

the Contrast-enhanced Dynamic MRI with the Macromolecular Contrast Agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res.*, 62 : 860-866, 2002.

Saito T, Mineishi S, Kanda Y, Shoji N, Kato K, Kunai S, Ohnishi T, Kawano Y, Nakai K, Ogasawara T, Matsubara H, Makimoto A, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, 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*, 2001.

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*, 2001.

Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Takashima S, Watanabe I, Konishi F, Kasumi F, Goldman CK, Thomas KA, Bett A, Terada M, Wakasugi H. Tumor-Infiltrating Endothelial Cells and Endothelial Precursor Cells in Inflammatory Breast Cancer. *Int. J. Cancer*, *in press*, 2002.

Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Kai T, Konishi F. Vasculogenic Mimicry and Pseudo Comedo Formation in Breast Cancer. *Int. J. Cancer*, *in press*, 2002.

2. 学会発表

炎症性乳癌における血管新生亢進とその機序に関する検討：白川一男、若杉尋、霞富士雄、吉本賢隆、小西文雄
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、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、三上留美子、峯石真、平家勇司、五十嵐美徳、加藤和則、高上洋一、若杉尋
ナチュラルキラー T(NKT)細胞と抗腫瘍免疫：若杉尋
新制癌剤グニディマクリンによる cdk2 活性阻害機序：吉田光二、平家勇司、加藤和則、池川哲郎、若杉尋

活性化 T 細胞培養上清による成熟樹状細胞の効率的な誘導：加藤和則、高上洋一、若杉尋

ヒト炎症性乳がんマウス移植モデルにおける血管構造を高率に欠損する血管新生と血管形成：白川一男、森川隆之、平家勇司、小西文雄、渡邊一郎、若杉尋

ヒト炎症性乳がんマウス移植モデル(WIBC-9)における血管構造を高率に欠損する血管新生と血管擬態(管腔形成)の結構動態：渡邊一郎、白川一男、小林久隆、平家勇司、小西文雄、若杉尋

G-CSF 投与後マウスの ex vivo α -GalCer 活性化脾細胞による抗腫瘍効果：金井幸代、三上留美子、平家勇司、五十嵐美徳、加藤和則、吉田光二、高上洋一、若杉尋

ヒト肺癌・乳癌細胞における癌拒絶抗原 S-ART1 遺伝子導入アデノウイルスによる細胞死の誘導：細川麻実、高嶋成光、江口研二、田尻久雄、七条茂樹、伊東恭悟、若杉尋、高上洋一、Demitriev Igor, Curiel David、平家勇司

Dendritic Cell (DC) Maturation Overrides H-2D-mediated NKT cell Inhibition: A Critical Role of B7 in CD1d -dependent NKT Cell IFN γ Production. Laurence Zitvogel, Yoshinori Ikarashi, Carole Masurier, Albert Bendelac, Nadine Fernandez, François A. Lemonnier, Hiro Wakasugi.

NKT CELLS EXPRESS A UNIQUE EPITOPE OF INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1 THAT PLAYS A ROLE IN TUMOR. Atsushi Shimizu, Hiroki Sasaki, Kazuhiko Aoyagi, Mutsuzi Yoshida, Kazuo Shirakawa, Kazunori Kato, Yuji Heike, Yoshinori Ikarashi, hideo Nagai, Hiro Wakasugi.

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 PCT/JP01/04746 出願日：2001 年 6 月 5 日）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』（出願番号：2001-88639 出願日：2001 年 3 月 26 日）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。

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 医長

研究要旨

骨髄非破壊的同種移植を通常の移植法が適応とならない血液腫瘍やほかに治療法のない転移性固形腫瘍の患者に用いその安全性と有効性を確立する。

A. 研究目的 血液腫瘍や転移性固形腫瘍に対し同種移植による移植片対腫瘍 (Graft-versus-tumor, GVT) 効果による治療が有効である事を確認する。化学療法が効かない血液腫瘍や転移性固形腫瘍にはこれまで有効な治療法が無かった。このような腫瘍に対してGVT効果による新しい治療法を開発する事を目的とする。この研究によって腎癌をはじめとする幾つかの固形腫瘍に対しては新しい標準的治療法となりうる方法が開発できる可能性がある。

B. 研究方法 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、ブスルファン±ATG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。対象患者としては固形腫瘍においてはGVT効果の有効性が期待できる腎癌などの患者を主とする。転移巣が巨大である症例、全身状態の悪い症例を除外することにより治療による副作用合併症を避ける。

C. 研究結果 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の移植法を施行したと同等の全生存・無病生存率であった。固形腫瘍においては腎癌で6例中部分寛解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。

D. 考察 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GVT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。

E. 結論 GVT効果を最大限に利用した骨髄非破壊的移植法は今後の血液・固形腫瘍の治療法に新しい発展をもたらす可能性のある治療法である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表

1. 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, Mineishi S: Successful application of non-myceloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol.*, 2001;29:639-642
2. Kanda Y, Mineishi S, Nakai K, Saito T, Tanosaki R, Takaue Y. Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following

a regimen containing antithymocyte globulin.
Blood, 2001;97:3676-3677

3. Saito T, Nakamura F, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Mincishi S. Reduced intensity regimen for a second mismatched transplant. Haematologica, 2001;86:780-781

4. 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, Mincishi S. Early full donor myeloid chimerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. Haematologica, 2001;86:1071-1074

5. Kanda Y, Mincishi 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, Takaue Y. Response-oriented pre-emptive therapy against cytomegalovirus diseases with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. Transplantation, In Press.

H. 知的財産権の出願・登録

特になし

厚生科学研究費補助金（厚生労働省がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

新しいがん免疫療法の研究に関する研究

分担者 河上裕 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門教授

研究要旨

免疫療法の科学的な開発において、標的抗原を同定することがまず大切である。分担者らは昨年度、癌患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原を単離する cDNA クローニング法（SEREX 法）を用いてメラノーマ抗原や膵癌抗原を単離し、この方法による癌抗原単離の有効性を示した。今年度は膀胱癌に対して本法を実施し、新規膀胱癌抗原を単離した。また昨年報告した、メラノーマ抗原 KU-MEL-1 に対して、進行メラノーマに対する樹状細胞を用いた免疫療法後の患者血清を用いて検討を行ったところ、86%と高率に抗体が認められたことから、有効な抗原と考えられることから、今後定量法を確立し更に解析を進める。

A.研究目的

各種癌患者血清中 IgG 抗体が認識する、癌患者において免疫原性をもつ癌蛋白遺伝子を cDNA 発現クローニング法(SEREX 法)を用いて単離同定し、免疫療法において標的抗原として使用できる癌抗原を同定する。

（倫理面への配慮）

本実験は慶應義塾大学医学部の倫理委員会の承認を受けており、その規定に基づいて実施された。また試料で、他施設からの場合は当該施設の倫理委員会の審議に基づき承認を得た後に、本人の了承を得た上で取得したものを研究に使用した。

B.研究方法

各種癌細胞からラムダファージ上に cDNA 発現ライブラリーを作製して大腸菌に発現させ、癌患者血清抗体を用いたスクリーニングにより癌抗原遺伝子を単離する（SEREX 法）。単離した抗原は、各種癌患者および健常人血清における単離抗原に対する IgG 抗体の存在を調べるとともに、RT-PCR 法やノー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癌抗原を同定する。有用である可能性のある癌抗原に対しては、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。

C. 研究結果

前年度、免疫原性が高いメラノーマで SEREX 法を試みたところ、診断、治療に臨床応用できる可能性を示す新規癌抗原 KU-MEL-1 が得られ、本法が有用な癌抗原の単離に有効であることを示し、さらに膵癌について応用し、同様に膵癌抗原を単離した。今年度は、膀胱癌抗原の単離・同定を行った。一人の膀胱癌患者血清と 2 種類の cDNA ライブラリーを用いた SEREX 法により合計 117 個の陽性クローンを単離した。これら抗原遺伝子は、49 個の既知分子と 22 個の未知

分子計71個の分子をコードしていた。各抗原に対する健常人血清中のIgG抗体の有無を調べたところ、38個の抗原に対する抗体は検出されなかった。膀胱癌患者血清中におけるIgG抗体は、15個の抗原で複数の血清中に存在した。この中で auto の系で得られた KU-BL-1 に対する抗体は膀胱癌患者 28 例中 2 例に検出されたが、その他の癌患者、健常人では認められなかった。また allo の系で得られた KU-BL-50 に対する抗体は膀胱癌患者 28 例中 3 例の患者と膵癌患者に抗体が検出されたが、健常人では認められなかった。さらに単離抗原の mRNA 発現を RT-PCR 法およびノーザン法で検討を行ったところ、KU-BL-1 は正常組織では膀胱と精巣に、また 6 例中 4 例の膀胱癌細胞株、14 例中全例で膀胱癌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 例の膀胱癌細胞株、8 例中 6 例の膀胱癌組織に発現を認めた。

つぎに東京大学医科学研究所と共同でメラノーマ患者に対して、自己腫瘍細胞溶解物と培養した樹状細胞を用いた免疫療法の第一相臨床試験を行った患者血清を用いて、前回、我々が SEREX 法で単離した KU-MEL-1 抗原に対する解析を行った。樹状細胞は、アフレーシスにより分離した末梢血単核球のプラスチック付着分画を GM-CSF と IL4 とともに培養して作製し、それに自己腫瘍細胞溶解物を取り込ませ、TNF α を加えて、成熟化させた。それを1週毎に皮内、皮下投与し、IL2の併用投与を行った。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、MAGE や tyrosinase に対する IgG 抗体は認められず、NY-ESO-1 や SART-1 に対して

は7例中2例にIgG抗体がIgG抗体認められた。しかし 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。

D. 考察

近年、世界的に癌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、癌細胞の株化と腫瘍反応性T細胞の樹立が難しい多くの癌にも適応可能な SEREX 法を用いて、新規膀胱癌抗原の単離を試み、臨床応用できる可能性をもつ新規癌抗原が単離された。昨年報告した、メラノーマ抗原 KU-MEL-1 の解析を、進行メラノーマ患者に対する自己溶解物感作樹状細胞を用いた免疫療法後の患者で検討したところ、86%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。

E. 結論

SEREX 法を用いて、新規膀胱癌抗原の単離・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、癌の診断および免疫療法の標的抗原として有用である可能性がある。昨年報告したメラノーマ抗原は免疫療法後の患者で抗原に対する抗体が高率に認められることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

Kiniwa 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.

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.Heamatology.* 112:916-926, 2001.

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.

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.

Kuwana M, Kaburaki J, Wright TM, Kawakami Y, and Ikeda Y.: Induction of antigen-specific human CD4+ T cell anergy by peripheral blood DC2 precursors. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31(9): 2547-2557.

2.学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

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

河上裕、藤田知信、伊藤敬一：「ヒト膀胱癌抗原」、特許番号 2000-304143

河上裕、藤田知信、伊藤敬一：「ヒト膀胱癌抗原」、特許番号 2000-304144

癌のワクチン療法に関する研究

分担研究者 伊東恭裕 久留米大学医学部免疫学講座教授

研究要旨 平成 13 年度は、主に臨床研究として投与前の患者個々の免疫特性（ペプチド特異的 CTL 前駆体同定に基づく）に沿ったペプチドワクチン第 I 相臨床試験を実施した。現時点で高度進行癌 70 症例が登録されており、安全性が確認されかつワクチン投与早期よりペプチド特異免疫能（CTL や抗体）の誘導や増強が惹起されテラーメイド型癌免疫治療の特性が実証されたといえる。さらに抗腫瘍作用（マーカー低下や腫瘍縮小）が評価可能症例の半数近くにおいて認められた。しかしながら、それらの作用は多くの場合一過性もしくは minor response に属するものであり、PR 症例は 4 例のみである。その主因としては高度進行上皮癌細胞上の HLA-A アレル崩失が 30~60% に及ぶという障壁があげられる。一方、stable disease 症例や極めてゆるやかに増悪する症例が多数確認されている。これらより、平成 14 年度からの臨床効果を主目的とした早期第 II 相臨床試験へ移行する医学的根拠が得られたものと判断される。

A. 研究目的

本研究の主目的は、癌に対する特異免疫療法の基礎及び臨床研究、とりわけペプチド特異的 CTL 前駆体同定に基づくペプチドワクチンの基礎及び臨床研究である。平成 13 年度は、患者末梢血のワクチン候補ペプチドに対する CTL 前駆体を確認しての CTL precursor oriented-peptide vaccine (CTL 前駆体同定に基づくペプチドワクチン) の基礎及び臨床研究を実施した。

B. 研究方法

1) 癌ワクチン開発（臨床研究）：HLA 拘束性 CTL 誘導可能なペプチド分子については、GMP グレード（臨床応用可能）のペプチドを不完全フロインドアジュバンド（montanide ISA-51）と共に皮下投与する臨床第 I 相試験を開始した。個々のプロトコールについては、本学倫理委員会にて審査を受け承認されたものに限って開始した。エンドポイントは有害事象の有無及び CTL 誘導能の有無である。有害事象の判定は JCOG の毒性判断基準に従った。CTL 誘導能の有無は、CTL precursor frequency analysis を主として採用し、癌特異性及びペプチド特異性の両者を算出し、細胞性免疫の定量化を行った。

（倫理面への配慮）

本学内での倫理委員会での審査を経て、これまで 7 つの臨床試験を実施した。試験毎に専任の臨床研究コーディネーター（有医師資格の本学スタッフ）が、被験者から自由意志による十分な説明を受けた上での同意（インフォームド・コンセント）を得て

常時実施した。データマネージャー及び臨床試験看護婦の参加をえて、臨床研究の充実と患者や家族への十分な対応が可及的にできる体制をひいている。

C. 研究結果

本年度からは、患者末梢血のペプチド特異的 CTL 前駆体を確認しての CTL precursor-oriented peptide vaccine を、HLA-A24 及び A2 の各種癌患者に対し第 I 相臨床試験を実施中である。これらは、症例毎に投与するペプチドが異なることからテラーメイド型ワクチンといえる。これまでに 62 症例が評価可能となったが、有害事象は局所炎症反応が 60% 以上、全身倦怠感、発熱などが 30% 近くの症例で認められたが、いずれもグレード I や II が主でありワクチンの安全性が確認された。HLA 拘束性癌特異的 CTL 活性は 50% の症例において認められた。ペプチド特異的 CTL 誘導は 80% 以上、ペプチドに対する血中 IgG 抗体の増強は 75% 以上の症例において認められ、評価可能な 33 症例では全例において特異免疫誘導能が確認された。臨床効果においては、62 症例中腫瘍縮小やマーカー低下が一時的に認められた症例は 27 症例（44%）に及んだ。しかし、これらの抗腫瘍作用の多くは一時的であり、これまで臨床効果はワクチン単独症例では 3 ヶ月評価（n=62）で PR2、SD30、PD30 であり、6 ヶ月評価（n=21）では PR2、SD10、PD9 例であった。肺癌をはじめ殆どの癌種で高い QOL と生存率の延長が認められている。

D. 考察

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喪失が30~50%におよび、その結果多くの癌細胞が免疫抵抗性であることが強く関与しているものと考えられる。しかしこのような高度進行癌のエスケープ現象にもかかわらず、ステージIV肺癌症例の1年生存率は50%を超え、生存率延長においてはこれまでに報告のないほど優れた成果が認められている。生存率延長は再燃前立腺癌や大腸癌症例においても認められている。さらに、ワクチン単独群にて明らかな腫瘍縮小例や骨転移消失例などの症例も認められている。さらに、いずれの症例においてもQOLは高いまま維持され外来通院による治療も可能であった。これらは高度進行癌に対する抗癌剤や放射線治療でのQOL低下とは対称的であり、また合併症、有害事象が少なく、医療費も低いという点から特筆される特徴であるといえる。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。

E. 結論

本年度はテラーメイド型のCTL precursor-oriented vaccineの安全性と免疫反応性が確認された。平成14年度は、臨床効果を目的とした早期第II相臨床試験を開始する。

F. 健康危険情報

平成12年10月から開始したCTL前駆体同定に基づくペプチドワクチン第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（グレードI）が80%近くで認められ、硬結及び疼痛（グレードII）が50%で認められた。グレードIIの局所炎症反応に対して、一部の症例においては抗ヒスタミン軟膏の塗布を必要とした。全身倦怠感、発熱（グレードI~II）は30%近くの症例で認められ、さらに前立腺癌症例の半数近くで血尿（グレードI~II）が認められた。また、肺癌の一症例において、限局性大腸炎（グレードIII）がLck₂₀₈ペプチドなどのワクチン投与により誘発され、Lck₂₀₈ペプチドワクチン中断により軽快した。以上、これまでの経験では（74症例）いずれにおいても重篤な健康危険を疑わせる有害事象/薬物有害反応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. 論文発表（英文査読誌掲載論文）

1. 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, 2001.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. 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, 2002.

14. 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, 2002.

15. 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, 2002.

16. 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, 2002.

17. 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, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（申請）

1) 11-22210, PCT/JP00/05220 (WO01/11044)

腫瘍抗原（Lck 関連）

2) 2000-231814, PCT/JP01/06526 (WO02/10369)

膵臓癌由来腫瘍抗原（Panc-1 関連）

3) 2001-306811

腫瘍抗原（11-18 肺癌関連）

4) 2001-177058

腫瘍抗原（大腸癌（SW620）由来の A2 拘束性腫瘍抗原）

5) 2001-191974

腫瘍抗原（大腸癌（SW620）由来の B46 拘束性腫瘍抗原）

6) 2001-250728

食道癌由来 A26 拘束性及び大腸癌由来 A2 拘束性腫瘍抗原

7) 2001-260046

脱感作剤

8) 2001-283413

細胞性免疫検出法およびその医薬への応用

9) 2001-333219

脳腫瘍由来腫瘍抗原

10) 2001-376415

前立腺癌マーカー由来 A24 拘束性腫瘍抗原ペプチド

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

分担研究報告書

難知性癌に対するワクチン療法の開発と臨床評価

研究者 珠玖 洋 三重大学医学部 教授

研究要旨:本研究で我々は、野生型現癌遺伝子 HER2を標的とした細胞性免疫による癌の免疫的治療を開発する。具体的には、HER2蛋白内に含まれる CTL エピトープ及びヘルパーエピトープの両者を提示し得る組み換え蛋白と疎水化多糖類プルランとの複合体により、独特の癌ワクチン開発を行う。本年度は新しい癌ワクチン作製の為のヘルパーエピトープの機能解析を行った。

A. 研究目的:

本研究は乳癌、卵巣癌、非小細胞性肺癌等の20~40%に発現されている野生型現癌遺伝子 HER2を標的としてのワクチン療法を中心とした免疫療法の開発を目指すものである。とりわけ、日本人の約60%が所有しているHLA-A2402結合性HER2由来ペプチドを既に同定していることより、多くの癌患者を対象とした治療法として展開する可能性が期待出来る。本研究では、既に同定したHER2p63-71ペプチドを含んだHER2組み換え蛋白を用いた癌ワクチンの基礎的臨床的な開発研究と共に、免疫的モニタリング法の検討、及びサイトカインや樹状細胞の使用によるより有効な免疫治療法の開発を目指す。

B 研究方法:

- (1) ペプチド特異的CD8⁺T細胞数の測定には、IFN γ 産生CD8⁺T細胞数測定のエリスポットアッセイを行った。標的細胞にはp1HTRを用いた。
- (2) 腫瘍細胞の転移測定にはBALB/Cマウス由来のCMSSM株を用い、 1×10^6 接種(静注)後21~28日後の肺転移結節を測定した。

(倫理面への配慮)

現時点では該当するものはなし。

C. 研究結果

1. マウスMHC class II I-A^d拘束性の二種のヘルパーエピトープによるCTLエピトープHER2p63特異的CD8⁺T細胞への増強効果およびHER2発現肉腫CMS7HEの*in vivo*腫瘍拒絶における効果につき検討した。これまでに我々が同定したHER2₁₆₋₃₀ヘルパーエピトープとHER2とは無関係のトリ卵白アルブミンOVA₃₂₃₋₃₃₉ヘルパーエピトープを各々CTLエピトープHER2p63と共免疫することにより、HER2p63CTLエピトープ単独投与マウスに比して、

いずれかのヘルパーエピトープとの共免疫マウスでは、約2~3倍のCTLエピトープ特異的CD8⁺T細胞を脾細胞中に検出した(IFN- γ 産生細胞検出用ELISPOTアッセイ)。このように、ほぼ同一の活性を示す二種のヘルパーエピトープのCMS7HE肉腫の配転移阻止における活性につき検討した。転移予防実験では、非免疫コントロールマウスおよびCTLエピトープ単独投与マウスにおいては100数十個の肺転移結節を検出したが、OVAヘルパーエピトープとHER2CTLエピトープの共免疫群では約100個の転移結節を、またHER2ヘルパーエピトープとCTLエピトープの共免疫マウスでは0~数個の結節を検出した。腫瘍の尾静脈投与4日後から免疫を開始した実験群においても、ほぼ同様の肺転移結節数が確認された。これらのグループの約二ヶ月間に渡る観察により、非免疫群およびCTLエピトープ単独免疫群では、全てのマウスが腫瘍細胞投与後25日以内に、またOVAヘルパーエピトープとCTLエピトープの投与群においては27日以内に、全ての動物が死亡したが、HER2₁₆₋₃₀ヘルパーエピトープとCTLエピトープの投与を受けたマウスは全てのマウスが生存を続けた。

2. CD4⁺T細胞に認識される可能性のある、SEREX法で同定された腫瘍細胞由来の免疫原性野生型分子を用いて、ヘルパー活性の検討を行った。BALB/cマウス由来メチルコラントレン誘発線維肉腫(CMS2, 5a, 7, 8, 13)よりファージライブラリーを作成し、各々の腫瘍の担癌マウス血清を用いてSEREX法によりIgG抗体で検出される抗原遺伝子を同定した。SEREX法により同定された腫瘍細胞由来免疫原性野生型分子のプラスミドDNAを、CMS5a腫瘍拒絶抗原である変異型ERK2(mERK2)の発現プラスミドpCAGGSmERK2とともに遺伝子銃を用いてマウスに免疫し、mERK2特異的CD8⁺T細胞を

ELISPOT アッセイにより測定した。SEREX 法により同定された免疫原性野生型分子発現用プラスミド DNA と pCAGGSmERK2 との共免疫により、pCAGGSmERK2 単独の免疫に比べて mERK2 特異的 CD8⁺T 細胞数が約 3~10 倍に増加した。増加反応は、ヒト SEREX 法により同定された異種の免疫原性の高い分子を共免疫した場合と同程度で、ヘルパー抗原としてよく利用される OVA を共免疫した場合に比較して遙かに大きかった。SEREX 法により同定されなかった、免疫原性が低いと考えられる分子の発現用プラスミド DNA と pCAGGSmERK2 との共免疫では、mERK2 特異的 CD8⁺T 細胞数の増加反応は認められなかった。mERK2 特異的 CD8⁺T 細胞数の増加反応は、CD4⁺T 細胞依存性であった。また遺伝子銃を用いた免疫で、pCAGGSmERK2 と SEREX 法により同定された免疫原性野生型分子発現用プラスミド DNA が、別々の金粒子にコートされた場合、および各々別々の部位に免疫された場合、mERK2 特異的 CD8⁺T 細胞数の増加反応は消失し、両プラスミドは、同一の金粒子にコートされる必要性が認められた。このことより SEREX 法により同定された免疫原性野生型分子と特異的 CD8⁺T 細胞抗原は、同一抗原提示細胞上に提示される必要性が示唆された。特異的 CD8⁺T 細胞の抗原として pCAGGS147HER2 を使用した場合も同様に、SEREX 法により同定された免疫原性野生型分子発現用プラスミド DNA との共免疫により、HER2 特異的 CD8⁺T 細胞数の増加効果が認められた。また CMS5m 腫瘍転移においては、pCAGGSmERK2 と SEREX 法にて同定された免疫原性野生型分子発現用プラスミド DNA との共免疫により、pCAGGSmERK2 の単独免疫では得られなかった完全な腫瘍の治療効果が認められた。

D. 考察

予てより、CTL の有効な活性化には適切なヘルパーエпитープが必要なことが示唆されていた。本年度は、全く異なった2つの実験系を用いて、ヘルパーエピトープの技能を明らかにした。とりわけ1. に示したヘルパーエピトープ HER2p16は、これ迄検討を続けて来た HER2組み換え蛋白と疎水化多糖類(CHP-HER2)の中に CTL エピトープ HER2p63 と共に含まれている。平成14年度に臨床第1相試験を予定している CHP-HER2 については、本年度中に GMP 基準の臨床グレードの分子の作製をほぼ終了しつつある。

E. 今後のより有効な癌ワクチン作製にとって、適切なヘルパーエピトープは極めて重要である。

F. 健康危険情報

現時点では該当するものはなし。

G 研究発表

1. 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).
2. 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).
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Nishii, K., Usui, E., Sakakura, M., Miyata, E., Ridge, SA., Ford, AM., 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.
11. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
現時点では該当するものはなし。

新しいがん免疫療法に関する研究

分担研究者 岡 正朗 山口大学・教授

研究要旨：膵癌の予後改善を目的に各種免疫療法を施行した。膵癌治癒切除 16 例で MUC1-CTL 細胞療法を行い、術後肝転移再発は 14 例に防止され、1 年生存率は約 80%であった。切除不能膵癌では、MUC1 ペプチドワクチン第 I 相試験を行った。HLA-A2 拘束性および HLA-A24 拘束性腫瘍拒絶抗原ペプチドの反応性を判定する簡便法を確立、同ペプチドを用いた第 I 相試験が進行中である。

岡 正朗・山口大学・教授

A. 研究目的

膵癌の予後は極めて不良であり、各種免疫療法を行い、その効果を検討し、膵癌の予後改善を目指す。切除例に対しては、MUC1-CTL による細胞療法を行い、肝再発防止効果と予後の改善を観察する。切除不能例では、MUC1 ペプチドによる第 I 相試験を行い、その安全性と有効性を確認する。また、癌退縮抗原ペプチドに対する反応を *in vitro* にて判定する方法を開発したので、同ペプチドによる第 I 相試験を行う。

B. 研究方法

細胞療法:

(1)膵癌切除例に対する術後 MUC1 特異的 CTL 療法

膵癌治癒切除例を対象とする。術前、ヒト膵癌細胞株(YPK-1)と患者末梢血単核球を3日間培養、その後、IL-2 を添加し、さらに7日間培養し、MUC1 特異的 CTL を誘導する。術前に誘導した CTL を術後1週間以内に投与し、再

発形式および生存期間を検討する。

癌ワクチン療法:

(1)切除不能膵癌患者を対象に MUC1 ペプチドワクチンの毒性、安全性および免疫反応性を検討する第 I 相試験を行う。

(2)腫瘍拒絶抗原ペプチドワクチン療法の第 I 相試験を行う。

なお、これらワクチン療法は倫理委員会で許可を得ている。

C. 研究結果

膵癌切除例に術後 7 日以内に、MUC1-CTL を静脈内投与し、その効果を検討した。16 例に行い、14 例には肝転移再発を認めなかった。細胞療法を施行しなかった 33 例(対照群)と細胞療法を施行した 15 例(CTL 群)に分けて検討した。対照群では 1 年,3 年,5 年生存率は 60.6,15.2,9.1%であった。対照群で肝転移再発死亡は 16 例(48.5%)で、肝転移再発時期が確定し得た 12 例の平均確認時期は 10.3±9.5 ヶ月、7 ヶ月以内に 8 例(66.6%)が肝再発を生じていた。一方、CTL 群の 1 年,2 年生存率は 80.4、21.4%であった。CTL

群では術後最長36ヶ月後の現在5例が生存しており、肝転移症例は2例(12.5%)と対照群に比べ有意に肝転移が少なかった($p<0.01$)。細胞療法の併用により有意に肝転移を抑制し、1年生存率はCTL群で良好であった。

9例の膵癌切除不能例を対象に、MUC1ペプチド療法の第I相試験を終了した。副作用は全く認めなかった。1例に腫瘍マーカーの低下を認めたが、他の8例はPDであった。免疫学的効果の評価: 個体差が大きく統計学的に有意差はないものの、Th1/Th2バランスの変化がTh2優位となり、抗MUC1 IgG抗体量が増加した症例を認めた。

新細胞性免疫定性法にて反応性を認めたペプチドワクチンの中から良好なものを最大4種類選択し、各ペプチド3mgと不完全フロイントアジュバントを混和したペプチドワクチンを2週間隔で3回投与して本癌ワクチンの毒性/安全性評価とともにリンパ球の免疫反応性について検討した。現在8症例に対して施行中である。8例中6例で3回投与を終了し、局所の発赤、腫脹、接種後の発熱を認めたが、重篤な有害事象は認めなかった。臨床効果は5例でPD、1例でNCであった。この症例は8回投与後もNCである。

D. 考察

膵癌切除例におけるMUC1-CTLを用いた細胞療法では良好な結果を得た。すなわち、肝転移再発が有意に防止できたことである。これにより、膵癌術後の短期再発死亡例は殆どなくなり、1年生存率80%と良好な結果を得た。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。

すなわち、膵癌切除例に術後MUC1-CTL療法を行い、これにHLA-A2およびA24の患者では癌拒絶抗原ペプチドにをるワクチン療法を併用する。それ以外のHLAを持つ患者ではMUC1ペプチドを用いる。ワクチン単独では臨床効果が得られていないが、免疫反応は引き起こされており、治癒切除症例では効果が期待される。なお、他の細胞療法として樹状細胞療法は切除不能膵癌において臨床研究を継続する。

E. 結論

膵癌切除例では、MUC1-CTLを用いた細胞療法は肝転移再発に有効であり、膵癌の予後改善に寄与する。また、切除不能膵癌でのペプチドワクチン療法では、MUC1ペプチドと癌退縮抗原ペプチドによる第I相試験を施行しており、切除例にて細胞療法と併用する計画である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki N, Tanaka S, Maeda Y, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M, Itoh K. Detection of Peptide-specific Cytotoxic T Lymphocyte Precursors used for Specific Immunotherapy of Pancreatic Cancer. *Int J Cancer*, in Press
2. Yoshimura K, Hazama S, Iizuka N, Yoshino S, Yamamoto K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Noma T, 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.

3. Yamamoto K, Yahara N, Gondo T, Ishihara T, Oka M. Establishment and characterization of a new human pancreatic cancer cell line, YPK-1.

Bulltin Yamaguchi, in press.

2. 学会発表

1. 矢原 昇,山本光太郎,岡 正朗. MUC1 樹状細胞を用いた膵癌養子免疫療法の検討.

第 101 回日本外科学会総会,2001.4

2. 鈴木伸明,田中聖子,檜田直也,岡 正朗,伊東恭悟. 膵癌症例末梢血中の腫瘍抗体原ペプチド特異的 CTL 前駆細胞の検出.

第 101 回日本外科学会総会,2001.4

3. 山本光太郎,上野富雄,岡 正朗. 免疫療法を併用した膵癌集学的治療の成績.

日本肝胆膵外科関連会議,2001.6

4. 山本光太郎,上野富雄,岡 正朗. 膵癌に対する多角的免疫治療戦略. 第 56 回日本消化器外科学会総会,2001.7,シンポジウム

5. 矢原 昇,荒木厚博,山本光太郎,岡 正朗. 切除不能膵癌における樹状細胞を用いた特異的免疫療法の検討. 第 56 回日本消化器外科学会総会,2001.7

6. 山本光太郎,上野富雄,岡 正朗. 膵・胆管癌に対する MUC1 ペプチドワクチン療法の第 1 相試験. 第 60 回日本癌学会総

会,2001.9

7. 鈴木伸明,田中聖子,檜田直也,前田好章,峯 孝志,山本光太郎,岡 正朗,伊東恭悟. 膵癌末梢血中の腫瘍抗原ペプチド特異的 CTL 前駆細胞の検出. 第 39 回日本癌治療学会総会,2001.10

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

特になし

厚生科学研究費補助金（がん克服研究事業）
（分担）研究報告書

がん抗原ペプチドの合成に関する研究

（分担）研究者 望月 徹 静岡県立大学薬学部助教授

研究要旨 合成した並列型 MUC 1 pentamer 刺激によりヒト樹状細胞から誘導される CTL 活性をヒト膵がん培養細胞株に対する細胞障害活性を指標として検討した。さらにその活性を MUC 1 monomer によるそれと比較すると共に、誘導された CTL による細胞障害作用の作用機構についても若干の検討を行った。MUC 1 pentamer で刺激した HLA-A24 陽性ドナー由来の樹状細胞から誘導された CTL は、ヒト膵がん培養細胞株で MUC 1 高発現の KP2N(A24+), PSN-1(A24+) および KP1N(A2+) に対して E/T 比 1:20 でそれぞれ 35%, 26%, 20% の細胞に障害を惹起した。MUC 1 pentamer と MUC 1 monomer 刺激により誘導された CTL は E/T 比 1:40 で PSN-1(A24+) 細胞に対しそれぞれ 45% と 25% の障害活性を示した。さらにこの CTL は Anti-CD8 抗体添加によりその細胞障害活性が 25% に、Anti-MUC-1 抗体添加により 30% にと大きく低下したが、Anti-class 1 抗体の添加では 75% に低下したのみであり MUC 1 陽性ヒト膵がん培養細胞株に対して主に HLA class 1 非拘束性の細胞障害活性を示すことを示唆した。

A. 研究目的

高抗原性がん抗原ペプチドの開発を目指し昨年度合成した非天然型並列型 MUC 1 pentamer (分子量:10274) と天然型 MUC 1 monomer の CTL 誘導活性をヒト膵がん培養細胞に対する細胞障害活性を指標として比較検討しさら MUC 1 pentamer により誘導された CTL が示す細胞障害作用の作用機構を検討することを目的とした。

B. 研究方法

HLA-A24 陽性ドナーより得たリンパ球から単離した接着細胞を IL-4 存在下 7 日間培養して得られた樹状細胞に MUC 1 pentamer を添加刺激し CTL を誘導した。誘導した CTL をヒト膵がん培養株である PSN-1(A24+), KP1N(A2+), KP2N(A24+), FA6(A24+) および正常細胞である K562 と HLA-A2402 遺伝子を導入した MRC-5 (A24+) に対して E/T 比 1:20 で作用させ破壊さ

れた細胞数を計測し、全体の細胞に対する 100 分率で表し CTL の細胞障害活性とした。また PSN-1(A24+), KP1N(A2+) および MCF-7(A24+) 細胞を用いて MUC 1 pentamer および MUC 1 monomer により誘導される CTL の細胞障害活性を同様に測定し両者による CTL 誘導活性を比較した。さらに MUC 1 pentamer により誘導される CTL の PSN-1(A24+) に対する細胞障害活性の作用機構を検討するために、Anti-CD8, Anti-MUC1 および Anti-class 1 抗体による CTL の細胞障害活性に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

合成並列型 MUC 1 pentamer 刺激により誘導された CTL は、E/T 比 1:20 において MUC 1 が高発現されている KP2N(A24+), PSN1(A24+) および KP1N(A2+) 細胞 に対してそれぞれ 35%,

26%および20%の細胞障害活性を示したが、MUC 1 低発現の FA6(A24+) 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 MRC-5(A24+) 細胞に対しては全く障害活性を示さなかった。この並列型 MUC 1 pentamer 刺激により誘導された CTL は、E/T 比 1:40 で PSN-1(A24+) 細胞の 45%、KP1N (A2+) 細胞においても 25% の細胞障害活性を認めたが、MCF-7(A2+) 細胞では 10% 以下であった。一方、MUC 1 monomer 刺激により誘導された CTL は PSN-1(A24+) 細胞にのみ 30% の活性を認めた。並列型 MUC 1 pentamer 刺激により誘導された CTL の PSN-1(A24+) 細胞に対する細胞障害活性は Anti-CD 8 抗体および Anti-MUC 1 抗体の添加によりそれぞれ 25% および 30% に大きく低下したが、Anti-class 1 抗体の添加では 75% に低下と大きな影響を受けなかった。

D. 考察

本研究では、高抗原性がん抗原ペプチドの開発を目指し設計・化学合成した非天然型並列 MUC 1 pentamer 刺激により HLA-A24 陽性ドナー由来の樹状細胞から誘導される CTL の活性をヒト膀胱がん培養細胞に対する細胞障害活性を指標として検討した。その結果、E/T 比 1:20 で MUC 1 高発現の KP2N (A24+) と PSN1(A24+) 細胞の 35% および 26% に障害が認められたが MUC 1 低発現の FA6(A24+) 細胞に対してはほとんど障害が認められず誘導された CTL が MUC 1 特異的であることが示唆された。さらに、MUC 1 pentamer 刺激により誘導された CTL は E/T 比 1:40 で PSN1 (A24+) 細胞に対して 45% の細胞障害活性を示し、天然型 MUC 1 monomer 刺激により誘導された CTL の活性である 30% よりも強い傾向を示した。すなわち、非天然型の MUC 1 並列ポリマーが高抗原性がん抗原ペプチドとして応用可能であるこ

ことを示唆した。また、この CTL 活性は Anti-CD 8 抗体および Anti-MUC 1 抗体の添加により大きく低下したが Anti-class 1 抗体の添加では強い影響を受けなかったことは、誘導された CTL が主に class 1 非拘束性に作用していることを示唆している。

E. 結論

以上本研究では、並列型 MUC 1 pentamer で刺激した樹状細胞から誘導される CTL は MUC 1 特異的であり MUC 1 monomer 刺激で誘導された CTL より強い活性であることを示し、同時に、この CTL は MUC 1 陽性ヒト膀胱がん細胞培養株に対して主に class 1 非拘束性の細胞障害活性を示すことを明らかにした。

F. 健康危機情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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(5), 417-422, 2001.
2. Sugatani, J., Komiyama, N., Mochizuki, T., Hoshino, M., Miyamoto, D., Igarashi, T., Hoshi, S. and Miwa, M. : Urinary concentrating defect in rats given shiga toxin: elevation in urinary AQP2 level associated with polyuria. Life Sciences in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
平成13年度 分担研究報告書
プロスタグランジンによる抗腫瘍免疫応答誘導の研究
分担研究者 福島雅典 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

抗腫瘍性PG乳剤：15-デオキシ- Δ^7 -PGA₂リピッドミクロスフェア(Lipo-TEI-9826)のこれまでの研究により、臨床試験実施に必要な、製剤の物性等に関するデータや動物における毒性試験（単回投与、反復投与）、移植腫瘍系における治療実験での有効性、および薬理動態に関するデータが揃い、パッケージとして定義できたので、臨床試験の実施に向け具体的準備として同剤の概要書を作成し、実際に臨床試験を実施すべく、平成13年度に京都大学大学院医学研究科に新たに設置された、探索医療センターの流動プロジェクトに応募し、プロトコルコンセプトを提出した。本研究では、第I相-II相試験として肺転移のある5-Fu不応性大腸癌症例を対象とし、単回および2-4時間持続静注での血中濃度・抗腫瘍効果・毒性を、段階的増量を行いながら評価する予定である。本剤は投与中止後、速やかに血中より消失するので、この方法によれば、安全に臨床試験を行える。臨床試験で実証しようとする新しい治療理論は、本剤によって腫瘍の増殖画分の細胞周期をG1とG2/Mに同調静止させて増殖を抑制し、さらに殺細胞的な制癌薬への感受性を増加させた状態に条件化（Preconditioning）することである。今年度はこの新しい治療理論に加え、最終的に治療を導くため、腫瘍超選択的局所療法とそれによる抗腫瘍免疫誘導の研究を新たに開始した。

A. 研究目的

これまでの研究で開発された臨床可能な製剤である抗腫瘍性PG製剤Lipo-TEI-9826の担癌生体の免疫応答への影響を明らかにして、同剤の臨床応用範囲を拡大し、同剤の生態的応答修飾薬としての治療学的意義を確立する。

B. 研究方法

抗腫瘍性PGの臨床応用範囲を拡大するための基礎的検討として、全く新しい腫瘍超選択的局所療法と、それによる抗腫瘍免疫誘導の研究を開始した。腫瘍局所選択的なエレクトロポレーション（EP）により血中から薬剤を多量に腫瘍細胞内に送達させた。細胞への電気パルス負荷により、細胞膜透過性を一時的に上昇させて遺伝子などを細胞内に導入するエレクトロポレーションを応用した癌治療法としては、ブレオマイシン（BLM）とEPの併用で著明な抗腫瘍効果が得られ、欧米では皮膚癌に対し臨床試験が行われている。しかし効果的な治療を行うための適切な治療条件に関する検討は不十分であり、例えば高電圧条件（電圧1,300V/cm、パルス幅0.1msec、パルス回数8回/8sec）による火傷や紅斑、浮腫など皮膚への損傷、筋肉収縮による不快感

が報告されている。本研究では、より低電圧で実施できる癌電気化学療法として、電気パルスの腫瘍部位選択性が高いフォーク型ピンセット電極と皮膚抵抗値減少のための伝導性ゲルを用い、電圧50あるいは100VのEPとブレオマイシン（BLM）を併用した場合の抗腫瘍効果について検討した。即ち、Colon26皮下担癌マウスにBLMをbolus i.v.投与(50 mg/kg)あるいは腫瘍内(i.t.)投与(100 μ g)のBLMを腫瘍内四カ所に12.5 μ lずつ投与した後、電極ニードル部を腫瘍の皮膚内下部に挿入し、角質層側には電導性ゲル塗布後、電極プレート部を押し当て、腫瘍を挟みEPを負荷した。EP条件は、電圧50あるいは100V、パルス幅1msec、パルス回数8回/1秒に設定し、治療回数は1回のみとした。

C. 研究結果

低電圧でのEP併用効果を得るため、bolus i.v.では高投与量のBLM投与を行ったが、100VのEP併用で著明な腫瘍増殖抑制効果が得られた。しかし、BLMの全身毒性がBLM単独群、EP併用群いずれでも見られた。BLM i.t.投与(約5 mg/kg)では、全身毒性を現すことなく、50および

100VのEP併用で抗腫瘍効果が得られ、特に100Vでは著明に腫瘍増殖を抑制した (Fig.1)。低電圧EP条件でも、BLMとの併用で著明な抗腫瘍効果が得られる事が明らかで、患者への負担がより少ない癌電気化学療法の開発が期待できる。また、別条件のBLM/EP (1A、100 μ sec pulse \times 5、1 sec interval) 治療によってcolon26 移植腫瘍 (ϕ 7mm) が消失した後、同腫瘍を再移植したところ、7匹中1匹にしか正着しなかったが、非消失群では7匹中6匹に正着した。更に両側腹部に腫瘍を移植し ϕ 7mmに成長した後、片側をBLM/エレクトロポレーションで治療して腫瘍を抑制すると、もう一方の無治療腫瘍も有意に抑制された (遠隔効果) が、皮膚正常部のBLM/EP処置は無効であった。

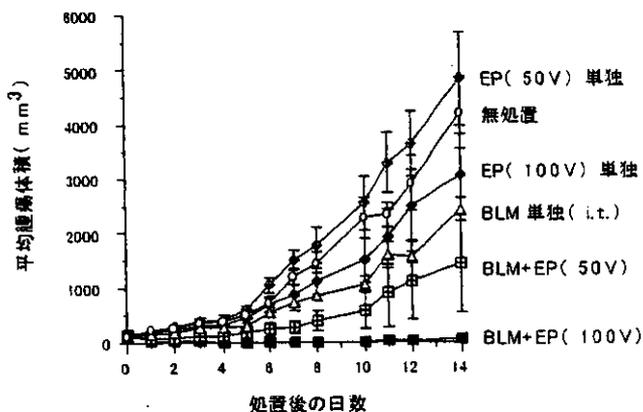


Fig.1 処置後の腫瘍増殖挙動

D. 考察

低電圧エレクトロポレーションによって腫瘍消失が得られたことは、肝癌に対するエタノール注入と同様な臨床的使用の可能性を示唆している。低電圧エレクトロポレーションは簡便かつ安全な局所療法として臨床的評価に値する。低電圧エレクトロポレーションの局所効果が実証されたので前年度に報告した腫瘍内投与方法と併せて合理的な臨床試験デザインが可能となった。なお、マウス腫瘍移植モデルでブレオマイシンを用いた本治療法が、局所効果のみではなく、腫瘍免疫誘導によると思われる再移植腫瘍の拒絶や遠隔効果を示すことも明らかで、超選択的局所治療により、腫瘍免疫が誘導された可能性が強く示唆された。超選択的局所療

法はLipo-TEI-9826を用いても可能であった。即ちin vivoでLipo-TEI-9826 (20 mg/ml) を腫瘍内に1日1回連日局注すると (1回約10 μ l)、腫瘍の増殖は投与期間中、有意に抑制され、in vitroでの細胞周期の検討結果と合わせると、G1あるいはG2-M停止を起こしていることが示唆された。腫瘍組織内より全身血中に移行したTEI-9826は半減期数分以内で消失するため (以前の検討結果)、全身的な作用はほとんど見られないと考えられる。本治療法でも免疫誘導が起こるかどうか検討中であり、また、EPや他の抗癌薬との併用で効果増強が可能か検討中である。1個、または複数の腫瘍に対してブレオマイシン、シスプラチン、5-Fu静注または局注、IL-12遺伝子プラスミド局注とエレクトロポレーションを使用すれば、それらの薬物は効率的に腫瘍細胞に移行し、その腫瘍を選択的に縮小させるばかりでなく、腫瘍に対する免疫応答を誘導して、遠隔効果が発現することが示されている。従って、本剤が血中にIC50レベル存在している時に、エレクトロポレーションを一つまたは複数の腫瘍に施せば、腫瘍に対してIC50以上となり、その腫瘍にアポトーシスを起こして生体に腫瘍に対する免疫応答を誘導しうる。

E. 結論

臨床試験使用可能な製剤である抗腫瘍性Lipo-TEI-9826の臨床試験コンセプトプランを提案した。これらを元に臨床試験チームを編成してプロトコルを倫理委員会に提出する予定である。安全な超選択的局所療法として低電圧エレクトロポレーション法を開発し、ブレオマイシン併用により移植腫瘍動物実験系で著しい治療効果を実証した。

F. 健康危険情報

通常のマウス皮下移植腫瘍の治療実験であり、ヒトへの健康へのリスクは無い。

G. 研究発表

1. 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., 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*. 2001,12 : 221-234.

2. Fukushima, M., Kataoka, T., Hamada, C., 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*. 2001,29 (1) : 1-16.

3. Mohri, K., Fukushima, M., Matsumoto, M. Gradual decrease of electric resistivity in water triggered by milli-gauss low frequency pulsed magnetic field. *Transactions of Magnetics Society of Japan*. 2001, Vol.1.22-26

4. Hosoe, S., Komuta, K., Shibata, K., Harada, H., Iwamoto, Y., Osaki, Y., Morioka, T., Origasa, H., Fukushima, M., Furuse, K., 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*. 2002, in press

5. Fukushima, M., Mohri, K., Kataoka, T. Matsumoto, M., : Milli-gauss pulsed magnetic field applied phosphate buffered saline solution elevates intracellular Ca²⁺ level and stimulates phagocytic activity of human neutrophils. *Transactions of Magnetic Society of Japan*, Vol.2, No.2 .2002. in press.

6. Mohri, K., 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).

7. Dezaki, T., Muramatsu, K., Sakakibara T., Cai, C.M., Mohri K., 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) .

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

H. 知的所有権取得状況