

厚生省科学研究助成金  
ヒトゲノム遺伝子治療研究事業  
平成11年度研究報告書

研究課題名

腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療－IV期腎細胞がん患者を  
対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接  
種に関する臨床研究（H10-ゲノム-032）

主任研究者

東京大学医科学研究所・病態薬理学研究部  
助教授 谷 憲三郎

## 総括研究報告書

### 腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療—IV期腎細胞がん患者を対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 東京大学医科学研究所・病態薬理学研究部・助教授

研究の要旨：「IV期腎細胞がん患者を対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究」の本邦での実施に際して、同意が得られた第 IV 期腎細胞がん患者において、東京大学医科学研究所附属病院で患側腎摘出を行い、同臨床細胞工学室内において腎細胞がん細胞を培養後、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をし、作製された遺伝子導入細胞の性状解析ならびに安全性を確認後、再度同意を得た 3 名の患者皮内へ接種した。接種後、患者における副作用出現の有無を諸検査によりモニターするとともに、抗腫瘍免疫誘導の有無、臨床的な抗腫瘍効果出現の有無をそれぞれ免疫学的もしくは画像診断により評価した。現在まで著明な副作用の出現を認めずに患者への接種が実施されており、一人の患者では細胞障害性 T リンパ球の出現と病状の安定化を認めている。これらの臨床研究に加え、(a) 遺伝子治療もしくは CTL 養子免疫療法施行例における自己腎癌細胞に対する CTL クローンの同定ならびにその樹立、(b) SAGE 法を用いた GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導における機能分子の同定、(c) CD70 (CD27 リガンド) 遺伝子導入腫瘍細胞を用いた遺伝子治療前臨床研究、(d) 泌尿器科癌と Lewis 血液型抗原の関連性についての検討、(e) 免疫遺伝子治療用新規アデノウイルスベクターの開発、を行い次世代の泌尿器系を中心とした悪性腫瘍に対する遺伝子治療法開発の為の基礎的情報を蓄積した。

#### 分担研究者

浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・教授  
赤座 英之 筑波大学医学専門学群・教授  
奥村 康 順天堂大学・医学部・教授  
藤目 真 順天堂大学・医学部・教授  
濱田 洋文 癌研究会・癌化学療法センター・部長  
佐藤 典治 東京大学医科学研究所・助教授

#### A. 研究目的

他臓器への転移、浸潤を認める IV 期進行腎細胞がん（腎癌）患者に対しては、既存のいずれの療法も無効で、殆どの患者は 2 年以内に死亡するため、新たな治療法の開発が強く望まれる。これ迄の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有効性が示唆されている。特に放射線照射 GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞 (GVAX) による抗腫瘍免疫誘導効果はマウス前臨床試験のみならず、米国などでの腎癌、メラノーマ、前立腺癌、肺癌の各患者に対する臨床研究においても明らかにされつつある。本遺伝子治療臨床研究では以上の知見を基に、患者の抗腫瘍免疫力をより強化し臨床的効果も期待する目的で、最適化した放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞量の皮内接種の可能性ならびに安全性の評価、患者体内に誘導された抗腫瘍免疫誘導効果、さらには画像診断技術を用いた腫瘍縮小効果の評価を併せて行う。また本臨床プロトコルの実施に加えて、固形腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療法の開発研究をマウス腫瘍モデルを用いて行うとともに、新規遺伝子のクローン化と遺伝子導入法の開発も行う。

#### B. 研究方法

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討：

病名告知の為された IV 期腎癌患者に対し、本臨床研究プロトコルの内容を十分に説明し、その内容を理解できた患者の中で同意書に署名をした患者 5 人

について、以下の臨床研究を行う。

1) 東大医科研究病院で患側腎の全摘出を行い、同病院附属臨床細胞工学室において GMP 基準に従い、腎癌細胞の初代培養を開始する。第 1 継代細胞に対し、CellGenesys 社より予め空輸され凍結保存している MFGs-GM-CSF レトロウイルスベクター液を用いて、GM-CSF 遺伝子導入を行い、同細胞を増幅後回収し、150 グレイの放射線照射後プログラム凍結を行う。最終回収細胞ならびに培養液の一部を安全性検討（複製可能レトロウイルス(RCR)、細菌、真菌、マイコプラズマなどの汚染がないことの確認）のため、米国 BioReliance (旧 MA) 社へ空輸するとともに、本病院において遺伝子導入細胞の機能検定(GM-CSF 産生能や患者 HLA の保存性などの検定)を行う。

2) 接種細胞の安全性ならびに GM-CSF 発現量が確認された場合、手術から約 8 週後より凍結細胞を解凍し、患者皮内に初回は  $4 \times 10^7$  個、2 週毎に  $2 \times 10^7$  個細胞を 5 回接種する。その後患者の希望があり、追加接種が患者にとって有利であると判断された場合には残余細胞を同様に接種する。

3) 患者の臨床的観察は原則として同附属病院入院管理下で行い、定期的採血により血液学的、生化学的、免疫学的な臨床検査項目に関する追跡検査を行う。また定期的に皮膚生検を細胞接種部位や遅延性皮膚反応(DTH) 検査部位について行い、病理学的に詳細に検討する。さらに MRI やエコーを用い、転移病巣の経過観察を行う。

(2) 腎癌免疫遺伝子治療患者等の末梢血単クローン増生 T リンパ球の抗腫瘍免疫能の検討：免疫遺伝子治療を受けた患者の末梢血や組織中のリンパ球を用い RT-PCR 法による TCR V $\beta$  レパートア解析を行う。

(3) 腎癌特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL) クローンの樹立：腎細胞癌 に対してさらに有効な免疫療法を開発することを目的に、遺伝子治療を受けた腎癌患者の免疫学的解析を行い、臨床的に有効な症例につ

いては自己腎癌細胞に対する CTL クローンの樹立を行う。さらに CTL 養子免疫療法のみを施行された例でも同様に検討する。さらにこれらの免疫療法の治療モデル系として SCID マウスを用いたヒト腎癌細胞移植系の開発を併せて行う。

(4) CD70 (CD27 リガンド) 遺伝子導入腫瘍細胞を用いた遺伝子治療前臨床研究: DBA/2 マウス由来肥満細胞腫 P815 にマウス CD70 遺伝子を導入し CD70/P815 細胞を作製する。この CD70/P815 細胞を BALB/c ノードマウスに尾静注し、その生存率ならびに肺転移、肝転移数を親株の P815 尾静注群と比較する。その際、抗 CD70 抗体やアシアロ GM1 抗体投与の影響を同時に検討し、in vitro では CD27 刺激による NK 細胞の増殖、IFN- $\gamma$  産生能、細胞傷害活性能を測定する。

(5) 免疫遺伝子治療用新規アデノウイルスベクターの開発: アデノウイルスのキャプシド蛋白に標的化ペプチドを組み込み、特定の細胞に感染効率の高い「標的化ウイルスベクター」を効率的に作製する方法を開発すると共に、インテグリンを標的とした Adv-F/RGD ウイルスを作成する。

(6) mRNA 連続解析システムによる GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析: 野生株 WEHI/3B(W3)細胞をマウス皮下に接種後、その腫瘍増生のためにマウスは死に至るが、GM-CSF 産生 W3 細胞を接種した場合腫瘍増殖は 10 日目を境に退縮し完全に拒絶される。一方、ノードマウスでは GM-CSF 産生細胞による抗腫瘍活性は認められない。GM-CSF 産生 W3 細胞を接種後、約 10 日目の腫瘍切除組織内に抗腫瘍活性が最も強く現れていることを想定し Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いた腫瘍内発現遺伝子解析を行い、上記 3 種類のマウス系からそれぞれ 11base から成る Tag 配列を 30,000 個づつクローニングした。この Tag 配列情報をもとに腫瘍拒絶に深く関与する遺伝子を同定する。

(7) 泌尿器科癌と Lewis 式血液型抗原の関連性についての検討: 1992 年~1999 年の間に順天堂大附属病院で治療を受けた膀胱癌患者で赤血球の Lewis 式血液型が調べられており、初発時表在性で膀胱が温存されその後の再発の有無について確認できた 150 例を対象とした。Lewis 式血液型は、赤血球表面の Lewis 抗原を血清学的に判定した。また一部の症例については、Lewis 式血液型の決定に関与する Le transferase 遺伝子の 59 番目、508 番目、1067 番目の塩基に起こる点突然変異の有無についても検討した。

#### (倫理面への配慮)

本遺伝子治療臨床研究への希望患者の医学的適応を学内の臨床検討委員会で十分に論議し、適応基準に合致する患者に対して説明書を用い少なくとも 2 回にわたり本研究の内容を詳細に説明する。文書での同意を得た後、さらに本附属病院遺伝子治療審査委員会による審査を受け、承認を得た患者に対して患側腎臓の摘出後、遺伝子治療に備えた遺伝子導入自家腎癌細胞の培養を開始する。その後遺伝子導入細胞

の安全性を米国の安全性検討会社で確認後、再度文書での説明・同意を得た後、遺伝子導入細胞の接種を行う。臨床研究中は患者における安全性を注意深くモニターし、その情報を患者に伝え、同意を得ながら臨床研究を継続する。臨床心理の専門家による定期的なインタビューも行い、患者心理も適格に把握し、その立場を常に尊重する。患者の純粋な個人情報に関しては決して公開はしない。副作用を含む有害事象の発生時は、規定に従い臨床研究の中止措置等を至急行い、病院長より所轄省庁へ報告する。

#### C. 研究結果及び考察

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討: 1) 60 歳男性、右腎細胞癌、多発性肺転移、肝臓浸潤: 平成 10 年 10 月 5 日に右腎臓摘出を行い 10 月 19 日に遺伝子導入腎癌細胞を回収、遺伝子導入細胞の安全性等を確認後 12 月 10 日より遺伝子導入細胞接種を 2 週間毎計 6 回、さらに 4 回の追加接種を行った。この間患者においては問題となる副作用は認められず、接種後より DTH 反応は陽性化し、患者末梢血リンパ球解析ならびに病理組織検査結果も抗腫瘍免疫誘導を示唆する結果であった。臨床的にも最大評価病変の右肺門部転移巣の増殖速度が遺伝子導入ワクチン細胞接種後に鈍化した。接種終了約 1 カ月後より 70-140 万単位/日の IL-2 全身投与を開始した。転移巣数の増加及び増大を来し患者は平成 11 年 7 月 8 日に腫瘍死したものの、IL-2 投与後には末梢血好酸球数増加ならびに最大肺転移巣の約 30% の縮小を認めた。剖検体の検査結果から、縮小を認めた病巣では腫瘍の壊死像が著明であり CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球を多数認めた。2) 71 歳男性、右腎細胞癌、仙骨転移: 平成 11 年 1 月の時点で仙骨転移 (直径約 6.5cm 大の球状腫瘍) に起因する著明な右腰部—下肢痛を認めたため、2 月 1-22 日に 30Gy の放射線照射を局所に行い、経口モルヒネ剤、硬膜外持続麻酔により疼痛のコントロールを行った。平成 11 年 4 月 6 日に右腎臓摘出、4 月 19 日に遺伝子導入自家腎癌細胞を回収した。安全性確認後、6 月 3 日より 6 回の遺伝子導入細胞の接種を開始後さらに 11 回の追加接種を行った。著明な副作用の出現なく、同様に諸検査結果より抗腫瘍免疫誘導効果を認めた。特に患者末梢血リンパ球中には自家腎癌細胞に対して持続的に CTL 活性が検出された。タリウムシンチグラフィ上、ワクチン接種に伴い腫瘍部分へのタリウム取り込み量の低下を認め、ワクチン接種前には増加していた腫瘍マーカー IAP (inactivated acidic protein) が正常化した。3) 57 歳女性、左腎細胞癌、多発性肝転移、多発性肺転移: 平成 11 年 10 月にめまいの精査を受け、左腎腫瘍ならびに多発性肝ならびに肺転移が発見された。同 12 月 17 日に左腎臓摘出、12 月 27 日に遺伝子導入自家腎癌細胞を回収した。安全性確認後、2 月 22 日より 4 回の遺伝子導入細胞の接種をこれまでおこなっている。現在まで著明な副作用の出現は認められておらず、さらに接種を継続する予定である。

(2) 腎癌遺伝子治療患者末梢血中のT細胞レパートア解析：第1例目において経過中に退縮した腕部ならびに肺転移巣、退縮しなかった肺転移巣組織を比較した結果、Vb10, Vb17, Vb21 TCR T細胞が退縮腫瘍により多く浸潤してきている傾向を認めた。更にVb10, Vb17 TCRのCDR3 LOOP領域の解析を行った結果、Vb10 TCR T細胞が腫瘍拒絶過程に共通するCDR3 LOOP領域を有することが明らかになった。また第2例目においても患者末梢血中でオリゴクローン性Tリンパ球を検出している。

(3)腎癌特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)クローンの樹立：腎癌遺伝子治療もしくはCTL療法を受けた患者の末梢血Tリンパ球よりCTLクローンの樹立を行っている。特にCTL養子免疫を施行し臨床的に病巣の50%以上の縮小効果が得られた症例で検討した結果、CTL投与後4週の時点では投与前に比べ末梢血からのCTL誘導能が有意に増強する傾向を認めた。さらに誘導されたCTLの抗腫瘍活性及びCTLのT細胞レセプターを解析したところ一定のT細胞レセプターを使用するCTLクローンが高い傷害活性を有する傾向が得られた。また手術切除標本より樹立したヒト腎癌細胞株をSCIDマウスの皮下に接種したところ腫瘍を形成し早期に担癌マウスが腫瘍死した。腫瘍死したマウスには明らかな転移は認めなかった。

CTL養子免疫療法後における末梢血からのCTL誘導能の増強は、本治療の作用機序として移入されたリンパ球の腫瘍に対する直接的な傷害活性以外に免疫カスケードを介してCTL前駆細胞を増加させる可能性があることを示唆している。また、CTLクローンの生体内での動態を解析することは本治療における免疫学的モニタリングとして有用であり、今後さらに簡便化したCTLクローンの解析法について検討する意義があると考えられた。一方SCIDマウス腎癌モデルは皮下腫瘍が比較的小さく、かつ転移が形成されないにもかかわらずマウスが死亡することが特徴的であり、皮下腫瘍局所では血管増生が著明であることも併せて末期臨床腎癌の生物学的特性によく合致した動物モデルであると考えられた。

(4) CD70 (CD27 リガンド) 遺伝子導入腫瘍細胞を用いた遺伝子治療前臨床研究：CD70/P815細胞をBALB/cヌードマウスに尾静注したところ、親株P815と比較して有意な生存日数の延長と肺転移、肝転移数の減少がみられ、この抗転移効果は抗CD70抗体およびアシアロGM1抗体の投与により解除された。NK細胞は恒常的にCD27を発現しており、抗CD27抗体存在下では、Fc受容体を発現しているP815細胞に対しても、CD70/P815細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった。しかしIL-2存在下、CD27刺激で3日間培養後のNK細胞は有意な細胞傷害活性の増強を示した。この細胞傷害活性の増強効果はIFN- $\gamma$ 中和抗体により打ち消された。CD27刺激によりNK細胞の細胞増殖とIFN- $\gamma$ 産生の増強が誘導された。このようにCD70遺伝子導入腫瘍細胞は、NK細胞を活性化しIFN- $\gamma$ 産生を誘導、オートクライン

に作用しNK細胞の細胞傷害活性を増強し抗腫瘍効果を示した。

(5)免疫遺伝子治療用新規アデノウイルスベクターの開発：ファイバー変異型アデノウイルスを用いて新たな腫瘍標的化法を開発した。(A)細胞側の受容体分子との吸着を担うファイバーに20個のリジンを付加したF/K20変異型を作製し、ヒト悪性神経膠腫細胞に対して従来型よりも数十倍高い遺伝子導入効率を得られた。p53結合タンパクp33ING1とp53との併用で高いアポトーシス増強が得られた。また、F/K20変異を制限増殖性のE1B55K欠失型に組み込んだAx1E1AdB-F/K20は、動物実験で従来型に比べて著明な治療効果増強を示した。(B)悪性黒色腫に対して特異的に強い細胞傷害活性を有するファイバー変異型の作成に成功した。Adv-F/RGDウイルスカシメに関しては、従来型アデノウイルスF/wtとほぼ同等のウイルス液を調製することができた。Adv-F/RGDを用いると、ヒトやマウスのメラノーマや口腔癌に対して従来型アデノウイルスベクターに比べて数十倍高い遺伝子導入効率を得られた。Adv-F/RGDベクターの効果のメカニズムを詳細に検討した結果、メラノーマや口腔癌細胞ではアデノウイルスの受容体CARの発現が低く、従来型のアデノウイルスでは十分に感染しないが、インテグリンの発現量はこれらの癌細胞では比較的高く、F/RGD変異型のアデノウイルスの受容体としてインテグリンを用いて十分な感染が成立しうるためであることが明らかとなった。今後、GM-CSF/IL-4などの樹状細胞活性化と腫瘍拒絶抗原提示による免疫遺伝子治療の実験動物モデルを用いて、高効率の本変異型ベクターを投与し、in vivoでの治療効果、副作用の有無などを検討することが必要である。

(6) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：腫瘍拒絶の系から共通して20倍以上発現増強される遺伝子を9種類同定できた。GenBankによると既知遺伝子が1種類と未知遺伝子が8種類あり、50倍以上も発現増幅される遺伝子が2種類含まれていた。

(7) 泌尿器科癌とLewis式血液型抗原の関連性についての検討：Lewis式血液型はLe(a+b-)が26例、Le(a-b+)が105例、Le(a-b-)が19例であった。膀胱内再発率は、Le(a+b-), Le(a-b+), Le(a-b-)でそれぞれ73%, 53%, 58%であった。各群間で有意差検定( $\chi^2$ 検定)を行った結果は、Le(a+b-) vs Le(a-b+)  $p=0.0685$ , Le(a+b-) vs Le(a-b-)  $p=0.2859$ , Le(a-b+) vs Le(a-b-)  $p=0.7135$ であった。

またBCG膀胱腔内注入療法後の再発率は、Le(a+b-), Le(a-b+), Le(a-b-)それぞれ60%, 32%, 43%であった。各群間で有意差検定( $\chi^2$ 検定)を行った結果は、Le(a+b-) vs Le(a-b+)  $p=0.0935$ , Le(a+b-) vs Le(a-b-)  $p=0.4858$ , Le(a-b+) vs Le(a-b-)  $p=0.5682$ であった。

3種のLewis式血液型間で、再発率およびBCG注入療法後再発率に有意差は認められなかった。しかし、Le(a+b-)ではLe(a-b+)に比べて、再発率( $p=0.0685$ )およびBCG注入療法後再発率( $p=0.0935$ )共に高い傾

向がみられた。表在性膀胱癌は多発・再発しやすいことが知られている。本研究において、膀胱癌患者の Lewis 式血液型と膀胱内再発との間に関連を窺わせる結果を得たことは、糖鎖抗原の関与を示唆するものであり、表在性膀胱癌の再発機序の一部を解明する道を開くものであると考えられる。現在 Lewis 式血液型を決定する遺伝子の一つである、Le 遺伝子の genotype と膀胱内再発との関係について検討中であり、さらに Se 遺伝子の genotype を合わせて検討することで、表在性膀胱癌の再発と Lewis 抗原との関連を追求していく予定である。

#### D. 結論

腎癌に対する GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療を実施した3例におけるこれまでの臨床ならびに免疫学的検討結果より、本遺伝子治療法は安全に患者に対して実施できると共に、患者体内に同定可能な腫瘍特異的免疫反応の誘導を観察できている。第1例目においては特に GM-CSF 遺伝子治療の併用療法としての IL-2 全身投与の意義について示唆に富む結果が得られ、今後の免疫遺伝子治療の開発に向けて重要な結果が得られた。さらに本療法の抗腫瘍免疫効果に寄与できる分子の同定ならびにその特異的遺伝子導入法についての研究成果も上げることができた。さらに本研究では、本遺伝子治療症例ならびに、遺伝子治療の適応とならず従来からの CTL 療法を受けた患者より CTL クローンの樹立を試みており、現在候補 T 細胞クローンを得ている。GM-CSF 遺伝子治療や CTL 養子免疫治療などの癌特異的免疫療法については、現在のところ臨床応用例は限られているが、既存の免疫療法では観察されない免疫反応が惹起されていることを示唆する所見が得られた。今後のさらなる検討が必要である。今後これらのクローン T 細胞を用いてそれらが認識する腫瘍抗原を同定し、同抗原分子遺伝子を用いての免疫遺伝子治療の開発は、今後低コストでの遺伝子治療を目指す上で極めて重要であると考えられ、さらに研究を継続していく必要がある。

今後のより効果的な遺伝子治療法開発を目指す上で、GM-CSF 遺伝子以外の遺伝子を用いた複合的遺伝子治療法を導入することも将来的には重要である。本年度の研究では免疫遺伝子治療共刺激分子 CD70 遺伝子の導入を試みたところ、NK 細胞を介しての抗腫瘍免疫誘導の可能性が示唆された。これはまた、少なくとも CD70 を発現するウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対する NK 細胞の自然免疫監視機構の一つの機序とも考えられた。

さらに高度に目的とした細胞の標的化が可能なアデノウイルスベクター系の開発を目的に、本年度作成したインテグリン分子を標的とした Adv-F/RGD ベクターは、従来型アデノウイルスベクターに比べて数十倍高い遺伝子導入効率を得られ、臨床への応用が期待された。今後、メラノーマの治療などへの実用化を目指して準備を進め、より効率的かつ低コストでの免疫遺伝子治療法の開発を行って行きたい。

SAGE 法を用いた解析研究では、新規腫瘍拒絶エフェクター分子をとらえることが可能であるものと考えられ、これまでにマウス腫瘍細胞系で同定された GM-CSF 遺伝子治療のエフェクター分子の cDNA 分子全長のクローン化を行うと共に、これら分子の発現を免疫学的に検索し、その新規遺伝子治療への応用の可能性を探っていくことが必要であると考えられた。

また泌尿器腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療法開発を念頭に、表在性膀胱癌患者の Lewis 式血液型と膀胱内再発との間に関連性を検討したところ、両者間に関連性が示された。今後本分子ペプチド遺伝子を用いた遺伝子治療法の開発も可能であるものと考えられた。

以上の様に、本年度の研究成果は現在実施中の GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療法を継続して実施することへの意味を示すと共に、その将来的な展望を示すものと考えられた。さらに本臨床研究に付随した基礎研究は今後の新規免疫遺伝子治療法開発に向けて多くの示唆を与えてくれるものであった。これらの方法の複合的利用により、より効果的で副作用の少ない新規免疫遺伝子治療の開発が可能になるものと期待される。

#### E. 発表

1. Hibino, H., Tani, K., Asano, S., et al. Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. *Blood* 93: 2839-2848, 1999
2. Ohata, J., Tani, K., Asano, S., et al. CD4/CD8 double-positive adult T cell leukemia with preceding cytomegaloviral gastroenterocolitis. *Int J Hematol.* 69: 1-5, 1999.
3. Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al. Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol* 73: 1868-1877, 1999.
4. Tsuruta, T., Tani, K., Asano, S., et al. Alkaline phosphatase, defensin gene expression and effect of myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 32: 237-247, 1999.
5. Tsuruta, T., Tani, K., Asano, S., et al. Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 32: 257-267, 1999.
6. Kawai, K., Akaza, H., Tani, K., Asano, S., et al. Gene-modified immunotherapy for renal cell carcinoma. *Contrib Nephrol* 128: 75-81, 1999.
7. Tani, K., Asano, S., et al. Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated GM-CSF transduced autologous renal cancer cells. in *The 15th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium Proceedings: Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 1999
8. Tani, K., Asano, S., et al. Hematological Aspects of Common Marmoset Monkey Transplanted with autologous MDR1 gene transduced peripheral blood

- stem cells. *Molecular Biology of Hematopoiesis* 6: 307-319, 1999.
9. Tani, K., Nakazaki, Y., Hase, H., Takahashi, K., Azuma, M., Ohata, J., Oiwa, M., Kitamura, R., Masunaga, A., Mackawa, T., Satoh, N., Adachi, D., Soda, Y., Watari, K., Tojo, A., Yamashita, N., Yoshikawa, H., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Wakumoto, Y., Hanazawa, K., Shuin, T., Kawai, K., Hamada, H., Okumura, K., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Sherwin, S., Mulligan, R., and Asano, S. Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated GM-CSF transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 1999
  10. Hase, H., Tani, K., Asano, S., et al. Case Report: The availability of TCR-V repertoire analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol* (in press)
  11. Watari, K., Tani, K., Asano, S., et al. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett* (in press)
  12. Machida, U., Tani, K., et al. Asano, S. Refractory facial cellulitis following cosmetic rhinoplasty after cord blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* (in press)
  13. Machida U, Tani, K., Asano, S., et al. The effect of G-CSF administration in healthy donors before bone marrow harvesting. *Brit J. Haematol.*, (in press)
  14. Matsukawa Y, Asano, S., et al. Low seroprevalence of *Helicobacter pylori* in patients with leukemia. *Am J Hematol* 60: 253, 1999
  15. Kobayashi Y, Asano, S., et al. Analysis of myelodysplastic syndrome clones arising after multiple myeloma: A case study by correlative interphase cytogenetic analysis. *Jpn J Clin Oncol* 29: 374-377, 1999
  16. Okamoto S, Asano, S., et al. Treatment of advanced myelodysplastic syndrome with a regimen including recombinant human granulocyte colony-stimulating factor preceding allogeneic bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 104: 569-573, 1999
  17. Futaki M, Yamashita T, Asano, S., et al.: The IVS4+4 A T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with severe phenotype in Japanese patients. *Blood* (in press)
  18. Eguchi M, Asano, S., et al. Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* (in press)
  19. Hinotsu, S., Akaza, H., et al. Intravesical chemotherapy for maximum prophylaxis of new early phase superficial bladder carcinoma treated by transurethral resection: A combined analysis of trials by the Japanese urological cancer research group using smoothed hazard function. *Cancer* 86: 1818-1826, 1999.
  20. Akaza, H., et al. Aids drug evaluation: Epirubicin A review of its intravesical use in superficial bladder cancer. *Drugs & Aging* 150:307-333, 1999.
  21. Tomobe M., Akaza, H., et al. Angiophilic nucleolar organizer region in proliferating cell had a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor. *J. Urol* 162: 63-68, 1999.
  22. Kayagaki, N., Okumura, K., et al. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med* 189, no. 9:1451-60, 1999.
  23. Kayagaki, N., Okumura, K., et al. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 162:2639-2647, 1999.
  24. Nakano, H., Okumura, K., et al. Targeted disruption of *Traf5* gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, no. 17:9803-8.
  25. Tsukada, N., Okumura, K., et al. Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. 1999, 93, no. 8:2738-47.
  26. Mogi, S., Fujime, M., Okumura, K., et al.: Efficient generation of autologous peripheral blood-derived cytotoxic T lymphocytes against poorly immunogenic human tumors using recombinant CD80-adenovirus together with interleukin 12 and interleukin 2. *Clinical. Cancer Research*, in press.
  27. Fujita K, Fujime, M. et al. Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 80:301-308, 1999.
  28. Zhang Weiping, Hamada, H., et al. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Hum. Gene Ther.* 10 (7): 1151-1161, 1999.
  29. Fujii Si, Hamada, H., et al. Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 93(12):4328-4335, 1999
  30. Tanaka, H., Hamada, H., et al. Successful adoptive immunotherapy of murine nonimmunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. *J. Immunol.* 162(6):3574-82, 1999.
  31. Cao X, Hamada, H., et al. Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology* 97(4):616-625, 1999.
  32. Motoi, F., Hamada, H., et al. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Ther.* 11(2), in press 2000 (Jan 20)
  33. Yoshida, S., Sato, N., et al.: Some problems found in HIV-1 RNA quantification. *J Clinical Pathology* (in press)

## 分 担 研 究 報 告 書

分担研究者：浅野 茂隆（東京大学医科学研究所・教授）  
赤座 英之（筑波大学・医学専門学群・教授）  
奥村 康（順天堂大学医学部・教授）  
藤目 真（順天堂大学医学部・教授）  
濱田 洋文（癌研究会癌化学療法センター・部長）  
佐藤 典治（東京大学医科学研究所・助教授）

## 分担研究報告書

### 腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療—IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・助教授

分担研究者 浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・教授

佐藤 典治 東京大学医科学研究所附属病院・検査部・助教授

研究要旨：「IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究」の本邦での実施に際して、同意が得られた第IV期腎細胞がん患者において、東京大学医科学研究所附属病院で患側腎摘出を行い、同臨床細胞工学室内において腎細胞がん細胞を培養後、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をし、作製された遺伝子導入細胞の性状解析ならびに安全性を確認後、再度同意を得た3名の患者皮内へ接種した。接種後、患者における副作用出現の有無を諸検査によりモニターするとともに、抗腫瘍免疫誘導の有無、臨床的な抗腫瘍効果出現の有無をそれぞれ免疫学的もしくは画像診断により評価した。現在まで著明な副作用の出現を認めずに患者への接種が実施されており、一人の患者では細胞障害性Tリンパ球の出現と病状の安定化を認めている。これらの臨床研究に加え基礎研究では、GM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導における機能分子の同定をマウス腫瘍系を用い、SAGE法により行った。

#### A. 研究目的

他臓器への転移、浸潤を認めるIV期進行腎細胞がん（腎癌）患者に対しては、既存のいずれの療法も無効で、殆どの患者は2年以内に死亡するため、新たな治療法の開発が強く望まれる。これ迄の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有効性が示唆されている。特に放射線照射GM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞（GVAX）による抗腫瘍免疫誘導効果はマウス前臨床試験のみならず、米国などでの腎癌、メラノーマ、前立腺癌、肺癌の各患者に対する臨床研究においても明らかにされつつある。本遺伝子治療臨床研究では以上の知見を基に、患者の抗腫瘍免疫力をより強化し臨床的效果も期待する目的で、最適化した放射線照射・GM-CSF遺伝子導入自家腎癌細胞量の皮内接種の可能性ならびに安全性の評価、患者体内に誘導された抗腫瘍免疫誘導効果、さらには画像診断技術を用いた腫瘍縮小効果の評価を併せて行う。また本臨床プロトコールに付随して、固形腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療法開発に向けての新規遺伝子のクローン化と遺伝子導入法の開発を行う

(1) 第IV期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討：

病名告知の為されたIV期腎癌患者に対し、本臨床研究プロトコールの内容を十分に説明し、その内容を理解できた患者の中で同意書に署名をした患者5人について、以下の臨床研究を行う。

1) 東大医科研究病院で患側腎の全摘出を行い、同病院附属臨床細胞工学室においてGMP基準に従い、腎癌細胞の初代培養を開始する。第1継代細胞に対し、CellGenesys社より予め空輸され凍結保存しているMFGs-GM-CSFレトロウイルスベクター液を用いて、GM-CSF遺伝子導入を行い、同細胞を増幅後回収し、

15,000ラドの放射線照射後プログラム凍結を行う。最終回収細胞ならびに培養液の一部を安全性検討（複製可能レトロウイルス(RCR)、細菌、真菌、マイコプラズマなどの汚染がないことの確認）のため、米国BioReliance(旧MA)社へ空輸するとともに、本病院において遺伝子導入細胞の機能検定(GM-CSF産生能や患者HLAの保存性などの検定)を行う。

2) 接種細胞の安全性ならびにGM-CSF発現量が確認された場合、手術から約8週後より凍結細胞を解凍し、患者皮内に初回は $4 \times 10^7$ 個、2週毎に $2 \times 10^7$ 個細胞を5回接種する。その後患者の希望があり、追加接種が患者にとって有利であると判断された場合には残余細胞を同様に接種する。

3) 患者の臨床的観察は原則として同附属病院入院管理下で行い、定期的採血により血液学的、生化学的、免疫学的な臨床検査項目に関する追跡検査を行う。また定期的に皮膚生検を細胞接種部位や遅延性皮膚反応(DTH)検査部位について行い、病理学的に詳細に検討する。さらにMRIやエコーを用い、転移病巣の経過観察を行う。

(2) 腎癌免疫遺伝子治療患者等の末梢血単クローン増生Tリンパ球の抗腫瘍免疫能の検討：免疫遺伝子治療を受けた患者の末梢血や組織中のリンパ球を用いRT-PCR法によるTCRV $\beta$ レパートア解析を行う。

(3) 腎癌特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)クローンの樹立：腎細胞癌に対してさらに有効な免疫療法を開発することを目的に、遺伝子治療を受けた腎癌患者の免疫学的解析を行い、臨床的に有効な症例については自己腎癌細胞に対するCTLクローンの樹立を行う。

(4) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：野生株WEHI/3B(W3)細胞をマウス皮下に接種後、その腫瘍



増生のためにマウスは死に至るが、GM-CSF 産生 W3 細胞を接種した場合腫瘍増殖は 10 日目を境に退縮し完全に拒絶される。一方、ヌードマウスでは GM-CSF 産生細胞による抗腫瘍活性は認められない。GM-CSF 産生 W3 細胞を接種後、約 10 日目の腫瘍切除組織内に抗腫瘍活性が最も強く現れていることを想定し Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いた腫瘍内発現遺伝子解析を行い、上記 3 種類のマウス系からそれぞれ 11base から成る Tag 配列を 30,000 個ずつクローニングした。この Tag 配列情報をもとに腫瘍拒絶に深く関与する遺伝子を同定する。

#### (倫理面への配慮)

本遺伝子治療臨床研究への希望患者の医学的適応を学内の臨床検討委員会で十分に論議し、適応基準に合致する患者に対して説明書を用い少なくとも 2 回にわたり本研究の内容を詳細に説明する。文書での同意を得た後、さらに本附属病院遺伝子治療審査委員会による審査を受け、承認を得た患者に対して患側腎臓の摘出後、遺伝子治療に備えた遺伝子導入自家腎癌細胞の培養を開始する。その後遺伝子導入細胞の安全性を米国の安全性検討会社で確認後、再度文書での説明・同意を得た後、遺伝子導入細胞の接種を行う。臨床研究中は患者における安全性を注意深くモニターし、その情報を患者に伝え、同意を得ながら臨床研究を継続する。臨床心理の専門家による定期的なインタビューも行い、患者心理も適格に把握し、その立場を常に尊重する。患者の純粋な個人情報に関しては決して公開はしない。副作用を含む有害事象の発生時は、規定に従い臨床研究の中止措置等を至急行い、病院長より所轄省庁へ報告する。

#### B. 研究結果及び考察

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討：1) 60 歳男性、右腎細胞癌、多発性肺転移、肝臓浸潤：平成 10 年 10 月 5 日に右腎臓摘出を行い 10 月 19 日に遺伝子導入腎癌細胞を回収、遺伝子導入細胞の安全性等を確認後 12 月 10 日より遺伝子導入細胞接種を 2 週間毎計 6 回、さらに 4 回の追加接種を行った。この間患者においては問題となる副作用は認められず、接種後より DTH 反応は陽性化し、患者末梢血リンパ球解析ならびに病理組織検査結果も抗腫瘍免疫誘導を示唆する結果であった。臨床的にも最大評価病変の右肺門部転移巣の増殖速度が遺伝子導入ワクチン細胞接種後に鈍化した。接種終了約 1 カ月後より 70 - 140 万単位/日の IL-2 全身投与を開始した。転移巣数の増加及び増大を来した患者は平成 11 年 7 月 8 日に腫瘍死したものの、IL-2 投与後には末梢血好酸球数増加ならびに最大肺転移巣の約 30% の縮小を認めた。剖検検体の検査結果から、縮小を認めた病巣では腫瘍の壊死像が著明であり CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球を多数認めた。2) 71 歳男性、右腎細胞癌、仙骨転移：平

成 11 年 1 月の時点で仙骨転移 (直径約 6.5cm 大の球状腫瘍) に起因する著明な右腰部—下肢痛を認めたため、2 月 1—22 日に 30Gy の放射線照射を局所に行い、経口モルヒネ剤、硬膜外持続麻酔により疼痛のコントロールを行った。平成 11 年 4 月 6 日に右腎臓摘出、4 月 19 日に遺伝子導入自家腎癌細胞を回収した。安全性確認後、6 月 3 日より 6 回の遺伝子導入細胞の接種を開始後さらに 11 回の追加接種を行った。著明な副作用の出現なく、同様に諸検査結果より抗腫瘍免疫誘導効果を認めた。特に患者末梢血リンパ球中には自家腎癌細胞に対して持続的に CTL 活性が検出された。タリウムシンチグラフィ上、ワクチン接種に伴い腫瘍部分へのタリウム取り込み量の低下を認め、ワクチン接種前には増加していた腫瘍マーカー IAP (inactivated acidic protein) が正常化した。3) 57 歳女性、左腎細胞癌、多発性肝転移、多発性肺転移：平成 11 年 10 月にめまいの精査を受け、左腎腫瘍ならびに多発性肝ならびに肺転移が発見された。同 12 月 17 日に左腎臓摘出、12 月 27 日に遺伝子導入自家腎癌細胞を回収した。安全性確認後、2 月 22 日より 4 回の遺伝子導入細胞の接種をこれまでおこなっている。現在まで著明な副作用の出現は認められておらず、さらに接種を継続する予定である。

(2) 腎癌遺伝子治療患者末梢血中の T 細胞レパートア解析：第 1 例目において経過中に退縮した腕部ならびに肺転移巣、退縮しなかった肺転移巣組織を比較した結果、Vb10, Vb17, Vb21 TCR T 細胞が退縮腫瘍により多く浸潤してきている傾向を認めた。更に Vb10, Vb17 TCR の CDR3 LOOP 領域の解析を行った結果、Vb10 TCR T 細胞が腫瘍拒絶過程に共通する CDR3 LOOP 領域を有することが明らかになった。また第 2 例目においても患者末梢血中でオリゴクローン性 T リンパ球を検出している。

(3) 腎癌特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) クローンの樹立：腎癌遺伝子治療を受けた患者の末梢血 T リンパ球より CTL クローンの樹立を行っている。

(7) mRNA 連続解析システムによる GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：腫瘍拒絶の系から共通して 20 倍以上発現増強される遺伝子を 9 種類同定できた。GenBank によると既知遺伝子が 1 種類と未知遺伝子が 8 種類あり、50 倍以上も発現増幅される遺伝子が 2 種類含まれていた。

#### C. 結論

腎癌に対する GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療を実施した 3 例におけるこれまでの臨床ならびに免疫学的検討結果より、本遺伝子治療法は安全に患者に対して実施できると共に、患者体内に同定可能な腫瘍特異的免疫反応の誘導を観察できている。第 1 例目においては特に GM-CSF 遺伝子治療の併用療法としての IL-2 全身投与の意義について示唆に富む結果が得られ、今後の免疫遺伝子治療の開発に向け

て重要な結果が得られた。さらに本療法の抗腫瘍免疫効果に寄与できる分子の同定ならびにその特異的遺伝子導入法についての研究成果も上げることができた。今後さらにこれらの検討を継続していくことは重要であると考えられる。

#### D. 発表

1. Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Wu, M-S., Sugiyama, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Takahashi, S., Tojo, A., Suzuki, S., Tanioka, Y., Sugimoto, Y., Nakahata, T., and Asano, S. Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. *Blood* 93: 2839-2848, 1999
2. Koseki, S., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., Shiota, T., Nagai, Y., Shimada, T., Ohkawa, J. and Taira, K. Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol* 73: 1868-1877, 1999.
3. Tsuruta, T., Tani, K., Hoshika, A. and Asano, S. Alkaline phosphatase, defensin gene expression and effect of myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 32: 237-247, 1999.
4. Tsuruta, T., Tani, K., Hoshika, A. and Asano, S. Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 32: 257-267, 1999.
5. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano, S., Nakahata T: The IVS4+4 A T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with severe phenotype in Japanese patients. *Blood* (in press)
6. Kawai, K., Tani, K., Asano, S. and Akaza, H. Gene-modified immunotherapy for renal cell carcinoma. *Contrib Nephrol* 128: 75-81, 1999.
7. Tani, K., Hibino, H., Sugiyama, H., Wu, M-S., Izawa, K., Tanabe, T., Hase, H., Nakazaki, Y., Ishii, H., Suzuki, S., Tanioka, Y., Sugimoto, Y. and Asano, S. Hematological Aspects of Common Marmoset Monkey Transplanted with autologous MDR1 gene transduced peripheral blood stem cells. *Molecular Biology of Hematopoiesis* 6: 307-319, 1999.
8. Nosaka, T., Onishi, M., Kawashima, T., Yamada, K., Misawa, K., Ariyoshi, K., Towatari, M., Saito, H., Tani, K., Asano, S., Miyajima, A. and Kitamura, K. Identification and characterization of constitutively active Stat 5. *Molecular Biology of Hematopoiesis* 6: 277-287, 1999.
9. Okamoto S, Takahashi S, Wakui M, Ishida A, Tanosaki R, Ikeda Y, Asano, S. Treatment of advanced myelodysplastic syndrome with a regimen including recombinant human granulocyte colony-stimulating factor preceding allogeneic bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 104: 569-573, 1999
10. Matsukawa Y, Itoh T, Nishinarita S, Ohshima T, Horie K, Aizawa S, Suzuki A, Toyama K, Takahashi S, Asano, S., Mine T: Low seroprevalence of Helicobacter pylori in patients with leukemia. *Am J Hematol* 60: 253, 1999
11. Kobayashi Y, Nakayama M, Uemura N, Takayama K, Tobinai K, Takanaka T, Choi SH, Satoh H, Mori S, Asano, S.: Analysis of myelodysplastic syndrome clones arising after multiple myeloma: A case study by correlative interphase cytogenetic analysis. *Jpn J Clin Oncol* 29: 374-377, 1999
12. Ohata, J., Matsuoka, M., Yamashita, T., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. CD4/CD8 double-positive adult T cell leukemia with preceding cytomegaloviral gastroenterocolitis. *Int J Hematol*. 69: 1-5, 1999.
13. Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Tojo A, Morishita K, Suzuki K, Sato Y, Kudo S, Tanaka K, Setoyama M, Nagamura F, Asano, S., Kamata N: Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 93:1355-1363,1999.
14. Tani, K., Nakazaki, Y., Hase, H., Takahashi, K., Azuma, M., Ohata, J., Oiwa, M., Kitamura, R., Masunaga, A., Maekawa, T., Satoh, N., Adachi, D., Soda, Y., Watari, K., Tojo, A., Yamashita, N., Yoshikawa, H., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Wakumoto, Y., Hanazawa, K., Shuin, T., Kawai, K., Hamada, H., Okunara, K., Akaza, H., Fujiwara, M., Clift, S., Ando, D., Sherwin, S., Mulligan, R., and Asano, S. Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated GM-CSF transduced autologous renal cancer cells. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology*, 1999
15. Watari, K., Tojo, A., Nagamura-Inoue, T., Nagamura, F., Takeshita, T., Fukushima, T., Motoji, T., Tani, K. and Asano, S. Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. *FEBS Lett* 466:367-371, 2000
16. Tanabe T, Takata I, Kuwabara T, Warashina M, Kawasaki H, Tani, K., Ohta S, Asano, S., Taira K.: Maxizyme, novel allosterically controllable ribozymes, can be designed to cleave various substrates. *Biomacromolecules* 2000, 1, 108-117
17. Hase, H., Tani, K., Nagayama, H., Watari, K., Takahashi, S., Shirafuji, N., Izeki, T., Nakazaki, Y., Yamashita, T., Nakamura, T., Masunaga, A., Maekawa, T., Tojo, A. and Asano, S. . Case Report: The availability of TCR-V $\beta$  repertoire analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol* (in press)
18. Kawai, K., Tani, K., Asano, S. and Akaza, H. Ex vivo gene therapy using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transduced tumor vaccines. *Mol Urol*. 2000 (in press)
19. Machida, U., Tojo, A., Ooi, J., Iseki, T., Nagayama, H., Shirafuji, N., Sawada, M., Nakayama, K., Tani, K., Asano, S. Refractory facial cellulitis following cosmetic rhinoplasty after cord blood stem cell transplantation. *Int J Hematol* (in press)
20. Machida, U., Tojo, A., Takahashi, S., Iseki, T., Nagayama, H., Shirafuji, N., Mori, S., Wada, Y., Ogami, K., Yamada, Y., Sakamaki, H., Maekawa, T., Tani, K., Asano, S. The effect of G-CSF administration in healthy donors before bone marrow harvesting. *Br. J. Haematol.* (in press)

## 分担研究報告書

### 転移腎細胞癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究

主任研究者 谷憲三郎 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・助教授

分担研究者 赤座英之 筑波大学臨床医学系泌尿器科教授

研究要旨：転移腎細胞癌に対する GM-CSF 遺伝子治療及び CTL 養子免疫治療における補助療法の有効性ならびに免疫学的モニタリング法について検討した。GM-CSF 遺伝子治療後にインターロイキン 2 を投与した 1 例において一部の病巣に縮小効果を認めた。CTL 養子免疫治療が有効であった 1 例において治療後に末梢血からの CTL 誘導能が増強した。また、樹立ヒト腎癌細胞を用いてマウス腎癌モデルを作成した。

#### A. 研究目的

本研究では癌特異的免疫反応において中心的役割を担うと考えられる細胞傷害性 T リンパ球（以下 CTL）に注目し GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種治療（以下 GM-CSF 遺伝子治療）ならびに CTL 養子免疫療法の臨床的有用性について検討するとともに、各々における補助療法、治療中の免疫学的モニタリング法及び動物を用いた治療モデル系の作成を目的とする。

#### B. 研究方法

- 1) GM-CSF 遺伝子治療後の補助療法として T リンパ球活性作用を  
有するインターロイキン-2（以下 IL-2）の全身投与の有効性を検討する。
- 2) CTL 養子免疫療法施行例での免疫学的モニタリング法として末梢血 CTL 誘導能及び末梢血 T 細胞クローン解析の有用性について検討する
- 3) GM-CSF 遺伝子及び CTL 養子免疫療法の治療モデル系として SCID マウスを用いたヒト腎癌細胞移植系の開発を行う。

#### C. 研究結果

- 1) GM-CSF 遺伝子治療施行後の 1 例に対して 70-140 万単位/日の IL-2 全身投与を行った。治療効果としては転移巣の増加及び増大を来した患者は癌死に至ったが、肺転移巣の一部の縮小を認めた。剖検検体での検討では縮小を認めた病巣では腫瘍の壊死像が著明であり腫瘍浸潤リンパ球として CD8 陽性細胞が多数を占めていた。
- 2) CTL 養子免疫を施行し臨床的に病巣の 50%以上の縮小効果が得られた症例で検討した結果、CTL 投与後 4 週の時点では投与前に比べ末梢血からの CTL 誘導能が有意に増強する傾向を認めた。さらに誘導された CTL の抗腫瘍活性及び CTL の T 細胞レセプターを解析したところ一定の T 細胞レセプターを使用する CTL クローンが高い傷害活性を有する傾向が得られた。

- 3) 手術切除標本より樹立したヒト腎癌細胞株を SCID マウスの皮下に接種したところ腫瘍を形成し早期に担瘤マウスが腫瘍死した。腫瘍死したマウスには明らかな転移は認めなかった。

#### D. 結論と考察

GM-CSF 遺伝子治療後における一部の病巣の縮小効果の機序については現在のところ明確ではないが、GM-CSF 遺伝子治療の併用療法としてのサイトカイン全身投与について今後の基礎的検討が必要であると考えられた。また、IL-2 投与後の縮小病変で観察された腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞の抗腫瘍活性の検討も今後の重要な検討課題である。CTL 養子免疫療法後における末梢血からの CTL 誘導能の増強は、本治療の作用機序として移入されたリンパ球の腫瘍に対する直接的な傷害活性以外に免疫カスケードを介して CTL 前駆細胞を増加させる可能性があることを示唆している。また、CTL クローンの生体内での動態を解析することは本治療における免疫学的モニタリングとして有用であり、今後さらに簡便化した CTL クローンの解析法について検討する意義があると考えられた。我々の作成した SCID マウス腎癌モデルは皮下腫瘍が比較的小さく、かつ転移が形成されないにもかかわらずマウスが死亡することが特徴的であり、皮下腫瘍局所では血管増生が著明であることも併せて末期臨床腎癌の生物学的特性によく合致した動物モデルであると考えられた。

#### E. 結論

GM-CSF 遺伝子治療や CTL 養子免疫治療などの癌特異的免疫療法については、現在のところ臨床応用例は限られているが、既存の免疫療法では観察されない免疫反応が惹起していることを示唆する所見が得られた。今後のさらなる検討が必要である。

#### F. 発表

1. Hinotsu, S., Akaza, H., Ohashi, Y., Kotake, T. Intravesical chemotherapy for maximum prophylaxis of new early phase superficial bladder carcinoma treated

- by transurethral resection: A combined analysis of trials by the Japanese urological cancer research group using smoothed hazard function. *Cancer* 86: 1818-1826, 1999.
2. Kawai K, Tani K, Asano S, Akaza H. Gene-modified immunotherapy for renal cell carcinoma. Hino O(ed): *Kidney cancer. recent results of basic and clinical research.*
  3. *Contrib Nephrol* 128: 75-81,1999.
  4. S. V., Onrust, L.B. Wiseman, K.L. Goa., Reviewer: Akaza H., B.Ali-El-Dein, A.V. Bono, K. Ghose, K.H. Kurth, A.P.M.van der Meijden, W.Oosterlinck, M.D.Melekos, Y.Mizutani, M.Pavone-Macaluso, T.Tsushima. AIDS drug evaluation: Epirubicin: A review of its intravesical use in superficial bladder cancer. *Drugs & Aging* 150:307-333, 1999.
  5. Tomobe, M., Shimazui, T., Uchida, K., Hinotsu S. and Akaza, H.: Argyrophilic nucleolar organizer region in proliferating cell has a predictive value for local recurrence in superficial bladder tumor. *J Urol*:162:63-68,1999.
  6. Uchida, K., Akaza, H., Hattori, K., Noguchi, R., Kondo, F., Ishikawa, S., Ohtani, M., Hinotsu S. and Koiso K.: Antiemetic efficacy of granisetron; a randomized crossover study in patients receiving cisplatin-containing intraarterial chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol* 29:87-91,1999.
  7. Ota, T, Kawai, K, Hattori, K, Uchida, K, Akaza, K, and M, Harada. Hamartoma of the urinary bladder. *Int J Urol* 1999; 6, 211-214
  8. Kawai K and Akaza H: recent status and problems of cancer therapy in the field of urology. *Asian M J* 42:14-20,1999
  9. Miyanaga N, Akaza H, Tsukamoto T, Ishikawa S, Noguchi R, Ohtani M, Kawabe K, Kubota Y, Fujita K, Obata K, Hirao Y, Kotake T, Ohmori H, Kumazawa J, Koiso K: Urinary nuclear matrix protein 22 as a new marker for the screening of urothelial cancer in patients with microscopic hematuria. *Int. J. Urol.* 6:173-177, 1999.
  10. Miyanaga N, Akaza H, Shinohara N, Koyanagi T, Tsujino S, Miki M, Tobisu K, Niimi M, Hinotsu J: Assessment of QOL and survival for patients undergoing radical cystectomy or bladder preservation for invasive bladder cancer. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 90:445-453, 1999.
  11. Sekido N, Miyanaga N, Kikuchi K, Takeshima H, Akaza H: Lower urinary tract function after intra-arterial chemotherapy with concurrent pelvic radiotherapy for invasive bladder cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 29:479-484, 1999.
  12. Akaza H. Urological cancer: CG for superficial bladder. 4<sup>th</sup> International Conference of the Asian Clinical Oncology Society(ACOS) 1999, 4-7 8BALI)
  13. Akaza H., Debruyne, F.M.J., Fitzpatrick J., Mahler C., Motta M., Thrasher J.B., Tunn U., Yalkarakis M. Secondary hormone treatment 2nd International Consultation on Prostate Cancer 1999, 6.278-29 (Paris)
  14. Akaza H. Prostate cancer: Hormonal therapy for localized prostate cancer JUCTS (Japan/ U.S. Cancer Therapy Symposium 1999.4.24-25(Hiroshima)
  15. 赤座英之:腎細胞癌の新しい治療:遺伝子治療とCTL療法の可能性.第37回日本癌治療学会 1999 10.12-14 (岐阜)
  16. 河合弘二、赤座英之、谷 憲三郎、浅野茂隆:腎細胞癌に対する免疫遺伝子治療及び免疫学的モニタリング第1回泌尿器遺伝子治療研究会 1999 11.20

## CD70 (CD27 リガンド) 遺伝子導入による抗腫瘍効果

研究者 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学教授

研究要旨：共刺激分子 CD70 の遺伝子を腫瘍細胞に導入することにより、担癌個体の生存日数の延長と癌転移の減少が得られた。これは IFN- $\gamma$  産生増強とそれに引き続く NK 細胞の活性化によるものであることを明らかにした。

### A. 研究目的

本研究では、腫瘍に対する免疫遺伝子療法の開発を目的に、共刺激分子 CD70 (CD27 リガンド) の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それによって誘導される抗腫瘍効果について基礎的検討を行う。CD70/CD27 相互作用は T 細胞・B 細胞の活性化や分化を制御するのみならず、NK 細胞の活性化にも関与することが報告されている。本年度は、マウスの系において尾静注により肺転移、肝転移を惹起する DBA/2 マウス由来肥満細胞種 P815 に共刺激分子 CD70 を遺伝子導入し (CD70/P815)、作製した CD70/P815 細胞による抗腫瘍治療効果を、個体レベル、細胞レベルで検討した。

### B. 研究方法

DBA/2 マウス由来肥満細胞種 P815 にマウス CD70 遺伝子を導入し CD70/P815 細胞を作製した。この CD70/P815 細胞を BALB/c ノードマウスに尾静注し、その生存率ならびに肺転移、肝転移数を親株の P815 尾静注群と比較した。その際、抗 CD70 抗体やアシアロ GM1 抗体投与の影響も同時に検討した。また、*in vitro* にて CD27 刺激による NK 細胞の増殖、IFN- $\gamma$  産生能、細胞傷害活性を測定した。

### C. 研究結果

CD70/P815 細胞を BALB/c ノードマウスに尾静注したところ、親株 P815 と比較して有意な生存日数の延長と肺転移、肝転移数の減少がみられ、この抗転移効果は抗 CD70 抗体およびアシアロ GM1 抗体の投与により解除された。NK 細胞は恒常的に CD27 を発現しており、抗 CD27 抗体存在下 Fc 受容体を発現している P815 細胞に対して細胞傷害活性を示さず、また、CD70/P815 細胞に対しても細胞傷害活性を示さなかった。しかしながら、IL-2 存在下 CD27 刺激 3 日間培養後の NK 細胞は有意な細胞傷害活性の増強を示した。この細胞傷害活性の増強効果は IFN- $\gamma$  中和抗体により打ち消された。CD27 刺激により NK 細胞の細胞増殖と IFN- $\gamma$  産生の増強が誘導された。

### D. 考察

腫瘍に対する免疫遺伝子療法の開発を目的に、共刺激分子 CD70 の遺伝子を腫瘍細胞に導入し、それによって誘導される抗腫瘍効果について基礎的検討を行った。その結果、CD70 遺伝子導入腫瘍細胞は、NK 細胞を活性化し IFN- $\gamma$  産生を誘導、オートクラインに作用し NK 細胞の細胞傷害活性を増強し抗腫瘍効果を示した。

### E. 結論

共刺激分子 CD70 遺伝子を導入することにより、NK 細胞を介した抗腫瘍免疫を誘導できる可能性が示唆された。これはまた、少なくとも CD70 を発現するウイルス感染細胞や腫瘍細胞に対する NK 細胞の自然免疫監視機構の一つの機序と考えられた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Akiba, H., H. Oshima, K. Takeda, M. Atsuta, H. Nakano, A. Nakajima, C. Nohara, H. Yagita, and K. Okumura. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J. Immunol.* 162: 7058-7066, 1999.
- 2) Nakano, H., S. Sakon, H. Koseki, T. Takemori, K. Tada, M. Matsumoto, E. Munechika, T. Sakai, T. Shirasawa, H. Akiba, T. Kobata, S. M. Santee, C. F. Ware, P. D. Rennert, M. Taniguchi, H. Yagita, and K. Okumura. Targeted disruption of *Traf5* gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9803-9808, 1999.
- 3) Takeda, K., H. Oshima, Y. Hayakawa, H. Akiba, M. Atsuta, T. Kobata, K. Kobayashi, M. Ito, H. Yagita, and K. Okumura. CD27-mediated activation of murine NK cells. *J. Immunol.* 164: 1741-1745, 2000.

ヒトゲノム・遺伝子治療：腎細胞がんに対する免疫遺伝子治療—IV期腎細胞がん患者を対象とするGM-CSF遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究

主任研究者 谷 憲三郎 東京大学医化学研究所病態薬理学助教授

研究要旨 表在性膀胱癌の膀胱内再発とルイス式血液型との関連について検討した結果、Le(a+b-)では、Le(a-b+)に比べて、再発率およびBCG注入療法後再発率共に高い傾向がみられた。このことから表在性膀胱癌の膀胱内再発には、ルイス式血液型抗原が関与している可能性が考えられた。

分担研究者 藤目 真 順天堂大学 教授

#### A. 研究目的

表在性膀胱癌における治療上の問題として、高頻度にかかる膀胱内再発がある。最近膀胱癌細胞に発現するルイスa抗原が、膀胱癌細胞と接着分子の一つであるセレクトチンとの結合に関与することを示唆する報告がなされた。そこで、ルイスa抗原の発現が、臨床的にみられる膀胱内再発と関連するか検討と行ってみた。

#### B. 研究方法

1992年～1999年の間に、当院にて治療を行った膀胱癌患者で、赤血球のルイス式血液型が調べられており、初発時表在性で膀胱が温存され、その後の再発の有無について確認できた150例を対象とした。

ルイス式血液型は、赤血球表面のルイス抗原を血清学的に判定した。また一部の症例については、ルイス式血液型の決定に関与するLe transferase 遺伝子の59番目、508番目、1067番目の塩基に起こる点突然変異の有無について検討した。

#### C. 研究結果

ルイス式血液型はLe(a+b-)が26例、Le(a-b+)が105例、Le(a-b-)が19例であった。

膀胱内再発率は、Le(a+b-)、Le(a-b+)、Le(a-b-)それぞれ73%、53%、58%であった。各群間で有意差検定( $\chi^2$ 検定)を行った結果は、Le(a+b-) vs Le(a-b+)  $p=0,0685$ 、Le(a+b-) vs Le(a-b-)  $p=0,2859$ 、Le(a-b+) vs Le(a-b-)  $p=0,7135$ であった。

またBCG膀胱腔内注入療法後の再発率は、Le(a+b-)、Le(a-b+)、Le(a-b-)それぞれ60%、32%、43%であった。各群間で有意差検定( $\chi^2$ 検定)を行った結果は、Le(a+b-) vs Le(a-b+)  $p=0,0935$ 、Le(a+b-) vs Le(a-b-)  $p=0,4858$ 、Le(a-b+) vs Le(a-b-)  $p=0,5682$ であった。

3種のルイス式血液型間で、再発率およびBCG注入療法後再発率に有意差は認められなかった。しかし、Le(a+b-)では、Le(a-b+)に比べて、再発率( $p=0,0685$ )およびBCG注入療法後再発率( $p=0,0935$ )共に高い傾向がみられた。

#### D. 考察

表在性膀胱癌は多発・再発しやすいことが知られている。その原因として尿中の発ガン性物質により、複数の細胞がガン化するとする考え (field change) とガン細胞の管腔内播種・着床によるとする考え (implantation) の2説が従来より唱えられてきた。

近年になって、女性膀胱癌患者のガン細胞でのX染色体の不活化パターンやp53遺伝子の点突然変異のパターンの検討から、implantationを支持する結果が得られたとの報

告がみられるが、播種・着床に関与する分子については、未だ明らかにされていない。

最近Skorstengaardらは、膀胱癌細胞とPおよびEセレクトチンとの接着実験と免疫組織染色の結果から、膀胱癌細胞に発現するルイス式血液型抗原のうち、ルイスa抗原がEセレクトチンとの結合に関与している可能性を示唆した。

本研究において、膀胱癌患者のルイス式血液型と膀胱内再発との間に関連を窺わせる結果を得たことは、糖鎖抗原の関与を示唆するものであり、表在性膀胱癌の再発機序の一部を解明する道を開くものであると考えられる。

現在、ルイス式血液型を決定する遺伝子の一つである、Le 遺伝子の genotype と膀胱内再発との関係について検討中であり、今後、Se 遺伝子の genotype の解析結果と合わせて検討することにより、表在性膀胱癌の再発とルイスa抗原との関連を追求していく予定である。

#### E. 結論

表在性膀胱癌患者のルイス式血液型と膀胱内再発との間に関連のある可能性が示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

膀胱腫瘍におけるCA19-9値とLewis式血液型との関連 (DNA多型 1999, 7:254-257)

##### 2. 学会発表

表在性膀胱癌の膀胱内再発とルイス式血液型との関連について (第88回日本泌尿器科学会総会, 2000年, 札幌)

## 研究要旨

宿主の抗腫瘍免疫を強化する免疫遺伝子治療法の基礎実験により、私たちはGM-CSFに加えてIL-4の遺伝子を導入した腫瘍ワクチンが高い治療効果をもたらすことを見出し(Cancer Res., 1996)、抗腫瘍免疫増強の機序に抗原提示樹状細胞の十分な活性化が重要であることを報告した(J. Leuk. Biol., 1996; Eur. J. Immunol., 1998; *ibid*, 1999)。今年度は、腫瘍細胞や抗原提示細胞に対して感染効率が高く宿主域の制限されたアデノウイルスベクターを作成して腫瘍ワクチンに応用することを目指して基礎実験を行った。アデノウイルスの受容体CARの発現が低く従来型のアデノウイルスでは十分に感染しない腫瘍細胞に対して、当研究で作成したインテグリンを標的とした Adv-F/RGD ベクターは、従来型アデノウイルスベクターに比べて数十倍高い遺伝子導入効率を得られ、臨床への応用が期待される

### A. 研究目的

腫瘍細胞や抗原提示細胞に対して感染効率が高く宿主域の制限されたアデノウイルスベクターを作成して腫瘍ワクチンに応用することを目指して基礎実験を行った。

### B. 研究方法

私たちは、アデノウイルスのキャプシド蛋白に標的化ペプチドを組み込み、特定の細胞に感染効率が高い「標的化ウイルスベクター」を効率的に作製する方法を開発し(Hum. Gene Ther., 1998)、その有効な活用法を報告してきた(Cancer Res., 1999; *ibid*, in press)。本期間中は、インテグリンを標的とした Adv-F/RGD ウイルスを作成した。

### C. 研究結果

Adv-F/RGDウイルスのタイターに関しては、従来型アデノウイルス F/wt とほぼ同等のタイターのウイルス液を調製することができた。Adv-F/RGD を用いると、ヒトやマウスのメラノーマや口腔癌に対して従来型アデノウイルスベクターに比べて数十倍高い遺伝子導入効率を得られた。Adv-F/RGD ベクターの効果のメカニズムを詳細に検討した結果、メラノーマや口腔癌細胞ではアデノウイルスの受容体CARの発現が低く、従来型のアデノウイルスでは十分に感染しないのに対して、インテグリンの発現量はこれらの癌細胞では比較的高く、F/RGD 変異型のアデノウイルスの受容体としてインテグリンを用いて十分な感染が成立しうるのであることが明らかとなった。

### D. 考察

この Adv-F/RGDを用いることにより、in situ の腫瘍細胞や抗原提示樹状細胞に効果的に遺伝子を導入・発現させることができれば、高効率ベクターとして臨床への応用が期待される。今後、このベクターを用いて、腫瘍ワクチン療法に関して、in vivo 実験を行い、有効性を検討してゆきたい。すなわち、GM-CSF/IL-4 などの樹状細胞活性化と腫瘍拒絶抗原提示による免疫遺伝子治療の実験動物モデルを用いて、高効率の変異型ベクターを投与し、in vivo での治療効果、副作用の有無などを検討してゆきたい。

### E. 結論

当研究で作成したインテグリンを標的とした Adv-F/RGD ベクターは、従来型アデノウイルスベクターに比べて数十倍高い遺伝子導入効率を得られ、臨床への応用が期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 発表論文

1. Matsumoto, G., Sunamura, M., Shimamura, H., Kodama, T., Hashimoto, W., Kobari, M., Kato, K., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Hamada, H., and Matsuno, S. Adjuvant immunotherapy using genetically engineered interleukin 12 secreting fibroblasts prevents recurrence after surgical resection of established tumors in a murine adenocarcinoma model. *Surgery*, 125(3): 257-264, 1999.

2. Ohashi, M., Kanai, F., Ueno, H., Tanaka, T., Kawakami, T., Koike, Y., Ikenoue, T., Shiratori, Y., Hamada, H., and Omata, M. In vivo adenovirus-mediated p53 gene therapy for gastric carcinoma in vitro and in vivo. *Gut*, 44(3):366-371, 1999.

3. Inaba, M., Sawada, H., Sadata, A., and Hamada H. *In vitro* circumvention of 5-fluorouracil resistance in human stomach cancer cells by adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene. *Jp. J. Cancer Res.*, 90 (3): 349-354, 1999.
4. Tanaka, H., Yoshizawa, H., Yamaguchi, Y., Ito, K., Kagamu, H., Suzuki, E., Hamada H., and Arakawa, M. Successful adoptive immunotherapy of murine nonimmunogenic tumor with specific effector cells generated from gene-modified tumor-primed lymph node cells. *J. Immunol.*, 162(6):3574-82, 1999.
5. Ichikawa, T., Tamiya, T., Adachi, Y., Ono, Y., Matsumoto, K., Furuta, T., Yoshida, Y., Hamada H., and Ohmoto, T. In vivo efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine / cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. in press. *Cancer Gene Therapy*, 1999.
6. Zhang Weiping, He Long, Yuan Zhenglong, Xie Zhifang, Wang Jianli, Hamada Hirofumi, and Cao Xuetao, Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Hum. Gene Ther.* 10 (7): 1151-1161, 1999.
7. Seino K, Ogino T, Ju ST, Hamada H, Yagita H, Okumura K, Fukao K Biological factors that affect CD95 ligand-mediated inflammation. *Transplant Proc.* 31(2B): 893-895, 1999.
8. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene*, 18(41): 5703-5713, 1999.
9. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Kirino, T., Asai, A., Hashimoto, M., and Hamada H. Adenovirus-mediated overexpression of Fas induces apoptosis of gliomas. *Cancer Gene Ther.* in press 1999.
10. Caplen, NJ, Higginbotham, JN, Scheel, JR, Vahanian, N., Yoshida, Y., Hamada H., Blaese, RM, and Ramsey J. Adeno-retroviral chimeric viruses as in vivo transducing agents. *Gene Therapy* 6: (3) 454-459, 1999
11. Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of glioma. *Cancer Res.* 59(14):3411-3416, 1999.
12. Matsuoka, N., Yukawa, H., Ishii, K., Hamada H., Akimoto, M., Hashimoto, N., Miyatake, S. Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xl prevents cell death in primary neuronal culture of rat. *Neuroscience Lett.* 270(3):177-180, 1999.
13. Fujii Si, Hamada H. Fujimoto K, Shimomura T, Kawakita M Activated dendritic cells from bone marrow cells of mice receiving cytokine-expressing tumor cells are associated with the enhanced survival of mice bearing syngeneic tumors. *Blood* 93(12):4328-4335, 1999
14. Shinoura, N., Yoshida, Y., Nishimura, M., Muramatsu, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Expression level of Bcl-2 determines anti- or pro-apoptotic function. *Cancer Res.* 59(16): 4119-4128, 1999.
15. Deguchi, J., Namba, T., Hamada H., Nakaoka, T., Abe, J., Sato, O., Miyata, T., Makuuchi, M., Kurokawa, K., and Takuwa, Y. Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury. *Gene Ther.* 6: 956-965, 1999.
16. Takada T, Kato K, Yagita H, Hamada H, Okumura K Effects of immunization with tumor cells double transfected with interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes on artificial metastasis of colon26 cells in BALB/c mice. *Clin Exp Metastasis* 17(2):125-30, 1999.
17. Hayashi S, Namii Y, Guan-Lin M, Dai-Kaku L, Kobayashi T, Nagasaka T, Yokoyama I, Hamada H, Takagi H Effect of adenovirus-mediated gene transfer with CTLA4-Ig gene in organ transplantation. *Transplant Proc* 31(5):1944-1945, 1999.
18. Cao X, Zhang W, Wang J, Zhang M, Huang X, Hamada H, Chen W Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. *Immunology* 97(4):616-625, 1999.
19. Shibagaki, N., Hanada, Yamashita, H., Shimada, S. and Hamada H. Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA1/ICAM1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA1 in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* Eur J Immunol. 29(12):4081-4091., 1999.
20. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, H., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of p33ING



with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* 59(21):5521-5528, 1999.

21. Kawamura, K., Tasaki, K., Hamada, H., Takenaga, K., Sakiyama, S. and Tagawa, M. Expression of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene in murine colon carcinoma cells augments the antitumor effect of 5-fluorouracil and induces protective immunity. *Cancer Gene Therapy* in press 1999.

22. Sunamura, M., Sun, L., Lozonschi, L., Duda, D.G., Kodama, T., Matsumoto, G., Shimamura, H., Kobari, M., Hamada, H., and Matsuno, S. The anti-angiogenesis effect of IL-12 during early growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Pancreas* in press, 1999.

23. Asai, A., Shinoura, N., Hamada, H., et al. and Kirino, T., High-level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J. Biol. Chem.* in press, 1999.

24. Shinoura et al. and Hamada, H. Adenovirus-mediated gene transduction of I $\kappa$ B or I $\kappa$ B plus Bax drastically enhance tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jp. J. Cancer Res.* in press, 1999.

25. Koyama, F., Sawada, H., Fujii, H., Hirao, T., Ueno, M., Hamada, H., and Nakano, H. The enzyme/prodrug gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene driven by the CAG promoter associated with 5-fluorocytosine administration. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (JECCR) in press, 1999.

26. Shinoura, Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of p53 and Fas ligand drastically enhances apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* in press, 1999.

27. Shinoura, Saito, K., Yoshida, Y., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of Bax with caspase-8 controlled by myelin basic protein promoter induces enhanced apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* in press, 1999.

28. Sakurada, A., Hamada, H., Fukushima, S., Yokoyama, T., Yoshinaga, K., Furukawa, T., Sato, S., Yajima, A., Sato, M., Fujimura, S., and Horii, A. Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int. J. Oncol.* in press, 1999.

29. Motoi, F., Sunamura, M., Ding, L., Duda, D.G., Yoshida, Y., Zhang, W-P., Matsuno, S., and Hamada, H. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Ther.* 11(2), in press 2000.

30. Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-x1 protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 254(2): 221-231, 2000.

31. Narita, M., Takanaga, K., Yoshida, Y., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Matsubara, S., Hamada, H., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M.: Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res.* in press 2000.

32. Qiu, JH, Asai, A, Chi, S., Saito, N., Hamada, H., and Kirino, T. Protease inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J. Neuroscience* 20 (1): 259-265, 2000.

33. Kobayashi, T., Okamoto, Nakazawa, M., K., Kobata, T., Hasunuma, T., Kato, T., Hamada, H., and Nishioka, K. Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer: Induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes. *Gene Ther.* in press. 2000.

34. Kasaoka, Y., Nakamoto, T., Wang, J., Usui, T., and Hamada, H. Gene therapy for murine renal cell carcinoma using Genetically engineered tumor cells to secrete interleukin-12. *Hiroshima J. Med. Sci.* in press, 2000.

35. Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Hamada H, Ohmoto T Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 11(1):77-89, 2000.

36. Kobayashi, T., Okamoto, K., Kobata, T., Hasunuma, T., Kato, T., Hamada, H., and Nishioka, K. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes by TNF $\alpha$  and bFGF is associated with the expression of apoptosis-related molecules. *Arthritis & Rheumatism* in press. 2000.

37. Wang, J., Nakamoto, T., Kasaoka, Y., Usui, T., and Hamada, H. Antitumor effect of murine renal cell carcinoma cells genetically modified to express B7-1

combined with cytokines secreting fibroblasts. Hiroshima J. Med. Sci. in press, 2000.

38. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand Induces drastic apoptosis In U373MG glioma cells. Exp. Cell Res. in press, 2000.

39. Koyama, F., Sawada, H., Hirao, T., Fujii, H., Hamada, H., and Nakano, H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of *Escherichia coli* cytosine deaminase gene *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther.*, in press, 2000.

40. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, in press, 2000.

(別紙)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍・雑誌名・論文名	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Case Report: The availability of TCR-V repertoires analysis with RT-PCR methods for the early detection of pulmonary relapsed T-cell malignancy after the autologous stem cell transplantation. Am J Hematol	(in press)		Hase, H., Tani, K., Asano, S., et al.
Identification of a melanoma antigen, PRAME, as a BCR/ABL-inducible gene. FEBS Lett	(in press)		Watari, K., Tani, K., Asano, S., et al.
Refractory facial cellulitis following cosmetic rhinoplasty after cord blood stem cell transplantation. Int J Hematol	(in press)		Machida, U., Tani, K., Asano, S., et al.
The effect of G-CSF administration in healthy donors before bone marrow harvesting. Brit J. Haematol.,	(in press)		Machida, U., Tani, K., Asano, S., et al.
Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). Blood	(in press)		Eguchi, M., Asano, S., et al.
The IVS4+4 A T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with severe phenotype in Japanese patients. Blood	(in press)		Futaki, M., Asano, S., et al.:
Common Marmoset as a Target Preclinical Primate for Cytokine and Gene Therapy Studies. Blood 93: 2839-2848, 1999	1999		Hibino, H., Tani, K., Asano, S., et al.
Factors governing the activity in vivo of ribosomes transcribed by RNA polymerase III. J Virol 1868-1877	1999.		Koseki, S., Tani, K., Asano, S., et al.
CD4/CD8 double-positive adult T cell leukemia with preceding cytomegaloviral gastroenterocolitis. Int J Hematol. 69: 1-5	1999.		Okada, H., Tani, K., Asano, S., et al.
Alkaline phosphatase, defensin gene expression and effect of myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. Leuk Lymphoma 32: 237-247, 1999.	1999.		Tsuruta, T., Tani, K., Asano, S., et al.

Hematological Aspects of Common Marmoset Monkey Transplanted with autologous MDR1 gene transduced peripheral blood stem cells. Molecular Biology of Hematopoiesis 6: 307-319, 1999.	1999.		Tani, K., Asano, S. et al.
Myeloperoxidase gene expression and regulation by myeloid cell growth factors in normal and leukemic cells. Leuk Lymphoma 32: 257-267,	1999.		Tsuruta, T., Tani, K., Asano, S., et al.
Gene-modified immunotherapy for renal cell carcinoma. Contrib Nephrol 128: 75-81,	1999.		Kawai, K., Akaza, H., Tani, K., Asano, S., et al.
Progress reports on immune gene therapy for stage IV renal cell carcinoma using lethally irradiated GM-CSF transduced autologous renal cancer cells. in The 15th Bristol-Myers Squibb Nagoya International Cancer Treatment Symposium Proceedings: Cancer Chemotherapy & Pharmacology	1999		Tani, K., Akaza, H., Hamada, H., Okumura, K., Fujime, M., Asano, S., et al.
Hematological Aspects of Common Marmoset Monkey Transplanted with autologous MDR1 gene transduced peripheral blood stem cells. Molecular Biology of Hematopoiesis 6: 307-319	1999		Tani, K., Asano, S., et al.
Low seroprevalence of Helicobacter pylori in patients with leukemia. Am J Hematol 60: 253	1999		Matsukawa Y, Asano, S., et al.
Analysis of myelodysplastic syndrome clones arising after multiple myeloma: A case study by correlative interphase cytogenetic analysis. Jpn J Clin Oncol 29: 374-377	1999		Kobayashi Y, Asano, S., et al.
Cyclin D1 overexpression detected by a simple competitive reverse transcription-polymerase chain reaction assay for lymphoid malignancies. Jpn J Cancer Res 89: 159-166	1999		Taniguchi T, Asano, S., et al.