

20000121

厚生科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

新しいがん免疫療法の研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 口 建

平成13年4月

目 次

I. 総括研究報告

新しいがん免疫療法の研究

山口 建

II. 分担研究報告

1. 樹状細胞を用いたがんの免疫療法に関する研究

山口 建

2. がんの免疫療法における基礎技術に関する研究

若杉 尋

3. 免疫担当細胞移植技術を用いたがんの免疫療法に関する研究

峯石 真

4. 新しいがん抗原の探索に関する研究

河上 裕

5. がんのワクチン療法に関する研究

伊東 恭悟

6. 難治性がんに対するワクチン療法の開発と臨床評価

珠玖 洋

7. 膵がんの免疫療法に関する研究

岡 正朗

8. がん抗原ペプチドの合成に関する研究

望月 徹

9. プロスタグランジンによる抗腫瘍免疫応答誘導の研究

福島 雅典

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

平成12年度 総括研究報告書

新しいがん免疫療法の開発

主任研究者 山口 建 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

本研究では、難治がん治療成績の向上を目指した新しい免疫療法の開発を目的としている。がんの細胞療法としては、進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験の実施に向けた研究計画を完成させ、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を受けた。切除肺がんに対するMUC1-CTL療法では、術後肝転移の抑制効果を認めた。造血器腫瘍や難治性固形がんを対象とした移植免疫療法である骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）では、造血器腫瘍では27例中22例、固形腫瘍9例中6例が生存中である。このうち固形腫瘍では腫瘍縮小効果が腎がんの1例で、また腫瘍の増大が停止した例が4例認められた。

一方、がんのワクチン療法としては、進行上皮がんに対しHLA-A24拘束性ペプチド（SART1, SART3, Cyclophilin B, Lck）を用い、また乳がんを対象にHER2(63-71)ペプチドを用いたペプチドワクチン療法の第1相臨床試験を開始した。乳がんを対象としたCHP-HER2（HER2タンパクと疎水化多糖類の複合体）では、CTLとCD4⁺ヘルパーT細胞をともに刺激するpolyvalentワクチンとしての有効性が確認された。

本研究においては、より強力な新しい免疫療法の基盤技術を開発するための腫瘍抗原の探索や免疫遺伝子治療などの基礎的検討も行っている。腫瘍抗原の探索としては、血清中の抗体を指標に腫瘍由来のcDNAライブラリーから新しい抗原遺伝子を単離するserological identification of tumor antigens by cDNA expression cloning (SEREX)法を用いて、メラノーマや膵がんより新規の腫瘍抗原遺伝子を同定した。また、膵がんをはじめとする固形がん培養細胞株の上清中に産生・放出される腫瘍特異的な微量ペプチドをプロテインチップ法を用いて探索した。さらに、樹状細胞にサイトカイン遺伝子を導入し、抗腫瘍効果を増強させる免疫遺伝子治療についても、有効性に関する動物実験を行なった。

分担研究者

1. 山口 建 国立がんセンター研究所 副所長
2. 若杉 尋 国立がんセンター研究所 部長
3. 峯石 真 国立がんセンター中央病院 医長
4. 河上 裕 慶應義塾大学医学部 教授
5. 伊東 恭悟 久留米大学医学部 教授
6. 珠玖 洋 三重大学医学部 教授
7. 岡 正朗 山口大学医学部 教授
8. 福島 雅典 京都大学大学院医学研究科 教授
9. 望月 徹 静岡県立大学薬学部 助教授

A. 研究目的

本研究では、難治がん治療成績の向上を目指した新しい免疫療法を開発することを目的としている。研究内容としては、免疫担当細胞を用いた「がんの細胞療法」と抗原ペプチドを用いた「がんの

ワクチン療法」を2本の柱として行う。がんの細胞療法では、進行メラノーマや膵がんなどの難治がんに対して樹状細胞やCTL療法を導入し、治療効果につき検討する。骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）において認められる移植免疫効果を固形がんに応用し、有効性を評価する。NK様T細胞については、培養増幅技術を確認し、臨床応用の可能性を検討する。がんのワクチン療法としては、進行上皮がんに対してHLA-A24拘束性ペプチド（SART1, SART3, Cyclophilin B, Lck）、乳がんを対象としたHER2(63-71)ペプチドやCHP-HER2（HER2タンパクと疎水化多糖類の複合体）を用いたペプチドワクチン療法の第1相臨床試験を実施し、その安全性の評価を行い、さらにより強力な抗腫瘍効果を期待できる治療法の開発をめざす。がん抗原の探索では、SEREX法によりメラノーマおよび膵がんより新しいがん抗原を単離同定し、その

免疫原性の検討を行う。また、プロテインチップ法を用いて脾がん培養上清中に産生されるごく微量のがん抗原の単離同定を行う。免疫遺伝子治療の基礎検討では、樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入法を確立し治療への応用をめざす。

B. 研究方法

(1) 進行メラノーマおよび脾がんを対象とした細胞免疫療法

進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法の臨床研究計画書を作成し、すでに国立がんセンター倫理審査委員会にて承認を受けている。研究計画書の中で使用予定であるHLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドをそれぞれ5種類ずつ合成し、健康人由来の樹状細胞およびT細胞を用いて、CTLの誘導実験を行った。さらに、A2またはA24拘束性の5種類のペプチドを合わせたペプチドカクテルを作製し、同様にCTL細胞の誘導活性につき検討した。次に脾がん切除例を対象として、脾がん培養細胞により誘導したCTLを用い、術後1週間目より投与を行い、再発形式および生存期間への効果を検討した。

(2) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植

造血器腫瘍の患者では通常同種移植の適応とならない高齢の患者や臓器障害のある患者において、また固形腫瘍では通常の治療法で治療の望めない転移性の患者を対象とした。HLA一致または1抗原ミスマッチのドナーからG-CSF投与によって動員された末梢血幹細胞を採取し、免疫抑制を中心とする前処置(フルダラビンまたはクラドリビンおよびブスルファン±抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン)の後に同種造血幹細胞移植を行った。移植後は移植片対腫瘍効果を誘導するため免疫抑制剤を減量中止し、生着、合併症、抗腫瘍効果および血液のキメラの状態を定期的に調べた。

(3) NK様T細胞の増幅および移植免疫での役割

G-CSFにより動員された単核球を成分採血により採取し、interleukin (IL)-2およびNK様T細胞リガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer)の存在下にて培養を行い、TCRV α 24陽性NK様T細胞の増幅につき検討した。またNK様T細胞が骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の系でどのような影響を及ぼすかを解明するため、急性移植片対宿主病モデルマウスの系を用いて、 α -GalCer投与による影響を検討した。マウスは(BALB/c \times C57BL/6) F1(CBF1;H-2^{b/d})をホストに、C57BL/6 (B6; H-2^{b/b})をドナーとして用いた。CBF1にB6由来脾細胞 1×10^8 をday 0とday 7に尾静脈投与し、day 14, day 21およ

びday 42に各組織(脾、肝、末梢血、骨髄)での単核球のフェノタイプとキメリズムの解析及び移植片対宿主反応を解析した。

(4) がんのワクチン療法の開発

進行上皮がんに対するHLA-A24拘束性ペプチド(SART1, SART3, Cyclophilin B, Lck)を用いた治療法および乳がんを対象としたHER2(63-71)ペプチドを用いた治療法の第I相臨床試験を実施した。HLA-A24拘束性ペプチド分子については、good manufacturing practices (GMP)グレードで臨床応用可能なペプチドを不完全フロインドアジュバンド(montanide ISA-51)と共に皮下投与を行った。エンドポイントは有害事象の有無及びCTL誘導能の有無とした。また、新しいワクチン製剤としてCHP-HER2 (HER2タンパクと疎水化多糖類の複合体)を作成し、樹状細胞を介したマウスへの免疫によりHER2特異的なCD8⁺CTLやヘルパーT細胞の誘導活性について検討し、ワクチンとしての有効性を評価した。CHP-HER2は、天然多糖プルランに疎水基としてコレステロール基を100単糖当たり1~5個(重量比で5%以下)導入した疎水化多糖とヒトHER2の組み替え蛋白(N末端より147アミノ酸残基を含む)を用いて作製された。

(5) SEREX法を用いた新規ヒトがん抗原の単離

各種がん細胞からcDNA発現ライブラリーを作製して、がん患者血清抗体を用いたスクリーニングによりがん抗原遺伝子を単離した。単離した抗原は、RT-PCR法やノザンプロット法により組織特異的発現性を検討して、新しい診断法や免疫療法に有用となる可能性のあるがん抗原を同定した。有用である可能性のあるがん抗原に対しては、その全長cDNA単離による、遺伝子・蛋白の構造解析、機能推定、免疫原性の検討を詳細に行う。

(6) プロテインチップによる脾がん抗原の探索

脾がん培養細胞が無血清化した培養上清中に産生分泌する微量ペプチドをプロテインチップ質量分析計を用いて分析する。無血清化した培養上清2 μ lをチップに装填し、分子量2,000 - 10,000の領域でマスペクトルの解析を行う。多数のがん培養細胞について産生ペプチドを網羅的に解析し、脾がん特異的なペプチドにつきタンデム質量分析法を用いてアミノ酸配列を決定する。また、得られた抗原ペプチドに関して、CTL活性の誘導を含む免疫原性の検討を行う。

(7) 長鎖MUC1ペプチドの化学合成

分子量1万以上のペプチドの化学合成は従来の方法では困難が予想されることから、縮合反応に用いるBoc-アミノ酸を出発物質の4倍等量用い、縮合試薬は最近開発された2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-

1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)を用いた。まず、Ac-Lys-Gly-Lys-Resin, Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin, Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin および Ac-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Lys-Resin を調製した。ついで、各Lys残基側鎖のε-アミノ基上に20アミノ酸残基のMUC1一次構造に従い、そのC末端アミノ酸から順次TBTUを縮剤として導入しペプチド鎖を延長した。粗製ペプチドはSephadex G-50カラム(3×140 cm)を用いてゲル濾過し、次いでC18またはC8分取用カラム(2×25cm)を用い、逆相HPLCで精製した。

(8) レトロウイルスを用いた樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入

サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を用いた免疫療法は、樹状細胞にて誘導される免疫応答を増強し、強い抗腫瘍効果が期待できる。レトロウイルスベクターであるpMXを用いて、マウスIL-2, IL-12及びgreen fluorescence protein (GFP) 遺伝子を発現するウイルスベクターを作成した。レトロウイルスの産生細胞として293細胞を使用し、その培養上清をマウス樹状細胞への遺伝子導入に用いた。マウス骨髄前駆細胞にウイルスを含む培養上清を加え、48時間培養した後granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), stem cell factor (SCF), tumor necrosis factor (TNF)-αの存在下に12日間培養を継続し、IL-2およびIL-12を産生する樹状細胞を得た。これらの細胞を用いてB16メラノーマ腫瘍担がんマウスへの投与を施行し、抗腫瘍効果を検討した。

(倫理面への配慮)

(1) 新しい免疫療法の臨床研究(第I相試験)については、各施設の倫理審査委員会での承認とインフォームド・コンセントを得る。

(2) ヒト由来の試料を用いる場合には、研究計画の倫理審査委員会による承認、被験者からのインフォームド・コンセントの取得と個人情報の保護につとめる。

C. 研究結果

(1) 進行メラノーマおよび膵がんを対象とした細胞免疫療法

HLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドは、個々においても、また5種類のペプチドを合わせたペプチドカクテルについても標的細胞に対するCTL活性を誘導し得た。さらに、ペプチドカクテルをパルスした樹状細胞を用いて誘導したCTL細胞では、一部のメラノーマ培養細胞に対

する障害活性も認められた。次に膵がん切除12例においてMUC1-CTLを用いた細胞療法を行い、術後肝転移再発は完全に防止された。1年生存率は約90%であり、4ヵ月で死亡した症例は、急激な局所再発によるものであった。また肝転移を有する2例の膵がん切除不能例に、樹状細胞とMUC1-CTLにて治療したところ、1例で6ヵ月間のNCを得た。

(2) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植

造血器腫瘍27例、固形腫瘍9例において骨髄非破壊的移植を施行した。この36例のうち34例が高齢や臓器障害にもかかわらず移植後早期にドナータイプの完全キメラを達成し、2001年3月末の時点で、造血器腫瘍においては22例が(うち18例が完全寛解を現在まで維持)、また固形腫瘍においては6例が生存中である。さらに、固形腫瘍のうち腫瘍縮小効果が腎がんの1例で、また腫瘍の増大が停止しNCとなっている例が4例認められた。移植片対宿主病と感染症に関しては通常の移植法と頻度、重症度とも変わりなく、その他の移植関連合併症に関しては通常の移植法よりも軽度であった。

(3) NK様T細胞の増幅および移植免疫での役割

ヒトNK様T細胞の一部を構成すると考えられるTCRVα24陽性T細胞をNK様T細胞リガンドであるα-GalCerの存在下で培養すると培養開始10日前後の短期培養期間中に細胞を約1000倍程度増殖させ得ることを発見し、NK様T細胞療法の臨床応用の可能性を示した。このNK様T細胞の前駆細胞がCD14陰性細胞に含まれ、CD14陽性細胞の補助の元にTCRVα24陽性T細胞に成熟することを見いだした。また、急性移植片対宿主病モデルマウスの系でα-GalCer投与による影響を検討したが、コントロール群では約90%の細胞がドナータイプの細胞であるのに対し、α-GalCer投与群ではドナー細胞の生着が殆ど認められなかった。マウス肝臓のrecipientリンパ球は、α-GalCer投与群ではNKおよびNK様T細胞の割合が増加していた。またα-GalCer投与群にNK1.1あるいはU5A2-13抗体を投与するとキメリズムがドナータイプになることを確認した。

(4) がんのワクチン療法の開発

これまでの解析では、投与したHLA-A24拘束性のペプチドによる有害事象は局所の発赤、腫脹以外認められていない。また、がん細胞及び投与ペプチドに対して特異的認識を示すCTLが6割の症例においてペプチド投与後増加(もしくは誘導)していることが確認された。組み替えHER2蛋白とコレステロール疎水化多糖類プルランの複合体

(CHP-HER2)により処理したHLA-A2402陽性樹状細胞が、HLA-A2402拘束性HER2(63-71)ペプチド特

異的CD8⁺CTLクローンにより殺傷され、HER2(63-71)ペプチドが樹状細胞に抗原提示されることが確認された。またCHP-HER2にて免疫したBALB/cマウスの膝窩リンパ節由来のCD4⁺T細胞株を作成し、HER2蛋白中には少なくとも5種類のCD4⁺T細胞に反応するヘルパーエピトープが存在することを明らかにした。

(5) SEREX法を用いた新規ヒトがん抗原の単離

比較的予後のよかったメラノーマ患者血清を用いて、高色素産生性メラノーマ細胞株SKmel23から作製したcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、50個の陽性クローンが単離され、そのうち、20種類は既知蛋白を、6種は機能不明な蛋白をコードする遺伝子であった。同定された遺伝子KU-MEL-1は、メラノーマ細胞株と培養色素細胞に高発現が認められ、メラノーマ腫瘍組織および他のがん細胞株でも発現が認められたが、正常組織における発現は精巢に限られていた。

また膀胱がんに対し、SEREX法によるがん抗原の単離を試みた。47個の陽性クローンを単離し、19種類の異なる遺伝子を同定した。13個は既知遺伝子、6個は機能不明の蛋白をコードする遺伝子であった。そのうちのひとつKU-PAN-1は、健常人血清とは反応せず、膀胱がん患者血清のみと反応し、mRNAレベルでは、膀胱がん細胞株、膀胱がん組織だけでなく、乳がん、大腸がん、食道がん細胞株、および正常精巢に高発現を認めたが、他の培養細胞や正常組織では、ほとんど発現が認められなかった。

(6) プロテインチップによる膀胱がん抗原の探索

培養膀胱がん細胞34株、その他の培養がん細胞29株、正常膀胱上皮培養細胞2株につき産生されるペプチドをプロテインチップ法を用いて解析した。膀胱がん5株で特異的に発現し、他のがん細胞では認められないペプチドが検出された。タンデム質量分析法を用い、アミノ酸配列を検討した結果、10番染色体に存在する遺伝子がコードする蛋白の細胞外ドメインに一致する配列であることが確認された。

(7) 長鎖MUC1ペプチドの化学合成

精製して得られたMUC1並列型 dimer (40 mer), trimer (60 mer), tetramer (80 mer) および pentamer (100 mer)はいずれも酸分解物のアミノ酸分析およびToF-質量分析において理論値に一致する分析値を与えた。さらに分析用逆相HPLCでは単一の鋭いピークとして溶出され、精製ペプチドが目的とする構造を有する高純度単一物質であることを証明した。今後、個々の合成ペプチドにつきCTL誘導活性を検討する予定である。

(8) レトロウイルスを用いた樹状細胞へのサイ

トカイン遺伝子の導入

サイトカイン遺伝子 (IL-2, IL-12) を導入した樹状細胞の腫瘍内投与を受けたメラノーマ担がんマウスでは、コントロール群 (PBS, 遺伝子導入していない樹状細胞) に比較して著明な腫瘍縮小効果が見られ、また長期生存でも有意に生存期間の延長が認められた。これらのマウスでは、腫瘍特異的なCTLの誘導が確認された。

D. 考察

(1) 進行メラノーマおよび膀胱がんを対象とした細胞免疫療法

使用予定のメラノーマ関連ペプチドについては、ペプチドカクテルにてヒトのCTLが誘導可能である。今後、メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床研究においてそのCTL誘導活性ならびに抗腫瘍効果を検討して行く。膀胱がん切除例におけるMUC1-CTLを用いた細胞療法では、肝転移再発が抑制される傾向を認めた。問題点は、局所再発であり、これに対しては拡大郭清と術中放射線療法の線量増加により症例を重ね検討中である。免疫療法を補助療法の主軸とする効果が今後期待される。

(2) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植

この研究により骨髄非破壊的移植法は高齢あるいは臓器障害のある患者においても安全に実施しうることが示された。また弱い前処置でも免疫抑制剤の早期中止などによって移植片対腫瘍効果を引き起こすことにより強力な化学療法を用いた移植と比較しうる成績をあげられることが示された。固形腫瘍においても腎がんで抗腫瘍効果が見られたほか、他の腫瘍でも移植片対腫瘍効果の存在を示唆する所見が見られ今後の研究が待たれる。

(3) NK様T細胞の増幅

ヒトNK様T細胞であるTCRV α 24陽性T細胞を短期間で培養増幅することが可能となったため、臨床応用の可能性が強くなったと考える。今後増幅したNK様T細胞を用いた細胞療法の安全性・有効性を評価した上で、樹状細胞療法や腫瘍特異的なCTL療法への併用効果も期待される。

(4) がんのワクチン療法の開発

まず、HLA-A24拘束性いずれのペプチドワクチンにおいても安全性が確認され且つCTL誘導能もがん細胞及びペプチドに対して認められた。一方、PR以上の腫瘍退縮はペプチドワクチン単独では得られず、今後の課題として残されている。次に、HER2ペプチド複合体であるCHP-HER2は樹状細胞の貪食作用によって取り込まれ、MHCクラスI分子結合性ペプチドを提示するのみならず、少なく

とも5種類の異なるCD4⁺ヘルパーT細胞のエピトープペプチドが存在していることが明らかとなった。このことはCHP-HER2はHER2特異的なCTLおよびCD4⁺ヘルパーT細胞をともに刺激しうることを示しており、新しいタイプのpolyvalent ワクチンとして有用であると考えられ、今後の臨床応用が期待される。

(5) SEREX法を用いた新規ヒトがん抗原の単離

世界的にがん抗原の同定が進められているが、免疫療法に有用な抗原は、まだ、少数しか同定されていない。本研究においては、がん細胞の株化と腫瘍反応性T細胞の樹立が難しい多くのがんにも適応可能なSEREX法を用いて、新規ヒトがん抗原の単離を試みた。まずメラノーマと膵がんにおいて診断、治療に臨床応用できる可能性を示す新規がん抗原が得られた。今後SEREX法を他の様々ながん種にも応用して、より多くのがん抗原の同定が期待される。

(6) プロテインチップによる膵がん抗原の探索

培養細胞より産生される微量ペプチドのプロテインチップを用いた解析については、膵がんの特異的なペプチド以外にもがん細胞で普遍的に産生されるペプチドが複数同定されており、この方法の有用性が示されたと考える。

(7) 長鎖MUC1ペプチドの化学合成

従来方法では化学合成が困難であるとされた高分子ペプチドを並列型ポリマーとして設計し化学合成を検討した。その結果、分子量4111, 6165, 8220 および10274 の高分子ペプチドを高収率で得ることに成功し、採用した合成法および精製法が適切であったことが示された。MUC1並列型ポリマーは、20merのくり返し配列であるタンデムリピートを並列に複数個含んでおり、従来の20merMUC1よりは、強い免疫原性をもつことが期待される。

(8) レトロウイルスを用いた樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入

マウスのサイトカイン遺伝子(IL-2, IL-12)を導入した樹状細胞を用いた免疫療法は、明らかな有効性が認められた。しかし、ヒトCD34⁺細胞由来の樹状細胞への遺伝子導入の系は、まだ十分確立されておらず、今後ヒト樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入につき検討することが必要と思われる。

E. 結論

がんの細胞療法としてメラノーマの樹状細胞療法・膵がんのMUC1-CTL療法・骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植療法を検討した。メラノーマの樹状細胞療法については、CTL誘導活性のあるペプ

ドが選択され、臨床試験の準備が整った。膵がんのCTL療法については、12例において術後肝転移の抑制効果が認められ、症例の集積にて効果を確認する予定である。骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植については、その安全性が示され、また化学療法抵抗性の固形腫瘍でも移植片対腫瘍効果による免疫療法が有効である可能性が示された。このような移植免疫を用いた治療法は今後さらに発展することが期待される。細胞療法の一環としてヒトNK様T細胞について、TCRV α 24陽性T細胞を短期間で一挙に1000倍程度増殖させる方法を開発した。この結果免疫療法の効果増強にヒトNK様T細胞が有用か否かの検討が可能となった。

がんのペプチドワクチン療法では、HLA-A24拘束性の7つの異なるペプチドワクチンについて、第1相臨床試験を開始し、その安全性を確立し、またCTL誘導能の有無を明らかにした。HER2については、CTLエピトープとヘルパーエピトープの両者を含むHER2組み換え蛋白と疎水化多糖類の複合体(CHP-HER2)をpolyvalent ワクチンとして利用し、CTLとヘルパーT細胞の両者を活性化し得ることを明らかにした。

新しいがん抗原の探索については、SEREX法を用いて、新規メラノーマ抗原と膵がん抗原の単離同定に成功した。これら抗原は、その組織発現特異性および免疫原性から、がんの診断および免疫療法の標的抗原としての可能性を検討する。プロテインチップ法を用いた膵がん抗原ペプチドの探索では、膵がん5株で特異的に発現し、他のがん細胞では認められないペプチドが同定された。今後他のがん細胞での抗原ペプチドのスクリーニングにも応用が検討される。膵がん抗原ペプチドとしてMUC1非天然型並列ポリマー(100mer)が化学合成され、膵がんに対するペプチドワクチンとして期待される。新しい基盤的技術の開発としての免疫遺伝子治療については、サイトカイン遺伝子を導入したマウス樹状細胞の免疫療法としての有効性が確認された。

F. 健康危険情報

(1) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植における副作用の程度は、通常の移植に比べ軽度と考えられた。

(2) HLA-A24拘束性の7つのペプチドワクチンの投与を平成11年度から高度進行がん患者35名に対して行った。有害事象は、ワクチン投与部位のgrade Iの発赤・腫脹が約80%に認められた。それ以外の有害事象は認められなかった。

G. 研究発表

1. Maruyama, K., Tsukada, T., Honda, M., Nara-Ashizawa, N., Noguchi, K., Ceng, J., Ohkura, N., Sasaki, K. and Yamaguchi, K. : Complementary DNA structure and genomic organization of *Drosophila* *menin*. *Mol. Cell Endocrinol.* 168: 135-140, 2000.
2. Honda, M., Tsukada, T., Tanaka, H., Maruyama, K., Yamaguchi, K., Obara, T., Yamaji, T. and Ishibashi, M. : A novel mutation of the *MEN 1* gene in a Japanese kindred with familial isolated primary hyperparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 138-143, 2000.
3. Tsukada, T., Kishi, M., Obara, T. and Yamaguchi, K. : An intronic splicing mutation of the *MEN 1* gene. *Int. J. Cancer.* 87: 305, 2000.
4. Ohkubo, T., Ohkura, N., Maruyama, K., Sasaki, K., Nagasaki, K., Hanzawa, H., Tsukada, T. and Yamaguchi, K. : Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol. Cell Endocrinol.* 162: 151-156, 2000.
5. Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Hirai, K., Yokozawa, T., Kobayashi, K., Kuma, S., Kuma, K., Futami, H. and Yamaguchi, K. : Unilateral surgery supported by germline *RET* oncogene mutation analysis in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery* 24:1367-1372, 2000.
6. Hosono, T., Ohkura, N., Tsukada, T., Maruyama, K. and Yamaguchi, K. : Regulation of the NGFI-B family gene expression by steroid and related hormones in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed. Res.*, 21: 263-268, 2000.
7. Wada, S., Watanabe, M., Tsukada, T., Yasuda, S., Yamaguchi, K., Kitahama, S., Iitaka, M. and Katayama, S. : A germline mutation, 1001delC, of the multiple endocrine neoplasia type1 (*MEN1*) gene in a Japanese family. *Int. Med.* (in press)
8. Ohkura, N., Ohkubo, T., Maruyama, K., Tsukada, T. and Yamaguchi, K. : The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3. *Dev Neurosci.*, 23: 17-24, 2001.
9. Akiyama, Y., Watanabe, M., Maruyama, K., Ruscetti, F.W., Wiltrout, R.H. and Yamaguchi, K. : Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Therapy.* 7: 2113-2121, 2000.
10. Hojo, T., Akiyama, Y., Nagasaki, K., Maruyama, K., Kikuchi, K., Ikeda, T., Kitajima, M. and Yamaguchi, K. : Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vasculature in breast cancer tissues. *Cancer Lett.*, 2001(in press).
11. Sato, Kae., Sasaki, K., Akiyama, Y. and Yamaguchi, K. : Mass spectric high-throughput analysis of serum-free conditioned medium from cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 2001(in press).
12. Tajima, J., Heike, Y., Kato, K., Ikarashi, Y., Asada-Mikami, R., Yoshida, M., Kasahara, T., and Wakasugi, H. : Establishment and usefulness of an anti-human CD57 IgG1 monoclonal antibody. *Immunol. Lett.*, 72: 159-162, 2000.
13. Azuma, M., Kato, K., Ikarashi, Y., Asada-Mikami, R., Maruoka, H., Takaue, Y., Saito, A. and Wakasugi, H. : Cytokines production of U5A2-13-positive T cells by stimulation with glycolipid galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.*, 30: 2138-2146, 2000.
14. Noda, N., Ochiai, A., Miyazaki, K., Sugimura, T., Terada, M. and Wakasugi, H. : Detection of thioredoxin in gastric cancer: association with histological type. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2:519-528, 2000. (in press)
15. Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto, M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M. and Wakasugi, H. : Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.*, 61: 445-451, 2001.
16. Asada-Mikami, R., Heike, Y., Kanai, S., Azuma, M., Shirakawa, K., Takaue, Y., V. Krasnykh, D. Curiel, Terada, M., Abe, T. and Wakasugi, H. : Efficient gene transduction by RGD-fiber modified recombinant adenovirus into dendritic cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 2001(in press).
17. Saito, T., Seo, S., Tanosaki, R., Takaue, Y. and

- Mineishi, S. : Non-myeloablative stem cell transplantation using 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA) in a patient with myelodysplastic syndrome (MDS). *Experimental Oncology*, 22: 88-90, 2000.
18. Saito, T., Seo, S., Kanda, Y., Shoji, N., Ogasawara, T., Murakami, J., Tanosaki, R., Tobinai, K., Takaue, Y. and Mineishi, S. : Early onset *Pneumocystis carinii* pneumonia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.*, (in press)
19. Suenaga, K., Kanda, Y., Niiya, H., Nakai, K., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Takeuchi, T., Tanosaki, R., Makimoto, A., Miyawaki, S., Ohnishi, T., Kanai, S., Takaue, Y. and Mineishi, S. : Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp. Hematol.*, (in press)
20. Mineishi, S., Saito, T., Kanda, Y., Tanosaki, R., Tobinai, K. and Takaue, Y. : Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, (in press)
21. Kawakami, Y. : Immunotherapy of melanoma using T cell defined antigens. in "Cell Therapy" Ikeda, Y., Hata, J., Koyasu, S., Kawakami, Y., Hattori, Y., eds. Keio University Symposia for Life Sciences and Medicine, 5 : pp77-92, Springer , Tokyo, 2000.
22. Kawakami, Y., Suzuki, Y., Shofuda, T., Kuniwa, Y., Inozume, T., Dan, K., Sakurai, T. and Fujita, T. : T cell responses to melanoma and melanocytes. *Pigment Cell Research*, 13: 163-169, 2000.
23. Kawakami, Y. : New cancer therapy by immunomanipulation: Development of immunotherapy for human melanoma as a model system. *Cornea*, 19: 2-6, 2000.
24. Kageshita, T, Kawakami, Y. and Ono, T. : Clinical significance of MART-1 and HLA-A2 expression and CD8⁺ T cell infiltration in melanocytic lesions in HLA-A2 phenotype patients. *J. Dermatol. Science*, 25: 36-42, 2001.
25. Kawakami, Y., Wang, X., Shofuda, T., Sumimoto, H., Tupesis, J.P., Fitzgerald, E., and Rosenberg, S.A. : Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor infiltrating T lymphocytes. *J. Immunology*, 166: 2871-2877, 2001.
26. Nakao, M., Shichijo, S., Imaizumi, T., Inoue, Y., Matsunaga, K., Yamada, A., Kikuchi, M., Tsuda, N., Ohta, K., Takamori, S., Yamana, H., Fujita, H. and Itoh, K. : Identification of a gene coding for a new squamous cell carcinoma antigen recognized by the CTL. *J. Immunol.*, 164: 2565-2574, 2000.
27. Inoue, Y., Nakao, M., Matsunaga, K., Kikuchi, M., Gomi, S., Toh, U., Takamori, S., Yamana, H., and Itoh, K. : Induction of human leukocyte antigen-A26-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by a single peptide of the SART1 antigen in patients with cancer with different A26 subtypes. *J. Immunother*, 23: 296-303, 2000.
28. Kawagoe, H., Yamada, A., Matsumoto, H., Ito, M., Ushijima, K., Nishida, T., Yakushiji, M., and Itoh, K. : Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol.*, 76: 336-339, 2000.
29. Murayama, K., Kobayashi, T., Imaizumi, T., Matsunaga, K., Kuramoto, T., Shigemori, M., Shichijo, S., and Itoh, K. : Expression of the SART3 tumor-rejection antigen in brain tumors and induction of cytotoxic T lymphocytes by its peptides. *J. Immunother.*, 23: 511-518, 2000.
30. Shintaku, I., Kawagoe, N., Yutani, S., Hoshi, S., Orikasa, S., Yoshizumi, O., and Itoh, K. : Expression of the SART1 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *Urol. Res.*, 28: 178-184, 2000.
31. Kawano, K., Gomi, S., Tanaka, K., Tsuda, N., Kamura, T., Itoh, K. and Yamada, A. : Identification of a new endoplasmic reticulum-resident protein recognized by HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes of lung cancer. *Cancer Res.*, 60: 3550-3558, 2000.
32. Ito, M., Shichijo, S., Miyagi, Y., Kobayashi, T., Tsuda, N., Yamada, A., Saito, N. and Itoh, K. : Identification of SART3-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with different HLA-A2 subtypes. *Int. J.*

Cancer, 88: 633-639, 2000.

33. Kawagoe, N., Shintaku, I., Yutani, S., Etoh, H., Matuoka, K., Noda, S. and Itoh, K. : Expression of the sart3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 164:2090-2095, 2000.

34. Nishizaka, S., Gomi, S., Harada, K., Oizumi, K., Itoh, K. and Shichijo, S. : A new tumor-rejection antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes infiltrating into a lung adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 60: 4830-4837, 2000.

35. Toh, U., Yamana, H., Sueyoshi, S., Tanaka, T., Niiya, F., Katagiri, K., Fujita, H., Shirozou, K. and Itoh, K. : Locoregional cellular immunotherapy for patients with advanced esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6: 4663-4673, 2000.

36. Harashima, N., Tanaka, K., Sasadomi, T., Locoregional, Y., Miyagi, Y., Yamada, A., Tamura, M., Yamana, H., Itoh, K. and Shichijo, S. : Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by T cells of metastatic cancer patients. *Eur. J. Immunology*, 31: 323-332, 2001.

37. Suefuji, Y., Sasatomi, T., Shichijo, S., Nakagawa, S., Deguchi, H., Koga, T., Kameyama, T. and Itoh, K. : Expression of SART3 antigen and induction of CTLs by SART3-derived peptides in breast cancer patients. *British J. Cancer*, 2001.(in press.)

38. Ito, M., Schichijo, S., Tsuda, N., Ochi, M., Harashima, N., Saito, N. and Itoh, K. : Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 2001.(in press.)

39. Yutani, S., Shichijo, S., Inoue, Y., Kawagoe, N., Okuda, K., Kurohiji, T., Tanaka, M., Sata, M. and Itoh, K. : Expression of the SART1 tumor-rejection antigen in hepatocellular carcinomas. *Oncol. Rep.*, 8: 369-372, 2001.

40. Okugawa, T., Ikuta, Y., Takahashi, Y., Obata, H., Tanida, K., Watanabe, M., Imai, S., Furugen, R., Nagata, Y., Toyoda, N. and Shiku, H. : A novel HER2-

derived peptide homologous to the mouse Kd restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24 restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur. J. Immunology*, 11: 3338-46, 2000.

41. Hanson, H. L., Donermeyer, D. L., Ikeda, H., White, L. M., Shankaran, V., Old, L. J., Shiku, H. Schreiber, R. D. and Allen, P. M. : Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity*, 13: 265, 2000.

42. Ikuta, Y., Okugawa, T., Furugen, R., Nagata, Y., Takahashi, Y., Wang, L., Ikeda, H., Watanabe, M., Imai, S. and Shiku, H. : An HER2/neu-derived peptide, a Kd-restricted murine tumor rejection antigen, induced HER2-specific HLA-A2402-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 87: 553-558, 2000.

43. Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., Nishii, K., Masuya, M., Yasukawa, K., Minami, N. and Shiku, H. : Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br. J. Haematol.*, 109: 288-295, 2000.

44. Sawa, H., Kobayashi, T., Mukai, K., Zhang, W. and Shiku, H. : Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATOIII gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *Int. J. Oncology* 16: 745-749, 2000.

45. Nakase, K., Bradstock, K., Sartor, M., Gottlieb, D., Byth, K., Kita, K., Shiku, H. and Kamada, N. : Geographic heterogeneity of cellular characteristics of acute myeloid leukemia: a comparative study of Australian and Japanese adult cases. *Leukemia*, 14: 163-168, 2000.

46. Nishii, K., Katayama, N., Mitani, H., Matsumoto, T., Miwa, H., Kita, K. and Shiku, H. : Effects of cyclosporin A on refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Hematology*, 71: 59-65, 2000.

47. Nakase, K., Hasegawa, M., Tsuji, K., Ikeda, T., Tamaki, S., Tanigawa, M., Miyanishi, E. and Shiku, H. : HTLV-1 unrelated adult T-cell unique phenotype and

karyotype. *Amer. J. Hematology*, 64: 64-66, 2000.

48. Toyoda, H., Nakamura, T., Shinoda, M., Suzuki, T., Hatooka, S., Kobayashi, S., Ohashi, K., Seto, M., Shiku, H. and Nakamura, S. : Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Digestive Diseases & Sciences*, 45: 864-869, 2000.

49. Nakase, K., Wakita, Y., Minamikawa, K., Yamaguchi, T. and Shiku, H. : Acute promyelocytic leukemia with del(6)(p23). *Leukemia Research*, 24: 79-81, 2000.

50. Suzuki, N., Tanaka, S., Maeda, Y., Hida, N., Mine, T., Yamamoto, K., Oka, M. and Itoh, K. : Detection of peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors used for specific immunotherapy for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, (in press.)

51. Yoshimura, K., Hazama, S., Iizuka, N., Yoshino, S., Yamamoto, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Noma, T. and Oka, M. : Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and Igk leaded sequence. *Human Cancer Therapy*, (in press.)

52. Yamamoto, K., Yahara, N., Gondo, T., Ishihara, T. and Oka, M. : Establishment and characterization of a new human pancreatic cancer cell line, YPK-1. *Bulltin Yamaguchi*, (in press.)

53. Yoshino, S., Hamama, S., Yoshimura, K., Tabata, T., Oka, M. : Immunoregulatory effects of the anticancer polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Research* 20: 4707-4712, 2000.

54. Mori, N., Oka, M., Iizuka, N., Yamamoto, K., Yoshino, S., Tangoku, A., Noma, T. and Hirose, K. : Detection of telomerase activity in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer using immunomagnetic beads. *British J. Cancer*, 83: 1026-1032, 2000.

55. Iizuka, N., Miyamoto, K., Tangoku, A., Hayashi, H., Hazama, S., Yoshino, S., Hirose, K., Yoshida, H. and Oka, M. : Down regulation of intracellular nm23-H1

prevents cisplatin-induced DNA damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na⁺, K⁺-ATPase. *British J. Cancer*, 83: 1209-1215, 2000.

56. Ohno, R., Yamaguchi, Y., Toge, T., Kinouchi, T., Kotake, T., Shibata, M., Kiyohara, Y., Ikeda, S., Fukui, I., Gohchi, A., Sugiyama, Y., Saji, S., Hazama, S., Oka, M., Ohnishi, K., Ohhashi, Y., Tsukagoshi, S. and Taguchi, T. : A dose-escalation and pharmacokinetic study of subcutaneously administered recombinant interleukin 12 and its biological effects in Japanese patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Reseach*, 6: 2661-2669, 2000.

57. Kodaira, T., Kato, I., Li, J., Mochizuki, T., Usuki, Y., Oguri, H. and Yanaihara, N. : Novel ELISA for the measurement of immunoreactive Bisphenol A. *Biomed. Res.*, 21: 117-121, 2000.

58. Ogata, M., Kajiyama, F., Iguchi, K., Mochizuki, T. and Hoshino, M. : Production and secretion of galanin-related peptides in human small cell lung carcinoma. *Peptide Science*, 1999.(ed. N. Fujii), The Japanese Peptide Society, pp.213-216, 2000.

59. Fukushima, S., Takeuchi, Y., Kishimoto, S., Yamashita, S., Uetsuki, K., Shirakawa, S., Sawada, J., Kojima, M., Suzuki, M., Furuta, K., Noyori, R., Sasaki, H., Kikuchi, Y., Kita, T., Yamori, T., Hazato, A., Kurozumi, S. and Fukushima, M. : Antitumor Activity, Optimum Administration Method and Pharmacokinetics of 13, 14-Dihydro-15-deoxy- Δ 7-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) Intergrated in Lipid Microspheres (Lipo TEI 9826)1. *Anti-Cancer Drugs*. 12, 2001.(in press.)

60. Fukushima, S., Kishimoto, S., Takeuchi, Y. and Fukushima, M. : Preparation and evaluation of o/w type emulsions containing antitumor prostaglandin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45: 65-75, 2000.

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
平成12年度分担研究報告書

樹状細胞を用いたがんの免疫療法に関する研究

分担研究者：山口 建 国立がんセンター研究所 副所長

研究要旨

本研究では、難治がんに対する新しい免疫療法として樹状細胞を用いた臨床研究の施行を目的としている。臨床病期第IV期の進行悪性黒色腫を対象にメラノーマ腫瘍抗原ペプチドを用いた樹状細胞療法の臨床試験計画書を作成した。使用予定であるHLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍抗原ペプチドにより、HLA-A2またはA24分子を発現する標的細胞に対するCTL活性を誘導し得た。すでに臨床試験計画書は、倫理審査委員会にて承認されており、平成13年6月より開始予定である。さらに、樹状細胞にサイトカインの遺伝子を導入し、抗腫瘍効果を増強させる免疫遺伝子治療についても、有効性に関して動物実験による検討を行なった。また、膀胱がんをはじめとする固形がん培養細胞株の上清中に分泌される腫瘍特異的な微量のがん抗原ペプチドをプロテインチップ法を用いて同定した。

A. 研究目的

本研究では、難治がん治療成績の向上を目指した新しい免疫療法を開発し、その有効性を確認することを目的とする。抗原提示細胞として知られる樹状細胞は、さまざまな形で多くのがん抗原を取り込み、細胞表面に組織適合抗原との複合体として表出されT細胞を特異的に刺激することが示されている。今回我々は、臨床病期第IV期の進行悪性黒色腫に対して効果的な免疫療法を開発する目的にて、メラノーマ関連抗原ペプチドを用いた樹状細胞療法の臨床試験計画書を作成する。さらに、それに先立って、合成したメラノーマ関連抗原ペプチドに関してCTLの誘導活性を確認し、必要な検討を行う。また、それと平行して新しい基盤的治療技術の開発として樹状細胞を利用した免疫遺伝子治療をめざした基礎的検討を行う。新しいがん抗原の探索を目的として、膀胱がんをはじめとする固形がん培養上清中に産生・放出される腫瘍特異的な微量ペプチドをプロテインチップ法を用いて解析する。

B. 研究方法

(1) 進行メラノーマを対象とした細胞免疫療法に関する研究
進行メラノーマを対象とした腫瘍特異的樹状細胞療法の臨床試験計画書を作成し、国

立がんセンター倫理審査委員会にて承認を受けている。計画書において使用予定であるHLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドをそれぞれ5種類ずつ(A2 : MART1, AAGIGILTV; gp100, IMDQVPFSV; Tyrosinase, YMDGTNSQV; MAGE-2, YLQLVFGIEV; MAGE-3, FLWGPRALV; A24 : gp100, VWKTWGQYW; Tyrosinase, AFLPWHRFLF; MAGE-1, NYKHCFPEI; MAGE-2, EYLQLVFGI; MAGE-3, IMPKAGLLI)合成し、健康人由来の樹状細胞およびT細胞を用いて、CTLの誘導実験を行った。さらに、A2またはA24拘束性の5種類のペプチドを合わせたペプチドカクテルを作成し、同様にCTL細胞の誘導活性につき検討した。

(2) レトロウイルスを用いた樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入
サイトカイン遺伝子を導入した樹状細胞を用いた免疫療法は、樹状細胞にて誘導される免疫応答を増強することにより、強い抗腫瘍効果を期待できる。レトロウイルスベクターであるpMXを用いて、マウスIL-2, IL-12及びgreen fluorescence protein (GFP)遺伝子を発現するウイルスベクターを作成した。レトロウイルスの産生細胞として293細胞を使用し、その培養上清をマウス樹状細胞への遺伝子導入に用いた。マウス骨髄前駆

細胞にウイルスを含む培養上清を加え、48時間培養した後、mGM-CSF, mSCF, mTNF- α の存在下に12日間培養を継続し、IL-2およびIL-12を産生する樹状細胞を得た。これらの細胞を用いてB16メラノーマ腫瘍担がんマウスへの投与を施行し、抗腫瘍効果を検討した。

(3) プロテインチップ法を用いた膵がん抗原の探索

膵がん培養細胞が無血清化した培養上清中に産生分泌する微量ペプチドをプロテインチップ質量分析計を用いて分析する。無血清化した培養上清2 μ lをチップに装填し、分子量2,000~10,000の領域でマスマスペクトルの解析を行う。多数のがん培養細胞について産生ペプチドを網羅的に解析し、膵がん特異的なペプチドにつきタンデム質量分析法を用いてアミノ酸配列を決定する。また、得られた抗原ペプチドに関して、CTL活性の誘導を含む免疫原性の検討を行う。

(倫理面への配慮)

(1) 新しい免疫療法の臨床試験(第I相試験)については、各施設の倫理審査委員会での承認とインフォームド・コンセントを得る。

(2) ヒト由来の試料を用いる場合には、研究計画の倫理審査委員会による承認、被験者のインフォームド・コンセントの取得と個人情報の保護につとめる。

C. 研究結果

(1) 進行メラノーマを対象とした細胞免疫療法に関する研究

HLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ腫瘍関連ペプチドは、個々においても、また5種類のペプチドを合わせたカクテルペプチドについても、ペプチドをパルスしたHLA-A2またはA24分子を発現する標的細胞(ヒトEB virus-transformed B cell line; .221A2.1 for A2, TISI for A24)に対するCTL活性を誘導し得た。またペプチドカクテルに対して得られたCTL活性は、抗HLA-class I抗体の添加によりほぼ抑制された。さらに、ペプチドカクテルをパルスした樹状細胞を用いて誘導したCTL細胞で、一部のメラノーマ培養細胞に対する障害活性も認められた。

(2) レトロウイルスを用いた樹状細胞へ

のサイトカイン遺伝子の導入

サイトカイン遺伝子(IL-2, IL-12)を導入した樹状細胞の腫瘍内投与を受けたB16メラノーマ担がんマウスでは、コントロール群(PBS, 遺伝子導入していない樹状細胞)に比較して著明な腫瘍縮小効果が見られ、また長期生存でも有意に生存期間の延長が認められた。これらのマウスでは、腫瘍特異的なCTLの誘導が確認された。

(3) プロテインチップ法を用いた膵がん抗原の探索

培養膵がん細胞34株、その他の培養がん細胞29株、正常膵管上皮培養細胞2株につき産生されるペプチドをプロテインチップ法を用いて解析した。膵がん5株で特異的に発現し、他のがん細胞では認められないペプチドが検出された。タンデム質量分析法を用い、アミノ酸配列を検討した結果、10番染色体に存在する遺伝子がコードする蛋白の細胞外ドメインに一致する配列であることが確認された。

D. 考察

(1) 進行メラノーマを対象とした細胞免疫療法

メラノーマ関連ペプチドについては、ペプチドカクテルをパルスした樹状細胞によりヒトのCTLが誘導可能であることが明らかにされた。今後、メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床研究においてそのCTL誘導活性ならびに抗腫瘍効果が検討される予定である。

(2) レトロウイルスを用いた樹状細胞へのサイトカイン遺伝子の導入

マウスのサイトカイン遺伝子(IL-2, IL-12)を導入した樹状細胞を用いた免疫療法は、明らかな有効性を示した。しかし、ヒトCD34⁺細胞由来の樹状細胞への遺伝子導入の系は、まだ十分確立されておらず、今後ヒト樹状細胞へのサイトカイン遺伝子導入の技術開発につき検討することが必要と思われる。

(3) プロテインチップ法を用いた膵がん抗原の探索

培養細胞より産生される微量ペプチドのプロテインチップを用いた解析については、膵がんの特異的なペプチド以外にもがん細胞で普遍的に産生されるペプチドが複数同

定されており、この方法の有用性が示されたと考える。

E. 結論

がんの細胞療法としてメラノーマの樹状細胞療法については、合成したHLA-A2またはA24拘束性のメラノーマ関連ペプチドは、個々またはカクテルとしてそのCTL誘導活性が確認された。すでに臨床試験計画書は、倫理審査委員会にて承認されており、平成13年6月より開始予定である。新しい基盤的技術の開発としての免疫遺伝子治療については、サイトカイン遺伝子を導入したマウス樹状細胞の免疫療法としての有効性が確認された。プロテインチップ法を用いた膵がん抗原ペプチドの探索では、膵がん5株で特異的に発現し、他のがん細胞では認められないペプチドが同定された。今後他のがん細胞での抗原ペプチドのスクリーニングにも応用が検討される。

F. 健康危険情報

現時点では特にはない。

G. 研究発表

1. Maruyama, K., Tsukada, T., Honda, M., Nara-Ashizawa, N., Noguchi, K., Ceng, J., Ohkura, N., Sasaki, K. and Yamaguchi, K. : Complementary DNA structure and genomic organization of *Drosophila* menin. *Mol. Cell Endocrinol.* 168: 135-140, 2000.

2. Honda, M., Tsukada, T., Tanaka, H., Maruyama, K., Yamaguchi, K., Obara, T., Yamaji, T. and Ishibashi, M. : A novel mutation of the MEN 1 gene in a Japanese kindred with familial isolated primary hyperparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* 142: 138-143, 2000.

3. Tsukada, T., Kishi, M., Obara, T. and Yamaguchi, K. : An intronic splicing mutation of the MEN 1 gene. *Int. J. Cancer.* 87: 305, 2000.

4. Ohkubo, T., Ohkura, N., Maruyama, K., Sasaki, K., Nagasaki, K., Hanzawa, H., Tsukada, T. and Yamaguchi, K. : Early induction of the orphan nuclear receptor NOR-1 during cell death of the human breast cancer cell line MCF-7. *Mol. Cell Endocrinol.* 162: 151-156, 2000.

5. Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Hirai, K., Yokozawa, T., Kobayashi, K., Kuma, S., Kuma, K., Futami, H. and Yamaguchi, K. : Unilateral surgery supported by germline RET oncogene mutation analysis in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery* 24:1367-1372, 2000.

6. Hosono, T., Ohkura, N., Tsukada, T., Maruyama, K. and Yamaguchi, K. : Regulation of the NGFI-B family gene expression by steroid and related hormones in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed. Res.*, 21: 263-268, 2000.

7. Wada, S., Watanabe, M., Tsukada, T., Yasuda, S., Yamaguchi, K., Kitahama, S., Iitaka, M. and Katayama, S. : A germline mutation, 1001delC, of the multiple endocrine neoplasia type1 (MEN1) gene in a Japanese family. *Int. Med.* 2001 (in press).

8. Ohkura, N., Ohkubo, T., Maruyama, K., Tsukada, T. and Yamaguchi, K. : The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six3. *Dev Neurosci.*, 23: 17-24, 2001.

9. Akiyama, Y., Watanabe, M., Maruyama, K., Ruscetti, F.W., Wiltout, R.H. and Yamaguchi, K. : Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Therapy.* 7: 2113-2121, 2000.

10. Hojo, T., Akiyama, Y., Nagasaki, K., Maruyama, K., Kikuchi, K., Ikeda, T., Kitajima, M. and Yamaguchi, K. : Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. *Cancer Lett.*, 2001 (in press).

11. Sato, Kae., Sasaki, K., Akiyama, Y. and Yamaguchi, K. : Mass spectric high-throughput analysis of serum-free conditioned medium from cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 2001(in press).

H. 知的所有権の取得状況

現時点では特にはない。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

平成12年度 分担研究報告書

「がんの免疫治療のために有効なエフェクター細胞の開発に関する研究」

分担研究者 若杉 尋

国立がんセンター研究所・薬効試験部長

研究要旨

1) ヒト NK 様 T 細胞の一部と考えられている TCR V α 24 陽性 T 細胞を α -GalCer により短期間で一挙に 1000 倍程度増殖させる方法を開発した。2) ミニ移植モデルを確立することをめざす第1段階として、急性 GVHD モデルマウスの系を用いて、NKT 細胞リガンドである α -GalCer 投与による影響を検討した。3) ヒトの造血幹細胞移植においては、HLA 一致もしくは一座不一致ドナーからの移植が多いことを考慮して、マウスにおいても MHC 一座不一致間でのミニ移植モデルの樹立を試みた。

A. 研究目的

CTL, NK, NKT 細胞や DC 等の免疫担当細胞の役割を総合的に解析し、がんの治療法の確立に貢献することを本研究の目的とする。これらの免疫担当細胞のうち、特に NKT 細胞に注目して研究してきた。DC および DC 由来 exosome による NKT 細胞の活性化の解析から DC 療法および NKT 細胞療法の臨床応用を行う。さらに白血病の治療の一環として既に臨床では graft-versus-leukemia (GVL) 効果を用いたがん治療が行われ、一部に良好な結果が得られている。しかしその免疫学的解析は未解析のままになっており、この解析に着手し固形がんの治療に応用する。NKT 細胞やこれまでの CTL, NK 細胞などのエフェクター細胞による総合的ながん免疫療法の新たな展開を試みる。

B. 研究方法

U5A2-13 モノクローナル抗体を始め市販のマウスヒトリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて NKT 細胞の表現型を解析する。FACS analyzer や Cell sorter, MACS 大量細胞磁気分離装置などを用いて純化細胞を分離し、抗腫瘍活性などの機能を解析する。リンパ球のソースとしてマウスの系では、BALB/c, (BALB/c x C57BL/6) F1(CBF1;H-2^{b/d}), A/J (H-2D^d); C3H/He(H-2D^b), C57BL/6 (B6; H-2^{b/b})等の系統のマウスを用い、ヒトの時は健康人末梢血やがん患者末梢血を用いる。細胞培養は RPMI-1640 培地を用い、CO2 incubator 内で培養する。実験操作はクリーンベンチ内で行い、マウスの維持は SPF 条件

下の動物飼育室で行う。NKT 細胞の刺激には抗 CD3 抗体や α -galactocylceramide などを用いる。

C. 研究結果

ヒト NKT 細胞の一部を構成すると考えられる TCRV α 24 陽性 T 細胞を α -galactocylceramide の存在下で培養すると培養開始10日前後の短期培養期間中に細胞を約 1000 倍程度増殖させ得ることを発見し、NK 様 T 細胞療法の臨床応用の可能性を示した。このプレカーサ細胞が CD14 陰性細胞に含まれ、CD14 陽性細胞の補助の元に TCRV α 24 陽性 T 細胞に成熟することを見いだした。

2) 当センターでは現在ミニ骨髄移植が白血病以外にも腎がんなどの固形がんを対象として行われ始めている。ミニ移植は従来行われてきた骨髄破壊型の超大量化学療法の補助としての骨髄移植ではなく、免疫抑制を主眼とし骨髄破壊を最小限にとどめ、且つアロの免疫担当細胞による抗腫瘍免疫療法として臨床での応用が端緒に付いたばかりであり、臨床応用が基礎研究に先行した形となっている。つまり、ミニ移植で起こっている免疫応答は、何がエフェクター細胞であり、がん細胞の認識機構、活性化機構、細胞の傷害機構などの解析は殆ど行われていない。そこでミニ移植モデルを確立することをめざす第1段階として、その中でも Th1/Th2 バランスを司る細胞群として注目されている NKT 細胞が移植時にどのような影響を及ぼすかを解明するため、急性 GVHD モデルマウスの系を用いて、NKT 細胞リガンドである α -GalCer 投与による影響を検討した。マウスは(BALB/c x

C57BL/6) F1(CBF1;H-2^{b/d})をホストに, C57BL/6 (B6; H-2^{b/b})をドナーとして用いた。CBF1 に B6 由来脾細胞 1x10⁸を d0 と d7 に尾静脈投与し d14,21,42 に各組織(脾、肝、末梢血、骨髄)での単核球のフェノタイプとキメリズムの解析及び GVH 反応を解析した。α-GalCer は 1 回目の脾細胞移植直後(d0),d3,d7,d11 と投与開始時期を遅らせて 3 日間隔で計 6~3 回投与した。その結果、α-GalCer 非投与群では 2 週目以降から活動性低下、体重減少、脱毛が認められ、GVHD 発症と判断した。ドナー由来細胞は d14 で約 83%, d21 で 90%, d42 で約 71%と、いずれの場合でも Mixed Chimerism になっていた。d0 からの α-GalCer 投与群では体重減少などの GVHD は認められなかった。FACS にて各群のドナー細胞の割合を解析した結果、いずれの組織に存在しているリンパ球ともにコントロール群では 3 週間後には約 90%の細胞がドナータイプの細胞であるのに対し、α-GalCer 投与群ではドナー細胞の生着が殆ど認められなかった。このドナーリンパ球の生着拒絶は α-GalCer の投与タイミングを遅らせることによって軽減した。ドナータイプのリンパ球拒絶に関与する細胞を解析するため α-GalCer 投与後日目のマウス肝臓の recipient リンパ球のプロファイルを調べたところ非投与群に比べて α-GalCer 投与群では NK および NKT 細胞の割合が増加していた。また α-GalCer 投与群に NK1.1 あるいは U5A2-13 抗体を投与するとキメリズムがドナータイプになることからこのドナーリンパ球の生着拒絶には NK 細胞あるいは NKT 細胞が関与していることが示唆された。

3) ヒトの造血幹細胞移植においては、HLA 一致もしくは一座不一致ドナーからの移植が多いことを考慮して、マウスにおいても A/J (H-2D^d)をホストに、C3H/He(H-2D^k)をドナーにし、MHC 一座不一致間での移植を試みた。中央病院におけるミニ移植の前処置を基に、cladribine, cyclophosphamide, ratATG (+cyclosporineA) を用いた系においても day40 の時点で Mixed chimerism の状態が確認できた。今後さらにミニ移植モデルを確立し、これらのモデルを用いて、NK および NKT 細胞の役割を含めた免疫応答や抗腫瘍効果を解析するとともに、GVHD 抑制方法や DLI(donor lymphocyte infusion)のあり方など様々な臨床的課題についても探求してゆく所存である。

E. 考察と結論

これまでの研究成果として 1) ヒト NK 様 T 細胞の一部と考えられている TCRVα 24 陽性 T 細胞を短期間で一挙に 1000 倍程度増殖させる方法を開発した。2) 急性 GVHD モデルマウスの系を用いて、NKT 細胞リガンドである α-GalCer 投与による影響を検討した。コントロール群に比べ、α-GalCer 投与群では体重減少などの GVHD は認められなかった。α-GalCer 投与群ではドナー細胞の生着拒絶が認められた。α-GalCer の 10 日目以降の投与では逆にドナーリンパ球の生着を延長させた。NK1.1 あるいは U5A2-13 抗体を投与すると生着拒絶が認められないことからドナーリンパ球の生着拒絶には NK 細胞あるいは NKT 細胞が関与していることが示唆された。3) ミニ移植モデルの樹立についてはマウスにおいても A/J (H-2D^d)をホストに、C3H/He(H-2D^k)をドナーにし、MHC 一座不一致間での移植を試みた。中央病院におけるミニ移植の前処置薬剤を用いた系においても day40 の時点で Mixed chimerism の状態が確認できた。以上の結果から、NK 様 T 細胞を用いたがん免疫療法の臨床応用の可能性を示すことができたと確信する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tajima, J., Heike, Y., Kato, K., Ikarashi, Y., Asada-Mikami, R., Yoshida, M., Kasahara, T., Wakasugi, H. : Establishment and usefulness of an anti-human CD57 IgG1 monoclonal antibody. *Immunol. Lett.*, 72:159-162, 2000.

Azuma, M., Kato, K., Ikarashi, Y., Asada-Mikami, R., Maruoka, H., Takaue, Y., Saito, A., Wakasugi, H. : Cytokines production of U5A2-13-positive T cells by stimulation with glycolipid α-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.*, 30:2138-2146, 2000.

Noda, N., Ochiai, A., Miyazaki, K., Sugimura, T., Terada, M., Wakasugi, H. : Detection of Thioredoxin in Gastric Cancer: Association with Histological Type. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2:519-528, 2000. *In Press*,

Shirakawa, K., Tsuda, H., Heike, Y., Kato, K., Asada, R., Inomata, M., Sasaki, H., Kasumi, F., Yoshimoto,

M., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., Wakasugi, H. : Absence of Endothelial Cells, Central Necrosis, and Fibrosis Are Associated with Aggressive Inflammatory Breast Cancer. *Cancer Res.*, 61:445-451, 2001.

Asada-Mikami, R., Hojike, Y., Kanai, S., Azuma, M., Shirakawa, K., Takaue, Y., V. Krasnykh, D. Curiel, Terada, M., Abe, T., Wakasugi, H. : Efficient Gene Transduction by RGD-fiber Modified Recombinant Adenovirus into Dendritic Cells. *JJCR*, 2001. *In press*.

2. 学会発表

SART-1 PAP 由来 HLA-A2402 結合性ペプチドに対する特異的細胞の誘導と PAP 蛋白抗原を用いた細胞療法における免疫学的評価の検討：井上佳子、加藤和則、武井正夫、高上洋一、蔦巢賢一、垣添忠生、伊東恭悟、若杉尋

慢性リンパ球白血病に対する CD40 リガンド遺伝子療法と自己白血病特異的免疫応答の解析：加藤和則、L. Z. Rassenti、W.G. Wierda、若杉尋、T.J. Kipps

G-CSF 投与後末梢血からのヒト V α 24⁺ NKT 細胞の体外増殖法の確立：浅田三上留美子、平家勇司、高上洋一、阿部達生、若杉尋、

ヒト癌細胞におけるグニディマクリンへの感受性と PKC 発現について：吉田光二、平家勇司、大野茂男、Camalier Richard, Mayo Joseph G, Narayanan Ven L, 池川哲郎、若杉尋

CD40 リガンドとレチノイン酸による骨髓性白血病細胞の抗原提示細胞への分化と免疫反応誘導：加藤和則、吉田光二、原田ゆきえ、高上洋一、若杉尋

ヒト炎症性乳癌(IBC)に対する可溶化型 Flt-1 及び Tie-2 遺伝子導入アデノウイルスによる Anti-angiogenic therapy：森川隆之、白川一男、平家勇司、高橋美奈子、加藤和則、吉田光二、若杉尋

PAP 由来 HLA-A2402 結合性ペプチドに対する特異的 T 細胞の誘導と PAP 抗原を用いた細胞療法での免疫学的評価の検討：井上佳子、加藤和則、武井正夫、高上洋一、蔦巢賢一、垣添忠夫、伊東恭悟、若杉尋

炎症性乳癌における血管内皮構造を高率に欠損する血管新生：白川一男、平家勇司、高橋美奈子、加藤和則、吉田光二、森川隆之、若杉尋

レチノイン酸による TRAIL 誘発アポトーシスの相乗効果：若杉尋、吉田光二、加藤和則

Dendritic Cell Classical and Non-Classical NHC Class I Pathways Differentially Regulate NKT Cell Function: Critical Role of DC Maturation for NKT Cell IFN γ Production. : Yoshimori IKARASHI, Laurence ZITVOGEL, Hiro WAKASUGI

マウス NKT 細胞マーカー U5A2-13 の活性化リンパ球における発現と機能解析：菅原俊明、加藤和則、安本篤史、吉田光二、小林芳郎、若杉尋

ヒト V α 24 陽性 T 細胞の granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF) 刺激後末梢血単核球からの体外増殖：浅田三上留美子、平家勇司、加藤和則、金井幸代、高上洋一、阿部達生、若杉尋

急性 GVHD モデルマウスにおける NKT 細胞リガンド α -GalCer 投与の影響：金井幸代、浅田留美子、峯石真、平家勇司、加藤和則、若杉尋

活性化自己 T 細胞培養液によるマウスおよびヒト成熟樹状細胞の誘導：安本篤史、加藤和則、浅田留美子、石田良、小林芳郎、若杉尋

CD40 リガンドとレチノイン酸による骨髓性白血病細胞の抗原提示細胞への分化抗腫瘍免疫反応誘導：加藤和則、吉田光二、高上洋一、若杉尋

レチノイン酸による TRAIL 誘発アポトーシスの相乗効果：石田良、加藤和則、安本篤史、巖本三寿、吉田光二、若杉尋

H. 知的所有権の取得状況

1) ヒト TCR V α 24 陽性 T 細胞の増殖法の発見は『ナチュラルキラー T 細胞の増幅方法』（特許出願番号 2000-169430）として特許出願中である。

2) 急性 GVHD モデルマウスの系で α -GalCer 投与による影響を検討した成果は『 α -グリコシルセラミドによる移植片対宿主拒絶反応(GVHD)の抑制』（特許出願番号 2001-88639）として特許出願中である。

3) マウスにおけるミニ移植モデルの樹立についても特許出願予定である。

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

免疫担当細胞移植技術を用いたがんの免疫療法に関する研究

分担研究者 峯石 真 国立がんセンター中央病院幹細胞移植科

研究要旨 骨髄非破壊的移植法によりHLAの一致したあるいは非常に近いドナーから同種造血幹細胞移植を行い、移植された免疫担当細胞特にT細胞による移植片対腫瘍効果(GVLあるいはGVT効果)により腫瘍の根絶または縮小を図る。

A.研究目的

同種移植において移植片のドナーの腫瘍細胞に対する免疫効果(移植片対白血病効果、GVLあるいは移植片対腫瘍効果GVT)の治療における有用性を評価する。

B.研究方法

血液腫瘍の患者では通常と同種移植の適応とならない高齢の患者や臓器障害のある患者において、また固形腫瘍では通常の治療法で治癒の望めない転移性の患者を対象とした。HLA一致または1抗原ミスマッチのドナーからG-CSF投与によって末梢血幹細胞の採取を行い、免疫抑制を中心とする副作用の少ない前処置(フルダラビンまたはクラドリピンおよびブスルファン士ATG)によって同種造血幹細胞移植を行った。移植後はGVLまたはGVTを誘導するため免疫抑制剤を比較的早期に減量中止し、生着、合併症、免疫回復の経過および血液のキメラの状態を定期的に調べた。もしドナータイプの完全キメラになっていない場合にはドナーよりリンパ球輸注を施行した。

倫理面への配慮

この治療法は研究的方法であるためプロトコールはすべて国立がんセンター中央病院

の倫理委員会で承認を受けている。また、他に治療法のある患者は原則としてこのプロトコールには入らない。すなわち、血液腫瘍では移植の絶対適応であるが高齢あるいは臓器障害のため通常と同種移植が施行できない患者に限り、また固形腫瘍では転移性腫瘍で通常の方法では治癒が望めない場合にのみこの方法を適用する。

C.研究結果

Bにあげたような条件を満たす血液疾患27例、固形腫瘍9例において骨髄非破壊的移植を施行した。この36例のうち34例が高齢や臓器障害にもかかわらず移植後早期にドナータイプの完全キメラを達成し、2001年3月末までのところ血液疾患においては22例が(うち18例が完全寛解を現在まで維持)、また固形腫瘍においては6例が生存中である。また固形腫瘍のうち明らかな腫瘍縮小効果が見られたのが腎癌の1例、腫瘍の増大が停止しNCとなっている例が4例である。GVHDと感染症に関しては通常同種移植法と頻度、重症度とも変わりなく、その他の移植関連合併症に関しては通常同種移植法よりも軽度であった。

考察

この研究により骨髄非破壊的移植法は高年齢あるいは臓器障害のある患者においても安全に実施しうる事が示された。また弱い前処置でも免疫抑制剤の早期中止などによって GVL 効果を引き起こすことにより強力な化学療法を用いた移植と比較しうる成績をあげられることが示された。固形腫瘍においても腎癌で明らかな抗腫瘍効果が見られたほか、他の腫瘍でも GVT の存在を示唆する所見が見られ今後の研究が待たれる。

E. 結論

この研究により骨髄非破壊的移植法の安全性が示され、また化学療法抵抗性の固形腫瘍にさえも GVT による免疫療法が有効である可能性が示された。このような移植免疫を用いた治療法は今後さらに発展することが期待される。

F. 健康危険情報

通常の移植法でも見られる副作用が見られただけである。なお、副作用の程度は通常の移植法に比べ軽度と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Saito T, Seo S, Tanosaki R, Takaue Y, Mineishi S. Non-myeloablative stem cell transplantation using 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA) in a patient with myelodysplastic syndrome (MDS). *Experimental Oncology* 2000,22:88-90.
- ② Saito T, Seo S, Kanda Y, Shoji N,

Ogasawara T, Murakami J, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S: Early onset Pneumocystis carinii pneumonia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Hematol*. In Press.

- ③ Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, Nakai K, Saito T, Saito A, Ohnishi M, Takeuchi T, Tanosaki R, Makimoto A, Miyawaki S, Ohnishi T, Kanai S, Takaue Y, Mineishi S: Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* In Press.
- ④ Mineishi S, Saito T, Kanda Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y: Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. *Jpn J Clin Oncol*. In Press.

2. 学会発表

- ① Saito, Kanda Y, Kanai S, Ohnishi T, Kawano Y, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S. Successful Non-Myeloablative Transplant (NST) Using A Novel Combination Of Cladribine (2-CdA) / Busulfan (Bu) / ATG: Early Full Donor Chimerism But Delayed

Immune Reconstitution. Blood 2000,
96(Supple 1):782a.

H.知的所有権の出願・登録状況
特になし