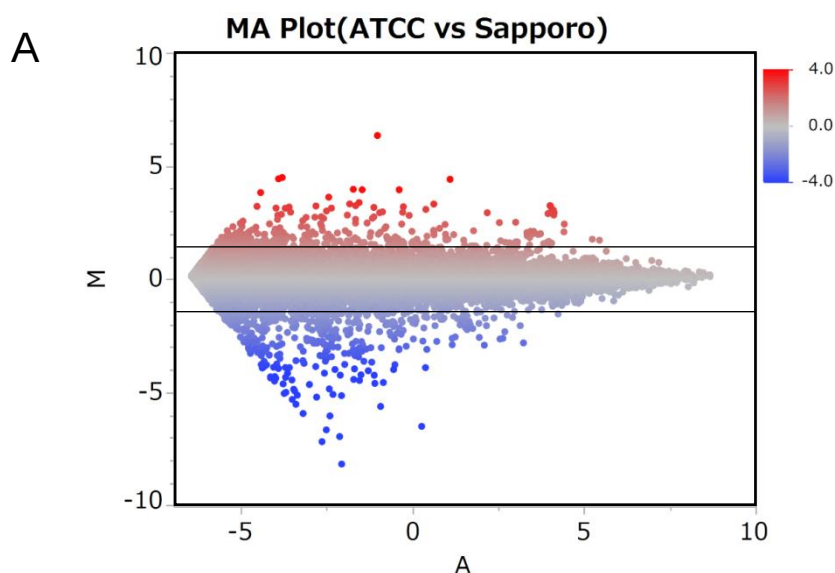


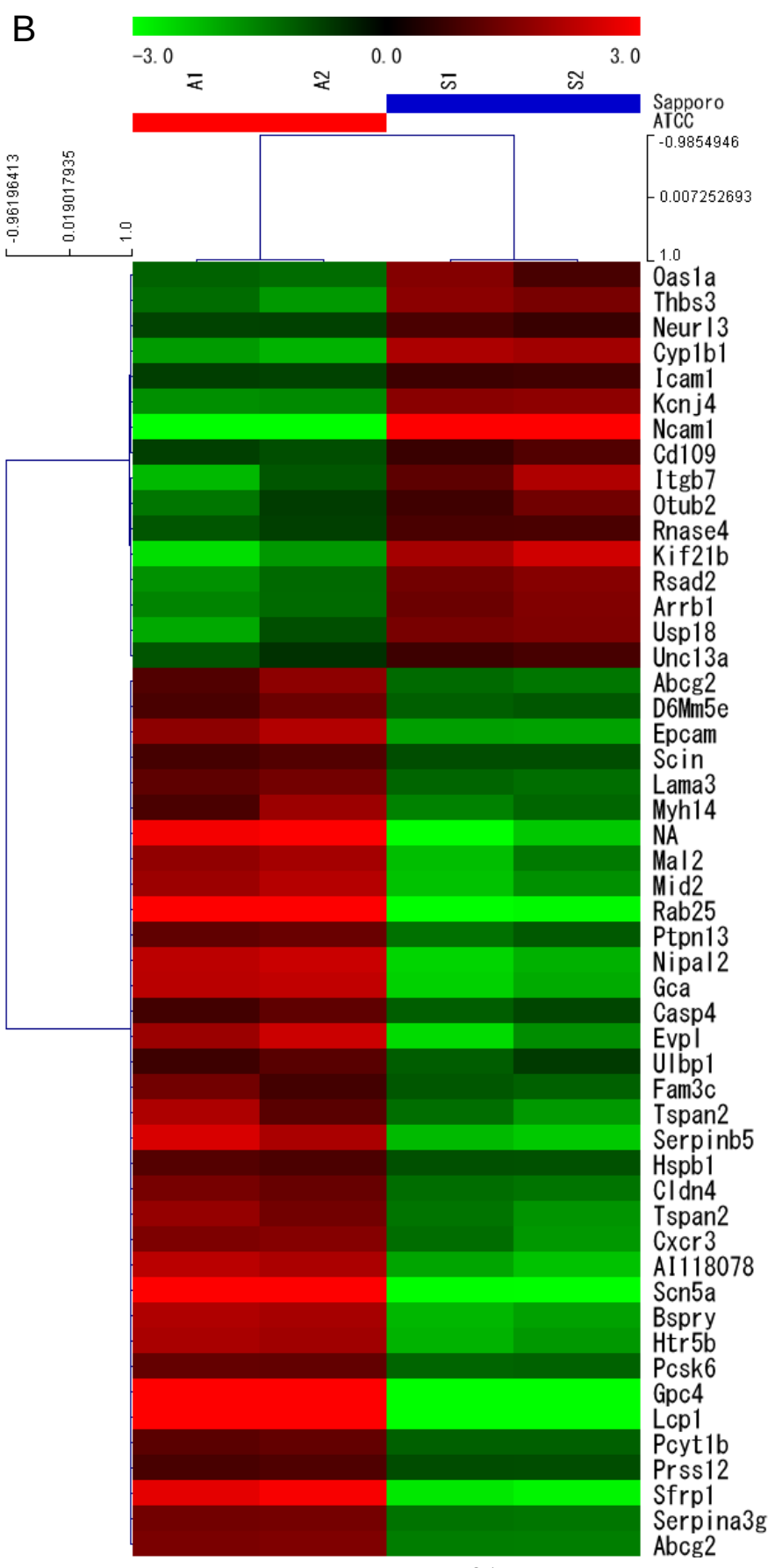
- A) 免疫記憶の解析のために使用した各種臓器の回収プロトコールと、その後の培養条件を示す。生体においてワクチン接種とその後の二次刺激としての腫瘍接種を行い、脾臓と各リンパ節を回収したのちに、培養環境でも刺激を入れるため、6 日間 IL-2 (5 IU/ml) を添加して同一の細胞株と共培養した。その後、培養上清を回収し、フローサイトメトリーにて解析した。
- B) メモリー T 細胞として CD8 陽性、CD62L 陽性の細胞集団を比較した。DLN、RLN では明らかな差は認めなかったが、脾臓において 4T1-A でワクチンした群が 22.8% であったのに対し、4T1-S でワクチンした群では 50.1% と増加していることが確認された。

8) 4T1-A と 4T1-S は異なる分子発現を示す

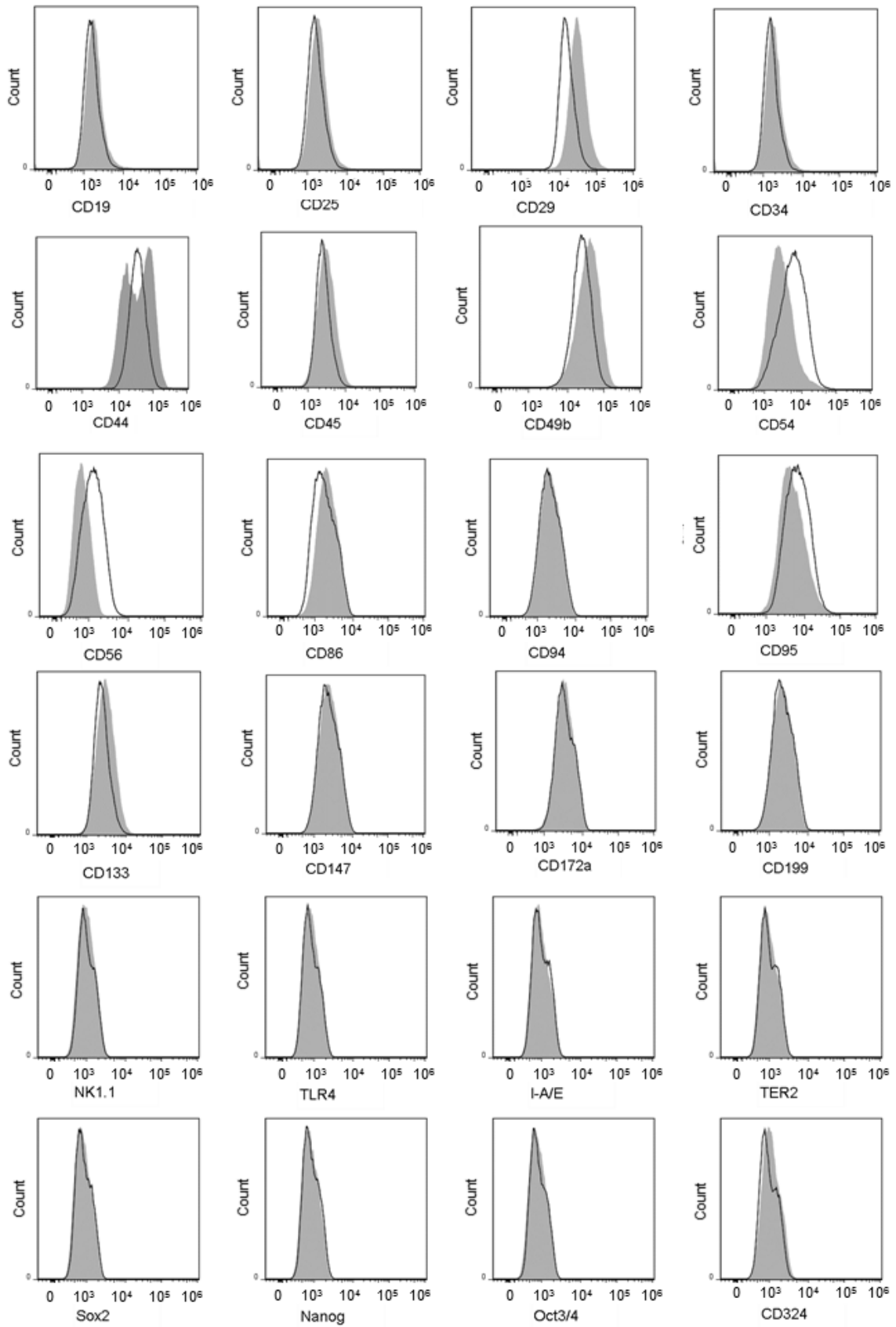
4T1-S のワクチン効果に起因している分子の候補を探すために、マイクロアレイ解析を施行した。4T1-A と 4T1-S の分子発現を解析すると、ほとんどの分子が両者で同等のパターンを示したが、いくつかの分子ではその発現量に差を認めた (図 8A、8B)。さらに、フローサイトメトリーを使用し CD54 や CD56 (NCAM-1) などの分子の発現差があることを確認した (図 8C)。これらの結果をもとに、4T1-S において高発現していた遺伝子の中から 4T1-A での発現が低く、その他の正常組織においても定常状態で発現していない分子を発現量の差の大きい順から CD56、Kif21b、Thbs3、Cyp1b1、Oas1a、Arrb1 といった分子を候補として選択し、4T1-A へのトランスフェクションを行うこととした。各 primer を使用し、4T1-S より全長の cDNA を合成可能であった 5 遺伝子について、作成した cDNA を pPyCAG ベクターを使用し、4T1-A へのトランスフェクションを施行した。各導入遺伝子の発現確認は RT-qPCR を用いて行った (図 8D)。その後、図 1A と同様に作成した形質導入細胞を使用してワクチン実験を施行したが、腫瘍生着を阻害し得たものは認めなかった (図 8E)。また、生存期間についても延長傾向を認めるものは存在しなかった。

図 8 遺伝子発現の網羅的解析と強制発現株の作製



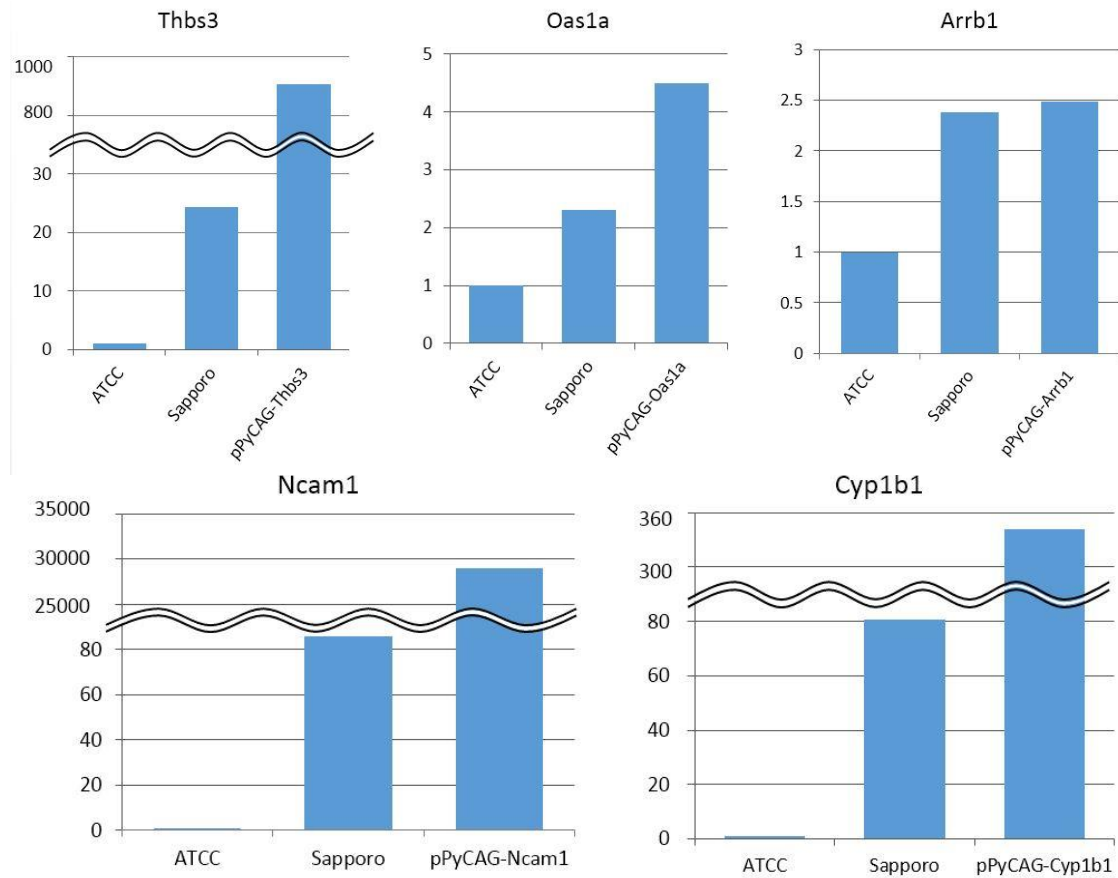


C



D

$\Delta\Delta$ CT (Relative expression to ATCC)



E

	Tumorigenesis	%
Thbs3	5/5	100
Oas1a	5/5	100
Arrb1	4/4	100
Ncam1 (CD56)	5/5	100
Cyp1b1	4/4	100

A) 4T1-S と 4T1-A のマイクロアレイ解析の結果を MA plots にて展開。各ドットが今回検定した遺伝子一つ一つと対応しており、 $M = \text{Log}_2(4T1-S) - \text{Log}_2(4T1-A)$ 、 $A = \{\text{Log}_2(4T1-S) + \text{Log}_2(4T1-A)\}/2$ を示す。M が大きいほど 4T1-S で高発現しており、A は各遺伝子の平均的な発現量を示している。実線の間 ($-1.5 < M < 1.5$) に今回解析した 43380 遺伝子中 42275 遺伝子が含まれており、大半の遺伝子発現には差を認めなかった。

- B) マイクロアレイデータより発現差の大きかった遺伝子を解析し、51 遺伝子を抽出後、ヒートマップにて展開した。A1-A2 と S1-S2 はそれぞれ 4T1-A、4T1-S より抽出した total RNA をもとにしていることを示す。
- C) 4T1-A と 4T1-S の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーにて解析した。灰色ヒストグラムが 4T1-A、白色ヒストグラムが 4T1-S を示す。多くの分子では発現差を認めないが、CD54、CD56 (NCAM-1) などでは 4T1-S に発現増加が確認された。
- D) 作成した強制発現株の遺伝子発現レベルを RT-qPCR にて確認した。いずれの細胞株でも 4T1-S と同等かそれ以上の発現が確認された。
- E) D) で確認された強制発現株を用いて図 1A に従いワクチン実験を施行。その後の 4T1-S 接種に対し、腫瘍生着の有無を評価した。30 日間の観察期間において全てのマウスにおいて肉眼的に腫瘍の形成が確認された。

考 察

本研究において、元来、免疫原性の乏しいといわれているマウス乳がん細胞株の 4T1 においても、全細胞ワクチンとして使用すると同細胞株の腫瘍生着を拒絶するに足る免疫反応を引き起こすことのできる細胞亜株、4T1-S が存在していることを確認した。この細胞株に対しては、人工的な遺伝子改変を行っておらず、マイコプラズマの感染も認められなかったことから、自発的な変異によりその免疫原性が修飾されたものと想定した。実際、実験動物においてはこのような自発的遺伝子変異は過去にも報告されており、Sakaguchi ら¹⁷はリウマチ性関節炎を自然発症するマウス (SKG マウス) の存在を報告し、その後 SKG マウスでは ZAP-70 遺伝子に point mutation が起こっていることを明らかにしている。さらに、最近のエクソームシーケンスを用いた実験では遺伝性疾患を来す 91 種類のマウスの病原性変異が同定されている¹⁸。そこで、4T1-S についても免疫原性を変化させるに足る変異が存在していると想定し、その原因を検索するために同一細胞で免疫原性の乏しい 4T1-A との比較検討を行った。

本研究ではまず、4T1-A と 4T1-S の生物学的な差異についての考察を行った。今回使用した 4T1-S と 4T1-A は肉眼的に明らかな形態の違いを認めないことはもちろん、いずれもワクチン接種を行わずにマウスに接種すると確実に腫瘍が生着し、全マウスが死亡した。生存解析においては免疫応答性マウスを使用した際には 4T1-A の方が早期に死亡したが、免疫不全マウスでは逆の傾向がみられた。培養環境では 4T1-S において細胞増殖が高速であったことから 4T1-S は宿主免疫により何らかの抑制を受けていることが想定された。また、今回の実験では 4T1 の免疫原性を誘導する方法として放射線照射を使用しているため、両細胞株に放射線に対する感受性の違いがないことも確認した。

次に、4T1-S で観察されたワクチン効果のメカニズムについて考察を行った。4T1-S を接種されたマウスの DLNs は著明に腫大し、活性化型の CD8 陽性 T 細胞が増加していることが明らかとなった。また、4T1-S によるワクチン効果はヌードマウスでは消失していることも確認されたことから、4T1-S のワクチン効果発現は T 細胞依存性であることが示された。さらに、CD8 陽性 T 細胞に加えて 4T1-S 接種によって顆粒球と思われる細胞集団内に CD11b と Ly6G といった細胞表面マーカーが高発現している細胞群が増加していることも確認された。CD11b と Ly6G は骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSCs) や好中

球のようなミエロイド細胞に高発現するマーカーである。CD11b、Ly6G を高発現した好中球は自然免疫系を担当し、炎症性サイトカインの放出によってウイルスなどに対する感染予防に重要な役割を担っているとされている¹⁹。一方で、MDSCs は免疫反応を抑制することにより、恒常性の維持にも寄与しているとされ²⁰、免疫学的に相反した働きが報告されている。本研究における 4T1-S 接種後の状況を考えると、CD11b、Ly6G 高発現の細胞集団は自然免疫系の応答により腫瘍生着を阻害するように働いているか、獲得免疫系の応答により腫瘍生着を阻止した結果によるものかは不明である。今後、CD11b、Ly6G 高発現の細胞集団がどのような役割を担っているのかを解明する必要がある。

また、4T1-S のワクチン接種により誘導された CTL は細胞障害性を有していると思われるが、今回の実験条件下における細胞障害性は確認することができなかった。このことは生体内における免疫環境を実験環境下で忠実に再現できていないことに起因するものと思われた。そこで、生体内での評価も行ったが、細胞障害性を証明することはできなかった。脾臓や DLN など周辺臓器においては細胞障害性を示すリンパ球は豊富でないことから、TILs における評価が重要であると考えた。しかし、実際には腫瘍内へのリンパ球浸潤が乏しく、解析に足る量のリンパ球を回収できなかったため、その解析も不能であった。ただし、メモリー T 細胞の解析においては 4T1-S を接種したマウスの脾臓において CD8 陽性、CD62L 陽性のメモリー型細胞障害性 T 細胞の割合が増加していることが確認され、4T1-S が宿主免疫により感作され、免疫応答により排除された可能性が高いと考えられた。

また、本研究のワクチン効果について興味深い点として、その特異性があげられる。すなわち、4T1-S により誘導されたワクチン効果は 4T1-S に対してのみ有効であり、亜集団である 4T1-A に対するワクチン効果を認めなかった。このことは 4T1-S 細胞が、癌による変異遺伝子由来の特異抗原を発現し、それによりワクチン効果が誘導された可能性も考えられる²¹。マイクロアレイを用いた遺伝子発現の比較では、いくつかの分子が 4T1-S で有意に高発現していることが示されたが、これらのうちの有力な 5 個の候補遺伝子を 4T1-A に導入し強制発現させた細胞を用いてワクチン実験を施行しても、4T1-S に対するワクチン効果を誘導することはできなかった。今回は単一の遺伝子のみでしか検討を行っていないが、複数の遺伝子が相互作用を示すことによって 4T1-S で見られているようなワクチン効果を誘導している可能性もあることから、今後、複

数の遺伝子を導入した強制発現株を作製して検証することによりワクチン効果を誘導できる可能性があると考ええる。また、今回候補とした遺伝子は 4T1-S に高発現しているものから選択したが、反応が癌特異抗原によるものであればワクチン効果は発現量には寄らないと考えられ、今回検証した 5 遺伝子以外も候補となる可能性がある。さらに、新規の遺伝子変異が関与している場合はマイクロアレイで検出することは不可能である。これらを総合すると、4T1-S の免疫原性を変化させた因子を同定するためには、single nucleotide polymorphism (SNP) や次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が必要となる。また、免疫チェックポイントの観点から考えると 4T1-A に発現している分子が宿主免疫を抑制している可能性もあり、CRISPR/Cas9 システムなどを用いた knock out 系を作成し、比較検討する手法も有効かもしれない。

本研究では 4T1-A と 4T1-S の比較検討に主眼を置き実験系の確立と結果の考察を行ったが、今回の結果を踏まえると 4T1-S から樹立したサブクローン同士で比較検討を行うことにより、より差の少ない細胞株同士での比較が可能となり、免疫原性を誘導している原因の特定に有用な情報をもたらす可能性も考えられた。

癌の免疫修飾については elimination、equilibrium、escape といった三つの段階に分けられるといわれている¹²が、免疫原性の低い 4T1-A は equilibrium 以後の段階であり、免疫原性を示す 4T1-S は elimination の段階にあると考えられる。生体内において 4T1-S が 4T1-A よりも腫瘍の増大スピードが遅かったことは、この仮説の傍証となるかもしれない。また、本研究で免疫原性の認められた 4T1-S も生着後の腫瘍については治療効果を示すことはできなかったが、この事実は 4T1-S ワクチンにより誘導される免疫反応は、elimination からすでに equilibrium や escape といった段階へと修飾された腫瘍組織に対しては有効に機能しなかったということを示しているかもしれない。実際、免疫原性の高い腫瘍として知られる悪性黒色腫であっても、治療ワクチンの領域においては十分な結果が得られていない²²。その一方で、このような免疫原性の高い腫瘍においては TILs を用いた養子免疫療法 (Adoptive Cell Therapy: ACT) が既に臨床応用されており、従来の治療法を凌駕する効果が報告されている^{23,24}。4T1-S がどのような機序で免疫原性を獲得したかは明らかでないものの、この機序を解明することができれば免疫原性の乏しい癌種に対しても免疫原性を付与し、養子免疫療法のごとく有効な免疫療法を導入することができるようになるかもし

れない。

本研究において、同一細胞株に対して十分なワクチン効果を発現する免疫原性の高い乳がん細胞株 4T1-S が存在していることを同定した。今後、さらなる解析を加え、癌の免疫修飾機構の調節因子が判明すれば、現在行われている癌免疫療法の効果改善に寄与し得るだけでなく、再生医療の手法を用いた新しい免疫治療法に発展する可能性がある。たとえば、induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞から誘導した樹状細胞に 4T1-S から同定した変異遺伝子を導入することにより、がん細胞に対して恒常的な免疫を誘導することができる可能性を有する。このように、4T1-S の免疫原性を調整している機構を明らかにすることによって、現在行われている癌の免疫療法の効果を改善するだけでなく、新規の治療法の開発にも貢献できるものと思われる。

総括および結論

1. 本研究からの新知見

- ・ 免疫原性の乏しいとされる細胞株の中にも、免疫原性を有しワクチン効果を誘導することのできる細胞亜株が存在していることを見いだした。
- ・ ワクチン効果が T 細胞依存的であることを示し、癌細胞の抑制には宿主免疫機構の応答が重要であることを示した。

2. 新知見の意義

- ・ 癌細胞の免疫修飾の不均一性が細胞株においても存在し、それを制御することによる新たな癌治療戦略開発の可能性を見出した。

3. 今後の研究・課題

今回の研究により、以下の新たな課題に対しさらなる研究を進めるべきと考えられた。

- ・ 4T1-S の免疫原性を変化させた要因を明らかにし、免疫原性の乏しい細胞亜株に対して免疫原性を獲得させ得るかを検討する。
- ・ 今回の研究で作成した 4T1-S の亜株を使用し、腫瘍内における免疫原性が不均一であることの証明、さらには免疫修飾機構の調節因子の解明のために本研究同様の免疫学的な比較実験を行う。
- ・ 上記の過程により、癌の免疫修飾機構を明らかにし、癌ワクチン療法を初めとする免疫療法全般の有効性向上に寄与する知見を得る。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝いたします。特に、実際の研究の場を与えていただき基礎実験全般につき御指導頂きました、同大遺伝子病制御研究所 免疫生物分野 清野 研一郎 教授に深謝申し上げます。ならびに、研究全般にわたり御指導頂きました和田はるか講師、Muhammad Baghdadi 助教に深く感謝いたします。

さらに、本研究を遂行するに当たりご協力いただいた北海道大学大学院消化器外科学分野Ⅱの皆様、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野の皆様に心より感謝いたします。

引用文献

- 1 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *CA: Cancer J. Clin.* **65**, 5-29 (2015).
- 2 がん登録・統計. がん情報サービス, 国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター.
http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html (2016)
- 3 Burstein, H. J. *et al.* Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2255-2269 (2014).
- 4 Azim, H. A. *et al.* Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann. Oncol.* **22**, 1939-1947 (2011).
- 5 Howard-Anderson, J., Ganz, P. A., Bower, J. E. & Stanton, A. L. Quality of life, fertility concerns, and behavioral health outcomes in younger breast cancer survivors: a systematic review. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 386-405 (2012).
- 6 Kirkwood, J. M. *et al.* Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: Cancer J. Clin.* **62**, 309-335 (2012).
- 7 Emens, L. A. Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **12**, 1597-1611 (2012).
- 8 Wang-Johanning, F. *et al.* Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **104**, 189-210 (2012).
- 9 Hailemichael, Y. *et al.* Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat. Med.* **19**, 465-472 (2013).
- 10 Wu, X. *et al.* Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Can. Lett.* **340**, 124-133 (2013).
- 11 Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr. Opin.*

- Immunol.* **27**, 16-25 (2014).
- 12 Dunn, G. P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991-998 (2002).
 - 13 Swann, J. B. & Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.* **117**, 1137-1146 (2007).
 - 14 Haikerwal, S. J. *et al.* Building immunity to cancer with radiation therapy. *Cancer Lett.* **368**, 198-208 (2015).
 - 15 Matthew R. Buckwalter, P. K. S. Mechanism of dichotomy between CD8+ responses elicited by apoptotic and necrotic cells. *Cancer immunity* **13**, 13 (2013).
 - 16 Matsumura, S. *et al.* Radiation-Induced CXCL16 Release by Breast Cancer Cells Attracts Effector T Cells. *The Journal of Immunology* **181**, 3099-3107 (2008).
 - 17 Sakaguchi, N. *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* **426**, 454-460 (2003).
 - 18 Fairfield, H. *et al.* Exome sequencing reveals pathogenic mutations in 91 strains of mice with Mendelian disorders. *Genome Res.* **25**, 948-957 (2015).
 - 19 Fischer, M. A. *et al.* CD11b(+), Ly6G(+) cells produce type I interferon and exhibit tissue protective properties following peripheral virus infection. *PLoS pathogens* **7**, e1002374 (2011).
 - 20 Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162-174 (2009).
 - 21 Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577-581 (2014).
 - 22 Lens, M. The role of vaccine therapy in the treatment of melanoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 315-323 (2008).
 - 23 Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 233-240 (2009).
 - 24 Rosenberg, S. A. *et al.* Durable complete responses in heavily

pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4550-4557 (2011).