

200/0141

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 口 建

平成14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. 隣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13年度 総括研究報告書

三

「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おり、がんの細胞療法とワクチン療法を2つの柱としている。がんの細胞療法としては、臨床病期第IV期の進行悪性黒色腫（HLA-A2またはA24）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第II相臨床試験が平成13年10月より開始された。これまでに6例が登録され、最大9回までの樹状細胞の投与が施行されている。明らかな有害事象は見られていない。抗腫瘍効果については、1例に肺およびリンパ節転移巣の明らかな縮小（PR）を認めている。切除脾がんに対するMUC1-CTL療法では、脾がん治癒切除16例中14例に術後肝転移の抑制効果が確認された。骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植（ミニ移植）については、ハイリスクの造血器腫瘍において通常と同種移植の場合と同等の治療効果が得られた。造血器腫瘍では、40例中無病生存が28例と良好であり、また固形腫瘍についても腎がん症例において明らかな抗腫瘍効果が認められた。ヒトNK様T細胞の培養増幅技術をメラノーマ担がんマウスモデルに応用し、G-CSFにて動員した末梢単核球から培養にて得られたNK様T細胞がin vivoにて抗腫瘍効果を発揮することが示された。

がんのワクチン療法については、ヒト上皮がん拒絶抗原として同定された遺伝子(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, lck, ART1, ART4)より、CTL前駆細胞の誘導活性を指標にペプチドを同定・合成し、高度進行上皮がんを対象に個々の症例の免疫特性を活かしたペプチドワクチン療法の第I相試験を施行した。有意な副作用は認めず、62症例中PRが2例に認められた。また高度進行脾がん14例に対してMUC1ペプチドワクチン療法の第I相試験を施行した。明らかな抗腫瘍効果は見られなかったが、重篤な有害事象は認めず治療の安全性が確認された。がん退縮抗原であるHER2由来のヘルパーエпитープが、HER2ペプチド特異的CTLの活性やin vivoでの抗腫瘍効果を増強することが示された。Serological identification of tumor antigens by cDNA expression cloning (SEREX)法を用いた新規ヒトがん抗原の単離に関する研究では、樹状細胞療法を施行した進行メラノーマ患者の血清を用いた検討で、新規遺伝子KU-MEL-1の発現が確認され、また膀胱がんの患者血清を利用して新規がん抗原遺伝子が単離されている。プロテインチップ法を用いた脾がん抗原の探索については、脾がん培養細胞株36例中5株で2種類のペプチドが特異的に産生されることが確認されており、現在腫瘍組織などでの発現を検討中である。

また免疫遺伝子治療をめざした基礎的研究では、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、脾がんを対象として動物実験による検討を行なう。

分担研究者

- |          |                    |          |                    |
|----------|--------------------|----------|--------------------|
| 1. 山口 建  | 国立がんセンター研究所<br>副所長 | 6. 珠玖 洋  | 三重大学医学部<br>教授      |
| 2. 若杉 尋  | 国立がんセンター研究所<br>部長  | 7. 岡 正朗  | 山口大学医学部<br>教授      |
| 3. 峯石 真  | 国立がんセンター中央病院<br>医長 | 8. 望月 徹  | 静岡県立大学薬学部<br>助教授   |
| 4. 河上 裕  | 慶應義塾大学医学部<br>教授    | 9. 福島 雅典 | 京都大学大学院医学研究科<br>教授 |
| 5. 伊東 恭悟 | 久留米大学医学部<br>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」を引き続き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療法に基づいた臨床試験を実施し、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同種移植免疫効果をハイリスクの血液腫瘍や転移性固形がんに応用し、さらに有効性を確認する。NK様T細胞については、培養増幅技術やCD1dテトラマーを利用し、臨床応用を実現させる。がんのワクチン療法としては、進行上皮がんに対してCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, lck, ART1, ART4)を用いた第I相臨床試験、乳がんを対象としたHER2p63-71ペプチドやヘルパーエピト-プを含むCHP-HER2

(HER2タンパクと疎水化他と多糖類の複合体)を用いたペプチドワクチン療法の第I相臨床試験を実施する。がん抗原の探索では、SEREX法を利用して膀胱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膵がん培養上清中に特異的に産生されるがん抗原ペプチドの同定を行い、腫瘍マーカーとして可能性につき検討する。免疫遺伝子治療の基礎検討では、膵がんを標的として、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膵がんを対象とした細胞免疫療法の臨床試験

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第I/II相試験を平成13年10月より開始している。対象は、臨床病期IV期の転移性メラノーマでHLA-A2またはA24陽性の患者とした。CTL誘導活性の確認された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種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成し、患者由来の樹状細胞をペプチドカクテルとKLHにて刺激後皮下投与を行った。最大10回まで樹状細胞の投与を行い、治療の安全性および有効性の評価を行う。次に膵がん治療切除例を対象として、膵がん培養細胞と患者末梢血単核球の共培養により誘導したCTLを用い、術後1週間より投与を行い、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（ミニ移植）

通常の移植法の適応とならない血液腫瘍や他に治療法のない転移性固形腫瘍の患者をフルダラビン、ブスルフェン±抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリンの前処置の後に同種造血幹細胞移植を施行する。移植後の生着の状態、血液細胞の混合キメラの状態、GVHDの程度、そして抗腫瘍効果を記載する。

(3) NK様T細胞の増幅およびマウスミニ移植モデルの樹立

NK様T細胞の増幅技術をin vivoにて確認する。G-CSFにて刺激したマウス脾細胞をIL-2と $\alpha$ -GalCer存在下に8日間培養しNK様T細胞を増幅した。Yac-1, B16メラノーマに対するin vitro細胞傷害活性とB16メラノーマ肺転移モデルに対するin vivo抗腫瘍効果を検討した。ミニ移植療法での抗腫瘍効果の免疫学的機序を動物実験において解明する目的で、A/J (H-2Dd)マウスをホストに、C3H/He(H-2Dk)マウスをドナーにし、MHC一座不一致間での移植を施行し、ミニ移植モデルの樹立を行う。

(4) がんのワクチン療法の開発

進行上皮がんに対してCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, lck, ART1, ART4)を用いた第I相臨床試験を実施する。HLA拘束性でCTL誘導可能なペプチドについては、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、HER2p63-71CTLエピト-プやヘルパーエピト-プ(HER2p16-30)を含むCHP-HER2(HER2タンパクと疎水化他と多糖類の複合体)を用いた乳がんを対象としたペプチドワクチン療法の第I相臨床試験を施行する予定である。これに先立った基礎的検討では、HER2発現肉腫CMS7HEを移植したマウスにおいて、HER2 CTLエピト-プとヘルパーエピト-プとの共免疫での抗腫瘍効果につき検討された。

(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成して、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(SEREX法)。単離した抗原は、RT-PCR法やノザンブ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する。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・蛋白質の構造解析、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<sub>1</sub>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、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。

(7) 長鎖MUC1ペプチドの化学合成

高抗原性がん抗原ペプチドの開発を目指し、非天然型並列型MUC1 pentamer(分子量; 10274)を合成し、ヒト膵がん培養細胞に対するCTL誘導活性を検討した。HLA-A24陽性ドナーより得た単球細胞をサイトカイン存在下で7日間培養して得られた樹状細胞にMUC1 pentamerを添加刺激し、CTLを誘導した。誘導したCTLのヒト膵がん培養株に対する細胞障害活性につき検討した。

(8) 膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発

進行膵がんは、きわめて難治性であり現在有効な治療法は、確立されていない。このため膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発を目的としてハムスター膵がんを用いた腹膜播種モデルを作成し、樹状細胞療法の有効性につき検討した。ハムスター膵がん細胞PGHAM-1 2x10<sup>6</sup>個を腹腔内投与し、3日後より腫瘍抗原にて処理したハムスター樹状細胞1x10<sup>7</sup>個またはPBSを1週ごとに3回腹腔内投与を行った。腫瘍接種後28日目にPGHAM-1細胞に対するCTL活性や腫瘍重量を計測し、抗腫瘍効果を検討した。さらに抗腫瘍効果を増強させる目的で、アデノウイルスベクターを用いたIL-12遺伝子のハムスター樹状細胞への導入技術を確立している。

(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の臨床試験

平成13年10月臨床試験開始後6例の進行メラノーマ患者(HLA-A2 3例, A24 3例)が登録され、最大9回まで投与が施行されている。これまでに明らかな有害事象は確認されていない。臨床的效果については、レベル1(1x10<sup>7</sup>細胞)の2症例が評価可能であり、それぞれPRとPDであった。PR症例では、肺およびリンパ節転移巣に明らかな縮小効果が認められた。ELISPOT反応による免疫学的解析では、PR症例においてHLA-A24ペプチドのうち4種類に強いペプチド特異的な細胞障害活性が確認されている。次に膵がんMUC1-CTL療法では、治療切除後の肝転移症例は、対照群33例中16例に対し、治療群では16例中2例と再発抑制効果が認められた。また1年生存率もCTL治療群において良好であった。

(2) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植(ミニ移植)

造血器腫瘍40例、固形腫瘍16例において骨髄非破壊的移植を施行した。血液腫瘍においては高齢者や臓器障害のあるハイリスクの患者において、通常リスクの患者に通常移植法を施行したと同等の全生存・無病生存率であり、28例が無病生存中である。固形腫瘍においては、特に腎癌で6例中PR 1例を含む5例で腫瘍の増大停止以上の効果が見られた。

(3) NK様T細胞の増幅およびマウスミニ移植モデルの樹立

G-CSFにて刺激したマウス脾細胞より、IL-2と $\alpha$ -GalCer存在下において、NK1.1陽性T細胞が増幅されることを確認した。培養細胞は、 $\alpha$ -GalCer非添加培養細胞に比べてYac-1とB16メラノーマに対して高い細胞傷害活性と、in vivoにおけるB16メラノーマの肺転移抑制を認めた。マウスミニ移植モデル系においては、day40の時点でMixed chimerismの状態が確認できた。今後このミニ移植モデルを用いて、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予定である。また、CD1d/a-GalCerテトラマーを作製し、これを用いることによってIL-2と $\alpha$ -GalCerにて誘導されたNK様T細胞は、CD8+NK1.1+NKT細胞とCD1d拘束性でNK1.1-

NKT細胞の2種類あることが明らかとなった。

#### (4) がんのワクチン療法の開発

進行上皮がんに対するCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, Ick, ART1, ART4)を用いた第I相臨床試験では、62症例が評価可能であったが、有害事象はいずれもグレードIIまでであり、ワクチンの安全性が確認された。HLA拘束性で腫瘍特異的なCTL活性は50%の症例において認められた。臨床効果においては、PR2, SD30, PD30であり、治療群において高いQOLと生存率の延長が認められている。

CHP-HER2に関する基礎的検討では、HER2 CTLエピトープとヘルパーエピトープとの共免疫にて腫瘍特異的なCTLの数が数倍に増加し、またin vivoでの抗腫瘍効果が著明に増強された。

#### (5) SEREX法を用いた新規ヒトがん抗原の単離

膀胱がん由来のcDNAライブラリーを用いたSEREX法により、KU-BL-1とKU-BL-50の2つの抗原遺伝子を単離した。単離抗原のmRNA発現は、KU-BL-1は正常組織では膀胱と精巣に、また6例中4例の膀胱がん細胞株、14例中全例で膀胱がん組織に発現を認めた。KU-BL-50は正常組織には発現を認めず、6例中2例の膀胱がん細胞株、8例中6例の膀胱がん組織に発現を認めた。つぎに樹状細胞を用いた免疫療法の第I相臨床試験を行った患者血清を用いて、SEREX法で単離したKU-MEL-1抗原に対する解析を行った。樹状細胞投与後の患者血清を用いて、免疫反応を調べたところKU-MEL-1に対する反応は7例中6例と高率にIgG抗体が認められたことから、KU-MEL-1は有効な抗原と考えられ、今後定量法を確立し更に解析を進める予定である。

#### (6) プロテインチップを用いた膀胱がん抗原の探索

プロテインチップ質量分析法を用いて膀胱がん培養株36株、膀胱duct cell由来細胞株2株、膀胱duct cell初代培養細胞、および非膀胱がん培養株36株由来の無血清化した培養上清を分析し、膀胱がん5株に分子量3335および2341のペプチドが選択的に発現することを明らかにした。タンデム質量分析により、前者は、がん抑制遺伝子産物と推定されているDeleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1) 蛋白質のC端29アミノ酸、後者は、家族性英国痴呆症の責任遺伝子産物で2型膜蛋白質であるintegral membraneprotein 2B/BRIのC端20アミノ酸であることを明らかにした。

#### (7) 長鎖MUC1ペプチドの化学合成

合成並列型MUC1 pentamer刺激により誘導されたCTLは、MUC1が高発現されている膀胱がん培養細胞株であるKP2N(HLA-A24陽性)、PSN1(A24陽性)およびKP1N(A2陽性)細胞に対してそれぞれ細胞障害活性を示したが、MUC1低発現のFA6(HLA-A24陽性)細胞に対する細胞障害活性はほとんど認められなかった。さらに、正常細胞のK562とHLA-A2402遺伝子を導入したfibroblastであるMRC-5細胞に対しては全く障害活性を示さなかった。

#### (8) 膀胱がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発

ハムスター膀胱がん細胞を用いた腹膜播種モデルの検討では、PBS投与(陰性コントロール)群の腫瘍重量および腹水量は、それぞれ $1.2 \pm 0.98$  g,  $6.2 \pm 2.1$  mlであったが、樹状細胞+tumor lysate治療群では、明らかな残存する腫瘍は認められなかった。PGHAM-1細胞に対するCTL活性は、樹状細胞+tumor lysate治療群において有意に腫瘍特異的な細胞障害活性が確認された。生存期間の検討でも樹状細胞治療群においてPBS投与群に比べて明らかな延命効果が見られている。

#### 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の臨床試験

進行メラノーマに対する樹状細胞療法の臨床試験が開始されており、今後症例の蓄積により樹状細胞療法の安全性および有効性に関して客観的な評価が可能となる。MUC1-CTLを用いた細胞療法にて、膀胱がん術後の肝転移再発が有意に防止できた。しかし、問題点は、局所再発であり、これに対しては癌ワクチン療法を併用するプロトコールを平成14年度に開始する。

##### (2) 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植(ミニ移植)

骨髄非破壊的移植法は血液疾患では高齢者や臓器障害のある患者など通常の移植法で合併症を起こす可能性の高い患者に対して安全に移植を施行する方法であることを確立した。また固形腫瘍においては、移植免疫効果を最大限に利用した免疫療法として有効であることを確認した。

##### (3) NK様T細胞の増幅およびマウスミニ移植モデルの樹立

新たに開発したヒトNKT細胞の短期間増殖法を、動物モデルを用いて確認した。さらに、CD1d/\_GalCcrテトラマーを作製し、\_GalCerに

反応性のNK様T細胞の挙動を追跡することを可能とした。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が示唆された。またマウスにおいてMHC一座不一致間でのミニ移植モデルが樹立され、移植免疫療法における抗腫瘍効果の機序の解明に向けて大いに役立つと考えられる。

#### (4) がんのワクチン療法の開発

特異免疫が誘導されているにもかかわらず抗腫瘍作用が一過性である誘因には、高度進行癌細胞のHLA-クラスI喪失や癌細胞の免疫抵抗性などのエスケープ現象であることが示唆された。しかし、ペプチドワクチン療法を受ける多くの症例においてはQOLは高く、合併症、有害事象が少なく、医療費も低いという特徴が見られた。以上により、平成14年4月より臨床効果を目的とした早期第II相臨床試験へ移行する十分な医学的根拠が得られたものと判断された。

また、HER2ペプチドのCTL活性化には、適切なヘルパーエピトープの存在が非常に重要であることが示され、平成14年度に予定されるCHP-HER2の臨床第I相試験の実施に向けて有用な知見であると考えられる。

#### (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。SEREX法は、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方法論であり、今後多くの新規ヒトがん抗原の単離が可能となる。

#### (6) プロテインチップを用いた膵がん抗原の探索

プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん培養細胞より特異的に分泌されるペプチドが2種類同定されている。プロテインチップ解析法の有用性が示されたのみならず、膵がん特異的な腫瘍マーカーの開発において今後の展望が期待される。

#### (7) 膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発

今回のハムスター膵がん腹膜播腫モデルにおいて、樹状細胞療法が有効な治療手段の一つであることが示唆されている。有効な治療法が確立されていない進行膵がんに対して基盤的治療技術を開発するという目的に関して、動物実験での樹状細胞投与の有用性は、今後の臨床試験を検討する上で意義があると思われる。

## 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・ミニ移植療法の臨床試験を施行している。メラノーマの樹状細胞療法については、臨床第III相試験が開始されており、治療の安全性や有効性に関して臨床データが蓄積されつつある。これまで登録された6症例について、有害事象は全くみられておらず、また1例においてPRを得ている。今後症例の集積によりさらに有効例の出現が期待される。膵がんのCTL療法については、16例において治癒切除後肝転移の抑制効果が確認された。ミニ移植については、合併症を起こす可能性の高いハイリスク患者に対しても安全に移植を施行でき、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。NK様T細胞については、短期間の増殖法の開発とCD1d/-GalCerテトラマーの作製によりNK様T細胞を用いたがん免疫療法への臨床応用が促進される。がんのペプチドワクチン療法では、進行上皮がんに対するCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定されたペプチド(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, Ick, ART1, ART4)やCTLおよびヘルパーエピトープを共に有するCHP-HER2など、より免疫誘導効果の強いペプチドを用いた臨床試験が進行しており、今後治療効果の改善が期待される。新しいがん抗原の探索については、SEREX法で膀胱がんにおいても新規のがん抗原が同定されており、スクリーニング法としてに有用性が示された。今後樹状細胞療法などの免疫療法有効例の血清を用いた検討で、さらに免疫原性が強くワクチンとして臨床応用可能ながん抗原の単離も期待できる。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も、膵がん5株で特異的に発現するペプチドが2種類同定されており、今後膵がん以外の腫瘍細胞の培養上清や臨床検体での解析も可能となると思われる。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樹状細胞療法の臨床応用に向けて具体的なプロトコールの作成を行う。

## F. 健康危険情報

平成12年10月から開始した進行上皮がんに対するCTL前駆細胞の誘導活性を指標に同定され

たペプチド(SART1, SART2, SART3, Cyclophilin B, Ick, ART1, ART4)を用いた第I相臨床試験の有害事象としては、ワクチン投与部位の発赤、腫脹 (grade I) が80%近くで認められ、硬結及び疼痛 (grade II) が50%で認められた。以上、これまでの経験では、いずれにおいても重篤な健康危険を疑わせる有害事象は、ワクチン投与により生じていないと判断される。

#### G. 研究発表

1. 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.*, 171: 103-110, 2001.
2. Maruyama, K., Akiyama, Y., Nara-Ashizawa, N., Hojo, T., Cheng, J. Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., and Yamaguchi, K. : Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells. *J. Immunotherapy*, 24: 345-353, 2001.
3. Nara-Ashizawa, N., Tsukada, T., Maruyama, K., Akiyama, Y., Kajimura, N., Iwanaga, T., and Yamaguchi, K. : Hypothalamic appetite-regulating neuropeptide mRNA levels in cachectic nude mice bearing human tumor cells. *Metabolism*, 150: 1213-1219, 2001.
4. Nara-Ashizawa, N., Akiyama, Y., Maruyama, K., Tsukada, T., and Yamaguchi, K. : Lipolytic and lipoprotein lipase (LPL)-inhibiting activities produced by a human lung cancer cell line responsible for cachexia induction. *Anticancer Res.*, 21: 3381-3383, 2001.
5. Sato, K., Sasaki, K., Akiyama, K., and Yamaguchi, K. : Mass spectrometric high-throughput analysis of serum-free conditioned medium from cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 170: 153-159, 2001.
6. Maruyama, K., Akiyama, Y., Cheng, J. Y., Nara-Ashizawa, N., Hojo, T., Sasaki, K., and Yamaguchi, K. : Hamster DEC205, its primary structure, tissue and cellular distribution. *Cancer Lett.*, 181: 223-232, 2002.
7. Akiyama, Y., Maruyama, K., Mochizuki, T., Sasaki, K., Takaue, Y., and Yamaguchi, K. : Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. *Immunol. Lett.*, 83: 21-30, 2002.
8. Akiyama, Y., Maruyama, K., Nara-Ashizawa, N., Hojo, T., Cheng, J. Y., Mori, T., Wiltrout, R. H., and Yamaguchi, K. : Antitumor effects induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Cancer Lett.*, in press.
9. 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.
10. Asada-Mikami, R., Heike, Y., Kanai, S., Azuma, M., Shirakawa, K., Takaue, Y., Krasnykh, V., Curiel, D. T., Terada, M., Abe, T., and Wakasugi, H. : Efficient gene transduction by RGD-fiber modified recombinant adenovirus into dendritic cells. *JJCR*, 92 : 321-327, 2001.
11. Ilkarashi, Y., Mikami, R., Bendelac, A., Terme, M., Chaput, N., Terada, M., Tursz, T., Angevin, E., Lemonnier, F. A., Wakasugi, H., and Zitvogel, L. : Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon  $\gamma$  production. *J. Exp. Med.*, 194 : 1-9, 2001.
12. Inoue, Y., Takaue, Y., Takei, M., Kato, K., Kanai, S., Harada, Y., Tobisu, K., Noguchi, M., Kakizoe, T., Itoh, K., and Wakasugi, H. : Induction of tumor specific cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer using prostatic acid phosphatase derived HLA-A2402 binding peptide. *J. Urology*, 166 : 1508-1513, 2001.

13. Yoshida, M., Weijian, F., Nishio, K., Takahashi, M., Heike, Y., Saijo, N., Wakasugi, H., and Ikekawa, T. : Antitumor action of the PKC activator gnidimacrin through CDK2 inhibition. *Int. J. Cancer*, 94 : 348-352, 2001.
14. Noda, N., and Wakasugi, H. : Cancer and oxidative stress. *JMJA*, 44 : 535-539, 2001.
15. Kato, K., Takaue, Y., and Wakasugi, H. : T cell conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. *J. Leukocyte Biology*, 70 : 941-949, 2001.
16. Niiya, H., Kanda, Y., Saito, T., Ohnishi, T., Kanai, S., Kawano, Y., Kamijo, K., Iizuka, A., Yakushijin, K., Ueda, K., Chizuka, A., Iijima, K., Ohnishi, M., Nakai, K., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., Takaue, Y., and Mineishi, S. : Early full donor myeloid chimerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. *Haematologica*, 86 : 1071-1074, 2001.
17. Shirakawa, K., Kobayashi, H., Heike, Y., Kawamoto, S., Brechbiel, M. W., Kasumi, F., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., and Wakasugi, H. : Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res.*, 62 : 560-566, 2002.
18. Kobayashi, H., Shirakawa, K., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Watanabe, I., Heike, Y., Togashi, K., Konishi, J., Brechbiel, M. W., and Wakasugi, H. : Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res.*, 62 : 860-866, 2002.
19. Saito, T., Mineishi, S., Kanda, Y., Shoji, N., Kato, K., Kanai, S., Ohnishi, T., Kawano, Y., Nakai, K., Ogasawara, T., Matsubara, H., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., and Takaue, Y. : Suggested therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan and anti-thymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, in press.
20. Kato, K., Sugahara, T., Yamamoto, A., Sancho, D., Yoshida, M., Ikarashi, Y., Takaue, Y., Kobayashi, Y., Sanchez-Madrid, F., and Wakasugi, H. : U5A2-13, an antigen originally found on mouse NK-like T cells, is an early inducible cell surface antigen during lymphoid activation. *Cell. Immunol.*, in press.
21. Shirakawa, K., Shibuya, M., Heike, Y., Takashima, S., Watanabe, I., Konishi, F., Kasumi, F., Goldman, C. K., Thomas, K. A., Bett, A., Terada, M., and Wakasugi, H. : Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int. J. Cancer*, in press.
22. Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., Kai, T., and Konishi, F. : Vasculogenic mimicry and pseudo comedo formation in breast cancer. *Int. J. Cancer*, in press.
23. 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., Tobinai, K., Takaue, Y., and Mineishi, S. : Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp. Hematol.*, 29:639-642, 2001.
24. Kanda, Y., Mineishi, S., Nakai, K., Saito, T., Tanosaki, R., and Takaue, Y. : Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing antithymocyte globulin. *Blood*, 97:3676-3677, 2001.
25. Saito, T., Nakamura, F., Kanda, Y., Tanosaki, R., Takaue, Y., and Mineishi, S. : Reduced intensity regimen for a second mismatched transplant. *Haematologica*, 86:780-781, 2001.

26. Niiya, H., Kanda, Y., Saito, T., Ohnishi, T., Kanai, S., Kaano, Y., Kamijo, K., Iizuka, A., Yakushijin, K., Ueda, K., Chizuka, A., Iijima, K., Ohnishi, M., Nakai, K., Makimoto, A., Tanosaki, R., Tobinai, K., Wakasugi, H., Takaue, Y., and Mineishi, S. : Early full donor myeloid chimerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. *Haematologica*, 86:1071-1074, 2001.
27. Kanda, Y., Mineishi, S., Saito, T., Saito, A., Ohnishi, M., Niiya, H., Chizuka, A., Nakai, K., Takeuchi, T., Matsubara, H., Makimoto, A., Tanosaki, R., Kunitoh, H., Tobinai, K., and Takaue, Y. : Response-oriented pre-emptive therapy against cytomegalovirus diseases with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. Transplantation, in press.
28. Kuniwa, Y., Fujita, T., Akada, M., Ito, K., Shofuda, T., Suzuki, Y., Yamamoto, A., Saida, T., and Kawakami, Y. : Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res.*, 61:7900-7907, 2001
29. Matsushita, M., Ikeda, H., Kizaki, M., Okamoto, S., Ogasawara, M., Ikeda, Y., and Kawakami, Y. : Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br. J. Haematology*, 112:916-926, 2001.
30. Toda, M., Iizuka, Y., Yu, W., Imai, T., Ikeda, E., Yoshida, K., Kawase, T., Kawakami, Y., Okano, H., and Uyemura, K. : Expression of the neural RNA-binding protein musashi1 in human gliomas. *Glia*, 34: 1-7, 2001.
31. Ogawa, Y., Yamazaki, K., Kuwana, M., Mashima, Y., Nakamura, Y., Ishida, S., Toda, I., Oguchi, Y., Tsubota, K., Okamoto, S., and Kawakami, Y. : Ultrastructural and immunohistochemical studies of lacrimal gland in patients with chronic graft-versus-host disease: a significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42:111-9, 2001.
32. Kuwana, M., Kaburaki, J., Wright, T. M., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. : Induction of antigen-specific human CD4+ T cell energy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur. J. Immunol.*, 31: 2547-2557, 2001.
33. 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 of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, in press.
34. 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 leader sequence. *Cancer Gene Ther.*, 8:9-16, 2001.
35. 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.
36. 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 of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer*, in press.
37. Miyagi, Y., Imai, N., Sasatomi, T., Yamada, A., Mine, T., Katagiri, K., Nakagawa, M., Muto, A., Okouchi, S., Isomoto, H., Shirouzu, K., Yamana, H., and Itoh, K. : Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination of SART3 peptides. *Clin. Can. Res.*, 7:3950-3962, 2001.
38. Yamada, A., Kawano, K., Koga, M., Matsumoto, T., and Itoh, K. : Multidrug resistance-associated protein 3 is a tumor rejection antigen recognized by HLA-A2402-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 61:6459-

6466, 2001.

39. Imai, N., Harashima, N., Ito, M., Miyagi, Y., Harada, M., Yamada, A., and Itoh, K. : Identification of Lck-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in cancer patients with distant metastases. *Int. J. Cancer*, 94:237-242, 2001.
40. Inoue, Y., Takaue, Y., Takei, M., Kato, K., Kanai, S., Harada, Y., Tobisu, K., Noguchi, M., Kakizoe, T., Itoh, K., and Wakasugi, H. : Induction of tumor specific cytotoxic T lymphocytes in prostate cancer using prostatic acid phosphatase derived HLA-A2402 binding peptide. *J. Urol.*, 166:1508-1513, 2001.
41. Tamura, M., Nishizaka, S., Maeda, Y., Ito, M., Harashima, N., Harada, M., Shichijo, S., and Itoh, K. : Identification of cyclophilin B-derived peptides capable of inducing histocompatibility leukocyte antigen-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:762-767, 2001.
42. Harada, K., Yamada, A., Yang, D., Itoh, K., and Shichijo, S. : Binding of a SART3 tumor-rejection antigen to a pre-mRNA splicing activation factor RNPS1: a possible regulation of splicing by a complex formation. *Int. J. Cancer*, 93:623-629, 2001.
43. 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.
44. Ito, M., Shichijo, 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.*, 61:2038-2046, 2001.
45. 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*, 84:915-919, 2001.
46. Harashima, N., Tanaka, K., Sasatomi, T., Locoregional, Y., Miyagi, Y., Yamada, A., Tamura, M., Yamana, Y., Itoh, K., and Shichijo, S. : Recognition of the Lck tyrosine kinase as a tumor antigen by T cells of metastatic cancer patients. *Eur. J. Immunol.*, 31:323-332, 2001.
47. Tsuda, N., Murayama, K., Ishida, H., Matsunaga, K., Komiya, S., Itoh, K., and Yamada, A. : Expression of a newly defined tumor-rejection antigen SART3 antigen in musculoskeletal tumors and induction of HLA-class I-restricted CTLs by SART3-derived peptides. *J. Orthopedic Research*, 19:346-351, 2001.
48. Hida, N., Maeda, Y., Katagiri, K., Takasu, H., Harada, M., and Itoh, K. : A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the circulation. *Can. Immunol. Immunother.*, in press.
49. Yutani, S., Tanaka, M., Mastumoto, H., Imai, N., Sata, M., Shichijo, S., and Itoh, K. : Elevation of serum MAGE-4 protein levels and prediction of hepatocellular carcinogenesis in patients with liver cirrhosis. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
50. Tanaka, K., Harashima, N., Niiya, F., Miyagi, Y., Hida, N., Ochi, M., Imai, N., Harada, M., Itoh, K., and Shichijo, S. : Serine proteinase inhibitor 9 can be recognized by cytotoxic T lymphocytes of epithelial cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
51. Sasatomi, T., Suefuji, Y., Miyagi, Y., Ogata, H., Akagi, T., Shirouzu, K., and Itoh, K. : Expression of tumor-rejection antigens in colorectal cancers. *Cancer*, in press.
52. Nakatsura, R., Senji, S., Ito, M., Nishimura, Y., and Itoh, K. : Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, CLP, originally defined by the SEREX method. *Eur. J. Immunology*, in press.

53. Mukai, K., Yasutomi, Y., Watanabe, M., Kenjo, A., Aota, T., Wang, L., Nishikawa, H., Ishihara, M., Fujita, T., Kuribayashi, K., and Shiku, H. : HER2 peptide-specific CD8+ T cells are proportionally detectable long after multiple DNA vaccinations. *Gene Therapy*, in press.
54. Ikuta, Y., Katayama, N., Wang, L., Okugawa, T., Takahashi, Y., Schmitt, M., Gu, X., Watanabe, M., Akiyoshi, K., Nakamura, H., Kuribayashi, K., Sunamoto, J., and Shiku, H. : Presentation of an MHC class I-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide/truncated HER2 protein complex: Implications for a polyvalent immuno-cell therapy. *Blood*, in press.
55. Yamaguchi, M., Seto, M., Okamoto, M., Ichinohasama, R., Nakamura, N., Yoshino, T., Suzumiya, J., Murase, T., Miura, I., Akasaka, T., Tamaru, J., Suzuki, R., Kagami, Y., Hirano, M., Morishima, Y., Ueda, R., Shiku, H., and Nakamura, S. : De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*, 99:815-821, 2002.
56. Nishikawa, H., Tanida, K., Ikeda, H., Sakakura, M., Miyahara, Y., Aota, T., Mukai, K., Watanabe, M., Kuribayashi, K., Old, L., and Shiku, H. : Role of SEREX-defined immunogenic wild-type cellular molecules in the development of tumor specific immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 98:14571-14576, 2001.
57. Araki, H., Katayama, N., Mitani, H., Suzuki, H., Nishikawa, H., Masuya, M., Ikuta, Y., Hoshino, N., Miyashita, H., Nishi, N. and Shiku, H. : Efficient ex vivo generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes in the presence of human serum albumin for use in clinical vaccine trials. *Br. J. Haematol.*, 114:681-689, 2001.
58. Ohishi, K., Katayama, N., Mitani, H., Araki, H., Masuya, M., Suzuki, H., Hoshino, N., Miyashita, H., Nishii, K., Kageyama, S., Minami, N., and Shiku, H. : Efficient ex vivo generation of human dendritic cells from mobilized CD34+ peripheral blood progenitors. *Int. J. Hematol.*, 74:287-296, 2001.
59. Nishii, K., Katayama, N., Chen, F., Usui, E., Kadowaki, S., Mitani, H., Masuya, M., Kageyama, S., Kita, K., and Shiku, H. : Aggressive neoplastic plasma cell growth with MLL gene rearrangement after high-dose therapy with autologous stem cell support for multiple myeloma. *Bone Marrow Transpl.*, 27:555-558, 2001.
60. Yamaguchi, M., Kimura, M., Watanabe, Y., Taniguchi, M., Masuya, M., Kageyama, S., Katayama, N., Ohno, T., Kita, K., and Shiku, H. : Successful autologous peripheral blood stem cell transplantation for relapsed intravascular lymphomatosis. *Bone Marrow Transpl.*, 27:89-91, 2001.
61. Yamaguchi, M., Ogawa, S., Nomoto, Y., Oka, K., Taniguchi, M., Nakase, K., Kobayashi, T., and Shiku, H. : Treatment outcome of nasal NK-cell lymphoma: a report of 12 consecutively-diagnosed cases and a review of the literature. *J. Clin. Exp. Hematopathol.*, 41:93-99, 2001.
62. Nishii, K., Usui, E., Sakakura, M., Miyata, E., Ridge, S. A., Ford, A. M., Chen, F., Yamaguchi, M., Masuya, M., Katayama, N., Kita, K., and Shiku, H. : Additional translocation t(11;17)(q23;q21) in a patient with Philadelphia-positive mixed lineage antigen-expressing leukemia. *Cancer Genet. Cytogen.*, 126:8-12, 2001.
63. Watanabe, Y., Ito, M., Kataoka, Y., Wada, H., Koyama, M., Feng, J., Shiku, H., and Nishikawa, M. : Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase, is involved in human platelet section. *Blood*, 97:3798-3805, 2001.
64. 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- $\Delta$ 7-prostaglandin A1 methyl ester (TEI-9826) Intergrated in Lipid Microspheres (Lipo TEI 9826)1. *Anti-Cancer Drugs*, 12:221-234, 2001.
65. Fukushima, M., Kataoka, T., Hamada, C., and Matsumoto, M. : Evidence of qi-gong energy and its biological effect on the enhancement of the phagocytic activity of human polymorphonuclear leukocytes. *American Journal of Chinese Medicine*, 29:1-16, 2001.
66. Mohri, K., Fukushima, M., and Matsumoto, M. : Gradual decrease of electric resistivity in water triggered by milli-gauss low frequency pulsed magnetic field. *Transactions of Magnetics Society of Japan*, 1:22-26, 2001.
67. Hosoe, S., Komuta, K., Shibata, K., Harada, H., Iwamoto, Y., Osaki, Y., Morioka, T., Origasa, H., Fukushima, M., Furuse, K., and Kawahara, M. : Gemcitabine plus vinorelbine followed by docetaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer : A multi-institutional phase II trial of non-platinum sequential triplet combination chemotherapy (JMTO LC00-02) . *Journal of Clinical Oncology*, in press
68. Fukushima, M., Mohri, K., Kataoka, T., and Matsumoto, M. : Milli-gauss pulsed magnetic field applied phosphate buffered saline solution elevates intracellular Ca<sup>2+</sup> level and stimulates phagocytic activity of human neutrophils. *Transactions of Magnetic Society of Japan*, in press.
69. Mohri, K., and Fukushima, M. : Gradual decreasing characteristics and temperature stability of electric resistivity in water triggered with milli gauss AC field. *IEEE Intermag 2002 Conference.*, FU-08, 2002.
70. Dezaki, T., Muramatsu, K., Sakakibara T., Cai, C.M., Mohri, K., and Fukushima, M. : Fingertrip blood vessel pulsation change detected with CoSiB Amorphous Wire SI Sensor after application of Milli-Gauss AC magnetic field. *IEEE Intermag 2002 Conference*, GE-06, 2002.
71. Iwahori, K., Miyata, N., Takata, N., Morisada, S., and Mochizuki, T. : Production of anti-gordonia amarae mycolic acid polyclonal antibody for detection of mycolic acid-containing bacteria in activated sludge foam. *J. Biosci. Bioeng.*, 92:417-422, 2001.
72. Sugatani, J., Komiyama, N., Mochizuki, T., Hoshino, M., Miyamoto, D., Igarashi, T., Hoshi, S., and Miwa, M. : Urinary concentrating detect in rats given shiga toxin: elevation in urinary AQP2 level associated with polyuria. *Life Science*, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

若杉尋 :

- 1) 『ナチュラルキラーT細胞の増幅方法』(特許出願番号PCT/JP01/04746出願日:2001年6月5日)として特許出願中。
- 2) 『 $\alpha$ -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』(出願番号:2001-88639出願日:2001年3月26日)として特許出願中。
- 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。

河上裕 :

- 1) 河上裕、木庭幸子、藤田知信 : 「ヒト悪性黒色腫抗原」、特許番号2000-161252
- 2) 河上裕、藤田知信、伊藤敬一 : 「ヒト膀胱癌抗原」、特許番号2000-304143
- 3) 河上裕、藤田知信、伊藤敬一 : 「ヒト膀胱癌抗原」、特許番号2000-304144

福島雅典 :

- 1) 特願 2001-285591 : 水分子の誘電率の増殖的增加方法およびその装置 平成13年9月20日
- 2) 特願 2001-286611 : 微小パルス磁界発生装置及びそれを用いた血行促進・免疫力増強・組織再生システム 平成13年9月20日

「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細胞療法の開発を目的として樹状細胞を用いた臨床試験を開始した。臨床病期第IV期の進行悪性黒色腫（HLA-A2またはA24）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第I/II相臨床試験が平成13年10月より開始された。これまでに6例が登録され、最大9回までの樹状細胞の投与が施行された。明らかな有害事象は見られていない。抗腫瘍効果については、1例に肺およびリンパ節転移巣の明らかな縮小（PR）を認めている。今後15例まで症例を増やし、臨床試験を継続する予定である。また、基礎的研究では、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、膀胱がんを対象として動物実験による検討を行なった。さらに、膀胱がん培養細胞株の上清中に特異的に分泌される微量のがん抗原ペプチドについて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。樹状細胞は、抗原提示細胞としてがん抗原を組織適合抗原との複合体として表出することによりT細胞を特異的に刺激することができ、*in vivo*での抗腫瘍活性が期待されている。

今回我々は、臨床病期第IV期の進行悪性黒色腫に対して、メラノーマ関連抗原ペプチドを用いた樹状細胞療法の第I/II相臨床試験を開始する。

また、新しい基盤的治療技術の開発として難治がんである膀胱がんを標的とした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。

それに加えて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同定し、腫瘍マーカーとしてに可能性につき検討する。

### B. 研究方法

#### （1）進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法の臨床試験

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第I/II相試験を平成13年10月より開始している。対象は、臨床病期IV期の転移性メラノーマでHLA-A2またはA24陽性の患者とした。CTL誘導活性の確認された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種類ずつ合わせたペプチドカクテルを作成した。

成分採血より得られた患者由来の単球をサイトカイン（GM-CSF, IL-4）を用いて培養し、得られた樹状細胞をペプチドカクテルとKLHにて刺激後、患者へ皮下投与を行った。投与樹状細胞数は、 $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ の3つのレベルにて行い、それぞれ3症例ずつ割り当てる。個々の症例は、最大10回まで樹状細胞の投与を行い、治療の安全性および有効性の評価を行う。免疫学的なモニタリングについては、ペプチドの皮内テストに加えてELISPOTアッセイやテトラマーを用いた染色により免疫学的な治療効果について検討を行う。

## (2) 膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発

進行膵がんは、きわめて難治性であり現在有効な治療法は、確立されていない。このため膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発を目的としてハムスター膵がんを用いた腹膜播種モデルを作成し、樹状細胞療法の有効性につき検討した。

ハムスター膵がん細胞PGHAM-1  $2 \times 10^6$  個を腹腔内投与し、3日後より腫瘍抗原にて処理したハムスター樹状細胞  $1 \times 10^7$  個またはPBSを1週ごとに3回腹腔内投与を行った。腫瘍接種後28日目にPGHAM-1細胞に対するCTL活性や腫瘍重量を計測し、抗腫瘍効果を検討した。

## (3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索

膵がんの特異的な分泌ペプチド性腫瘍マーカーを探索する為に、培養細胞の無血清培養上清中に存在するペプチドをプロテインチップ質量分析法を用いてプロファイリングする新しい手法を確立した。

無血清化した培養上清2<sub>1</sub>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。膵がん培養株36株、膵duct cell 由来細胞株2株、膵duct cell初代培養細胞、および非膵がん培養株36株を分析し、膵がんの特異的に発現するペプチドの同定を行った。

### (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、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樹状細胞療法の臨床試験

平成13年10月臨床試験開始後6例の進行メラノーマ患者(HLA-A2 3例、A24 3例)が登録され、最大9回まで投与が施行されている。これまでに明らかな有害事象は確認されていない。

臨床的効果については、レベル1 ( $1 \times 10^7$  細胞)の2症例が評価可能であり、それぞれPRとPDであった。PR症例では、肺およびリンパ節転移巣に明らかな縮小効果が認められた。皮内反応では、PR症例でKLH、ツベルクリン反応に陽性化が見られた。

ELISPOT反応による免疫学的解析では、PR症例においてHLA-A24ペプチドのうち4種類に強いペプチド特異的な細胞障害活性が確認されている。

## (2) 膵がんを標的とした樹状細胞を利用した免疫療法の開発

ハムスター膵がん細胞を用いた腹膜播種モデルの検討では、PBS投与(陰性コントロール)群の腫瘍重量および腹水量は、それぞれ  $1.2 \pm 0.98$  g,  $6.2 \pm 2.1$  mlであったが、樹状細胞+tumor lysate治療群では、明らかな残存する腫瘍は認められなかった。

PGHAM-1細胞に対するCTL活性は、樹状細胞+tumor lysate治療群において有意に腫瘍特異的な細胞障害活性が確認された。生存期間の検討でも樹状細胞治療群においてPBS投与群に比べて明らかな延命効果が見られている。

## (3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索

プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん培養株36株、膵duct cell 由来細胞株2株、膵duct cell初代培養細胞、および非膵がん培養株36株由来の無血清化した培養上清を分析し、膵がん5株に分子量3335および2341のペプチドが選択的に発現することを明らかにした。

タンデム質量分析により、前者は、がん抑制遺伝子産物と推定されているDeleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1) 蛋白質のC端29アミノ酸、後者は、家族性英国痴呆症の責任遺伝子産物で2型膜蛋白質である

integral membraneprotein 2B/BRI のC端20アミノ酸であることを明らかにした。

#### D. 考察

##### (1) 進行メラノーマを対象とした樹状細胞療法 の臨床試験

進行メラノーマに対する樹状細胞療法の臨床試験が開始されており、今後症例の蓄積により樹状細胞療法の安全性および有効性に関して客観的な評価が可能となる。

##### (2) 膵がんを標的とした樹状細胞を利用 した免疫療法の開発

今回のハムスター膵がん腹膜播腫モデルにおいて、樹状細胞療法が有効な治療手段の1つであることが示唆されている。有効な治療法が確立されていない進行膵がんに対して基盤的治療技術を開発するという目的に関して、動物実験での樹状細胞投与の有効性は、今後の臨床試験を検討する上で意義があると思われる。

##### (3) プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原の探索

プロテインチップ質量分析法を用いて膵がん培養細胞より特異的に分泌されるペプチドが2種類同定されている。プロテインチップ解析法の有用性が示されたのみならず、膵がん特異的な腫瘍マーカーの開発において今後の展望が期待される。

#### E. 結論

がんの細胞免疫療法としての進行メラノーマに対する樹状細胞療法については、臨床第I/II相試験が開始されており、治療の安全性や有効性に関して臨床データが蓄積されつつある。これまで登録された6症例について、有害事象は全くみられておらず、また1例において肺およびリンパ節転移巣の著明な縮小が認められ、PRを得ている。今後の臨床試験の継続によりさらなる有効例の出現が期待される。

難治性の進行膵がんを標的とした基盤的

技術の開発については、腫瘍抗原にて処理した樹状細胞の投与がハムスター膵がんの腹膜播腫に対する抑制効果を持つことが確認された。

プロテインチップ質量分析法を用いた膵がん抗原ペプチドの探索では、膵がん培養細胞に特異的に産生される2種類のペプチドが同定された。今後膵がん腫瘍マーカーとしての可能性につき検討される。

#### F. 健康危険情報

現時点では特になし。

#### G. 研究発表

1. Sato K, Sasaki K, Akiyama Y, and Yamaguchi K. : Mass spectrometric high-throughput analysis of serum-free conditioned medium from cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 170: 153-159, 2001.
2. Maruyama K, Akiyama Y, Nara-Ashizawa N, Hojo T, Cheng JY, Mizuguchi H, Hayakawa T, and Yamaguchi K. : Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells. *J. Immunother.*, 24:345-353, 2001.
3. 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.*, 171:103-110, 2001.
4. Nara-Ashizawa N, Tsukada T, Maruyama K, Akiyama Y, Kajimura N, Nagasaki K, Iwanaga T, and Yamaguchi K. : Hypothalamic appetite regulating neuropeptide mRNA levels in cachectic nude mice bearing human tumor cells. *Metabolism*, 50: 1213-1219, 2001.

5. Nara-Ashizawa N, Akiyama Y, Maruyama K, Tsukada T, and Yamaguchi K. : Lipolytic and lipoprotein lipase (LPL)-inhibiting activities produced by a human lung cancer cell line responsible for cachexia induction. *Anticancer Res.*, 21: 3381-3388, 2001.
6. Nara-Ashizawa N, Tsukada N, Maruyama K, Akiyama Y, Kajimura K, and Yamaguchi K. : Response of hypothalamic neuropeptide mRNAs to a negative energy balance is less sensitive in cachectic nude mice bearing human tumor cells. *Nutr. Cancer*, 41:111-118, 2001.
7. Maruyama K, Akiyama Y, Cheng J-Y, Nara N, Hojo T, Sasaki K, and Yamaguchi K. : Hamster DEC205, its primary structure, tissue and cellular distribution. *Cancer Lett.*, 181:223-232, 2002.
8. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Hojo T, Cheng JY, Mori T, Wiltrot RH, Yamaguchi K. : Antitumor effects induced by dendritic cell (DC)-based immunotherapy against established pancreatic cancer in hamsters. *Cancer Lett.*, 184: 37-47, 2002.
9. Akiyama Y, Maruyama K, Mochizuki T, Sasaki K, Takaue Y, and Yamaguchi K. : Identification of HLA-A24-restricted CTL epitope encoded by the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus. *Immunol. Lett.*, 83: 21-30, 2002 .

H. 知的所有権の取得状況  
現時点では特にない。

## 研究要旨

1) 新たに開発したヒト NKT 細胞の短期増殖法を、動物モデルを用いて確認した。2) マウスにおいても MHC 一座不一致間での骨髄非破壊的造血幹細胞移植モデルを樹立した。3) NKT 細胞の活性化は樹状細胞により正と負のシグナルで制御されることを明らかにした。4) CD1d/ $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)テトラマーを作製し、 $\alpha$ -GalCer に反応性の NKT 細胞の挙動を追跡することを可能とした。

## 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)効果を用いた骨髄非破壊的造血幹細胞移植がん治療が行われ、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。以上、NKT 細胞やこれまでの CTL, NK 細胞などのエフェクター細胞や DC による総合的ながん免疫療法の基盤研究を行うことを本研究の目的とする。

## B. 研究方法

C57BL/6 に生食もしくは G-CSF 250  $\mu$ g/kg/day 6 日間皮下投与後、脾細胞を IL-2 と  $\alpha$ -GalCer 存在下に 8 日間培養した。培養細胞をエフェクター細胞として、Yac-1, B16 メラノーマに対する *in vitro* 細胞傷害活性と B16 メラノーマ肺転移モデルに対する *in vivo* 抗腫瘍効果を検討した。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 A/J (H-2<sup>d</sup>) をホストに、C3H/He(H-2<sup>k</sup>) をドナーにし、MHC 一座不一致間での移植を試みる。中央病院におけるミニ移植の前処置を

基に、cladribine 1.1mg/kg/day x 6 (day-8 to -3), cyclophosphamide 150mg/kg/day x 2 (day-4, -3), rat ATG 1.0mg/mouse/day x 2 (day-4, -3),  $\pm$  cyclosporine A 10mg/kg/day x 16 (day-2 to 18) を用いた系において day 40 の時点で Mixed chimerism の確認を行う。DC はマウス骨髄より GM-CSF と IL-4 によって誘導した細胞を用い、NKT 細胞は肝臓より NK1.1<sup>+</sup>T 細胞をソーティングによって精製した細胞を用いる。テトラマーの作成には、クローネンバーグ博士より供与された mCD1d と m $\beta$ 2-microglobulin 遺伝子を組み込んだトランスファーベクターと Linearized baculovirus DNA とを用いて精製してきた mCD1d-m $\beta$ 2microglobulin heterodimer をビオチン化し、 $\alpha$ -GalCer と、蛍光色素をつけたストレプトアビジンに結合させ、蛍光標識 CD1d 抗原複合体 4 量体 (CD1d テトラマー) として作成した。

ヒトリンパ球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、CO<sub>2</sub> 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  $\alpha$ -GalCer 等を用いる

## C. 研究結果

1) G-CSF 投与後マウス *ex vivo*  $\alpha$ -GalCer 活性化脾細胞による抗腫瘍効果：NKT 細胞は特有のサイトカイン産生能と強い抗腫瘍活性を持つことから抗腫瘍免疫細胞療法等での応用が期待されている。我々は G-CSF 投与後ヒト末梢血単核球を IL-2 と NKT 細胞の

特異的リガンドである $\alpha$ -GalCerの共存下培養で、ヒトNKT細胞の一種であるV $\alpha$ 2-1陽性細胞が効率良く増殖できることを報告してきた。この成果はNKT細胞療法前臨床試験及び臨床試験として実地を計画中である。その一環として、今回はG-CSF投与マウス脾細胞からエフェクター細胞を誘導し、*in vitro*、*in vivo*における抗腫瘍効果を動物実験で検討した。マウス脾細胞を用いても、IL-2と $\alpha$ -GalCer存在下において、NK1.1陽性T細胞が増殖することを確認した。培養細胞は、 $\alpha$ -GalCer非添加培養細胞に比べてYac-1とB16メラノーマに対して高い細胞傷害活性と、*in vivo*におけるB16肺転移抑制を認めた。G-CSF刺激後の培養においても、 $\alpha$ -GalCer非添加培養細胞に比べて $\alpha$ -GalCer存在下培養のエフェクター細胞が高いB16肺転移抑制を示し、臨床応用の可能性が示唆された。

2) ミニ移植モデルの樹立：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。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-2<sup>d</sup>)をホストに、C3H/He(H-2<sup>d</sup>)をドナーにし、MHC一座不一致間での移植を試みた。用いた系において、day40の時点でMixed chimerismの状態が確認できた。今後このミニ移植モデルに加えて3座不一致移植モデルも確立し、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。さらに臨床で行われているミニ移植についてはドナーCTLによって認識されるマイナー抗原の同定を慶応大河上裕博士との共同研究によって試みている。

3) 樹状細胞によるNKT細胞の活性化の制御に関する研究

NKT細胞はそれ自身が抗腫瘍活性を持つと同時にTh1サイトカインであるIFN $\gamma$ を産生し、NK細胞やキラーT細胞を活性化させ、腫瘍免疫応答を有利に誘導すると考えられる。がん樹状細胞療法においては腫瘍特異的キラーT細胞を活性化と樹状細胞(DC)との相互作用についての解析がなされている。しかしながらNKT細胞が樹状細胞とどのように相互作用するのか、腫瘍免疫応答においてどのような役割を果たすかは明らかとなっていない。本年度は樹状細胞療法の効果を増強させる為あるいは樹状細胞を介した新しいNKT細胞療法を開発するために樹状細胞によるNKT細胞の活性化の制御機構について解析を行った。未成熟なDCはNKT細胞を活性化させることはできないがMHCクラスIa(H-2K<sub>D</sub>)欠損マウス由来のDCはNKT細胞のIFN $\gamma$ の産生を誘導できる。しかし、MHCクラスIbのひとつであるCD1d欠損ではこれらの活性は認められないことより、NKT細胞の活性化はCD1d依存性であるが、DC上のMHCクラスIa分子によって活性化が抑制されることが明らかとなった。また成熟DCはCD1d依存性にB7/CD28を介し、NKT細胞を活性化しIFN $\gamma$ の産生を誘導する。これらの結果は成熟DCを用いた樹状細胞療法においてキラー細胞のみならず、NKT細胞が関与することが示唆された。

4) CD1d/ $\alpha$ -GalCerテトラマーの作製と*ex vivo*でのNKT細胞の増殖と抗腫瘍活性

NKT細胞はCD1d分子に拘束し、その多くが $\alpha$ -GalCerに反応する。本年度はCD1d/ $\alpha$ -GalCerテトラマーを作製し、これを用いることによって $\alpha$ -GalCerに反応性のNKT細胞の挙動を追跡することが可能となった。われわれは以前にG-CSF動員後の末梢単核球細胞をIL-2と $\alpha$ -GalCerで培養することによってヒトV $\alpha$ 24<sup>+</sup>NKT細胞を効率よく増殖させることに成功している。これらの殆どはCD1d/ $\alpha$ -GalCerテトラマー陽性であるが、腫瘍に対する細胞傷害活性化はCD1dに非拘束性であった。つまり、NKT細胞の活性化・増殖(activation phase)にはCD1d拘束性であるが、細胞傷害活性の段階(effector phase)ではCD1d非拘束性で幅広く腫瘍を傷害することが明らかとなった。またCD1d/ $\alpha$ -GalCerテトラマ

一を用いることによって、従来のマウス NKT 細胞は NK1.1 陽性であるが、脾細胞を ex vivo で IL-2 と  $\alpha$ -GalCer で培養することによって CD8<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> NKT 細胞と CD1d 拘束性で NK1.1<sup>-</sup> NKT 細胞の 2 種類あることが明らかとなった。今後、これらのサブセットの機能について明らかにする事を計画している。

#### D. 考察・結論

今年度に得られた成果は、1)新たに開発したヒト NKT 細胞の短期間増殖法を、動物モデルを用いて確認した、2) マウスにおいても MHC 一座不一致間での骨髄非破壊的造血幹細胞移植モデルを樹立した。3) NKT 細胞の活性化は樹状細胞により正と負のシグナルで制御されることを明らかにした。4) CD1d/ $\alpha$ -GalCer テトラマーを作製し、 $\alpha$ -GalCer に反応性の NKT 細胞の挙動を追跡することを可能とした。以上の結果から、NKT 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。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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.
- Asada-Mikami R, Heike Y, Kanai S, Azuma M, Shirakawa K, Takaue Y, Victor Krasnykh, David T, Curiel, Terada M, Abe T, Wakasugi H. Efficient Gene Transduction by RGD-fiber Modified Recombinant Adenovirus into Dendritic Cells. *JJCR*, 92 : 321-327, 2001.
- Ikarashi Y, Rumiiko Mikami, Albert Bendelac, Magali Terme, Nathalie Chaput, Terada M, Thomas Tursz, Eric Angevin, Francois A. Lemonnier, Wakasugi H, and Laurence Zitvogel. Dendritic Cell Maturation Overrides H-2D-mediated Natural Killer T (NKT) Cell Inhibition: Critical Role for B7 in CD1d-dependent NKT Cell Interferon  $\gamma$  Production. *J. Exp. Med.*, 194: 1-9, 2001.
- Inoue Y, Takaue Y, Takei M, Kato K, Kanai S, Harada Y, Tobisu K, Noguchi M, Kakizoe T, Itoh K, and Wakasugi H. INDUCTION OF TUMOR SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN PROSTATE CANCER USING PROSTATIC ACID PHOSPHATASE DERIVED HLA-A2402 BINDING PEPTIDE. *J. Urology*, 166 : 1508-1513, 2001.
- Yoshida M, Weijian F, Nishi K, Takahashi M, Heike Y, Saijo N, Wakasugi H, Ikekawa T. ANTITUMOR ACTION OF THE PKC ACTIVATOR GNIDIMACRIN THROUGH CD1c2 INHIBITION. *Int. J. Cancer*, 94 : 348-352, 2001.
- Noda N, Wakasugi H. Cancer and Oxidative Stress. *JMJA*, 44 : 535-539, 2001.
- Kato K, Takaue Y, and Wakasugi H. T cell conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. *J. Leukocyte Biology*, 70 : 941-949, 2001.
- Niyya H, Kanda Y, Saito T, Ohnishi T, Kanai S, Kawano Y, Kamijo K, Iizuka A, Yakushijin K, Ueda K, Chizuka A, Iijima K, Ohnishi M, Nakai K, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Takaue Y, Mineishi S. Early Full Donor Myeloid Chimerism After Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation Using a Combination of Fludarabine and Busulfan. *Haematologica*, 86 : 1071-1074, 2001.
- Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Martin W, Brechbiel, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, and Wakasugi H. Hemodynamics in Vasculogenic Mimicry and Angiogenesis of Inflammatory Breast Cancer Xenograft. *Cancer Res.*, 62 : 560-566, 2002.
- Kobayashi H, Shirakawa K, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Watanabe I, Heike Y, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW, Wakasugi H. Rapid Accumulation and Internalization of Radiolabeled Herceptin in an Inflammatory Breast Cancer Xenograft with Vasculogenic Mimicry Predicted by