

## 合成ペプチドを用いたMUC-1特異的細胞傷害Tリンパ球(CTL)の誘導

著者	澤井 聡, 紺谷 桂一, 花岡 淳, 森 渥視
雑誌名	滋賀医科大学雑誌
巻	14
ページ	19-27
発行年	1999-02
その他の言語のタイトル	Oligopeptides derived from MUC-1 mucin are available for inducing tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10422/97">http://hdl.handle.net/10422/97</a>

## 合成ペプチドを用いた MUC 1特異的細胞傷害 T リンパ球(CTL)の誘導

澤井 聡, 紺谷 桂一, 花岡 淳, 森 渥視

滋賀医科大学第二外科

## Oligopeptides Derived from MUC 1 Mucin Are Available for Inducing Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs)

Satoru SAWAI, Keiichi KONTANI, Jun HANAOKA and Atsumi MORI

Second Department of Surgery, Shiga University of Medical Science

Abstract: MUC-1 mucin has been reported to carry a strong immunogenicity and to be recognized by T lymphocytes in MHC-unrestricted manner. Also, the antigenic epitopes of this molecule are known to be located within the tandem repeat domain of MUC-1 core protein. In this study, we analyzed the ability of 30-amino acid oligopeptides (MUC-1 peptide) derived from the MUC-1 core to elicit tumor-specific CTLs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with lung cancer. To determine whether the MUC-1 peptide was presented by antigen presenting cells, peptides bound on the dendritic cells (DCs) pulsed with the MUC-1 peptide were eluted by acid-treatment and studied for reactivity to anti-MUC-1 antibody using spot test. Although the eluates from the DCs pulsed with the MUC-1 peptide showed the reactivity to the antibody, no reactivity was seen in those from the DCs pulsed with non-related peptides. The induced CTLs using the MUC-1 peptide exhibited a strong cytotoxic activity against MUC-1-expressing target cells in the  $^{51}\text{Cr}$ -release assay. A strong cytotoxic activity of the CTLs was observed against the MUC-1-transduced cell line, whereas there was a weak activity against the MUC-1 deficient parent cell line. Using synthetic peptides is thought to be useful to induce MUC-1 specific CTLs for the purpose of immunotherapeutic treatment of cancer.

Key words: MUC-1, cytotoxic T lymphocytes, synthetic peptides, antigen presenting cells, dendritic cells

### はじめに

腫瘍関連抗原の研究から, MAGE<sup>1)</sup>および GAGEファミリー<sup>2)</sup>, tyrosinase<sup>3)</sup>, Melan-A/MART 1<sup>4)</sup>, erbB-2<sup>5)</sup>など種々の腫瘍抗原が同定されている。し

かも, その多くが担癌個体に強い特異的抗腫瘍免疫応答を誘導しうることから, これらの分子を標的抗原に用いた免疫療法の可能性についての研究が精力的に進められている。特に抗原提示細胞 (APC) 上の MHC 分子に結合して発現する腫瘍抗原ペプチドが同定されてからは, その合成ペプチドを用いた

Received September 28, 1998; Accepted after revision December 9, 1998

Correspondence: 滋賀医科大学第二外科 澤井 聡 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

抗原特異的細胞傷害Tリンパ球 (CTL) の誘導が盛んに行われ、現在臨床試験の段階に入っているものもある。

MUC 1分子も重要な腫瘍抗原の1つと考えられており、多くの癌細胞上に高発現する膜貫通糖蛋白である。その遺伝子は7つのエクソンより構成され、エクソン2にセリン、スレオニンに富む20アミノ酸をコードする繰り返し配列ドメインが存在する。正常上皮細胞上では、これらセリン、スレオニンから O-linkage を介して複雑で長い糖側鎖が結合しているために抗原決定基を含むコア蛋白が被覆されている。細胞の癌化に伴い、糖鎖形成不全がおりコア蛋白上の繰り返し配列が露出される結果、腫瘍抗原として免疫系に認識される<sup>6-10)</sup>。また、多くの腫瘍抗原の CTL による認識機構が MHC 拘束性であるのに対して、MUC 1の認識機構は MHC 非拘束性である点が特徴的である<sup>11)</sup>。

今回我々は、MUC 1コア蛋白の繰り返し配列に従った30アミノ酸のペプチドを合成し、ヒト末梢血単核球 (PBMC) からこの MUC 1ペプチドを用いて CTL の誘導を試みた。さらに CTL 誘導に関与する APC を同定するとともに、CTL の抗原特異性を解析し臨床応用の可能性について報告する。

## 方 法

### 腫瘍細胞株

MUC 1高発現乳癌細胞株 T 47D は ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) より購入した。MUC 1欠損株 SBC 2 (肺小細胞癌) は成田達彦先生 (愛知県がんセンター研究所第二病理) より供与を受けた。MUC 1 cDNA を組み込んだプラスミドベクター pDKOF muc<sup>10)</sup> は Dr.O.J.Finn (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA) より供与を受けた。これを electroporation 法により SBC-2に導入した。その後 G418存在下にセレクションを行い、MUC 1遺伝子導入株 SBC-M を樹立した。

### ペプチド合成

MUC 1コア蛋白上の繰り返し配列の20アミノ酸を含んだ30アミノ酸 GVTSAPDTRPAPGSTAP-

PAHGVTSAPDTR) および MAGE 3の HLA-A2結合ペプチド<sup>12)</sup> (FLWGPRLALV) をクラボウ社に依頼合成した。いずれの合成ペプチドも90%以上の純度であり、50%DMSO で溶解後 -20 以下で凍結保存した。

### MUC 1コア合成ペプチドを用いた CTL の誘導

同意を得た上で採取した2名の肺癌患者の末梢血より、Ficoll 比重勾配分離法を用いて PBMC を分離した。分離 PBMC を MUC 1コア合成ペプチド (20 $\mu$ g/ml) で37 2時間刺激後、IL 7 (10ng/ml) (genzyme, Cambridge, MA) を含む10%FCS 添加 RPMI1640で培養し responder 細胞とした<sup>12)</sup>。培養7日目、同様にペプチド刺激した自己 PBMC に30Gy 放射線照射を行いこれを stimulator 細胞として IL 7 (10ng/ml), IL 2 (10units/ml) (Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka) 存在下に responder 細胞と共培養した。その後、7日毎に stimulator 細胞で刺激を繰り返し IL 2 (20units/ml) 存在下に培養し CTL を誘導した。

### 樹状細胞 (DC) の誘導

PBMC (1  $\times$  10<sup>7</sup> cells) を15cm プラスティックプレート上で37 2時間インキュベートした後、非接着細胞をピペティングにより除去した。接着細胞は GM-CSF (2000 units/ml; Wako Junyaku, Osaka) および IL 4 (400units/ml; Petro Tech EC Ltd., London, UK) 添加 FCS-free medium (AIM-V medium) で1~2週間培養した後<sup>13)</sup>、これを DC として以下の解析に用いた。

### FACS 解析

HLA class I (A, B, C), HLA class II (DR), B7 1, B7 2に対する抗体はそれぞれ W6/32 (SE-ROTEC Corp., Cambridge, MA), L243 (Leico Technologies, Inc., Ballwin, MO), BB 1 (Wako Junyaku, Osaka), BU63 (Ansell Corp., Bayport, MN) を用いた。細胞 5  $\times$  10<sup>5</sup>個を1次抗体至適濃度希釈 PBS100 $\mu$ l に浮遊させ4 30分間反応させた。2%FCS 添加 PBS で2回洗浄後、2次抗体として1000倍希釈 FITC 標識ヤギ抗マウス IgG で4 30分間反応させた。PBS で2回洗浄後、それぞれの蛍光強度を FACSsort (Becton Dickinson, San

Jose, CA) で測定した。CTL の phenotype は FITC 標識抗 CD3, FITC 標識抗 CD8, PE 標識抗 CD56 (いずれも PHARMINGEN, San Diego, CA), PE 標識抗 CD4 (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用い 2 カラー染色で解析した。データ解析にはソフトウェア LYSIS II (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いた。

#### 細胞傷害試験

樹立した CTL の腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性は<sup>51</sup>Cr-release assay により解析した。すなわち、腫瘍細胞を Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> (DuPont NEN, Boston, MA) で 37 1 時間標識したのち 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml の濃度で培養液に浮遊させた。5 × 10<sup>6</sup> cells/ml 濃度の CTL 浮遊液 100 μl と腫瘍細胞浮遊液 100 μl を 96 穴 U-bottom tissue culture plate (Corning Costar Co. Ltd., Tokyo) に加え 16 時間共培養した。培養後、上澄液 100 μl 中の放射活性をガンマカウンター (COBRA II, Packard Instrument Co., Meriden, CT) で測定した。% cell lysis は以下の式で求めた。

$$\% \text{ cell lysis} = \frac{\text{試料解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}}{\text{最大解離(cpm)} - \text{自然解離(cpm)}} \times 100$$

最大解離 (cpm) は target cell 浮遊液に 1 N 塩酸を加えたもの、自然解離 (cpm) は target cell だけの浮遊液の測定値とした。% cell lysis 値は 3 試料の平均値 ± 標準誤差で示し、2 群間の統計処理は t 検定で行い、危険率 p < 0.05 をもって統計的有意とした。

#### cell lysate の抽出

PBS で 3 回洗浄した細胞のペレットに lysis buffer (40mM HEPES, 1% Triton X 100, 10% glycerol, 1 mM PMSF) を加え超音波破碎処理を行った。12000 × g, 4, 30 分間遠心した後、その上澄液を採取し cell lysate を抽出した。cell lysate を Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD, Hercules, CA) で発色させ、spectrometer を用いて 595nm 波長の吸光度を standard protein の吸光度と比較することによりその蛋白濃度を測定した。

#### Spot test

誘導した DC (2 × 10<sup>6</sup> cells) を合成ペプチド (20

μg/ml) または T 47D cell lysate (100 μg/ml) で 37 2 時間刺激した。PBS にて 3 回洗浄後、FCS-free medium (AIM-V medium) で一晩インキュベートした。3 回の洗浄の後に citrate phosphate buffer (pH 3) で 1 分間酸処理を行い、細胞表面ペプチドを溶出させた。溶出液は Speed Vac SC 100 (SAVANT, Farmingdale, NY) で凍結乾燥後 20 μl DMSO で溶解した。この溶解液を autoclaved water で希釈し 1 μl を 0.1%ゼラチンで処理した nitrocellulose membrane (Life Technologies, Grand Island, NY) にスポットした後、パラホルムアルデヒドで 80 2 時間加熱し固定した。この membrane をブロッキング処理後 1 次抗体マウス抗ヒト MUC 1 モノクローナル抗体 SM3 (2 μg/ml) (Cymbus Bioscience Ltd., Southampton, UK) と室温で 2 時間反応させた。洗浄後 2 次抗体 peroxidase-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (1000 倍) と反応させ、さらに avidin-biotin complex と結合させた。chemiluminescence (Renaissance, NEN Life Science Products, Boston, MA) と 1 分間反応後、FUJI MEDICAL X-RAY film RX-U に感光させその SM3 反応性を解析した。

## 結 果

#### 抗原提示細胞 (APC) の同定

合成ペプチドを用いた CTL の誘導には、T リンパ球にそのペプチドを抗原提示する APC の存在が必要である。そこで、まず APC の同定を試みた。DC は多くのペプチド抗原が結合する MHC 分子のほか、co-stimulatory 分子や接着分子を高発現しており抗原提示能に優れた細胞であると考えられていることから、同細胞がペプチド刺激により MUC 1 の APC として機能し得るかを検討した。3 個体の PBMC のプラスチックプレート接着細胞分画を GM-CSF および IL 4 存在下に培養することによって DC-1 3 を誘導した。DC 1 および DC 2 は肺癌患者の、DC 3 は健康人の PBMC から誘導したものである。それぞれの HLA ハプロタイプは、DC 1: A2/24, B51/52, DR2/4, DC 2: A2/31, B46/60, Cw1/w3, DR8/11 および DC 3: A24/-, B7/52, Cw7/-, DR1/2 であった。誘導した DC の pheno-

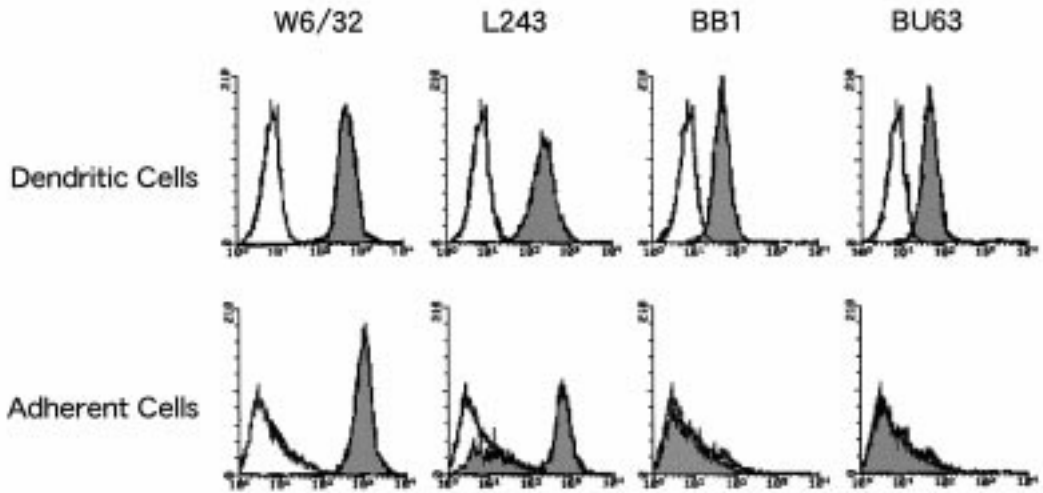


Fig. 1 樹状細胞とプラスチックプレート接着細胞に対する FACS 解析 . W 6 / 32 , L 243 , BB 1 , BU63 はそれぞれ HLA A , B , C , HLA D R , B 7 1 , B 7 2 に対するモノクローナル抗体を示す . 白抜き波形は 1 次抗体のみ未処理の対象を示す .

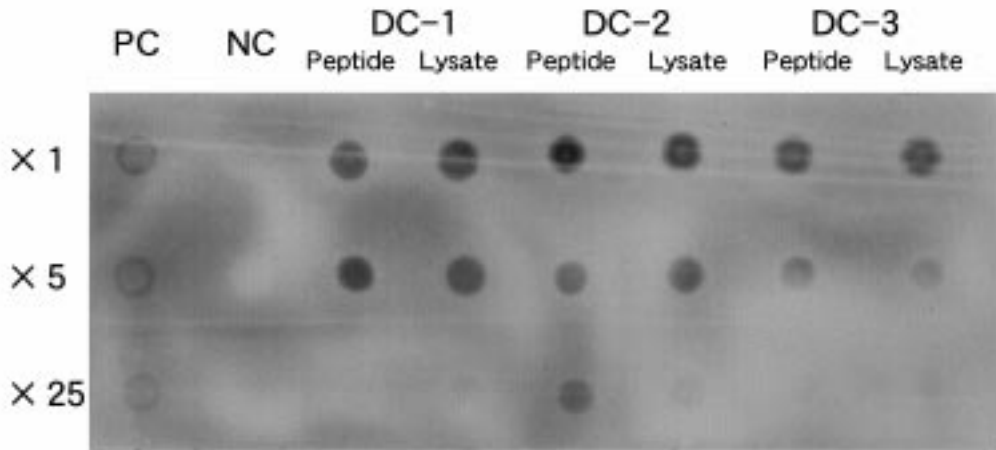


Fig. 2 樹状細胞から酸溶出した細胞表面ペプチドの Spot test . Peptide , Lysate はそれぞれ MUC-1合成ペプチド , T 47D cell lysate で刺激した DC から溶出ペプチドを示す . x1 x25 は溶出ペプチドの希釈倍率 . PC は MUC 1合成ペプチドをスポットした陽性コントロール . NC は MAGE 3ペプチド刺激樹状細胞 DC 2から溶出したペプチドをスポットした陰性コントロール .

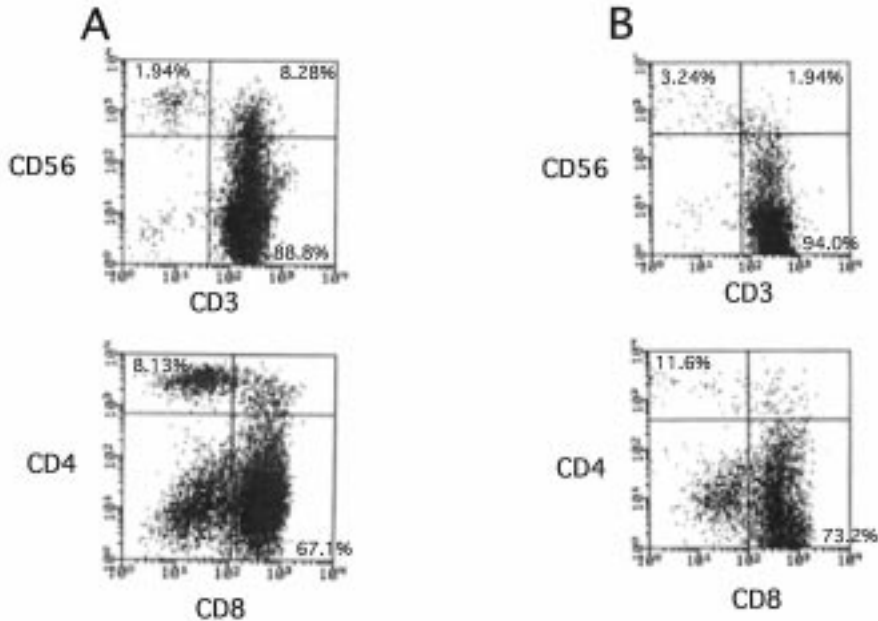


Fig. 3 MUC 1 コア合成ペプチド刺激により誘導された CTL 1 の FACS 解析 . A は 5 回 , B は 8 回刺激後の CTL の表面マーカーを示す .

type をプレート接着細胞と FACS により比較すると (Fig. 1), DC は MHC class I, II のほか co-stimulatory 分子である CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) が高発現していた . この合成ペプチド刺激 DC の細胞表面ペプチドを酸処理により溶出させ , spot test にて SM3 に対する反応性をみた (Fig. 2) . 他のペプチド (MAGE 3) 刺激 DC 2 からの溶出ペプチドは SM3 に対して無反応であったのに対して , MUC 1 ペプチド刺激 DC からの溶出ペプチドは DC1 3 いずれも陽性反応を示した . DC1 3 すべてに共通する HLA ハプロタイプがないことより , MUC 1 ペプチドの結合は HLA 拘束を受けないと考えられた . また , MUC 1 高発現株 T 47D の cell lysate による刺激でも同様の結果が認められた .

#### CTL の抗原特異性の解析

2 個体の進行肺癌患者よりそれぞれ CTL 1 , CTL 2 を誘導した . 両者とも 3 回目までの刺激では responder cell 数は開始時よりむしろ減少し , 5 回目以降になりようやく assay に供するまでに増加した . CTL 1 の表面マーカーを FACS にて解析し

た . 5 回刺激の CTL 1 では , CD3 陽性細胞は 97% と大部分が T リンパ球であったがその中で CD3/CD56 陽性の細胞群が 8.28% 含まれていた . また , CD4 陽性細胞が 8.13% に対して CD8 陽性細胞は 67.1% と CD8 優位の CTL であった (Fig. 3A) . さらに 8 回まで刺激を繰り返してもその population にほとんど変化がみられなかった (Fig. 3B) . CTL 2 も CTL 1 同様に CD8 優位な CTL であった .

誘導された CTL の MUC 1 抗原特異性を MUC 1 発現の異なる腫瘍細胞株を標的細胞とした細胞傷害試験で解析した . 5 回刺激 CTL 1 は , MUC 1 高発現株 T 47D に対する % cell lysis が 71.5% と強い細胞傷害活性を示したが , MUC 1 欠損株 SBC 2 とその MUC 1 遺伝子導入株 SBC-M に対してはそれぞれ 25.8% , 33.3% と両者間に有意差を認めなかった (Fig. 4A) . 8 回刺激 CTL 1 は , SBC 2 に対して全く傷害活性を示さなくなったが , SBC-M に対しては強い傷害活性を示した (Fig. 4B) . 刺激を 8 回まで繰り返すことにより MUC 1 特異的 CTL が誘導されたと考えられた . また , CTL 2 は 5 回刺激 (Fig. 5A) で有意な MUC 1 特異性を示した . 8 回まで刺激を繰り返すと MUC 1 特異性はさらに向上

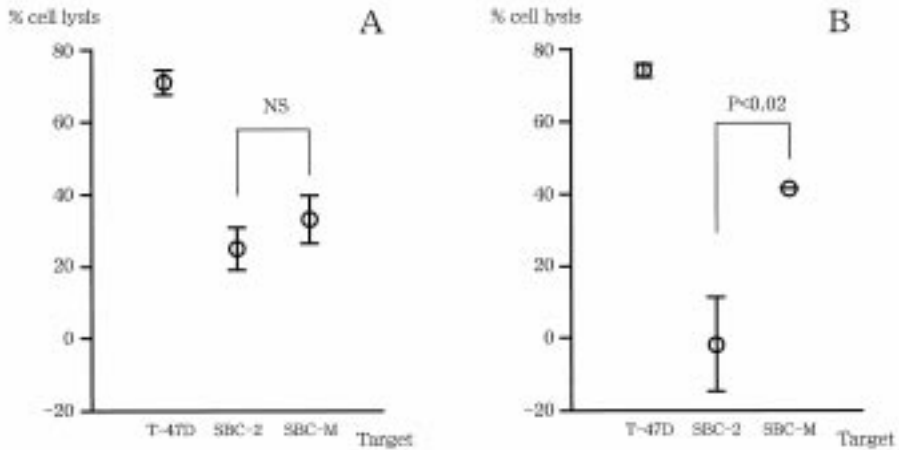


Fig. 4 誘導された CTL - 1 の腫瘍細胞株に対する細胞傷害試験 ( $^{51}\text{Cr}$ -release assay). A は 5 回, B は 8 回刺激後の CTL を effector とした. E : T = 50 : 1. % cell lysis 値は平均値  $\pm$  標準誤差で示す.

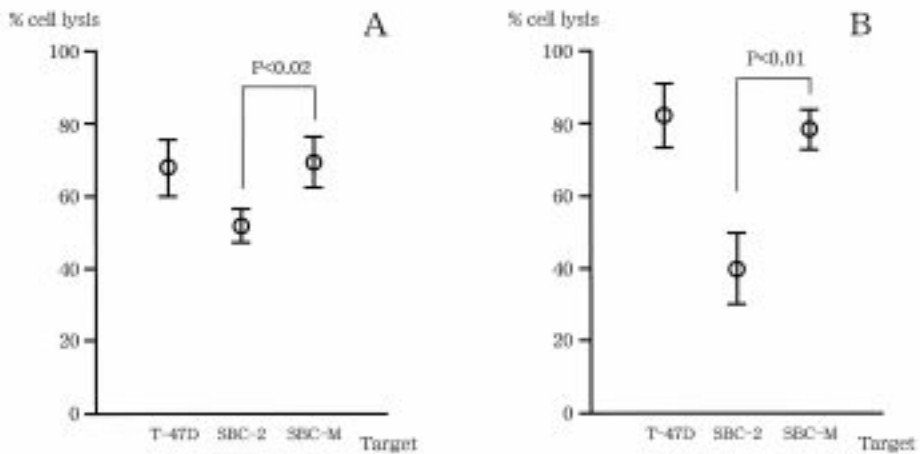


Fig. 5 誘導された CTL - 2 の腫瘍細胞株に対する細胞傷害試験 ( $^{51}\text{Cr}$ -release assay). A は 5 回, B は 8 回刺激後の CTL を effector とした. E : T = 50 : 1. % cell lysis 値は平均値  $\pm$  標準誤差で示す.

した (Fig. 5B). 肺癌患者 PBMC から MUC 1ペプチドを用いた方法で MUC 1特異的 CTL 誘導が可能であり, その誘導には 5 ~ 8 回以上刺激を繰り返すことが必要であった.

## 考 察

近年の外科的治療, 放射線療法および化学療法の進歩にもかかわらず, 癌は依然として予後不良の疾

患であり, 新たな治療法の開発が早急の課題である. その新しいアプローチのひとつとして養子免疫療法がある. 当初, 癌患者のリンパ球を IL 2により活性化し, 誘導された LAK 細胞 (lymphokine activated killer cells) を患者に投与する LAK 療法が期待された<sup>14)</sup>. しかし, この方法は腫瘍特異性に乏しく, 大量の IL 2投与に伴う副作用の問題から臨床効果を得るまでには至らなかった.

次に開発されたのが, 癌に特異的なキラー活性をもつ Tリンパ球を誘導する CTL 療法である. 多く

の腫瘍抗原が同定され、それに対する CTL 誘導が試みられているが、我々はその中で膜貫通糖蛋白である MUC 1 分子に着目した。なぜなら MUC 1 は乳癌、膵臓癌をはじめ多くの癌細胞に高発現しており、この高い発現頻度は癌治療の標的抗原としての必須の条件であるからである。我々が行った切除組織の免疫染色では、肺癌全体で 80% に、最も頻度の多い肺腺癌においては 90% の症例にその発現が認められた。また MUC 1 の CTL による認識機構が MHC 非拘束性であることより、同分子に対する CTL 療法は MHC 拘束性に認識される他の腫瘍抗原を標的とする治療と比べると、より多くの癌患者に適応しうると考えられる。

MUC 1 発現癌細胞株を stimulator に用いた CTL 誘導の研究から、CTL は MUC 1 コア蛋白上の繰り返し配列のうち、APDTRP をエピトープとして認識する事が明らかにされた。また、Finn<sup>10)</sup> は、EB ウイルスで遺伝子導入した自家 B 細胞に MUC 1 遺伝子を導入し、乳癌患者の PBMC より MUC 1 特異的 CTL の誘導に成功している。養子免疫療法の臨床応用を考慮する上で、アロ腫瘍細胞株ではなく自己の細胞を CTL の刺激細胞に用いることは、未知のウイルス感染や allogeneic response 等種々の問題を回避できる点で実用的である。そこで、我々は MUC 1 エピトープを 2 回含む 30 アミノ酸のペプチドを合成し、これにより PBMC を感作刺激し CTL の誘導を試みた。非特異的細胞傷害活性を示す NK 細胞の増殖をできる限りなくすため、1 回目刺激後は IL 7 のみで、その後は低濃度の IL 2 を添加し培養を行った。その結果、大部分が CD3 陽性、CD56 陰性の phenotype を持った CTL が誘導された。

誘導された CTL は、MUC 1 欠損親株に比しその MUC 1 遺伝子導入株に対してより強い細胞傷害活性を示したことから MUC 1 特異的 CTL であることが証明された。しかも、刺激を繰り返すことでさらに高い特異性を持った CTL が誘導された。この CTL が免疫系の機能低下が予想される進行肺癌患者の PBMC から誘導されたことは本法の臨床応用を考慮する上で意義があると考えられる。

T 細胞への抗原提示は、通常抗原提示細胞の細胞内で processing を受けたペプチドが MHC 分子上に提示されることにより行われる。MHC class I で

あれば、そのハプロタイプに特定の binding motif を持った 8 ~ 10 アミノ酸長のペプチドが提示される。従って、合成ペプチドによる腫瘍抗原特異的 CTL の誘導には細胞内での processing を受けずに MHC class I に直接結合する 9 アミノ酸長のものが用いられてきた<sup>12)15)16)</sup>。MUC 1 においても同様で、Doménech ら<sup>17)</sup> は HLA-A11 に直接結合する 9 アミノ酸の合成ペプチドを用いて MUC 1 特異的 CTL を誘導している。そのほか、Apostolopoulos ら<sup>18)</sup> は mannan-fusion protein を付加した 9 アミノ酸の合成ペプチドを HLA-A2 transgenic マウスに免疫することにより CTL を誘導している。しかし、いずれも MHC 拘束性の CTL 誘導であり、今回の我々の行った無修飾の 30 アミノ酸の MUC 1 コアペプチドで MHC 非拘束性 CTL を誘導する試みは今までに報告がない。

ここで問題となるのは、30 アミノ酸長のペプチド刺激で果たして APC 上に抗原提示され得るのか、PBMC 内にそれを行う APC が存在するのかということである。spot test において、MUC 1 ペプチド刺激した DC からの溶出ペプチドのみが陽性反応を示した。このことは MUC 1 ペプチド刺激 DC の細胞表面上に SM3 に認識されるペプチドが存在することを意味しており、CTL 誘導において同細胞が APC としての機能し得ることが示唆された。さらに同ペプチドは HLA ハプロタイプに無関係に抗原提示されることも明らかになった。この事実は MUC 1 コア上のエピトープ APDTRP 部分が CTL により MHC 非拘束性に認識されるというこれまでの報告と一致する<sup>10)</sup>。ただし、MUC 1 ペプチドがどの様に抗原提示されているかは、まだ明らかでない。MUC 1 分子が Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) のリガンドになるとの報告<sup>19)</sup> もあり、ペプチドが直接細胞表面上のある特定の分子に結合する可能性がある。また、DC が phagocytosis の機能を持つことが最近証明された<sup>20)</sup>。したがって、ペプチドが細胞内に取り込まれ、processing を受けて細胞表面上に表出する可能性も考えられる。これらは今後、検討されるべき問題であると思われる。今回は抗原提示能の強い DC を用いて APC の MUC 1 提示能を証明したが、PBMC で CTL 誘導が可能であったことから PBMC 内にも MUC 1 ペプチドを抗原提示できる APC が存在すると考えら



れた。

また Spot test において, MUC 1高発現株 T 47 D の cell lysate 刺激でも DC が合成ペプチド刺激と同じエピトープを抗原提示していたことは大変興味深い。SM3に認識される部位は MUC 1エピトープと同じ APDTRP であり<sup>21)</sup>, MUC 1発現腫瘍組織から抽出した cell lysate 刺激でも MUC 1特異的 CTL の誘導が可能であると考えられる。

今後, MUC 1分子をターゲットにした CTL 療法の臨床応用が大いに期待できる。

## 結 語

PBMC から MUC 1ペプチドを用いた簡便な方法で MUC - 1 特異的 CTL の誘導が可能であった。その抗原提示は, HLA ハプロタイプに関係なく APC によってなされていると考えられた。本法による CTL の誘導は自己の細胞を用いたものであり, 腫瘍に対する養子免疫療法の臨床応用に適している。

## 文 献

- 1 ) Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643 1647, 1991.
- 2 ) Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T: A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J. Exp. Med.* 182: 689 698, 1995.
- 3 ) Wölfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer zum Bschenfelde KH, Boon T: Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24: 759 764, 1994.
- 4 ) Kawakami Y, Eliyasu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, Rosenberg SA: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180: 347 352, 1994.
- 5 ) Paik S: Clinical significance of c-erbB-2 (HER-2/neu) protein. *Cancer Invest.* 10: 575 579, 1992.
- 6 ) Gendler SJ, Lancaster CA, Talor-Papadimitriou J, Duhig T, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D: Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265: 15286 15293, 1990.
- 7 ) Lan MS, Hollingsworth MA, Metzgar RS: Polypeptide core of a human pancreatic tumor mucin antigen. *Cancer Res.* 50: 2997 3001, 1990.
- 8 ) Lan MS, Batra SK, Qi MN, Metzgar RS, Hollingsworth MA: Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* 265: 15294 15299, 1990.
- 9 ) Itzkowitz S, Kjeldsen T, Frieria A, Hakomori S, Yang US, Kim YS: Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas. *Gastroenterology* 100: 1691 1700, 1991.
- 10 ) Jerome KR, Bu D, Finn OJ: Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr virus-immortalized B-cells and Burkitt's lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA. *Cancer Res.* 52: 5985 5990, 1992.
- 11 ) Barnd DL, Lan MS, Metzger RS, Finn OJ: Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 7159 7163, 1989.
- 12 ) Valmori D, Liéard D, Waanders G, Rimoldi D, Cerottini JC, Romero P: Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients. *Cancer Res.* 57: 735 741, 1997.

- 13) Tütting T, Deleo AB, Lotze MT, Storkus WJ: Genetically modified bone marrow - derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* 27: 2702-2707, 1997.
- 14) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG, White DE: A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine - activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Eng J Med* 316: 889-897, 1987.
- 15) Hu X, Chakraborty NG, Sporn JR, Kurtzman SH, Ergin MT, Mukherji B: Enhancement of cytolytic T lymphocyte precursor frequency in melanoma patients following immunization with the MAGE-1 peptide loaded antigen presenting cell-based vaccine. *Cancer Res.* 56: 2479-2483, 1996.
- 16) Mortarini R, Anichini A, Di Nicola M, Siena S, Bregni M, Belli F, Molla A, Gianni AM, Parmiani G: Autologous dendritic cells derived from CD34+ progenitors and from monocytes are not functionally equivalent antigen-presenting cells in the induction of Melan-A/Mart-1(27-35)-specific CTLs from peripheral blood lymphocytes of melanoma patients with low frequency of CTL precursors. *Cancer Res.* 57: 5534-5541, 1997.
- 17) Doménech N, Henderson RA, Finn OJ: Identification of an HLA-A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the epithelial tumor antigen mucin. *J. Immunol.* 155: 4766-4774, 1995.
- 18) Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF: Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J. Immunol.* 159: 5211-5218, 1997.
- 19) Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC: The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 56: 4244-4249, 1996.
- 20) Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL: Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and II molecules. *J. Immunol.* 158: 2723-2730, 1997.
- 21) Taylor-Papadimitriou J, Peterson JA, Arklie J, Burchell J, Ceriani RL, Bodmer WF: Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: Production and reaction with cells in culture. *Int. J. Cancer.* 28: 17-21, 1981.