

学位申請論文

肺癌における末梢血樹状細胞への脂質集積と 抗腫瘍免疫の関連

獨協医科大学 内科学（呼吸器・アレルギー）

新井 良

要 旨 肺癌患者、特に進行期患者の抗腫瘍免疫能の低下における樹状細胞の関与を検討するために、末梢血樹状細胞 (dendritic cell, DC) のサブセットと DC への脂質集積を検討した。肺癌症例から得られた末梢血より、モノクローナル抗体を結合させ、フローサイトメトリーを使用し DC のサブセットとその割合を分析した。また、分離した DC で、脂肪親和性蛍光色素 (BODIPY 650/665) を使用し脂質集積を分析した。未治療肺癌患者において、健常人と比較し末梢血 DC 数が有意に減少し、病期分類 III+IV 期の患者群で骨髄系 DC (myeloid DC, mDC) と形質細胞様 DC (plasmacytoid DC, pDC) とともに有意に減少していた。BODIPY650/665 の蛍光強度でみた DC への脂質集積は、健常者と比較し、肺癌 III+IV 期の症例群で有意に高値を示した。また、サブセット別の解析では mDC において蛍光強度が高値を示し、脂質集積を認めた。細胞内へ蓄積された脂質はトリグリセリド (triglyceride, TG) であることが同定された。肺癌症例の末梢血中 mDC では、健常者と比較し混合リンパ球反応 (mixed leukocyte reaction, MLR) の低下を認めた。肺癌患者では末梢血 DC 数の明らかな減少と DC 細胞内へ多量の脂質集積による抗原提示細胞としての機能の低下から、抗腫瘍免疫能が抑制されているものと考えられた。

Key Words : 肺癌, 樹状細胞, 脂質集積, 腫瘍免疫

緒 言

肺癌は他の癌腫と比較し、予後不良な疾患である。肺癌症例における腫瘍免疫の病態解析は、今後の免疫療法にとって重要となってくる。メラノーマ、腎細胞癌のような免疫原性の悪性腫瘍では、DC ワクチン治療が有望であることがわかっているが^{1,2)}、肺癌での臨床試験でもよい成績が示されている^{3~6)}。抗原提示細胞である DC は、免疫応答において重要な役割を担っている。DC は癌組織を取り込み、癌特異的ヘルパー T 細胞 (T helper, Th) や細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T cell, CTL) の活性化にかかすことのできない抗原提示細胞であり、抗腫瘍効果の初期の免疫機能に関わっている。

ヒト由来の DC は一般的に 2 つの系統に分類されており、骨髄系 DC (myeloid DC, mDC) と形質細胞様 DC

(plasmacytoid DC, pDC) に分けられる^{7,8)}。末梢血単球由来の mDC は、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor, GM-CSF)、インターロイキン 4 (interleukin-4, IL-4) により分化し、ナイーブ T 細胞から Th1 (T helper 1) に傾いた CD4 (+) T 細胞へ誘導する働きがある^{9~13)}。生体内において、mDC は強い貪食能と抗原提示能を持ち、細胞性免疫の獲得に関与しているとされている。一方、pDC は、インターロイキン 3 (interleukin-3, IL-3) との培養で誘導され、免疫寛容などに働いている^{14,15)}。

DC は未熟な状態で末梢血中に存在し、特異的な腫瘍抗原をとらえ認識する。インターフェロン α (Interferon- α , IFN- α)、Toll 様受容体 (toll-like receptor, TLR) アゴニストのような炎症性メディエーターに反応し成熟をおこすと、T 細胞に抗原提示をし、特異的抗腫瘍 T 細胞応答を活性化させる能力を獲得し、各組織へと遊走する^{16,17)}。生物活性のある IL-12p70 を産生する DC は著明な抗腫瘍免疫を誘導する。ナチュラルキラー (Natural killer, NK) 細胞の活性を増強し、Th1 反応へ導き、

平成 24 年 12 月 5 日受付, 平成 24 年 12 月 10 日受理
別刷請求先: 新井 良

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880
獨協医科大学 内科学 (呼吸器・アレルギー)

腫瘍特異的 CD8 (+) 細胞を誘導する^{18,19)}。

しかし、担癌患者では、抗腫瘍免疫が低下していることが知られている。多くの腫瘍は、DC の成熟あるいは分化を抑制するサイトカインやほかの因子を産生することで免疫応答から回避する¹⁶⁾。Th1 細胞由来のサイトカインにより活性化された CTL は細胞障害活性を示し、癌細胞に対してアポトーシスを誘導するが、癌患者においては T 細胞の活性が低下しており、その機構の一つとして腫瘍細胞から放出されるトランスフォーミング増殖因子ベータ (transforming growth factor- β , TGF- β) による Th1 細胞および CTL の活性抑制が存在する^{20,21)}。DC の機能障害をおこす要因は十分に明らかになっていないが、その要因の一つとして、担癌患者では DC に脂質が集積し、DC の機能が抑制されている可能性がある²²⁾。DC における脂質集積のメカニズムを明らかにすることは、新しい免疫療法の開発につながることを期待される。今回、肺癌症例を対象とし、末梢血中の DC のサブセットと脂質の集積を解明することで、肺癌における腫瘍免疫能の変化を明らかにするため本研究を行った。

方 法

患 者

患者は、病理組織学的に診断された未治療肺癌症例を対象とした。肺癌の病期診断は、TNM 分類第 7 版で病期分類された²³⁾。アレルギー疾患や感染症、自己免疫性疾患、悪性腫瘍の既往がなく、同意が得られた健常人を対象群とした。全症例にインフォームドコンセントを得た。

フローサイトメトリー

健常人及び肺癌患者より末梢血約 20ml のヘパリン採血を行い、下記のモノクローナル抗体を採取した新鮮末梢血に添加し、室温で 2 時間培養した。Lineage-1 ; FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), HLA-DR ; Per-CP (BD), CD11c ; FITC (BD), CD11c ; PE (BD), CD123 ; PE (BD), CD1a ; APC (BD), CD1a ; PE (BD), BDCA-1 (CD1c) ; APC, BDCA-2 ; APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)。その後 Cell Lysing Solution (BD) を用いて、赤血球の溶血と細胞固定を行った。固定後の細胞に脂肪親和性蛍光色素 BODIPY 650/665 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を添加し、室温で 15 分間培養した細胞を FACS calibur (BD) を使用し、DC サブタイプとその割合をフローサイトメトリーで分析した。そのデータは Cell Quest Pro (BD Biosciences) で解析した。

蛍光顕微鏡での DC 分析

健常人及び肺癌患者より末梢血を採取し、セルソーター (FACS Aria, BD) で Lineage (-), HLA-DR (+) の DC 分画をソートし、BODIPY 650/665 と核内染色の DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole, Polysciences, Warrington, PA, USA) で染色した。その細胞を蛍光顕微鏡で、DC への脂質集積を分析した。

オイルレッド O 染色

オイルレッド O 染色はアゾ色素の 1 種で、無極性・脂溶性であるため、細胞内脂質 (トリグリセリド) に溶け込み、トリグリセリドを特異的に染色する方法とされている²⁴⁾。未治療肺癌症例と健常人から採取した末梢血より mDC, pDC を FACS aria (BD) を用いて細胞分離しサイトスピンを用いてスライド標本を作成し、10%ホルマリン固定後にオイルレッド O (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) で染色を行い、細胞内トリグリセリドを染色した。

DC 内の脂質定量

未治療肺癌症例と健常人から採取した末梢血より、mDC と pDC を FACS Aria (BD) を用いて細胞分離した。細胞内トリグリセリド高感度定量キットである Adipogenesis Assay Kit (Bio Vision, Milpitas, CA, USA) を用いて定量を行い、健常人と肺癌症例の細胞内トリグリセリドの集積量の差を比較した。

混合リンパ球反応

健常人及び肺癌患者より末梢血を採取し、セルソーター (FACS Aria) で Lineage (-), HLA-DR (+), CD11c (+), CD123 (-) の mDC 分画をソートし、同種異系のナイーブ T 細胞と 1 : 6 (DC : ナイーブ T 細胞) の割合で、96 ウェルプレートを使用し共培養した。6 日間培養後に BrdU (10 μ M 5-bromo 2-deoxyuridine PBS, pH 7.4, Roche, Basel, Switzerland) を添加し、細胞を Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Roche Applied Science) を用いて BrdU の細胞内取り込みを行い、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Japan) を用いて測定を行った。

統 計

統計解析は、JMP version 9.0.2 (SAS, Cary, NC, USA) を使用した。データは平均 \pm 標準偏差で表し、ノンパラメトリックな解析を行い、群間ごとに Wilcoxon 検定をした。p < 0.05 を統計学的に有意差とした。

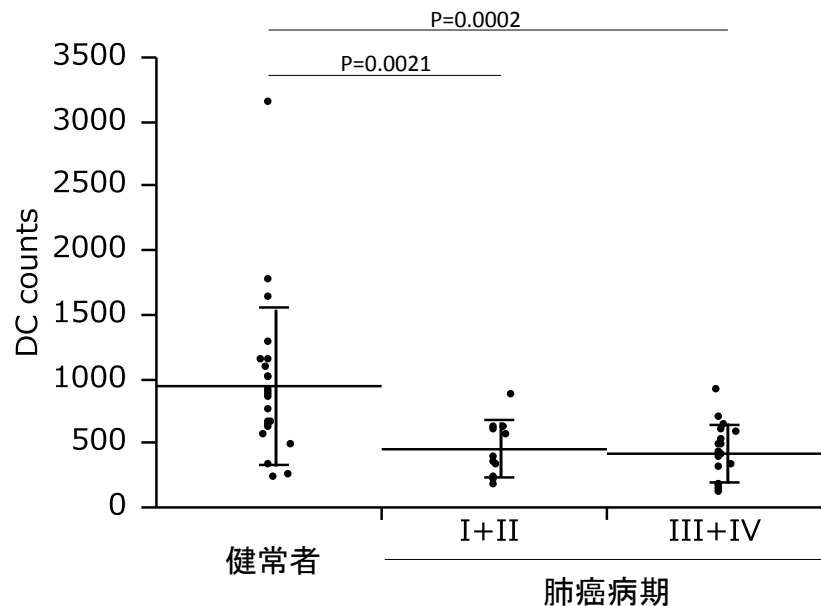


図1 末梢血 DC 数

末梢血にモノクローナル抗体を添加後溶血し，細胞固定の処理を行ったあと，FACS calibur を使用し，HLA-DR (+)，Lineage-1 (-) の分画を DC とし，白血球 200,000 カウントでの細胞数を解析した．健常者群と肺癌 I+II 期群の間に $p=0.0021$ ，肺癌 III+IV 期群の間に $p=0.0002$ の有意差があった．点は個々のデータ，長横線は平均，縦線は標準偏差を表す．

結 果

患者背景

肺癌 29 例，健常者 25 例がこの研究の対象となった．肺癌の平均年齢 71.6 歳（範囲 53-84 歳），男/女 21 例/8 例，健常者平均年齢 55.7 歳（範囲 28-67 歳），男/女 10 例/15 例であった．肺癌の組織型は腺癌 18 例，扁平上皮癌 7 例，小細胞肺癌 3 例，非小細胞肺癌 1 例であった．病期分類 I 期 10 例，II 期 1 例，III 期 6 例，IV 期 12 例の内訳であった（表 1）．

末梢血 DC 数

フローサイトメトリー解析により，末梢血中の DC 数は，健常者 (954.9 ± 629.2 /白血球 200,000 カウント) と比較し，肺癌患者で有意に減少していた (I+II 群； 452.6 ± 221.2 /白血球 200,000 カウント， $p=0.0021$ ，III+IV 群； 418.0 ± 219.9 /白血球 200,000 カウント， $p=0.0002$) (図 1)．DC サブタイプでの解析では，mDC では，健常者 (516.3 ± 386.8 /白血球 200,000 カウント) と比較し，肺癌 III+IV 期患者 (207.7 ± 201.3 /白血球 200,000 カウント， $p=0.0007$) で有意に減少していた．また，pDC でも健常者 (84.0 ± 45.8 /白血球 200,000 カウント) と比較し，肺癌 I+II 期患者 (35.0 ± 14.9 /白血球 200,000 カウント， $p=0.0009$) および肺癌 III+IV 期患者 (32.9 ± 38.8 /白血球 200,000 カウント， $p=0.0004$)

表 1 患者背景

	健常者	肺癌患者
人数	25	29
年齢 (歳)	平均	71.6
	範囲	53-84
性別	男/女	21/8
	組織診断	
	腺癌	18
	扁平上皮癌	7
	小細胞癌	3
	非小細胞肺癌	1
病期分類	I/II/III/IV	10/1/6/12

で有意に減少していた (図 2)．

末梢血中 DC への脂質集積

脂肪親和性蛍光色素 (BODIPY 650/665) にて染色した末梢血中 DC の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 値を解析した結果，健常者 (1148.6 ± 237.1) と比較して，肺癌患者では病期の進行により MFI 値の増強が認められた．すなわち，I+II 群では， 1299.9 ± 293.8 と上昇傾向を認めたが有意ではなく ($p=0.0892$)，III+IV 群では 1419.7 ± 283.7 と有意 ($p=0.0053$) な上昇を示した (図 3)．また，DC のサブセット別の脂質集積の解析で，健常者 mDC (0.036 ± 0.063)

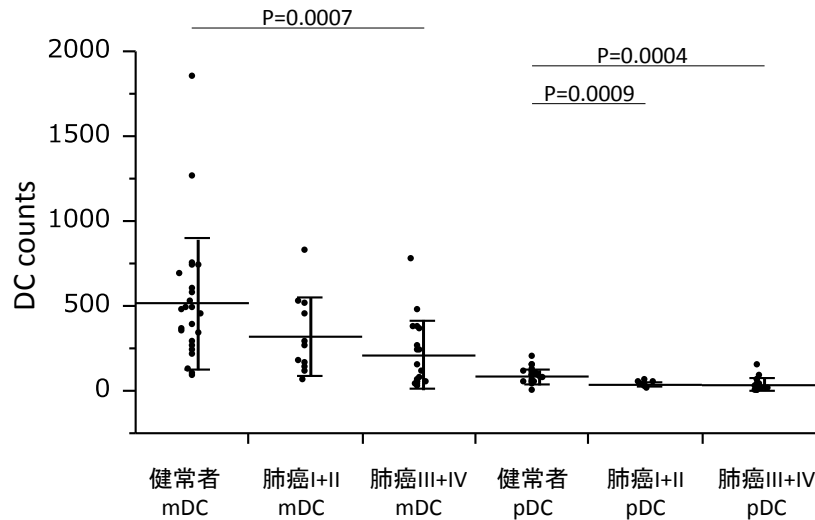


図2 DCサブタイプ別のDC数

FACS calibur を使用し, Lineage (-), HLA-DR (+), CD11c (+) の mDC と, Lineage (-), HLA-DR (+), CD123 (-) の pDC 分画の細胞数を, 健常者, 肺癌 I+II 期, 肺癌 III+IV 期で解析した. mDC は, 健常者と比較し, 肺癌 III+IV 期で有意に減少を認めた. また, pDC は, 健常者と比較し, 肺癌 I+II 期, 肺癌 III+IV 期ともに減少していた.

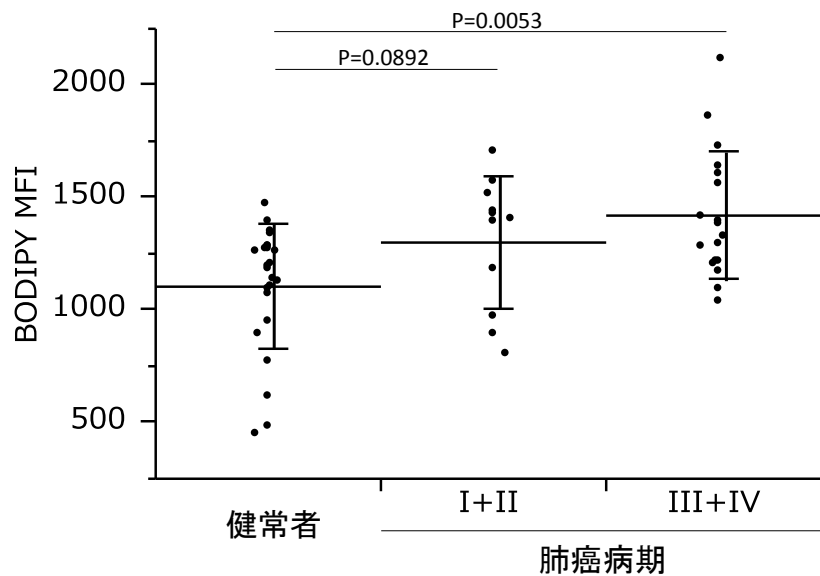


図3 DCのBODIPY 650/665蛍光強度

HLA-DR (+), Lineage-1 (-) で分画した DC の BODIPY650/665 の MFI をコントロール群と肺癌の病期分類ごとに比較した. 健常者群と肺癌 III+IV 期群の間に $p=0.0053$ で有意差があった.

%) に対し, I+II 群 mDC (0.185 ± 0.183 %, $p=0.0003$), III+IV 群 mDC (0.177 ± 0.212 %, $p=0.0001$) でともに有意な上昇を認めた. 肺癌症例では mDC への脂質集積は増加していたが, pDC では集積増加は認められなかった (図4).

細胞内脂質集積の蛍光顕微鏡解析

脂肪親和性蛍光色素 (BODIPY 650/665) で蛍光染色された健常人及び肺癌患者の末梢血 DC を蛍光顕微鏡にて解析した結果, 肺癌患者の DC では, 細胞質内に明らかに BODIPY の強い発光を認めた (図5).

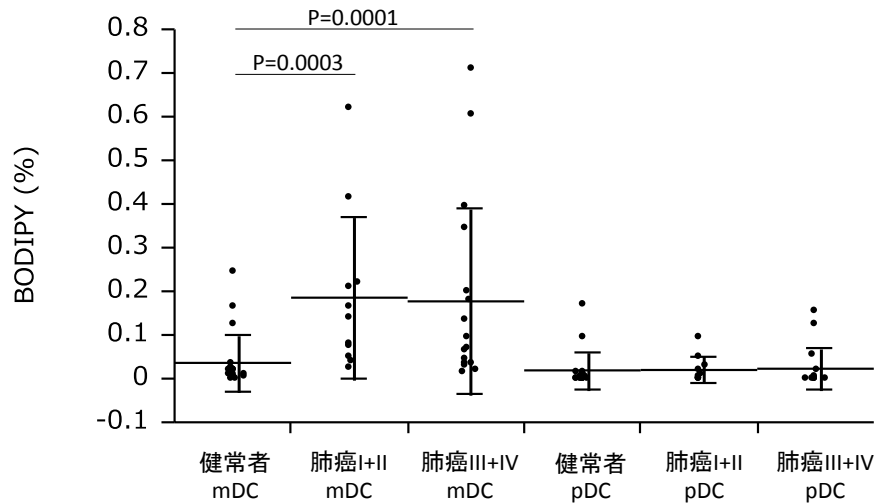
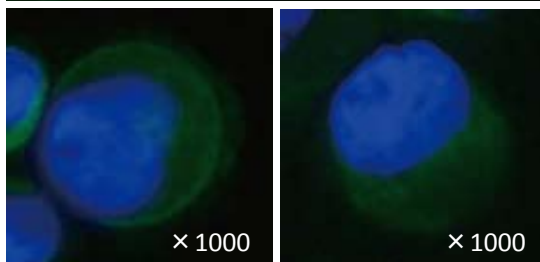
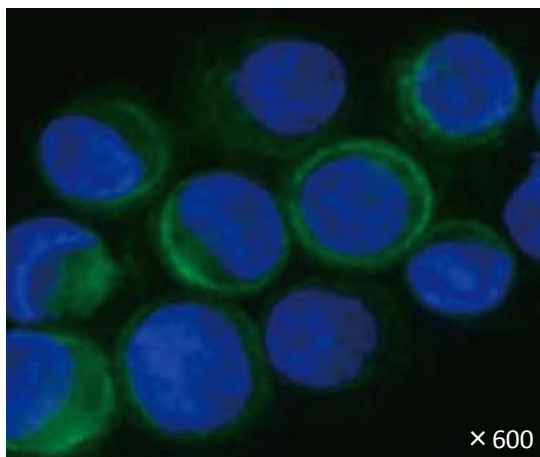


図4 mDC, pDCのBODIPY 650/665

HLA-DR (+), Lineage (-) DC割合に対するBODIPY発現陽性mDCおよびpDC割合の比率を示し、健常者mDC群に対して、肺癌I+II群、肺癌III+IV群で有意に上昇していた。

a) 健常者DC



b) 肺癌DC

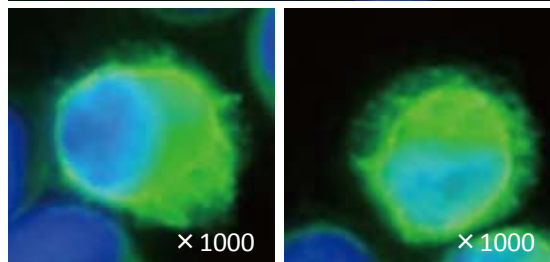
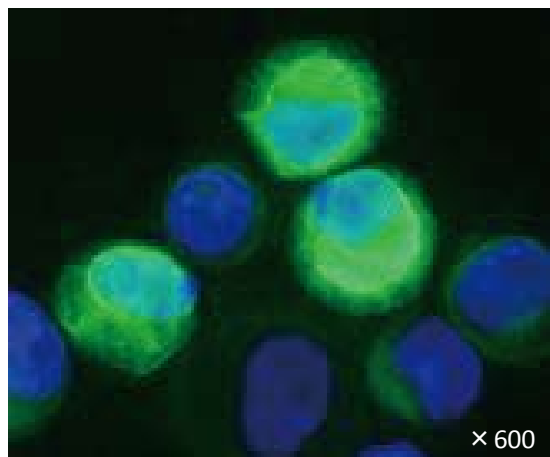


図5 DCへの脂質集積

末梢血より分離したDCをBODIPY650/665染色を行い、蛍光顕微鏡で確認した。a) 健常者DCの細胞内の蛍光はわずかのみであったが、b) 肺癌DCの細胞内には強い蛍光が認められた。

オイルレッドO染色

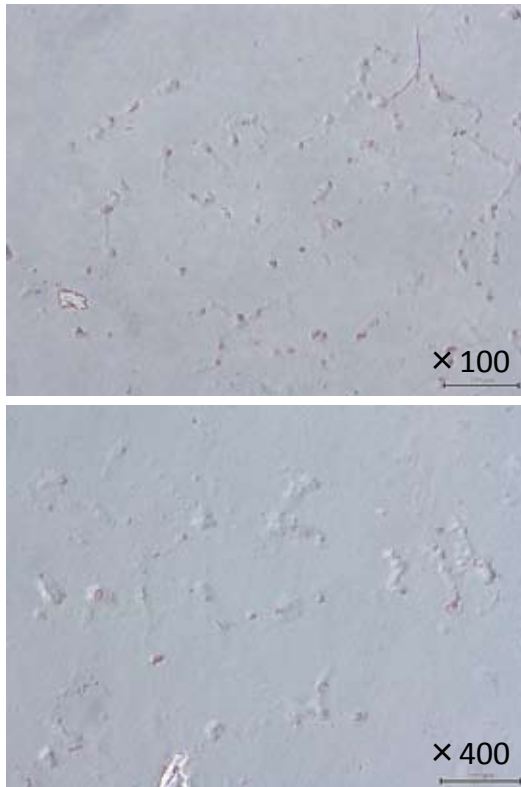
細胞内脂質(トリグリセリド)に溶け込むとされているオイルレッドOで末梢血DCの染色を行った結果、肺癌患者においてより多くの染色細胞が認められ、BODIPYで染色された細胞内脂質はトリグリセリドである

ことが示唆された(図6)。

DC内トリグリセリドの定量

DC内のトリグリセリドを細胞内トリグリセリド高感度定量キットであるAdipogenesis Assay Kit (Bio Vi-

a) 健常者DC



b) 肺癌DC

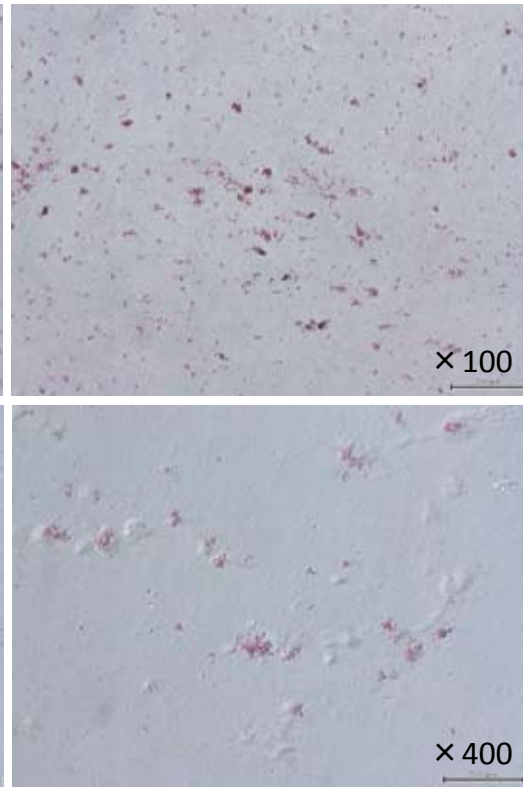


図6 オイルレッド染色

a) 健常者 DC では染色細胞は少数であった。b) 肺癌 DC ではオイルレッド染色細胞が多数確認された。

sion) を用いて定量した結果, 健常者 mDC (4.23 ± 2.52 nmol) と比較し, 肺癌 mDC 群 (17.73 ± 3.89 nmol, $p = 0.0339$) で有意に高いトリグリセリド値を示した。一方, pDC では, 健常者, 肺癌ともにトリグリセリドは低値であった (図7)。

混合リンパ球反応

末梢血中 DC を同種異系ナイーブ T 細胞と共培養を行い, 抗原提示能を確認したところ, mDC において健常者 (1.21 ± 0.19 rlu/s $\times 10^3$) よりも肺癌患者 (0.32 ± 0.26 rlu/s $\times 10^3$, $p = 0.0195$) で有意に低い反応値を示した (図8)。pDC では, 健常者, 肺癌ともに低値であった。

考 察

本研究において, 肺癌患者の末梢血から得られた DC には, 脂質集積が増加しており, トリグリセリドであること, 集積する DC のサブセットが mDC であることが確認された。さらに, がんの進行, 転移とともに, DC への脂質集積が増加することが, 我々の研究で初めて確認された。脂質の集積した DC では, リンパ球増殖能が低下しており, 抗腫瘍免疫能が低下していることが示唆

された。

脂質は, さまざまな状態で存在し, 脂肪酸, リン脂質, スフィンゴリピッド, ステロール, リポ蛋白など, またその代謝物, 酸化物が免疫細胞に影響していることが知られている。近年, 脂質がマクロファージの機能に影響を及ぼすことが報告されているが, 脂質の DC への影響を研究した報告はまだ少ない。Loscher らは, マウスの骨髄由来の DC において, 複合リノール酸が核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) の活性や IL-12 の産生を抑制し, 細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) を介して IL-10 の誘導をしていると報告している²⁵⁾。また, 脂肪酸がヒト由来の DC の活性を主にペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) を介して調節していると報告がある²⁶⁾。脂肪酸が DC の成熟や機能に関わり, 膜受容体 (TLR), PPAR- γ , NF- κ B を介してシグナル伝導している可能性がある。

DC の機能に対する脂質集積の影響については²²⁾, マウスの DC の細胞内に脂質, とくにトリグリセリドの集積がみられることが報告されている。またヒトにおける

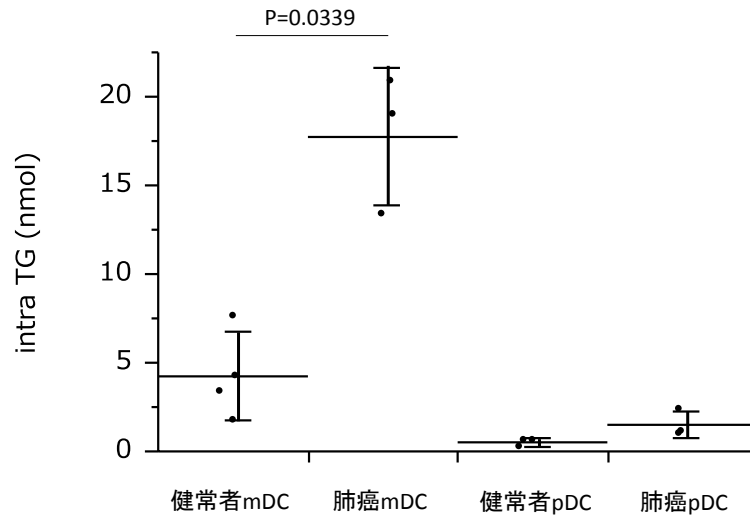


図7 DC内トリグリセリドの定量

健常人及び肺癌患者より末梢血を採取し、セルソーター (FACS Aria) で Lineage (-), HLA-DR (+), CD11c (+) の mDC と、Lineage (-), HLA-DR (+), CD123 (-) の pDC 分画をソートし、Adipogenesis Assay Kit (Bio Vision) の細胞溶解液を用いて細胞を溶解し、キットに基づいて細胞内トリグリセリドの定量を行った。健常者 mDC (n=4) より肺癌 mDC (n=3) の細胞内トリグリセリド値が上昇している傾向であった。

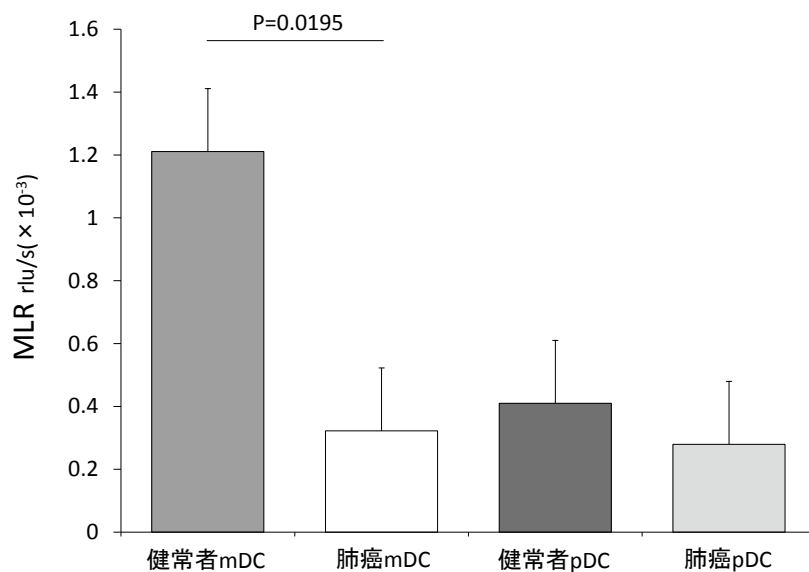


図8 混合リンパ球反応

末梢血 DC と同種異系ナイーブ T 細胞を 1 : 6 比で共培養し、BrdU を用いて T 細胞の増殖率を測定した。健常者 mDC より肺癌 mDC の MLR の低下を認めた。

非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)、腎細胞癌の DC においても脂質集積がみられたという。この報告ではヒトの症例数は 6 例と少数例での検討であり、ヒトにおけるさらなる検討が必要であると考え、この研究を行った。その結果、我々の研究でもヒト肺癌の末梢血 DC に脂質集積を認め、細胞内トリグリセリド高感度定量とオイルレッド O 染色を行いトリグリセリド

であることを確認した。これらの結果は、Heber らの報告²²⁾ を支持する結果であった。さらに、我々の研究においては、がんの進行とともに DC 数は減少し、DC への脂質集積は増強すること、DC への脂質集積は mDC であったことがわかり、新しい知見であった。

この脂質の集積に影響する因子として、担癌状態以外にも加齢や血清トリグリセリド値の影響が存在する可能

性が考えられる。年齢については、健常者の年齢が平均55.7歳と肺癌より若年であったが、健常者、肺癌、全症例のいずれの集団でも、年齢とDCのBODIPY 650/665 MFIには相関がみられず、年齢の影響はないものと考えられた。また、血清TG値の影響も同様に解析したところ、血清トリグリセリド値とDCのBODIPY 650/665 MFIには相関はみられず、血清トリグリセリド値の影響はないものと考えられた（示されていないデータ）。

DCへの脂質集積に関わる受容体にスカベンジャーファミリーが関わり、その中でマクロファージスカベンジャー受容体1 (macrophage scavenger receptor 1, Msr-1) の発現が上昇していたと報告されているが²²⁾、我々の研究では、肺癌末梢血DC表面に蛋白としてのMsr-1の発現増強を示さなかった。（示されていないデータ）。マウスとヒトにおいてはDCの脂質集積に関わる受容体が異なる可能性も考えられる。また、マウスの骨髄、脾臓DCにおいて、脂質集積にスカベンジャー受容体B (scavenger receptor B, SRB) の発現が増強していたとの報告²⁷⁾もあり、今後、ヒト肺癌におけるDCの脂質生成や代謝、発現受容体など脂質集積のメカニズムについて解明する必要がある。

腫瘍免疫において、DCは癌細胞抗原を取り込み、T細胞へ抗原提示する。T細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) から提示された癌細胞抗原を認識する。そして、T細胞は癌組織で、癌細胞表面にあるMHCを認識し、アポトーシスを誘導する。この過程で肺癌症例においてはDCの機能不全がおきていることが考えられるため、我々は癌患者のDCにおいてMLRで検討した。DCと同種異系のナイーブT細胞の割合は1:6 (DC:ナイーブT細胞)がMLRの反応が高く²⁸⁾、我々の研究でもその割合で行った。脂質集積が高い癌患者DCのMLRでは、健常者DCのMLRより有意に低下を認めており、DCへの脂質集積がナイーブT細胞への抗原提示を低下させ、T細胞のアポトーシスを抑制していることが考えられる。また、末梢血において、CD8 (+) T細胞の減少が癌患者でみられ（示されていないデータ）、癌細胞からのTGF- β 、IL-10などの因子だけではなく、DCへの脂質集積も影響し、CTLへの誘導低下や活性化の抑制が存在すると考えられる。

腫瘍免疫の低下には、様々な要因が関与するといわれる。癌抗原への曝露が長時間になると、T細胞に補助刺激受容体のプログラム死受容体 (programmed death receptor-1, PD-1) の発現を認め、癌細胞上にPD-1リガンドを発現させ、結合することでT細胞の活性化を

抑制する機序が明らかになっている^{29,30)}。抗PD-1抗体の開発により、PD-1リガンドと競合的にPD-1と結合し、T細胞抑制をおさえる治療戦略が考えられ、臨床応用まで至っている。固形癌を対象とした第I相臨床試験が行われ、NSCLC、メラノーマ、腎癌に対する抗PD-1抗体の効果が報告され³¹⁾、第I相臨床試験ではあるが高い奏効率を示し期待される。またPD-1のほかにTIM-3、BTLA、LAG-3の抑制性共刺激マーカーの関与が報告されている^{32~34)}。

このように、腫瘍免疫には様々なメカニズムが関わり、免疫抑制、免疫寛容をおこし、腫瘍免疫から癌細胞は逃避していることがわかる。我々は、DCへの脂質集積に焦点をあて、癌の進行とともにmDCへの有意な脂質集積の増強を明らかにした。癌患者のDCでは、MLRが低下しており、初期の腫瘍免疫を司るDCの免疫応答の低下を認めた。今後さらに、DCにおける脂質取り込みのメカニズムを明らかにすることで、脂質取り込みを制御する薬剤が開発できれば、癌患者の抗腫瘍免疫の増強する新しい免疫療法が確立できる可能性がある。

結 論

- ・未治療肺癌患者では、健常人と比較し、末梢血樹状細胞数が有意に減少していた。
- ・肺癌症例では、pDCと比較しmDC優位に細胞内の脂質集積を認め、健常者より脂質集積が強くなっていた。
- ・肺癌患者において、末梢血DCと同種異系ナイーブT細胞との混合リンパ球反応で低下を認め、免疫応答の低下を認めた。
- ・細胞内へ多量の脂質が集積することにより、抗原提示細胞としての機能が抑制され、抗腫瘍免疫応答が起きにくい状態になっていることが考えられ、今後さらなる検討が必要であると思われた。

謝 辞 本研究にあたり、ご指導賜りました呼吸器・アレルギー内科学教室福田健教授、石井芳樹教授、ならびに、鈴木みつ美研究員、藤牧未央研究員に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Ribas A: Genetically modified dendritic cells for cancer immunotherapy. *Curr Gene Ther* **5**: 619-628, 2005.
- 2) Schuler G: Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* **40**: 2123-2130, 2010.
- 3) O'Mahony D, Kummar S, Gutierrez ME: Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: a concise review. *J*

- Clin Oncol **23** : 9022-9028, 2005.
- 4) Antonia SJ, Mirza N, Fricke I, et al : Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. Clin Cancer Res **12** : 878-887, 2006.
 - 5) Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al : A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res **11** : 1910-1917, 2005.
 - 6) Chang GC, Lan HC, Juang SH, et al : A pilot clinical trial of vaccination with dendritic cells pulsed with autologous tumor cells derived from malignant pleural effusion in patients with late-stage lung carcinoma. Cancer **103** : 763-771, 2005.
 - 7) Ito T, Liu YJ, Kadowaki N : Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. Int J Hematol **81** : 188-196, 2005.
 - 8) Shortman K, Liu YJ : Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol **2** : 151-161, 2002.
 - 9) Akagawa K, Takasuka N, Sakurai T : IL-4 stimulates the generation of dendritic cells and multinucleated giant cells from human monocytes. Lymphokine Cytokine Res **12** : 326, 1993.
 - 10) Shortman K, Liu YJ : Mouse and human dendritic cell subtypes. Nat Rev Immunol **2** : 151-161, 2002.
 - 11) Akagawa KS, Takasuka N, Nozaki Y, et al : Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. Blood **88** : 4029-4039, 1996.
 - 12) Bender A, Sapp M, Schuler G, et al : Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J Immunol Methods **196** : 121-135, 1996.
 - 13) Romani N, Reider D, Heuer M, et al : Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. J Immunol Methods **196** : 137-151, 1996.
 - 14) Grouard G, Risoan MC, Figueira L, et al : The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med **185** : 1101-1111, 1997.
 - 15) Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al : Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science **283** : 1183-1186, 1999.
 - 16) Gabrilovich D : Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nat Rev Immunol **4** : 941-952, 2004.
 - 17) Fainaru O, Almog N, Yung CW, et al : Tumor growth and angiogenesis are dependent on the presence of immature dendritic cells. FASEB J **24** : 1411-1418, 2010.
 - 18) Minkis K, Kavanagh DG, Alter G, et al : Type 2 Bias of T cells expanded from the blood of melanoma patients switched to type 1 by IL-12p70 mRNA-transfected dendritic cells. Cancer Res **68** : 9441-9450, 2008.
 - 19) Xu S, Koski GK, Faries M, et al : Rapid high efficiency sensitization of CD8+ T cells to tumor antigens by dendritic cells leads to enhanced functional avidity and direct tumor recognition through an IL-12-dependent mechanism. J Immunol **171** : 2251-2261, 2003.
 - 20) Ito M, Minamiya Y, Kawai H, et al : Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. J Immunol **176** : 5637-5643, 2006.
 - 21) Perrot I, Blanchard D, Freymond N, et al : Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. J Immunol **178** : 2763-2769, 2007.
 - 22) Herber DL, Cao W, Nefedova Y, et al : Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. Nat Med **16** : 880-886, 2010.
 - 23) Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al : The IASLC Lung Cancer Staging Project : proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. J Thorac Oncol **2** : 706-714, 2007.
 - 24) Penney DP, Powers JM, Frank M, et al : Analysis and testing of biological stains--the Biological Stain Commission Procedures. Biotech Histochem **77** : 237-275, 2002.
 - 25) Loscher CE, Draper E, Leavy O, et al : Conjugated linoleic acid suppresses NF-kappa B activation and IL-12 production in dendritic cells through ERK-mediated IL-10 induction. J Immunol **175** : 4990-4998, 2005.
 - 26) Zapata-Gonzalez F, Rueda F, Petriz J, et al : Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR (gamma) : RXR heterodimers : comparison with other polyunsaturated fatty acids. J Leukoc Biol **84** : 1172-1182, 2008.

- 27) Maroof A, English NR, Bedford PA, et al : Developing dendritic cells become 'lacy' cells packed with fat and glycogen. *Immunology* **115** : 473-483, 2005.
- 28) Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, et al : Expression of Th2-skewed pathology mediators in monocyte-derived type 2 of dendritic cells (DC2). *Immunol Lett* **126** : 29-36, 2009.
- 29) Chen DS, Irving BA, Hodi FS : Molecular Pathways : Next Generation Immunotherapy : Inhibiting Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-1. *Clin Cancer Res* **18** : 6580-6587, 2012.
- 30) Krempsi J, Karyampudi L, Behrens MD, et al : Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J Immunol* **186** : 6905-6913, 2011.
- 31) Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al : Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366** : 2455-2465, 2012.
- 32) Haymaker C, Wu R, Bernatchez C, et al : PD-1 and BTLA and CD8 (+) T-cell "exhaustion" in cancer : "Exercising" an alternative viewpoint. *Oncoimmunology* **1** : 735-738, 2012.
- 33) Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, et al : Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* **13** : 832-842, 2012.
- 34) Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al : Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* **72** : 917-927, 2012.