

解能はCTスライス厚×1.4であった。

#### D. 考察

DRRは1983年にその概念が発表され、1990年に実用化されたが、それ以降DRRの画質に関する研究は全く行われていなかった。

近年CT画像が放射線治療計画に利用されるようになったが、位置照合は点焦点平面画像に頼らざるを得ず、治療計画と実際の治療との位置照合はDRR画像との対比でのみ実行可能な状況に変わりはない。その結果、漸くDRRと位置決め用平面画像とのdiscrepancyが注目され始めたところである。

今回の検討では、DRRの空間分解能向上のためには物理的に薄いスライス厚を用いるしか、当面の解決策がないことが明らかとなった。密度分解能は再構成計算アルゴリズムの改良により若干の改善は図れるものの、満足すべき画像ではなかった。

従って、この問題の解決のためには別のアプローチ、例えばパターン認識画像処理技術などからの検討が必要であることが示唆された。

#### E. 結論

DRRの空間分解能ならびに密度分解能向上に関する検討を行った。物理的に薄いCT厚を用いることが空間分解能向上に直接的に寄与した。再構成計算アルゴリズムは密度分解能の向上に役立った。別の方法論での再検討が必要である。

#### F. 研究発表

1. Ohtsu, A., Boku, N., Muro, K., Chin, K., Muto, M., Yoshida, S., Satake, M., Ishikura, S., Ogino, T., Miyata, Y., Seki, S., Kaneko, K. and Nakamura, A. : Definitive chemoradiotherapy for T4 and/or M1 lymph node squamous cell carcinoma of the esophagus. *J. Clin. Oncol.*, 17: 2915-2921, 1999.
2. Muto, M., Ohtsu, A., Miyamoto, S., Muro, K., Boku, n., Ishikura, S., Satake, M., Ogino, T., Tajiri, H. and Yoshida, S. : Concurrent chemoradiotherapy for esophageal carcinoma patients with malignant fistulae. *Cancer*, 86: 1406-1413, 1999.
3. Ishikura, S., Ogino, T., Ono, M., Arai, T., Sugito, M., Shimizu, W., Kawashima, M., Imai, M., Ito, Y. and Ikeda, H. : Preliminary results of pelvic autonomic nerve-preserving surgery combined with intraoperative and postoperative radiation therapy for patients with low rectal cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 29: 429-433, 1999.
4. Kawashima, M., Ogino, T., Fujii, H., Ishikura, S., Ito, Y. and Ikeda, H. : Local-regional control by conventional radiotherapy according to tumor volume in patients with squamous cell carcinoma of the pharyngolarynx. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 29: 467-473, 1999.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

「抗腫瘍性プロスタグランジンの臨床開発に関する研究」  
分担研究者：福島雅典 愛知県がんセンター 内科医長

## 研究要旨

Walker256担がんラットを用いて、抗腫瘍性PG製剤（LipoTEI-9826）について、臨床試験で予定される持続静注投与によって、*in vitro*で認められる用量反応関係が、生体でも得られることを実証した。今年度得られた実験結果から、第1相臨床試験は、血中濃度モニタリングしながら $C_{ss} = 1 \mu\text{g/ml}$ を目標として増量し、毒性評価するデザインが合理的であることを証明した。

### A. 研究目的

本研究の目的は、新規構造を有し、COMPAREアルゴリズムにおいてユニークな感受性プロファイルを示す新規メカニズムによる抗腫瘍性プロスタグランジン15-deoxy- $\Delta 7$ -PGA1-Meの臨床開発である。今年度はヒトにおける第1相臨床試験のデザインに必要な目標血中濃度と用量反応関係を求める。

### B. C. 研究方法と結果

Walker256担がんラットを用いて、臨床試験で予定される持続静注投与によって、*in vitro*で認められる用量反応関係が、生体でも得られるか否か検討した。フリームービング装置を取り付けた上記ラットで、持続静注による治療実験を行った。LipoTEI-9826は持続静注投与下では単位時間当たりの用量とAUCの間に直線関係が成立し、用量依存性に腫瘍を抑制した。定常状態における平均血中濃度( $C_{ss}$ ) =  $1 \mu\text{g/ml}$ に達すると(240mg/kg/日持続静注)、投与終了後も腫瘍サイズは縮小し続け、完全に抑制された。この投与量での毒性は認められなかった。この実験結果

から、第1相臨床試験は、血中濃度モニタリングしながら $C_{ss} = 1 \mu\text{g/ml}$ を目標として増量し、毒性評価するデザインが合理的であることがわかった。

### D. E. 考察と結論

今回得られた実験結果から、抗腫瘍性PG、15-deoxy $\Delta 7$ -PGA1は持続静注によって定常血中濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ を維持すれば、毒性なく、強い抗腫瘍効果が得られることが実証され、第1相試験の合理的デザインができた。科学的に残された課題は、5FU不応性進行大腸がん、シスプラチン耐性進行卵巣がん患者における第1相臨床試験である。

### F. 研究発表

#### 1. 発表論文：

1. Fukushima, S., Kishimoto, S., Takeuchi, Y. and Fukushima, M. : Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, in press.

2. Sasaki, H., Niimi, S., Akiyama, M., Tanaka, T., Hazato, A., Kurozumi, S., Fukushima, S. and Fukushima, M. : Antitumor activity of 13, 14-dihydro-15-deoxy prostaglandin-A1-methyl ester integrated into lipid microsphere against human ovarian carcinoma cells resistant to cisplatin in vivo. *Cancer Res.*, 59: 3919-3922, 1999.
  
- 3 .Hayakawa, T., Naruse, S., Kitagawa, M., Ishiguro, H., Kondo, T., Kurimoto, K. Fukushima, M., Takayama, T., Horiguchi, Y., Kuno, M., Noda, A. and Furukawa, T. : A prospective multicenter trial evaluating dianostic serum marker In differential diagnosis of pancreatic cancer from genign pancreatic diseases. *Intern. J. Pancreatology*, 25: 23-29, 1999.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
平成11年度分担研究報告書

遺伝子診断を用いた遺伝がんの外科手術法の確立  
分担研究者：小原 孝男 東京女子医科大学内分泌外科教授

## 研究要旨

多内分泌腺腫瘍症2型（Multiple Endocrine Neoplasia type 2, MEN 2）において、RET遺伝子点突然変異診断による保因者の早期発見とそれに基づいた予防的手術を実施するにあたっての、診療ガイドラインを作成した。

### A. 研究目的

多内分泌腺腫瘍症2型（Multiple Endocrine Neoplasia type 2, MEN 2）におけるRET遺伝子診断と、それに基づいた予防的手術を実施するにあたっての診療ガイドラインを作成することを目的とする。

### B. 研究方法

（1）情報の収集：文献データベースMEDLINEを主として用いてRET遺伝子点突然変異解析による保因者診断と、それに基づく予防的甲状腺手術に関連する文献を系統的に検索し、必要な論文を抽出した。

収集した研究情報についての研究の妥当性と重要性を批判的に吟味した。とくに遺伝子診断の正確さと予防的手術の効果については、従来行われてきた内分泌学的な臨床検査に基づく方法と対比しその利点と限界を明らかにした。

（2）RET遺伝子診断に基づくMEN2診療ガイドラインの作成：（1）で収集し吟味した情報をもとに、RET遺伝子診断に基づくMEN2診療ガイドラインを作成した。

### C. 研究結果

#### （1）情報収集の結果

①遺伝子診断の意義：RET遺伝子診断は、従来の内分泌学的に比べ、MEN2患者やその保因者の診断を確実なものにすることができる。これにより患者の診療方針が明確になるばかりでなく、保因者であることが否定されればその後の臨床検査及び発病の不安から免れることができる。一方、保因者に対しては病変の早期診断・早期発見が可能となる。また、予防的甲状腺全摘術の実施も可能になる。②MEN2の保因者に対する治療方針：保因者の甲状腺に対する外科治療には2つの方針がある。遺伝子検査を行って発症前に予防的甲状腺手術を行う方針と、カルシトニン分泌刺激試験を繰り返して行い、検査結果が陽性になった後に手術を行う待機的甲状腺手術の方針とである。これらの2つの治療方針を比較した研究はなく、いずれが良いかを結論づけることはできなかった。

（2）遺伝子診断及びそれを用いた診療のガイドラインの作成

①ガイドライン原案の作成：収集した情報と専門家の意見をもとにしてガイ

ドラインの原案を作成した。全体的な勧告として以下の3点を示した。

1. MEN 2患者及びMEN 2が疑われる患者においては、RET遺伝子診断を行うことにより本症の確実な診断が可能であるので、遺伝子診断を行うことが推奨される。

2. RET遺伝子変異が明らかになった患者の血縁者においては遺伝子検査を行うことによりMEN 2の保因者診断ができる。MEN 2は若年時からの発症が知られており、保因者の確実な診断は早期診断・早期治療を確実にするものである。幼小児期を含む若年時から遺伝子検査を行うことが考慮されてよい。

3. 一般の臨床検査とは異なり、遺伝子診断の結果は被験者個人だけでなく、その家族にも種々の影響を与えることが予想される。また遺伝子診断ならびにそれに基づく治療の効果については明らかになっていない事柄もあるので、RET遺伝子診断の適用にあたっては倫理的、社会的、そして法的問題点を十分考慮することが望ましい。

②ガイドライン原案の審査：1999年6月7日に作成したガイドライン原案(MEN GL 99 draft version 5.4)について、生命倫理、遺伝カウンセリング、看護学、内分泌専門医、遺伝学研究者などから構成されたメンバーによる検討会を、1999年7月3日に開催した。同検討会で出された意見をもとに原案を修正し、1999年8月20日までに修正版(MEN GL 99 draft version 6.2)および被験者への説明と同意の文書(version 1.1.2)を作成した。ガイドライン案にはその後さらに

修正を加え、2000年2月20日に作成したMEN GL 2000 draft version 1.0を最終版とした。

#### D. 考察

MEN 2はきわめて希な疾患であり、臨床研究の対象とはなりにくい。このためガイドライン作成に有用な情報は少ないのが実状である。しかしながら遺伝子診断に基づいた診療を実施するにあたって未解決の問題が残されていることも事実である。今回作成したガイドラインが診療の現場で活用されるとともに、未解決の問題に対しては今後適切な臨床研究が行われることを望んでいる。

#### E. 結論

RET遺伝子診断による保因者の早期発見と、それに基づいた予防的手術を実施するにあたっての、医学的、倫理的、そして社会的な問題点を解明するために関連する医学情報の系統的収集と情報の批判的吟味を行った。さらにその結果をもとに診療のガイドラインを作成した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kishi, M., Tsukada, T., Shimizu, S., Hosono, K., Ohkubo, T., Kosuge, T., Sugano, K., Kanbe, M., Obara, T. and Yamaguchi, Y. : A novel splicing mutation (894-9G->A) of the MEN 1 gene responsible for Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Cancer Letters*, 145: 105-110, 1999.

2. Zhu, H., Kato, Y., Tanaka, R., Obara, T., Sato, K. and Kobayashi, M. :  
Osteopontin expression in papillary thyroid carcinoma. *Acta Histochem. Cytochem.*, 32: 281-285, 1999.
3. Sato, K., Yamazaki, K., Yamada, E., Kanaji, Y., Miura, M. and Obara, T. :  
Immunoglobulin G of untreated Graves' patients with or without TSH receptor antibody (Determined by porcine thyrocytes) univerlly elicit potent thyroid hormone-releasing activity in cultured human thyroid follicles. *Thyroid*, 9: 979-988, 1999.
4. Nagura, S., Katoh, R., Kawaoi, A., Kobayashi, M., Obara, T. and Omata, K. :  
Immunohistochemical estimations of growth activity to predict biological behavior of pheochromocytoma. *Mod. Pathol.*, 12: 1107-1111, 1999.
5. Fellmer, P., sato, K., Tanaka, R., Okamoto, T., Kato, Y., Kobayashi, M., Shibuya, M. and Obara, T. :  
Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery*, 126: 1056-1062, 1999.

G. 知的所有権の取得状況  
とくになし。

厚生科学研究費補助金（厚生省がん克服研究事業）  
（分担）研究報告書

持続性 PTHrP アンタゴニストの設計と合成

（分担）研究者 望月 徹 静岡県立大学薬学部 助教授

研究要旨：

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) は、悪性腫瘍に伴う高カルシウム血漿の原因物質であり、その作用は Parathyroid hormone (PTH) の受容体を介して発現される。我々は、[desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub> が in vivo においても有効な PTHrP アンタゴニストであることを見出したが、より強力なアンタゴニストの開発を目指し、その受容体結合部位が PTH の構造と類似した新規 PTHrP(8-34) 誘導体 7 種類を設計し化学合成を実施した。

A. 研究目的

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血漿治療薬としての PTHrP アンタゴニストの開発を目指し、先に見出した強力な PTHrP アンタゴニストである [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub> を基本骨格として、新たな PTHrP 誘導体を設計・化学合成する。

B. 研究方法

PTHrP が PTH 受容体を介して作用を発現することから、上記基本骨格内の PTH 受容体との結合に参与するアミノ酸残基を PTH のそれに置換することにより、より強力なアンタゴニストの開発が可能となる。そこで本研究では、以下の 7 種類の新たな PTHrP 誘導体を設計した。

1. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, H<sup>13</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>
2. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, N<sup>16</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>
3. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

4. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, H<sup>13</sup>, N<sup>16</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>
5. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, H<sup>13</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>
6. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, N<sup>16</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>
7. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>, H<sup>13</sup>, N<sup>16</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

合成は、BOP 試薬を縮合剤とし Boc-アミノ酸を用いる手動固相合成法で行った。

すなわち、最終的に C 端アミド型ペプチドが得られる p-methylbenzhydrylamine 樹脂(アミノ基含量：0.49mmol/g) 1.02g (0.5mmol) 上に、目的とするペプチドの一次構造に準じて C 端側より順次相当する Boc-アミノ酸誘導体を縮合してペプチド鎖を延長した。縮合剤として用いた BOP 試薬および Boc-アミノ酸誘導体はいずれも樹脂上のアミノ基に対して 3 倍当量 (1.5mmol) 用いた。なお、本合成に用いた Boc-アミノ酸誘導体は以下の通りである。

Boc-Ala-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-

Asn-OH, Boc-Asp(OcHex)-OH,  
Boc-Gln-OH, Boc-Glu(OcHex)-OH, Boc-  
His(Bom)-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Leu-  
OH,  
Boc-Lys(Cl-Z)-OH, Boc-Phe-OH, Boc-D-  
Phe(4-F)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH,  
Boc-Thr(Bzl)-OH

得られた保護ペプチド樹脂を10%  
アニソール含有液体HFで0℃、60  
分攪拌処理することによりペプチドを  
樹脂より切断し同時に全側鎖保護基を  
除去した。HF留去後50%酢酸100ml  
で抽出-凍結乾燥することにより粗製  
ペプチドを得た。続いて、YMC Pack-  
D-ODS-5 カラム (2.0 x 25 cm) を用い  
0.01N HCl/CH<sub>3</sub>CN 混合溶媒を溶出液  
とする分取用逆相HPLCによりペプ  
チドを精製した。

(倫理面への配慮)

本年度の研究は合成化学が主体であ  
り、特に倫理面への配慮は無い。

### C. 研究結果

精製ペプチドの収率は粗製ペプチド  
から計算して20.3%から28.5%と満  
足できるものであった。精製ペプチド  
の酸分解物のアミノ酸分析値および  
FAB質量分析値はいずれも理論値に  
良く一致し、分析用HPLCにおいても  
単一の鋭いピークとして溶出し合成  
ペプチドが高純度であることを証明し  
た。以下に合成ペプチドの酸分解物の  
アミノ酸分析値およびFAB質量分析  
値を示す。

1. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
H<sup>13</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(2)1.98 Thr(1)0.96 Ser(1)0.90

Glu(2)2.07 Ala(2)1.98 Leu(4)4.09  
Ile(3)3.10 Phe(2)2.08 His(4)3.75  
Arg(3)3.08

Formura : C<sub>154</sub>H<sub>236</sub>N<sub>48</sub>O<sub>36</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3354.89), M+/Z : 3355

2. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
N<sup>16</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(3)2.96 Thr(1)0.97 Ser(1)0.91  
Glu(1)1.05 Ala(2)1.97 Leu(4)4.11  
Ile(3)3.08 Phe(2)2.05 His(4)3.74  
Lys(1)0.96 Arg(3)3.10

Formura : C<sub>153</sub>H<sub>239</sub>N<sub>47</sub>O<sub>36</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3331.90), M+/Z : 3333

3. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(1)0.99 Thr(1)0.97 Ser(2)1.88  
Glu(2)2.05 Ala(2)2.01 Leu(4)4.05  
Ile(3)3.12 Phe(2)2.05 His(4)3.84  
Lys(1)0.99 Arg(3)3.09

Formura : C<sub>153</sub>H<sub>239</sub>N<sub>46</sub>O<sub>35</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3301.89), M+/Z : 3303

4. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
H<sup>13</sup>, N<sup>16</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(3)3.18 Thr(1)0.99 Ser(1)0.80  
Glu(1)1.00 Ala(2)2.04 Leu(4)4.05  
Ile(3)3.09 Phe(2)2.07 His(5)4.88  
Arg(3)3.11

Formura : C<sub>153</sub>H<sub>234</sub>N<sub>48</sub>O<sub>36</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3340.87), M+/Z : 3342

5. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
H<sup>13</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(1)1.00 Thr(1)0.97 Ser(2)1.81  
Glu(2)2.00 Ala(2)2.05 Leu(4)4.08  
Ile(3)3.03 Phe(2)2.10 His(5)4.98  
Arg(3)3.22

Formura : C<sub>157</sub>H<sub>236</sub>N<sub>48</sub>O<sub>35</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3374.93), M+/Z : 3376

6. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
N<sup>16</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(2)2.05 Thr(1)0.98 Ser(2)1.88



Glu(1)1.00 Ala(2)2.08 Leu(4)4.03  
Ile(3)3.10 Phe(2)2.13 His(4)3.97  
Lys(1)0.99 Arg(3)3.23

Formura : C<sub>152</sub>H<sub>239</sub>N<sub>47</sub>O<sub>35</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3303.89), M+/Z : 3305

7. [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>,  
H<sup>13</sup>, N<sup>16</sup>, S<sup>17</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub>

Asp(2)2.01 Thr(1)0.99 Ser(2)1.85  
Glu(1)1.09 Ala(2)2.07 Leu(4)4.10

Ile(3)3.15 Phe(2)2.09 His(5)4.88  
Arg(3)3.09

Formura : C<sub>152</sub>H<sub>234</sub>N<sub>48</sub>O<sub>35</sub>F<sub>1</sub>(MW:  
3312.86), M+/Z : 3314

#### D. 考察

本研究では、PTHrP が PTH の受容体を介して作用を発現することに着目し、より強力なアンタゴニストの開発を目的として、先に見出した強力な PTHrP アンタゴニストである [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub> 配列内の受容体結合部位である13位、16位および17位のアミノ酸残基をそれぞれあるいは同時に PTH のそれと置換した7種類の新規 PTHrP(8-34) 誘導体を設計しその化学合成を行った。これらのペプチドは、より PTH に類似した構造を有し同時に PTHrP アンタゴニスト活性の発現に必須の構造である desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup> 構造を保持することから強力なアンタゴニストとなることが期待できる。

#### E. 結論

悪性腫瘍が産生する PTHrP を原因物質とする高カルシウム血漿治療薬として PTHrP アンタゴニストの開発を目指した本研究では、先に PTHrP ア

ンタゴニストとして見出した [desamino-L<sup>8</sup>, N<sup>10</sup>, L<sup>11</sup>, D-F(4-F)<sup>12</sup>]-PTHrP(8-34)-NH<sub>2</sub> を基本骨格として、更に強力なアンタゴニスト作用が期待される新たな7種類の誘導体を設計し化学合成した。

合成は Boc-アミノ酸を用いる固相法で行い満足すべき収率で達成できた。逆相 HPLC により精製した精製ペプチドはアミノ酸分析、FAB 質量分析および HPLC により高純度であることを証明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Genevieve, R., Magous, R., Mochizuki, T., Nguyen, D.L., Martinez, J., Bail, J-P., Bataille, D., and Jarrousse, C. : Glicentin and oxyntomodulin modulate both the phosphoinositide and cyclic adenosine monophosphate signaling pathways in gastric myocytes. *Endocrinology*, 140: 22-28(1999)

2. Kanno, T., Asada, N., Yanase, H., Iwanaga, T., Ozaki, T., Nishikawa, Y., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., and Yanaihara, N. : Salivary secretion of highly concentrated chromogranin A in response to noradrenaline and acetylcholine in isolated and perfused rat submandibular glands. *Experimental Physiology*, 84: 1073-1083(1999)

3. Nagasawa, S., Nishikawa, Y., Li, J., Futai, Y., Kanno, T., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., Yanaihara, C., and Yanaihara, N. : Simple enzyme immunoassay for the measurement of immunoreactive chromogranin A in human

plasma, urine and saliva. Biomed. Res.,  
19(6): 407-410(1999)

4. Yu, X., Kajiyama, F., Iguchi, K.,  
Mochizuki, T., Hoshino, M., Li, J., Lou,  
W.Q., Yanaihara, N., Winarto, A., and  
Iwanaga, T. : Development of region-  
specific radioimmunoassays against rat  
prosecretin or secretin and their  
characterization. Biomed. Res., 20(1): 15-  
26(1999)

5. Ji, Y-H., Li, Y-J., Zhang, J-W., Song,  
B-L., Yamaki, T., Mochiozuki, T.,  
Hoshino, M., and Yanaihara, N. :  
Covalent structures of BmK AS and BmK  
AS-1, two novel bioactive polypeptides  
purified from chinese scorpion Buthus  
martensi Karsch. Toxicon. 37(3): 519-  
536(1999)

6. Yamaki, T., Mochizuki, T., Ogata, M.,  
Iguchi, K., Yanaihara, N., and Hoshino,  
M. : ACTH-releasing activity and cAMP  
accumulation of rat urocortin-elated  
peptides in pituitary corticotropic cells.  
Biomed. Res.,(in press)

7. Kajiyama, F., Mukaiyama, S.,  
Watanabe, Y., Ogata, M., Iguchi, K.,  
Mochizuki, T., and Hoshino, M. : Effect  
of galanin(15-29)-related peptides on  
glucose-nduced insulin release from  
isolated perfused rat pancreas. Biomed.  
Res., (in press)

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

無し

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
平成11年度分担研究報告書

「造血幹細胞・リンパ球の純化とがん免疫療法への応用」

分担研究者：高上洋一 国立がんセンター中央病院12B病棟医長

## 研究要旨

臓器毒性の少ないミニ移植技術を開発して移植適応を拡大し、非特異的免疫療法としての同種造血幹細胞移植の基礎づけを行った。また細胞免疫療法の理論的基盤に基づいてがん特異的抗原パルス樹状細胞療法を開発した。いずれも厳格な規定の臨床試験を行い、その治療効果を客観的に確認した。

### A. 研究目的

本研究は、麻酔が不必要で多量の造血幹細胞と免疫担当細胞を含む末梢血細胞の採取と保存技術を確立し、大量抗がん剤治療後の造血幹細胞移植や特異的免疫療法などの、いわゆる包括的細胞療法に応用することを目的とする。

骨髄移植などの同種造血幹細胞移植術は多くの白血病にとって有効な治療法であるが、反面、移植片対宿主病（GVHD）など多くの合併症も発生する。特に患者の年齢が55歳を超える場合や、移植前に既に肝臓、心臓や腎臓などの臓器の働きが低下している場合には、現在の方法で移植術を行うと合併症の頻度と重症度が高くなるため禁忌とされてきた。一方最近、移植の抗がん効果は移植前処置療法に加えて移植後に起こるドナー由来のリンパ球を介した同種免疫反応にもよることが明らかとなった。そこで後者を強調した治療を行うならば、前者を控えめに行って治療関連毒性を減らして移植をより安全に行うことが可能になる。この、いわゆる骨髄非破壊的な前処置療法を用いた新たな同種造血幹細胞移植では、患者の身体的負担も軽減するので移植

適応の拡大が可能となる。本研究では、比較的臓器毒性が少ない、いわゆる骨髄非破壊的な前処置療法を開発して、その有効性を解析する。

一方、移植術を含めた抗がん剤療法には重大な副作用の危険が常に伴うにもかかわらず、がん根絶は依然困難である。そこで科学的根拠に基づいた免疫療法である樹状細胞療法を開発し、厳格な臨床試験を行ってその有効性を評価する。

### B. 研究方法

新たなプリン誘導体であるクラドリピンを用いた骨髄非破壊的な前処置療法を開発し、国立がんセンター中央病院において治療を受ける造血器腫瘍患者のうち、他の治療では治癒や長期生存を期待できないような疾患や病状であるにもかかわらず、年齢制限（55歳）や臓器機能障害があるために通常の血縁/非血縁者間同種造血幹細胞移植の適応にならない患者を対象とした臨床試験を開始した。

がん抗原ペプチドパルス樹状細胞療法

法の基盤を確立する目的で、進行期前立腺がん術後ホルモン療法抵抗性患者を対象として、血液成分採取装置を

用いて末梢血細胞を採取して体外に取り出し、その後比重遠心液を用いて樹状細胞の前駆細胞を濃縮した。つぎに前立腺酸性ホスファターゼ抗原タンパクを加えて無血清、無サイトカインの状態に40時間培養した。このようにして得られた、処理済みの抗原ペプチド断片を膜表面のMHC Class I分子と結合した形で提示する樹状細胞を、2週毎に計3回患者に点滴静注する第一相臨床試験を開始した。

対象患者については、いずれも患者本人に説明同意文書の内容を極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書2部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得た。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の1部を本人に提供することで倫理性も確保した。

### C. 研究結果

現在までに骨髄非破壊的前処置療法を行った後に同種造血幹細胞移植を行った5名では、通常の移植術に見られるような重篤な副作用は発生せず、患者のQOLは通常の抗がん剤治療並に保たれた。

また、がん抗原ペプチドパルス樹状細胞療法の早期第I相試験の第一段階で治療を受けた6名中1名において、転移リンパ節が65%縮小したことが確認された。

### D. 考察

同種造血幹細胞移植術では、超大量の強力な術前療法によってdose-response効果を示す難治がんが根絶されると考えられていた。しかし最近に至って、これを覆す所見が得られている。つまり、白血病においては軽度のGVHDが発生した場合のほうが、全く起こらなかった場合に比べて再発が少なく、移植後の無病生存率が良くなる

事実があることであり、この効果を移植片対白血病(graft-versus-leukemia: GVL)効果と呼び、同様の現象は固形がんにおいても観察されている。このことから、ドナー由来のリンパ球、中でもT-cellにはGVHDを起こすという不都合な側面もある反面、抗腫瘍効果もあると考えられるにいたり、"同種細胞療法"という概念が確立された。

この同種免疫反応は時に強力になるため、この場合には、多くの合併症を発生させる大量抗がん剤療法や放射線照射よりも、強力な同種免疫反応を重視した移植法が開発されるのは自然の流れとなる。このような考えで開発されたものがミニ移植である。これを用いた場合には、臓器毒性が極めて少ないために移植適応を拡大できる可能性もある。この際の骨髄非破壊的前処置療法として、新たなプリン誘導体であるクラドリピンを世界では初めて用いる臨床研究を開始した。これにより従来は造血幹細胞移植の対象外とされた高齢者や臓器障害のある患者においても臓器毒性が極めて少ないために移植適応を拡大できる可能性があり、また今後は固形腫瘍に対する非特異的免疫療法としての適応を進める方向性が示された。

一方、移植術を含めた抗がん剤療法には重大な副作用の危険が常に伴うにもかかわらず、がん根絶は依然困難である。免疫療法は宿主の腫瘍に対する反応を応用するという点で極めて合理的、かつ魅力的な戦略である。しかし坦がん患者では様々な要因により免疫能が著明に抑制されることもあり、非特異的にリンパ球を賦活・培養増殖する従来の方法では明確な臨床効果は認められなかった。本研究で示した細胞処理技術を用いてより特異的な免疫療法を急ぎ開発する必要がある所以である。特に免疫担当細胞をがん特異的抗

原ペプチドと共に培養して増やした後  
に患者に再輸注する、いわゆる特異的  
細胞免疫療法は、他に有効な治療法を  
持たない多くの患者にとって負担が少  
なく、かつ有効な治療となる可能性が  
含まれている。

よって、今回の臨床試験において実  
際に臨床効果を確認したことは意義深  
いと考える。

## E. 結論

ミニ移植の開発により、非特異的免  
疫療法としての同種造血幹細胞移植の  
基礎づけが行なわれた。また特異的免  
疫療法として開発した樹状細胞療法で  
は、臨床試験の妥当性と治療の科学的  
根拠を持たせた臨床試験を初めて行い、  
その治療効果を客観的に確認した。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

1. Watanabe, T., Kawano, Y., Kanamaru, S., Onishi, T., Kaneko, S., Wakata, Y., Nakagawa, R., Makimoto, A., Kuroda, Y., Takaue, Y. and Talmadge, J. E. : Endogenous interleukin (IL)-8 surge in granulocyte-colony stimulating factor induced peripheral blood stem cell mobilization. *Blood*, 93: 1157-1163, 1999.
2. Yano, M., Watanabe, A., Kawano, Y., Watanabe, T. and Takaue, Y. : Facilitated engraftment by intramedullary administered enriched allogeneic CD34+ cells? *Bone Marrow Transplant.*, 23: 847-848, 1999.
3. Kawano, Y. and Takaue, Y. : Is filgrastim as useless after PBSC transplantation for adults as it could be for children? *Blood*, 93: 3566, 1999.

4. Kawano, Y., Takaue, Y., Watanabe, T., Abe, T., Okamoto, Y., Iwai, A., Iwai, T., Watanabe, A., Ito, E., Makimoto, A., Nakagawa, R., Watanabe, H., Sato, J., Suenaga, K., Suzuya, H., Ohnishi, T., Kanamaru, S., Kaneko, S. and Kuroda, Y. : Efficacy of the mobilization of peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor in pediatric donors. *Cancer Res.*, 59: 3321-3324, 1999.

5. Watanabe, T., Kawano, Y., Watanabe, A. and Takaue, Y. : Autologous and allogeneic transplantation with peripheral blood CD34+ cells: a pediatric experience. *Haematologica*, 84: 167-176, 1999.

6. Kawano, Y., Watanabe, T. and Takaue, Y. : Mobilization/harvest and transplantation with blood stem cells, manipulated or unmanipulated. *Pediatr. Transplant.*, 3(suppl 1): 65-71, 1999.

7. Takaue, Y. and Tanosaki, R. : Progress in cell therapy in Japan 1999. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 29: 117-118, 1999.

8. Takaue, Y., Eguchi, H., Kawano, Y., Watanabe, A., Mugishima, H. and Kaneko, M. : Transplantation with PBSC, manipulated or unmanipulated, for the treatment of childhood cancer. In: *Autologous Blood and Marrow Transplantation*. Dicke, K. A., Keating, A. (eds), Carden Jennings Publishing, Charlottesville, Virginia, 1999, pp.417-421.

9. Ando, M., Yokozawa, T., Sawada, J., Takaue, Y., Togitani, K., Kawahigashi, N., Narabayashi, M., Takeyama, K.,

Tanosaki, R., Mineishi, S., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Adachi, I. and Tobinai, K. : Cardiac conduction abnormalities in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. Bone. Marrow. Transplant., 25: 185-189, 2000.

10. Makimoto, A., Takaue, Y., Abe, T., Kajiume, T., Okamoto, Y., Sato, J., Nakagawa, R., Watanabe, H., Watanabe, T., Kawano, Y., Kuroda, Y. and Sweet, L. : Comparative evaluation of equipment with a Baxter CS-3000 cell separator for collecting peripheral blood cells from children. J. Hematother., in press.

11. Watanabe, T., Kajiume, T., Abe, T., Kawano, Y., Iwai, A., Iwai, T., Takaue, Y. and Kuroda, Y. : Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in children with hematological malignancies from HLA-matched siblings. Med. Pediatr. Oncol., in press.

12. Watanabe, T., Mineishi, S., Kawano, Y. and Takaue, Y. : Partially matched transplants with allogeneic CD34+ blood cells. Leuk. Lymphoma., in press.

13. Kawano, Y., Takaue, Y., Watanabe, T., Okamoto, Y., Abe, T., Kuroda, Y. and Watanabe, A. : Autologous and allogeneic transplantation with blood CD34+ cells: a pediatric experience. In: Hematopoietic Stem Cell Therapy. Champlin R, Palsson B, Ho AD (eds), Cambridge University Press, London, in press.

14. Horikoshi, Y., Mimaya, J., Takaue, Y., Kawano, Y., Watanabe, A., Watanabe, T., Sekine, I., Nishikawa, K.,

Tsunematsu, Y., Endo, M., Eguchi, H., Koyama, T., Kawakami, K., Oka, T., matsushita, T., Koizumi, S., Ohira, M. and Fujimoto, T. : Feasibility study of autologous peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of childhood acute myelogenous leukemia. Jpn. J. Clin. Oncol., in press.

G. 知的所有権の取得状況  
特になし。