

厚生労働省科学研究助成金
ヒトゲノム再生医療等研究事業

研究課題名

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子
治療法の開発と臨床研究 (H12-ゲノム-006)

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 九州大学生体防御医学研究所・
ゲノム機能制御学部門・ゲノム病態学分野
教授 谷 憲三郎

平成14年 4月10日

目 次

I. 総括研究報告（別添 2）

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究 谷憲三朗	----- 1
--	---------

II. 分担研究報告（別添 3）

1. GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究 谷憲三朗 浅野茂隆 佐藤典治	----- 6
2. 新規 TNF ファミリー分子の腫瘍細胞傷害機構と腫瘍拒絶における意義 奥村 康	----- 10
3. 泌尿器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究 赤座英之	----- 12
4. GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種における免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討 東 みゆき	----- 14
5. 前立腺がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係についての検討 藤目 真	----- 17

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 19
---------------------	----------

総括研究報告書

総括研究報告書

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 九州大学生体防御医学研究所 ゲノム機能制御学部門 教授

研究の要旨：「IV 期腎細胞がん患者を対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究」へ参加することに同意が得られた第 IV 期腎細胞がん患者 6 名に対して、東京大学医科学研究所附属病院で患側腎摘出を行い、同臨床細胞工学室内において腎細胞がん細胞を培養・レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をし、作製した GM-CSF 遺伝子導入細胞の性状ならびに安全性を確認後、適応を満たした 4 名の患者へ再度同意を得た後に接種を完了した。接種中ならびにその後の経過観察期間において著明な副作用の出現を認めず、全患者で一過性もしくは長期にわたる培養自家腎癌細胞に対する細胞障害性 T 細胞の出現を認めた。3 名は生存中であり、この中でも特に第 2 例目患者においては骨転移病巣が新たに発見されるまでの間（遺伝子導入腎癌細胞最終接種後約 2 1 カ月間（接種開始より 2 9 カ月間））病状の安定化と良好な生活の質の維持が可能であった。4 患者に誘導された細胞性ならびに液性免疫の解析を詳細に行った。基礎研究としては、SAGE 法により GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導に深く寄与すると考えられるケモカイン遺伝子 5 種に焦点を当て、次世代の免疫遺伝子治療への応用への可能性を検討中である。さらに、(a) GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種における免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討、(b) 新規 TNF ファミリー分子の腫瘍細胞傷害機構と腫瘍拒絶における意義、(c) 泌尿器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究、(d) 前立腺がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係についての検討、を行い次世代の泌尿器系を中心とした悪性腫瘍に対する遺伝子治療法開発の為の基礎的情報を蓄積してきている。

分担研究者

浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・教授
赤座 英之 筑波大学医学専門学群・教授
奥村 康 順天堂大学・医学部・教授
藤目 真 順天堂大学・医学部・教授
東 みゆき 東京医科歯科大学・歯学部・教授
佐藤 典治 東京大学医科学研究所・助教授

A. 研究目的

臓器への転移を認める第 IV 期腎癌患者に対しては、現在有効な治療手段はなく、多くの患者は 2 年以内に死亡しており、新たな治療法の開発が強く望まれている。一方、最近の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有用性が示唆されている。また放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍細胞(GVAX と省略)の抗腫瘍免疫誘導能もマウスを用いた前臨床研究結果より示唆されており、米国等において、進行期のメラノーマ、腎癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌などの患者を対象に、GVAX を用いた臨床研究が実施され、結果も報告されてきている。本療法はいずれの臨床研究においても安全性が高く、患者体内に接種細胞数に応じた抗腫瘍免疫が誘導されている。過去約 3 年にわたり我々が実施してきた第 IV 期腎癌を対象にした臨床研究では此迄の結果を元に、患者の抗腫瘍免疫活性をより増強させ臨床効果に結びつける目的で新たな GVAX 投与量を設定し、その投与実施の可能性と安全性の評価を行った。同時に実際に患者に誘導された抗腫瘍免疫を、免疫学的検査と画像診断で詳細に検討・評価した。この結果を基に、今後本療法の経済性・汎用性を考慮し、遺伝子導入同種細胞株を用いる方向性がより現実的であるとの

結論に達したため、次期の遺伝子治療臨床研究として、遺伝子導入高 GM-CSF 産生同種細胞株と自家腫瘍細胞を混合接種する方法を用いた、移植後再発性白血病ならびに進行性腎癌に対する遺伝子治療研究を計画する。さらに本研究では GM-CSF 遺伝子導入細胞接種が患者体内で誘導する抗腫瘍免疫を分子生物学的に詳細に解析し、関与する新規分子の検出、併用治療法開発の可能性についても検討し、治療法開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討：平成 10-13 年度の間東京大学医科学研究所附属病院において第 IV 期腎癌患者 6 名の GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンを作成し、その中で GM-CSF 産生量が規定以上であった 4 名に対して接種を完了した。これらの患者に対しては定期的採血による血液学的、生化学的、免疫学的な追跡検査を行うとともに画像診断により転移病巣の経過観察を行った。本年度は特にこれら患者血清について、自己腫瘍細胞タンパク質を認識する抗体の検索をウェスタンブロット法を用いて行った。

(2) mRNA 連続解析システム(SAGE 法)による GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：野生株 WEHI/3B(W3)細胞をマウス皮下に接種後、その腫瘍増生のためにマウスは死に至るが、GM-CSF 産生 W3 細胞を接種した場合腫瘍増殖は 10 日目を境に退縮し完全に拒絶される。ヌードマウスでは本現象は認められない。GM-CSF 産生 W3 細胞を接種後、

約10日目の腫瘍切除組織内に抗腫瘍活性が最も強く現れていることを想定し Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いた腫瘍内発現遺伝子解析を行い、上記3種類のマウス系からそれぞれ11baseから成る tag 配列を約30,000個ずつクローニングし、ケモカイン遺伝子の発現増加が抗腫瘍活性増強に関連して認められた。各種ケモカイン cDNA を retrovirus vector (pMX neo) に組み込んだ。このケモカイン遺伝子を挿入した retrovirus vector を使用して種々の腫瘍細胞にケモカイン遺伝子を単独または複数導入し、ケモカインを産生する腫瘍細胞を作製し、これらの抗腫瘍免疫誘導効果を検討中である。

(3) GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種における免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討：i) 種々のヒト腫瘍細胞株における未刺激および炎症性サイトカイン刺激後の PD-L1 発現のフローサイトメトリー法による解析、ii) マウス PD-L1 および PD-L2 に対するモノクローナル抗体の作製と未刺激および活性化刺激後の脾細胞における発現の検討、iii) マウス白血病細胞株 WEHI3B および GM-CSF 遺伝子導入 WEHI(GM/WEHI)の PD-1 および PD-1 リガンド分子発現と *in vitro* におけるこれら分子の増殖反応への影響の検討、同系マウスへの腫瘍移植モデルにおける抗 PD-1 および抗 PD-1 リガンド抗体投与による抗腫瘍免疫能に与える影響を検討する。

(4) 新規 TNF ファミリー分子の腫瘍細胞傷害機構と腫瘍拒絶における意義：種々の腫瘍細胞(HT29, HSC3, Kym1)のリコンビナント TWEAK に対する感受性を、caspase 阻害剤および cathepsin B 阻害剤の存在下で調べ、それぞれの細胞における TWEAK による細胞死の誘導機構を解析した。また、TRAIL の中和抗体の継続的投与および TRAIL 遺伝子のノックアウトが発癌に及ぼす影響、および TRAIL の発現誘導に重要な IFN- γ の腫瘍監視機構における意義の解析をメチルコラントレン(MCA)による発癌の系等を用いて解析した。

(5) 泌尿器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究：(i) CTL 養子免疫療法：転移腎癌症例において自己癌特異的 CTL の大量培養が可能な場合、これを用いて養子免疫療法を行なう。さらに、これまで治療を行なった症例について経過観察を行なう。(ii) BCG 抗腫瘍ワクチンモデル：C3H/HeN マウスを使用し腫瘍細胞株として C3H マウス由来の移行上皮癌細胞株 MBT2 を用いた。まず、C3H/HeN マウスに BCG 及び MBT2 細胞を混合接種しマウスが完全に MBT2 細胞の生着を拒絶する条件を設定した。さらにこのマウスに MBT2 細胞並びに *in vitro* で BCG と共培養した後に洗浄した MBT2 細胞を再接種し腫瘍の生着及び脾細胞の MBT2 細胞に対する傷害活性を検討した。

(6) 前立腺がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係に

についての検討：MUC1 ムチンは、基本骨格となるタンパクに糖鎖が付き、最後にシアル酸がついて、最も成熟した形となる。これは細胞内のゴルジ装置で行われる。腫瘍によって、MUC1 ムチンのいろいろな成熟過程のものが現れる。本年度は、基本骨格に少し糖鎖が付いただけのものを認識する HMFG2、さらに糖鎖のついたものを認識する HMFG1、さらにシアル酸が付いたものを認識する MY1E.12 の、3種類の異なる認識部位をもつ、モノクローナル抗体を用いて、前立腺癌組織を染色した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療臨床研究中はその規定通り患者における安全性検討を注意深く行い、その情報を患者に伝え、同意を得ながら臨床研究を継続した。遺伝子治療臨床研究第二(ワクチン細胞接種)段階が完了した患者に対しても、患者の立場を常に尊重し、通常の診察のみならず臨床心理の専門家を含む TRC(translational research coordinator)による定期的なインタビューも行い、患者心理を適格に把握し、精神的ケアの充実も図りながら最適な対症療法を行い、注意深く経過観察中である。患者の純粋な個人情報に関しては決して公開はしていない。今後患者に重篤な状態が発生した場合には病院長より所轄省庁へ報告する。また遺伝子治療臨床研究の適応外の患者に対して実施される養子免疫療法においても筑波大学倫理委員会の承認を得た上で定められた説明文書を用いてインフォームドコンセントが得られた症例に対してのみ施行した。すべての動物実験は各大学の「動物施設の利用内規」、および「動物実験に関する指針」に基づき、学内での審査を受け、十分な倫理面への配慮をしつつ行った。

C. 研究結果及び考察

(1) GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞ワクチン接種完了患者3名の経過観察：規定のワクチン接種を完了し、生存中の患者3名については現在東京大学医科学研究所附属病院もしくは順天堂大学附属病院にて経過観察中である。各患者の経過の概略のみ以下に記す。(i) (接種第2症例) 71歳男性、右腎細胞癌、仙骨転移：1999年6月3日から2000年2月3日までに計17回、 3.7×10^8 細胞のワクチン接種を行った。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。平成13年12月迄PS0の状態で評価病変の変化なく、経過観察していたが、同年12月に右大腿骨転移病変の出現を認めたと、現在局所放射線照射と低量インターロイキン-2投与を開始した。現在PS0にて東京大学医科学研究所附属病院外来にて経過観察中である。

(ii) (接種第3症例) 57歳女性、左腎細胞癌、多

発性肝転移、多発性肺転移ならびに対側腎転移：2000年2月22日から同9月19日まで計15回、 3.2×10^8 細胞のワクチン接種を行った。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。肝転移病巣のサイズはその後徐々に増加したことから本人の希望で近医において活性化リンパ球療法を受けたが改善を認めず、現在順天堂大学附属病院にて入院・外来管理下で対症療法を受けている。現在PS2である。(iii) (接種第4症例) 50歳男性、左腎細胞癌、多発性肺転移：2000年12月13日から2001年2月20日まで計6回、 1.4×10^8 細胞のワクチン接種を行った。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。同2月26日実施したCT検査において右前側頭葉皮質に径1cm弱の腫瘍ならびに周辺浮腫像を認めたため追加接種は行わず、同3月15日に転移性脳腫瘍部位へのγナイフ治療を実施した。同5月7日よりIL-2、35-70万単位/日の全身投与を開始し、その約1ヶ月目より肺腫瘍量の減少を認め、約2ヶ月目には23%の縮小を、IL-2投与中止後の同10月現在も約33%の減少状態が維持されていた。IL-2の投与開始時に一過性に脳浮腫の悪化による痙攣発作を認めたものの、脳腫瘍・浮腫の縮小化に伴いこれらの症状は全く認められなくなり、平成14年1月に脳腫瘍を摘出した。その後IL-2投与を再開し、現在PS0-1の安定した状態で入院経過観察中である。これら患者の末梢血中にはその後も自家腎癌細胞に対する細胞障害性Tリンパ球活性が検出され、第2, 3症例においてはオリゴクローン性のTリンパ球の増生が検出された。

(2)患者血清を用いた自己腫瘍細胞タンパク質を認識する抗体の検索：GM-CSFワクチン細胞接種を受けた4患者において、250 kDタンパク質に強いシグナルがみられた。このシグナルは治療後の自己血清により出現しており、治療前の自己血清では確認できなかったため、当該タンパク質に対する抗体が治療によって誘導されたものと考えられた。さらに4患者中2患者では、60 kDタンパク質にも同様の反応性が治療によって誘導されることも観察された。治療後血清の250 kDのタンパク質に対する反応は、正常自己腎細胞ライセートに対しても検出されるため、このタンパク質は腫瘍特異的に発現するものではなく、さらにVMRC-RCWのような腎がん細胞株やHL-60(前骨髄性白血病細胞株)あるいはヒト口唇繊維芽細胞などのライセートでも250 kDのシグナルが検出されたため、個体や組織に限定されず普遍的に発現するタンパク質である可能性が高い。それに対し、60 kDタンパク質は正常自己腎細胞ライセートではシグナルが見られないため、腫瘍特異的に発現し

ている可能性がある。また第二症例については、治療開始後の時間経過で250 kDタンパク質への反応性の変化を追ってみた。調査した範囲内では、5回目ワクチン接種後67日目において最も強いシグナルが観察され、その後ワクチン接種期間の81日-281日にかけては徐々にシグナルの減衰が確認された。その後の期間に関しては、シグナルは痕跡的レベルに留まっており、液性免疫反応の誘導は比較的初期の治療中にピークがあり、その後減衰することが示唆された。

(3) mRNA連続解析システムによるGM-CSF遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：計90,071tagを解析した結果、24,514種の異なる遺伝子であることがわかり、うち73.8%が既知の遺伝子であった。この中には腫瘍拒絶の系から共通して10倍以上発現増強される既知遺伝子が15種類同定できた。この中で特にケモカイン遺伝子5種に注目し、免疫組織化学的解析を行った結果、退縮する腫瘍組織にこれらの発現が検出された。従って腫瘍の退縮にはケモカインが関与している可能性が強く示唆された。今後ケモカイン発現レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入腫瘍細胞を作製し、その抗腫瘍増幅効果を検討する。

(4) GM-CSF遺伝子導入癌ワクチン接種における免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討：i) 検索したほとんどのヒト上皮系癌細胞株、悪性黒色腫、神経芽細胞腫にPD-L1の細胞表面発現が観察された。発現の認められなかった癌細胞株においても、IFN γ 刺激により誘導され、またTNF α あるいはIL-1刺激によっても安定に高発現されていた。ii) PD-1は活性化刺激によりT細胞およびB細胞に誘導されるが、リガンドのひとつであるPD-L1はT、B、NK、マクロファージ、樹状細胞(DC)にすでに発現が認められ、活性化刺激により増強された。PD-L2は、GM-CSF刺激後のDCにのみ発現誘導され、その他の細胞分画における発現誘導は認められなかった。iii) WEHI3BおよびGM/WEHIの細胞表面上には、わずかではあるがPD-1およびPD-L1、PD-L2の発現が認められた。In vitroにおける両細胞の増殖は、PD-1、PD-L1、PD-L2に対する抗体の単独あるいは併用添加により影響されなかった。同系マウスBALB/cへのWEHI3B細胞の生着は、抗PD-1抗体あるいは抗PD-L1および抗PD-L2抗体投与により明らかな影響をうけなかった。また、GM/WEHIの接種は、WEHI3Bと比較して明らかに腫瘍増殖を抑制したが、抗PD-1抗体投与による差はなかった。PD-L1は免疫担当細胞のみならず組織細胞上に発現が認められることから、T細胞およびAPC間において主要な役割を果たしているCD28/CTLA-4-CD80/CD86経路とは異なり、癌細胞-T細胞間相互作用に関与している可能性が考えられた。しかし本研究で用いたWEHI白血病細胞の

腫瘍モデルにおいては、抗腫瘍免疫応答における PD-1/PD-L1/PD-L2 経路の積極的な関与は抗体投与実験から明らかにできなかった。本結果が WEHI 細胞に特有の現象であるか、その他の腫瘍においても同様な結果であるか、それとも癌細胞上の PD-1 リガンド発現と宿主細胞上の PD-1 リガンド発現の間に関連性があるかについては今後、検討の予定である。

(5) 新規 TNF ファミリー分子の腫瘍細胞傷害機構と腫瘍拒絶における意義：TWEAK は caspase 依存的なアポトーシスによる細胞死の誘導以外に、腫瘍細胞によっては主に cathepsin B 依存的なネクローシスを誘導することを示した。同時に、これらの細胞死が、これまで TWEAK のレセプターと考えられていた DR3 を介した作用ではないことも明らかにした。一方、TRAIL の中和抗体の投与や TRAIL 遺伝子のノックアウトにより、MCA や p53 の変異による発癌が助長され、TRAIL が発癌に対してサーベイランス効果を担っていることを明らかにした。この効果の発揮には IFN- γ および NK 細胞が重要であり、同時に IFN- γ には MCA により誘導される腫瘍の TRAIL 感受性を上げる作用があることも明らかにした。さらには、NK 細胞から産生される IFN- γ が NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide の抗腫瘍作用において最も重要な作用機序であることを示した。腫瘍細胞に対する TWEAK の多彩な細胞死誘導機構を明らかにできたが、今後そのレセプター、および生体の腫瘍拒絶に関連した同分子の意義を明らかにする。また TRAIL の発現を司る IFN- γ は多面的に作用して、腫瘍に対する抵抗性を高めていると予想され、今後、細胞傷害活性分子、補助シグナル、ケモカインおよび血管新生等を含めて、総合的に腫瘍拒絶の機構を解析していく予定である。

(6) 泌尿器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究：(i) CTL 養子免疫療法：これまで治療を行なった 3 例について経過観察を行なったところ 2 例は PD と判定され IL-2 投与、放射線照射及び手術療法を行い現在のところ担癌状態で生存中である。1 例は長期間 PR (約 3 年) であったが大腸転移を来し死亡した。同例について病理解剖を行い組織学的に検討したところ原発巣に比べ転移巣では組織学的により悪性度が高い傾向にあった。また縮小効果を認めたリンパ節転移巣では広範な繊維化及び CD8 陽性 T リンパ球の浸潤を認めた。現在さらに 1 例を治療中である。(ii) BCG 抗腫瘍ワクチンモデル：BCG との混合接種により MBT2 細胞を拒絶したマウスに 4 週後に MBT2 細胞を再接種したところ全例に腫瘍が生着した。これに対して BCG と共培養した MBT2 細胞の生着は認められなかった。8 週後に再接種を行なっても同様の結果であり、腫瘍を拒絶したマウスの脾細胞は BCG と共培養した MBT2 細胞のみに対して傷害活性を示した。CTL 養子免疫療法患者の治療後に出現した転

移巣の悪性度は原発巣より高く、一部の癌細胞クローンの免疫学的エスケープが関与しているものと考えられた。

(7) 前立腺がんの糖鎖発現と浸潤・転移能との関係についての検討：(i) 前立腺全摘例 24 例において、術後の再発は、MY1E.12 陽性、HMFG1 陽性例に多くみられ、HMFG2 とは相関がみられなかった。前立腺全摘後、再発が多いということは、臨床的には局在がんであると考えられた例でも、微小転移があったことを意味する。したがって、この結果から MUC1 ムチンのシアル化の進行と転移との関連が示唆された。(ii) 転移のある病期 D の患者 35 例については、生検標本で MY1E.12 陽性のものは予後が悪かった。(iii) 予後を目的変数として多変量解析すると、生存率には grade が一番相関し、無病生存率では MY1E.12 は 2 番目であった。がん細胞間の接着の低下は、多くの癌に見られ、浸潤・転移能との関係が注目されている。MUC1 ムチンの表面はシアル化されることにより、陰性に荷電されている。細胞膜の表面に MUC1 ムチンが過剰発現されると、細胞間の接着が不安定になると考えられている。本研究結果から MUC1 ムチンのシアル化の進行と、微小転移の発生との間の関連が示唆された。また転移を有する例で、シアル化の進んだ腫瘍の予後が不良であることが示され、病勢が進行しやすい可能性が考えられた。

D. 結論

本臨床研究結果より GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療は安全に患者に対して実施できると共に、患者体内に腫瘍特異的免疫反応を誘導可能であることが明らかになった。特に本年度の研究結果から GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍ワクチン接種によって、患者免疫系に新たな液性免疫反応を誘導できることも明らかになった。今後、患者末梢血 T 細胞の機能検索と合わせて、本療法により如何なる抗腫瘍免疫応答が誘導されているか明らかにし、これらの知見からさらに有効性が期待できる抗腫瘍免疫療法・遺伝子治療を開発することが今後の課題である。なお次期遺伝子治療臨床研究プロトコルの準備状況としては、白血病、腎癌、膵臓癌を対象として GM-CSF 発現 K562 バイスタンダー細胞を用いた新規遺伝子治療臨床研究プロトコルを作成中であり、14 年度中には学内審査を開始する予定である。

また今後のより効果的な遺伝子治療法開発を目指す上で、GM-CSF 遺伝子とそれ以外の遺伝子を組み合わせた複合的遺伝子治療法を導入することも将来的には重要である。本年度の研究で腎癌に対する養子免疫療法については有用性が示唆されており引き続き臨床症例における検討を行い有効性及び安全性について明らかにする。基礎研究結果として i) 局

所的にケモカイン産生を増加させるベクターの使用の可能性、ii)TWEAKならびに TRAIL などの TNF ファミリー分子の腫瘍拒絶における重要性が示されており、今後の GM-CSF 遺伝子治療との併用の可能性が示唆された。一方、抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-1 リガンド抗体投与では抗腫瘍免疫効果は期待できないことが明らかになった。今後の検討として、BCG の抗腫瘍効果の検討、シアル化 MUC1 ムチンの発現の抑制の検討などを行うことも抗腫瘍免疫療法開発の上で重要な示唆を与えてくれるものと考えられた。以上の様に、本年度の研究成果は現在完了した GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療臨床研究をさらに進化した形で実施していく意義を示すと共に、がん免疫療法の進展に有益な情報を与えた。さらに本臨床研究に付随した基礎研究は今後の新規免疫遺伝子治療法開発に向けて多くの示唆を与えてくれるものであった。これらの方法の複合的利用により、より効果的で副作用の少ない新規免疫遺伝子治療の開発が可能になるものと期待される。

E. 発表

- 1 Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Suzuki, S., Wu, M.S., Sugiyama, H., Izawa, K., Hase, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Ooi, J., Izeki, T., Tojo, A., Tanioka, Y. and Asano, S. Haematopoietic progenitor cells from common marmoset as targets of gene transduction by retroviral and adenoviral vectors. *Eur J Haematol* 66:272-280,2001
- 2 Inazawa T, Tanabe T., Yamada H., Nakaoka T., Hashimoto, Yamasaki T., Kotaki H., Tani, K., Asano, S., and Yamashita N. Glucorticoid-regulated expression of exogenous human growth hormone gene in rats. *Molecular Therapy* 4:267- 272, 2001.
- 3 Kuwabara, T., Tanabe, T., Warashina, M., Kang X., Tani, K., Taira, K., Asano, S. Allosterically controllable maxizyme-mediated suppression of progression of leukemia in mice. *Biomacromolecules* 2: 1220-1228, 2001.
- 4 Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, T.A., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplantation* 29: 197-204, 2002.
- 5 Duda, DG., Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., Matsuno, S. Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis. *Br. J. Cancer* 86: 490-496, 2002.
- 6 Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S., Akaza, H. Clinical course of an advanced renal cell carcinoma patient treated with GM-CSF gene therapy (GVAX): The first experience of cancer gene therapy in Japan. *Int J Urol*
- 7 Ohata, J., Sakurai, J., Saito, K., Tani, K., Asano, S., Azuma, M. Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft versus-host disease prophylaxis. *Clin Exp Immunol* (in press)
- 8 Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kaer, L. V., Saiki, I., and Okumura, K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J. Immunol.* 166: 6012-6018. 2001.
- 9 Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Kaer, L.V., Saiki, I., and Okumura, K. Critical contribution of IFN-g and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* 31: 1720-1727. 2001.
- 10 Nakayama, K., Ishidoh, K., Kayagaki, N., Kojima, Y., Yamaguchi, N., Nakano, H., Kominami, E., Okumura, K., and Yagita, H. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J. Immunol.* 168: 734-743. 2002.
- 11 Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. Critical contribution for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195: 161-169. 2002.
- 12 Hattori, H., Okano, M., Yoishino, T. Akagi, E. Nakayama, C. Saito, A. Satoskar R., Ogawa, T., Azuma, M., Nishizaki, K. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1242-1249, 2001
- 13 Ebata, T., Mogi S. Hata Y., Fujimoto, J., Okumura, K., Azuma, M. Rapid induction of CD95 ligand and CD4⁺ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation. *Eur. J. Immunol.* 31: 1410-1416, 2001. 14) Nozawa, K., Ohata, J. Sakurai, H. Hashimoto H., Yagita H., Okumura, K., Azuma, M. Preferential blockade of CD8⁺ T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute chronic graft-vs-host diseases. *J. Immunol.* 167: 4981-4986, 2001
- 14 Mogi, S., Ebata, T., Azuma, M. The effect of recombinant CD80-Adenovirus and IL-12 on generation of autologous cytotoxic T lymphocytes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Disease.* (in press)
- 15 Takimoto, Y., Shimazui, T., Akaza, H., Sato, N., Noguchi, M., Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. *Cancer*, 91, 362-370, 2001
- 16 Iwasaki A., Kawai K., Hayashi H., Ikeda N., Toida I., Ohtani M., Akaza, H. Immunological protection induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) treatment in a murine bladder tumor model. *Int. J. Urol* (in press)
- 17 Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K and Akaza, H. Surface Antigen Expression on Bladder Tumor Cells Induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol* (in press)

分 担 研 究 報 告 書

分担研究報告書

GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失腫瘍細胞接種による遺伝子治療法の開発と臨床研究

主任研究者 谷憲三郎 九州大学生体防御医学研究所・ゲノム機能制御学部門・教授

分担研究者 浅野茂隆 東京大学医科学研究所・分子療法研究分野・教授

佐藤典治 東京大学医科学研究所附属病院・ゲノム診療部・助教授

研究要旨：「IV 期腎細胞がん患者を対象とする GM-CSF 遺伝子導入自己複製能喪失自家腫瘍細胞接種に関する臨床研究」へ参加することに同意が得られた第 IV 期腎細胞がん患者 6 名に対して、東京大学医科学研究所附属病院で患側腎摘出を行い、同臨床細胞工学室内において腎細胞がん細胞を培養・レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入をし、作製した GM-CSF 遺伝子導入細胞の性状ならびに安全性を確認後、適応を満たした 4 名の患者へ再度同意を得た後に接種を完了した。接種中ならびにその後の経過観察期間において著明な副作用の出現を認めず、4 患者で一過性もしくは長期にわたる培養自家腎癌細胞に対する細胞障害性 T 細胞の出現を認めた。1 名を除き、3 名は生存中であり、この中でも特に第 2 例目患者においては骨転移病巣が平成 13 年 12 月に新たに発見されるまでの間（遺伝子導入腎癌細胞最終接種後約 21 カ月間（接種開始より 29 カ月間））病状の安定化と良好な生活の質の維持を認めた。現在 4 患者に誘導された細胞性ならびに液性免疫の解析をさらに詳細に行っている。基礎研究としてはマウス自家腫瘍系を用い、SAGE 法により GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の抗腫瘍免疫誘導に深く寄与すると考えられるケモカイン遺伝子 5 種に焦点を当て、これらの遺伝子導入腫瘍細胞の誘導する抗腫瘍免疫活性を検討し、次世代の免疫遺伝子治療への応用への可能性を検討中である。

A. 研究目的

臓器への転移を認める第 IV 期腎癌患者に対しては、現在有効な治療手段はなく、多くの患者は 2 年以内に死亡しており、新たな治療法の開発が強く望まれている。一方、最近の臨床研究結果から、腎癌に対する免疫療法の有用性が示唆されている。また放射線照射・GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍細胞(GVAX と省略)の抗腫瘍免疫誘導能もマウスを用いた前臨床研究結果より示唆されており、米国等において、進行期のメラノーマ、腎癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌などの患者を対象に、GVAX を用いた臨床研究が実施され、結果も報告されてきている。本療法はいずれの臨床研究においても安全性が高く、患者体内に接種細胞数に応じた抗腫瘍免疫が誘導されている。過去約 3 年にわたり我々が実施してきた第 IV 期腎癌を対象にした臨床研究では此迄の結果を基に、患者の抗腫瘍免疫活性をより増強させ臨床効果に結びつける目的で新たな GVAX 投与量を設定し、その投与実施の可能性と安全性の評価を行った。同時に実際に患者に誘導された抗腫瘍免疫を、免疫学的検査と画像診断で詳細に検討・評価した。この結果を基に、今後本療法の経済性・汎用性を考慮し、遺伝子導入同種細胞株を用いる方向性がより現実的であるとの結論に達したため、次期の遺伝子治療臨床研究として、遺伝子導入高 GM-CSF 産生同種細胞株と自家腫瘍細胞を混合接種する方法を用いた、移植後再発性白血病ならびに進行性腎癌に対する遺伝子治療研究を計画する。さらに本研究では GM-CSF 遺伝子

導入細胞接種が患者体内で誘導する抗腫瘍免疫を分子生物学的に詳細に解析し、関与する新規分子の検出、併用治療法開発の可能性についても検討し、治療法開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 第 IV 期腎癌患者への免疫遺伝子治療の実施ならびにその臨床的・免疫学的検討：平成 10-13 年度の間東京大学医科学研究所附属病院において第 IV 期腎癌患者 6 名の GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞ワクチンを作成し、その中で GM-CSF 産生量が規定以上であった 4 名に対して遺伝子治療適応について慎重に検討し、接種の適応を十分に満たしたために接種を行った。これらの患者に対しては定期的採血による血液学的、生化学的、免疫学的な追跡検査を行うとともに画像診断により転移病巣の経過観察を行った。本年度は特にこれら患者血清について、自己腫瘍細胞タンパク質を認識する抗体の検索を行った。すなわち培養した細胞（自己腫瘍・正常腎・細胞株など）から NP-40 を含む細胞溶解バッファーでタンパク質を抽出した。これを SDS-PAGE 電気泳動で分子量による分画をおこない、セミドライブロッティングで PDF 膜に転写した。Ponceu-S 染色で各レーンを確認しながらレーンを切り離し、それぞれをブロッキング後、患者血清サンプルと反応させた。さらに HRP 標識ウサギ抗ヒト Ig G [F(ab')₂]を検出用抗体として反応させ、ECL で検出した。

(2) mRNA 連続解析システムによる GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析：野生株 WEHI/3B(W3)細胞をマウス皮下に接種後、その腫瘍増生のためにマウスは死に至るが、GM-CSF 産生 W3 細胞を接種した場合腫瘍増殖は 10 日目を境に退縮し完全に拒絶される。一方、ヌードマウスでは GM-CSF 産生細胞による抗腫瘍活性は認められない。GM-CSF 産生 W3 細胞を接種後、約 10 日目の腫瘍切除組織内に抗腫瘍活性が最も強く現れていることを想定し Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法を用いた腫瘍内発現遺伝子解析を行い、上記 3 種類のマウス系からそれぞれ 11base から成る tag 配列を約 30,000 個ずつクローニングした。この結果、ケモカイン遺伝子の発現増加が抗腫瘍活性増強に関連して認められた。そこで、マウス皮膚から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各種ケモカインの cDNA を増幅後、retrovirus vector (pMX neo) に組み込んだ。現在このケモカイン遺伝子を挿入した retrovirus vector を使用して種々の腫瘍細胞にケモカイン遺伝子を単独または複数導入し、ケモカインを産生する腫瘍細胞を作製し、これらの抗腫瘍免疫誘導効果を検討する予定である

(倫理面への配慮)

本遺伝子治療臨床研究への希望患者の医学的適応を学内の臨床検討委員会で十分に論議し、適応基準に合致する患者に対して説明書を用い少なくとも 2 回にわたり本研究の内容を詳細に説明した。文書での同意を得た後、さらに本附属病院遺伝子治療審査委員会による審査を受け、承認を得た患者に対して患側腎臓の摘出後、遺伝子治療に備えた遺伝子導入自家腎癌細胞の培養を開始した。その後遺伝子導入細胞の安全性を米国の安全性検討会社で確認後、再度文書での説明・同意を得た後、遺伝子導入細胞の接種を行った。臨床研究中は患者における安全性を注意深くモニターし、その情報を患者に伝え、同意を得ながら臨床研究を継続した。患者の立場を常に尊重し、臨床心理の専門家を含む TRC(translational research coordinator)による定期的なインタビューも行い、患者心理を適格に把握し、精神的ケアの充実も併せて図った。患者の純粋な個人情報に関しては決して公開はしない。副作用を含む有害事象の発生時や適応から外れる病状の変化等を認めた場合には、規定に従い臨床研究の中止措置等を至急に行い、病院長より所轄省庁へ報告した。GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍細胞ワクチン接種終了後も、患者の意志を十分に尊重し、選択可能な対症療法を本附属病院もしくは共同研究病院において実施し注意深く患者の経過を観察している。

C. 研究結果及び考察

(1) GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞ワクチン接種完了患者 3 名の経過観察：

接種完了し、生存中の患者 3 名については以下の状況である。

(i) (接種第 2 症例) 71 歳男性、右腎細胞癌、仙骨転移: 1999 年 6 月 3 日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後 2 週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計 5 回、さらに 11 回の追加接種を 2000 年 2 月 3 日まで行った (計 17 回、 3.7×10^8 細胞)。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。ワクチン細胞接種に伴い、タリウムシンチグラフィにて仙骨転移腫瘍部分へのタリウム取り込み量の低下ならびに CT 検査でも同部位の造影効果の減少所見を認め、腫瘍血管増生の減少が示唆されたが、治療効果の判定は NC (不変) であった。またワクチン接種前には増加していた腫瘍マーカー IAP (inactivated acidic protein) が、6 回接種以降は正常化した。2000 年 5 月 11 日に順天堂大学病院・整形外科において仙骨転移部分の開放生検を実施し、同部分の壊死を病理学的に確認した。なお下記のごとく同生検部分への浸潤リンパ球は DTH 反応の際に認めたリンパ球と同一クローンであることが確認され、細胞障害性 T リンパ球の可能性が示唆された。患者においては、その後も無治療にて仙骨転移病巣は徐々に縮小傾向にあり、他臓器への新たな転移病巣の出現も認められず、さらには腫瘍マーカー(IAP)は正常レベルでその後も安定化していた。平成 13 年 12 月迄 PS0 の状態で、経過観察していたが、同年 12 月に右大腿骨転移病変の出現を認めた為、現在局所放射線照射と低量インターロイキン-2 投与を開始した。現在 PS0 にて東京大学医科学研究所附属病院外来にて経過観察中である。

(ii) (接種第 3 症例) 57 歳女性、左腎細胞癌、多発性肝転移、多発性肺転移ならびに対側腎転移: 2000 年 2 月 22 日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後 2 週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計 5 回、さらに 9 回の追加接種を同年 9 月 19 日まで行った (計 15 回、 3.2×10^8 細胞)。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。肝転移病巣の総腫瘍量の増加速度は鈍化したものの次第に増加し、治療効果の判定は PD (進行) であった。ただし、肺ならびに腎臓の小転移

病巣のサイズには殆ど変化がなかった。平成 12 年 9 月 29 日に東京大学医科学研究所附属病院を退院後順天堂大学附属病院へ転院し、入院観察下 IL-2、インターフェロン α の接種をそれぞれ検討したが、いずれも開始 1 週間目より肝機能異常が出現したため各投与を中止した。肝機能異常は投与中止にて改善したため、現在は東大医科研附属病院と順天堂大学附属病院の両外来にて定期的に経過観察中である。肝転移病巣のサイズはその後徐々に増加したことから本人の希望で近医において活性化リンパ球療法を受けたが改善を認めず、現在順天堂大学附属病院にて入院・外来管理下で対症療法を受けている。現在 PS2 である。

(iii) (接種第 4 症例) 50 歳男性、左腎細胞癌、多発性肺転移: 2000 年 12 月 13 日に 4×10^7 個のワクチン細胞の皮内接種を行い、その後 2 週間毎に 2×10^7 個の皮内接種を計 5 回、2001 年 2 月 20 日まで行った (計 6 回、 1.4×10^8 細胞)。この間患者においては本遺伝子治療臨床研究を進める上で問題となるような副作用は認められなかった。6 回接種後同 2 月 26 日実施した CT 検査において右前側頭葉皮質に径 1cm 弱の腫瘍ならびに周辺浮腫像を認めた。本臨床研究の規定に従い、それ以降の追加接種は行わず、東京大学医学部附属病院放射線科において同年 3 月 15 日に転移性脳腫瘍部位への γ ナイフ治療を実施した。その後患者ならびに家族の希望により、同 5 月 7 日より東大医科研附属病院にて IL-2、35-70 万単位/日の全身投与を開始した。開始後約 1 ヶ月目より肺腫瘍量の減少を認めはじめ、約 2 ヶ月目には 23% の縮小を認め、IL-2 投与中止後の同 10 月現在も約 33% の減少状態が維持されている。IL-2 の投与開始時に一過性に脳浮腫の悪化による痙攣発作を認めたものの、脳腫瘍・浮腫の縮小化に伴いこれらの症状は全く認められなくなり、PS0-1 の状態で入院観察中であつたが脳腫瘍摘出を平成 14 年 1 月に東京大学附属病院で行った。その後 IL-2 投与を再開され、PS0-1 の安定した状態で入院経過観察中である。

これら患者の末梢血中にはその後も自家腎癌細胞に対する細胞障害性 T リンパ球活性が検出され、第 2, 3 症例においてはオリゴクローン性の T リンパ球の増生が検出された。

(2) 患者血清を用いた自己腫瘍細胞タンパク質を認識する抗体の検索: GM-CSF ワクチン細胞接種を受けた 4 患者において、250 kD タンパク質に強いシグナルがみられた。このシグナルは治療後の自己血清により出現しており、治療前の自己血清では確認で

きないため、当該タンパク質に対する抗体が治療によって誘導されたものと考えられる。さらに 4 患者中 2 患者では、60 kD タンパク質にも同様の反応性が治療によって誘導されることも観察された。治療後血清の 250 kD のタンパク質に対する反応は、正常自己腎細胞ライセートに対しても検出されるため、このタンパク質は腫瘍特異的に発現するものではなく、さらに VMRC-RCW のような腎がん細胞株や HL-60 (前骨髄性白血病細胞株) あるいはヒト口唇繊維芽細胞などのライセートでも 250 kD のシグナルが検出されるため、個体や組織に限定されず普遍的に発現するタンパク質である可能性が強い。それに対し、60 kD タンパク質は正常自己腎細胞ライセートではシグナルが見られないため、腫瘍特異的に発現している可能性がある。また第二症例については、治療開始後の時間経過で 250 kD タンパク質への反応性の変化を追ってみた。調査した範囲内では、5 回目ワクチン接種後 67 日目において最も強いシグナルが観察され、その後ワクチン接種期間の 81 日 - 281 日にかけては徐々にシグナルの減衰が確認された。その後の期間に関しては、シグナルは痕跡的レベルに留まっており、液性免疫反応の誘導は比較的初期の治療中にピークがあり、その後減衰することが示唆された。

(3) mRNA 連続解析システムによる GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞の増殖抑制機構の解析: 計 90,071 tag を解析した結果、24,514 種の異なる遺伝子であることがわかり、うち 73.8% が既知の遺伝子であった。この中には腫瘍拒絶の系から共通して 10 倍以上発現増強される既知遺伝子が 15 種類同定できた。これら既知遺伝子の中で特にケモカイン遺伝子 5 種に注目し、免疫組織化学的解析を行った結果、退縮する腫瘍組織にこれらケモカインの発現が検出された。以上の結果から、腫瘍の退縮にはケモカインが関与していることが強く示唆された。ケモカイン産生腫瘍細胞の作製については、それぞれのケモカイン遺伝子を組み込んだ retrovirus vector (pMX neo) の構築まで終了しており、現在遺伝子導入腫瘍細胞を作製中である。

D. 結論

腎癌に対する GM-CSF 遺伝子を用いた免疫遺伝子治療を実施した 4 例におけるこれまでの臨床ならびに免疫学的検討結果より、本遺伝子治療法は安全に患者に対して実施できると共に、患者体内に検出可能な腫瘍特異的免疫反応の誘導を観察できることが明らかにされた。特に本年度の研究結果から GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍ワクチン接種によって、患者免

疫系に新たな液性免疫反応を誘導できることが明らかになった。患者末梢血 T 細胞の機能検索と合わせて、本療法により如何なる抗腫瘍免疫応答が刺激されているか明らかにし、これらの知見からさらに有効性が期待できる腫瘍の免疫療法・遺伝子治療を開発することが今後の課題である。一方、GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞を用いたマウス in vivo 研究結果より、退縮する腫瘍における遺伝子・免疫組織学的解析結果からは、局所的なケモカイン産生が増加することにより腫瘍が拒絶されることが示唆された。今後、ケモカイン産生腫瘍細胞を使用してケモカインによる腫瘍免疫誘導の検討を行う予定である。なお、次期遺伝子治療臨床研究プロトコールの準備状況としては、白血病、腎癌、膵臓癌を対象として GM-CSF 発現 K562 バイスタンダー細胞を用いた新規遺伝子治療臨床研究プロトコールを作成中であり、14 年度中には学内審査を開始する予定である。

E. 発表

- 1 Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Suzuki, S., Wu, M.S., Sugiyama, H., Izawa, K., Hase, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tanioka, Y. and Asano, S. Haematopoietic progenitor cells from common marmoset as targets of gene transduction by retroviral and adenoviral vectors. *Eur J Haematol* 66:272-280, 2001
- 2 Ooi, J., Iseki, T., Nagayama, H., Tomonari, A., Ito, K., Shirafuji, N., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. Unrelated cord blood transplantation for adult patients with MDS-related secondary acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 114:834-836, 2001.
- 3 Ooi, J., Iseki, T., Ito, K., Mori, Y., Sato, H., Takahashi, T., Ishii, N., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. Successful unrelated cord blood transplantation for relapse after autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* (in press)
- 4 Tomonari A, Tojo A, Iseki T, Ooi J, Nagayama H, Ogami K, Maekawa T, Shirafuji N, Tani, K., Asano, S. Severe autoimmune thrombocytopenia after allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia. *Int J Hematol* 74: 228-232, 2001.
- 5 Inazawa T, Tanabe T., Yamada H., Nakaoka T., Hashimoto, Yamasaki T., Kotaki H., Tani, K., Asano, S., and Yamashita N. Glucocorticoid-regulated expression of exogenous human growth hormone gene in rats. *Molecular Therapy* 4:267- 272, 2001.
- 6 Kuwabara, T., Tanabe, T., Warashina, M., Kang X., Tani, K., Taira, K., and Asano, S. Allosterically controllable maxizyme-mediated suppression of progression of leukemia in mice. *Biomacromolecules* 2: 1220-1228, 2001.
- 7 Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, TA., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. *Bone Marrow Transplantation* 29: 197-204, 2002.
- 8 Duda, DG., Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., Matsuno, S. Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis. *Br. J. Cancer* 86: 490-496, 2002.
- 9 Ooi, J., Iseki, T., Adachi, D., Yamashita, T., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. Successful allogeneic bone marrow transplantation for hepatosplenic gd T cell lymphoma. *Hematologica* 2001; 86: E25
- 10 Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S., Akaza, H. Clinical course of an advanced renal cell carcinoma patient treated with GM-CSF gene therapy (GVAX): The first experience of cancer gene therapy in Japan. *Int J Urol*
- 11 Ohata, J., Sakurai, J., Saito, K., Tani, K., Asano, S., Azuma, M. Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft versus-host disease prophylaxis. *Clin Exp Immunol* (in press)

新規 TNF ファミリー分子の腫瘍細胞傷害機構と腫瘍拒絶における意義

研究者 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学教授

研究要旨：新規に見出された TNF ファミリー分子である TWEAK と TRAIL による腫瘍細胞の傷害機構の解析、およびその免疫学的腫瘍監視機構における意義を明らかにした。

A.研究目的

本研究では、腫瘍に対する免疫遺伝子療法における詳細なエフェクター分子の解析を目的とする。新たに見出された TNF ファミリーに属する分子、TWEAK のリコンビナント蛋白に細胞傷害活性があることが報告されている。しかし、そのレセプターおよび細胞傷害活性の機構に関しては未だ明らかにされていない。種々の腫瘍細胞を用いて、これらの詳細な解析を行う。また我々は昨年度、マウスの NK 細胞に TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) が発現し、これが TRAIL 感受性腫瘍に対する転移抑制作用を担っていること、および、この TRAIL の発現に IFN- γ が重要であることを明らかにした。今年度は、この TRAIL の意義を TRAIL ノックアウトマウス等を用いて解析し、さらには IFN- γ の腫瘍免疫における重要性の解析を行う。

B.研究方法

種々の腫瘍細胞(HT29, HSC3, Kym1)のリコンビナント TWEAK に対する感受性を、caspase 阻害剤および cathepsin B 阻害剤の存在下で調べ、それぞれの細胞における TWEAK による細胞死の誘導の機構を解析した。また、TRAIL の中和抗体の継続的投与および TRAIL 遺伝子のノックアウトが発癌に及ぼす影響、および TRAIL の発現誘導に重要な IFN- γ の腫瘍監視機構における意義の解析をメチルコラントレン(MCA)による発癌の系等を用いて解析した。すべての動物実験は「順天堂大学動物施設の利用内規」、および「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」に基づき、学内での審査を受け、十分な倫理面への配慮をしつつ行われた。

C.研究結果

TWEAK は caspase 依存的なアポトーシスによる細胞死の誘導以外に、腫瘍細胞によっては主に cathepsin B 依存的なネクローシスを誘導することがあることを示した。同時に、これらの細胞死が、これまで TWEAK のレセプターと考えられていた DR3 を介した作用

ではないことも明らかにした。一方、TRAIL の中和抗体の投与や TRAIL 遺伝子のノックアウトにより、MCA や p53 の変異による発癌が助長されることを見出し、TRAIL が発癌に対してサーベイランス効果を担っていることを明らかにした。この効果の発揮には IFN- γ および NK 細胞が重要であり、同時に IFN- γ には MCA により誘導される腫瘍の TRAIL 感受性を上げる作用があることも明らかにした。さらには、NK 細胞から産生される IFN- γ が NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide の抗腫瘍作用において最も重要な作用機序であることを示した。

D.考察

腫瘍細胞に対する TWEAK のマルチプルな細胞死誘導機構を明らかにしたが、これを担うレセプターは不明である。今後、新たな TWEAK レセプターの同定、および生体による腫瘍拒絶におけるこの分子の意義を明らかにしたい。

TRAIL、恒常的に TRAIL を発現している NK 細胞、および TRAIL の発現を司る IFN- γ が免疫的腫瘍監視機構および腫瘍拒絶において重要な役割を担っていることが明らかとなった。特に IFN- γ は多面的に作用して、腫瘍に対する抵抗性を高めていると予想され、今後、細胞傷害活性分子、補助シグナル、ケモカインおよび血管新生等を含めて、総合的に腫瘍拒絶の機構を解析する必要があると考えられる。

E.健康危険情報

特になし。

F.結論

TWEAK の細胞死誘導機能と TRAIL の生体における腫瘍サーベイランス効果が明らかにされ、TNF ファミリー分子の多面的な作用機序および腫瘍拒絶における重要性が示された。

G.研究発表

1.論文発表

1) Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H.,

- Kaer, L. V., Saiki, I., and Okumura, K. Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J. Immunol.* 166: 6012-6018. 2001.
- 2) Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Kakuta, S., Iwakura, Y., Kaer, L.V., Saiki, I., and Okumura, K. Critical contribution of IFN- γ and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* 31: 1720-1727. 2001.
- 3) Nakayama, K., Ishidoh, K., Kayagaki, N., Kojima, Y., Yamaguchi, N., Nakano, H., Kominami, E., Okumura, K., and Yagita, H. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J. Immunol.* 168: 734-743. 2002.
- 4) Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. Critical contribution for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J. Exp. Med.* 195: 161-169. 2002.

2.学会発表

第60回日本癌学会総会、第31回日本免疫学会学術集会、第11回国際免疫学会にて学会発表多数

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

泌尿器癌に対する癌特異的免疫療法に関する研究
分担研究者 赤座英之 筑波大学臨床医学系泌尿器科教授

研究要旨

細胞傷害性 T リンパ球 (以下 CTL) に注目し前年度に引き続き CTL 養子免疫療法の臨床的有用性について検討し、現在までに 4 症例の治療を行なっている。また **Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)**により惹起される抗腫瘍ワクチン効果に着目し動物を用いた治療モデルを作成し、さらにこのモデルを用いて、**BCG** の抗腫瘍効果に抗原特異的な免疫反応が関与していることを見出した。

A.研究目的

細胞傷害性 T リンパ球 (以下 CTL) に注目し前年度に引き続き CTL 養子免疫療法の臨床的有用性について検討する。また **Bacillus-Calmette-Guerin (BCG)**により惹起される抗腫瘍ワクチン効果に着目し動物を用いた治療モデルを作成し抗腫瘍ワクチン効果の機序について検討する。

B.研究方法

CTL 養子免疫療法：転移腎癌症例において自己癌特異的 CTL の大量培養が可能な場合、これを用いて養子免疫療法を行なう。さらに、これまで治療を行なった症例について経過観察を行なう。(倫理面への配慮) 養子免疫療法の施行にあたっては本学倫理委員会の承認を得たうえで定められた説明文書を用いて説明を行い同意が得られた症例に対して治療を行なった。**BCG** 抗腫瘍ワクチンモデル：C3H/HeN マウスを使用し腫瘍細胞株として C3H マウス由来の移行上皮癌細胞株 MBT2 を用いた。まず、C3H/HeN マウスに **BCG** 及び MBT2 細胞を混合接種しマウスが完全に MBT2 細胞の生着を拒絶する条件を設定した。さらにこのマウスに MBT2 細胞並びに *in vitro* で **BCG** と共培養した後に洗浄した MBT2 細胞を再接種し腫瘍の生着及び脾細胞の MBT2 細胞に対する傷害活性を検討した。

C.研究結果

CTL 養子免疫療法：これまで治療を行なった 3 症

例について経過観察を行なったところ 2 症例は PD と判定され IL-2 投与、放射線照射及び手術療法を行い現在のところ癌あり生存中である。1 例では長期間 PR (約 3 年) が得られたのち大腸転移を来たし癌死した。この症例について病理解剖を行い組織学的に検討したところ原発巣に比べ転移巣では組織学的により悪性度が高い傾向を認めた。また縮小効果を認めたリンパ節転移巣では広範な繊維化及び CD8 陽性 T リンパ球の浸潤を認めた。現在さらに 1 症例の治療中である。**BCG** 抗腫瘍ワクチンモデル：**BCG** との混合接種により MBT2 細胞を拒絶したマウスに対して 4 週後に MBT2 細胞を再接種したところ全例に腫瘍が生着した。これに対して **BCG** と共培養した MBT2 細胞の生着は認められなかった。8 週後に再接種を行なっても同様の結果であり、腫瘍を拒絶したマウスの脾細胞は **BCG** と共培養した MBT2 細胞にのみ傷害活性を示した。

D.考察

CTL 養子免疫療法を行なった 3 例中 1 例においては長期の寛解が得られた。治療後に出現した転移巣の悪性度は原発巣より高く、一部の癌細胞クローンの免疫学的エスケープが関与しているものと考えられた。

E.結論

腎癌に対する養子免疫療法については有用性が示唆されており引き続き臨床症例における検討を行い

有効性及び安全性について明らかにする。BCG 抗腫瘍ワクチンモデルについては BCG の抗腫瘍効果における抗原特異的な免疫反応を解析するうえで有用であると考えられ、今後さらに細胞株や治療スケジュールの検討を行い免疫学的機序を解明する。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

1. Iwasaki A., Kawai K., Hayashi H., Ikeda N., Toida I., Ohtani M., Akaza H. Immunological protection induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) treatment in a murine bladder tumor model. *Int. J. Urol.* in press
2. Ikeda N, Toida I, Iwasaki A, Kawai K and Akaza H. Surface Antigen Expression on Bladder Tumor Cells Induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol* in press.
3. Kawai K, Tani K, Yamashita N, Tomikawa S, Eriguchi M, Fujime M, Okumura K, Kakizoe T, Clift S, Ando D, Mulligan R, Yamauchi A, Noguchi M, Asano S, Akaza H. Clinical course of an advanced renal cell carcinoma patient treated with GM-CSF gene therapy (GVAX): The first experience of cancer gene therapy in Japan. *Int J Urol* in press
4. Takimoto, Y., Shimazui, T., Akaza, H., Sato, N., Noguchi, M., Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation, *Cancer*, 91, 362-370, 2001

2.学会発表

Akaza, H., Ozono, S., Kuroda, M., Kameyama, S., Koiso, K., PMCJ-9 (BCG Connaught Strain) treatment of existing TA, T1 bladder cancer and CIS of the bladder (combined analysis of two clinical studies in Japan), 25th Congress of the Societe Internationale

d'Urologie, 2000.10.29-11.2 (Singapore)

Hattori, K., Mabuchi, R., Kawai, K., Akaza, H., Fujiwara, H., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Laminin expression pattern in normal human urethral tissue, AUA 2001 Annual Meeting, 2001.6.2-7 (Anaheim)

Shimazui, T., Kawamoto, R., Yamauchi, A., Kawai, K., Uchida, K., Akaza, H., Yoshikawa, K., Saga, S., Uemura, H., Hirao, Y., Quantitative detection of cadherin-6 mRNA in peripheral blood from the patient with metastatic renal cell carcinoma, AUA 2001 Annual Meeting, 2001.6.2-7 (Anaheim)

H 知的所有権の取得状況

特になし

**GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種における
免疫抑制シグナル分子の関与に関する検討**

分担研究者 東 みゆき 東京医科歯科大学大学院分子免疫学分野 教授

研究要旨 GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種による抗腫瘍免疫強化の免疫補助療法として、免疫抑制シグナル解除の試みが検討されている。CTLA-4 と同じ CD28 ファミリーに属する新規抑制補助シグナル分子 programmed death-1 (PD-1) およびそのリガンド PD-L1 と PD-L2 の抗腫瘍免疫応答における関与について検討した。ヒト腫瘍細胞において、PD-L1 の発現がかなりの高頻度で認められた。マウス白血病細胞株である WEHI3B および GM-CSF 遺伝子導入 WEHI 細胞は、PD-1, PD-L1, および PD-L2 をわずかながら発現していたが、in vitro における増殖反応はこれらに対する抗体で影響をうけなかった。これら癌細胞の同系マウスへの腫瘍移植モデルにおいて、抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-1 リガンド抗体投与効果を検討したが、PD-1 経路の明らかな関与は認められなかった。

A. 研究目的

GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチン接種による抗腫瘍免疫強化の免疫補助療法として、免疫抑制シグナル解除の試みが検討されている。その標的分子のひとつが CTLA-4 であるが、CTLA-4 に対する阻害抗体の投与による GM-CSF 遺伝子導入癌ワクチンの抗腫瘍免疫増強効果が報告されている。CTLA-4 と同じ CD28 ファミリーに属する抑制補助シグナル分子として programmed death-1 (PD-1) および、リガンド PD-L1 と PD-L2 が同定されたが、その発現および機能に関しては明らかでない。本研究では、腫瘍細胞におけるこれら分子の発現および抗腫瘍免疫応答における PD-1 の関与について検討することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 種々のヒト腫瘍細胞株における未刺激および炎症性サイトカイン刺激後の PD-L1 発現をフローサイトメトリーで解析した。
- 2) マウス PD-L1 および PD-L2 に対するモノクローナル抗体を作製し、未刺激および活性化刺激後の脾細胞における発現を検討した。
- 3) マウス白血病細胞株 WEHI3B および GM-CSF 遺伝子導入 WEHI(GM/WEHI)の PD-1

および PD-1 リガンド分子発現と in vitro におけるこれら分子の増殖反応への影響を検討した。同系マウスへの腫瘍移植モデルにおける、抗 PD-1 および抗 PD-1 リガンド抗体投与による抗腫瘍免疫能に与える影響を検討した。

Table 1 Expression of PD-L1 on human tumor cell line

	(-)	IFN γ	TNF α	IL-1 α
HSC2 (oral SCC)	+	++	++	++
HSC3 (oral SCC)	+	+++	++	++
HSC4 (oral SCC)	+	+	+	++
NA (oral SCC)	+	++	++	++
KE3 (esopha.SCC)	+	++	+	+
KE4 (esopha.SCC)	+	++	+	+
PC14 (lung LCC)	+	++	+	++
ACHN (renal CC)	++	++	++	++
SK-N-SH (neuroblast.)	±	+++	++	±
IMR32 (neuroblast.)	+	++	+	+
526Mel (melanoma)	-	+	-	-
SK-Mel28 (melanoma)	+	+	+	+

C. 研究結果

- 1) 検索したほとんどのヒト上皮系癌細胞株、悪性黒色腫、神経芽細胞腫に PD-L1 の細胞表面発現が観察された。発現の認められなかった癌細胞株においても、IFN γ 刺激により誘導され、また、TNF α あるいは IL-1 刺激によっても安定に高発現されていた (Table 1)。

2) PD-1 は活性化刺激により T 細胞および B 細胞に誘導されるが、リガンドのひとつである PD-L1 は、T, B, NK, マクロファージ、樹状細胞(DC)にすでに発現が認められ、活性化刺激により増強された。もう一方の PD-L2 は、GM-CSF 刺激後の DC にのみ発現誘導され、その他の細胞分画における発現誘導は認められなかった。

3) WEHI3B および GM/WEHI の細胞表面上には、わずかではあるが PD-1 および PD-L1, PD-L2 の発現が認められた。In vitro における両細胞の増殖は、PD-1, PD-L1, PD-L2 に対する抗体の単独あるいは併用添加により影響されなかった。同系マウス BALB/c への WEHI3B 細胞の生着は、抗 PD-1 抗体(Fig.1)あるいは抗 PD-L1 および抗 PD-L2 抗体投与により明らかな影響をうけなかった。また、GM/WEHI の接種は、WEHI3B と比較して明らかに腫瘍増殖を抑制したが、抗 PD-1 抗体投与による差はなかった(Fig. 1)。

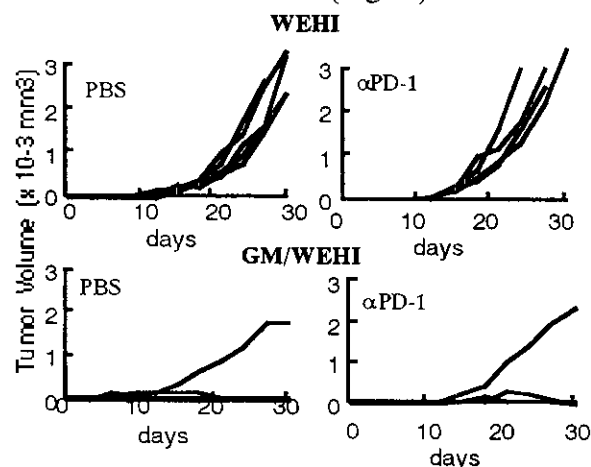


Fig. 1 Effect of anti-PD-1 mAb treatment on primary inoculated WEHI and GM/WEHI tumor growth

D. 考察

PD-L1 と PD-L2 は、レセプター PD-1 を共有するが、発現分布はかなり異なり、PD-L1 は免疫担当細胞のみならず組織細胞上に発現が認められることから、T 細胞および APC 間において主要な役割を果たしている CD28/CTLA-4-CD80/CD86 経路とは異なり、癌細胞-T 細胞間相互作用に関与している可能性が示唆された。しかしながら、本研究で用いた WEHI 白血病細胞の腫瘍モデルにおいて

は、抗腫瘍免疫応答における PD-1-PD-L1/PD-L2 経路の積極的な関与は抗体投与実験から明らかにできなかった。現在、放射線照射癌ワクチン接種時における抗 PD-1 抗体投与後の野生型腫瘍によるチャレンジ後の抗腫瘍免疫応答について検討中である。本結果が、WEHI 細胞における特有の現象なのか、その他の腫瘍においても PD-1 経路の関与が少ないのか、あるいは癌細胞上の PD-1 リガンド発現と宿主細胞上の PD-1 リガンド発現が各々どのような影響を与えているのかについては、今後の検討が必要と思われた。

E. 結論

ヒト培養腫瘍細胞株において、PD-L1 の発現がかなりの高頻度で認められた。マウス白血病細胞株である WEHI3B および GM-CSF 遺伝子導入 WEHI 細胞は、PD-1, PD-L1, および PD-L2 をわずかながら発現していたが、増殖反応はこれらに対する抗体で影響をうけなかった。これら癌細胞の同系マウスへの腫瘍移植モデルにおいて、抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-1 リガンド抗体投与効果を検討したが、PD-1 経路の明らかな関与は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hattori, H., M. Okano, T. Yoishino, T. Akagi, E. Nakayama, C. Saito, A. R. Satoskar, T. Ogawa, M. Azuma, K. Nishizaki. Expression of costimulatory CD80/CD86-CD28/CD152 molecules in nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. Clin. Exp. Allergy 31: 1242-1249, 2001
- 2) Nuriya, S., Enomoto, S., Azuma, M. The role of CTLA-4 in murine contact hypersensitivity. J. Invest. Dermatol. 116: 764-768, 2001
- 3) Ebata, T., S. Mogi, Y. Hata, J. Fujimoto, K. Okumura, M. Azuma. Rapid induction of CD95 ligand and CD4⁺ T cell-mediated apoptosis by

- CD137 (4-1BB) costimulation. *Eur. J. Immunol.* 31: 1410-1416, 2001.
- 4) Nozawa, K., J. Ohata, J. Sakurai, H. Hashimoto, H. Yagita, K. Okumura, M. Azuma. Preferential blockade of CD8⁺ T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute chronic graft-vs-host diseases. *J. Immunol.* 167: 4981-4986, 2001
- 5) Guo, Z., Wu, T., Kirchhof, N., Mital, D., Williams, J. M., Azuma, M., Sutherland, D. E. R., Hering, B. J. Immunotherapy with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibodies but not CD28 antagonists protects islet graft in spontaneously diabetic NOD mice from autoimmune destruction and allogeneic and xenogeneic graft rejection. *Transplantation* 71: 1656-1665, 2001.
- 6) Okano, M., Azuma, M., Yoshino, T., Hattori, H., Nakada, M., Satoskar, AR., Harn, DA., Nakayama, E., Akagi, T., Nishizaki, K. Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 1501-1507, 2001
- 7) Iwakami, S-I., Y. Setoguchi, Y. Saijo, M. Azuma, Y. Fukuchi. Replication-deficient adenovirus-mediated transfer of B7-1 (CD80) cDNA induced anti-tumour immunity in isolated human lung cancer. *Respirology* 6: 135-144, 2001
- 8) Mogi, S., T. Ebata, M. Azuma. The effect of recombinant CD80-Adenovirus and IL-12 on generation of autologous cytotoxic T lymphocytes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Disease.* in press
- 9) Ohata, J., J. Sakurai, K., Saito K. Tani, S. Asano, M. Azuma. Differential graft-versus-leukemia effect by blockade of CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft-versus-host disease prophylaxis. *Clin. Exp. Immunol.* in press
2. 学会発表
- 1) コラーゲン誘導関節炎発症における ICOS/AILIM-B7h/B7RP-1 の関与：岩井秀之，Pornpan Yougnak，津島文彦，金丸史子，大月典子，小園裕子，秋葉久弥，八木田秀雄，奥村康，上阪等，宮坂信之，東みゆき．第31回日本免疫学会，大阪，2001. 12. 11-13
- 2) Functional role of PD-L1 and PD-L2 in T cell activation : Pornpan YOUNGNAK, Yuko KOZONO, Hideyuki IWAI, Hisaya AKIBA, Ko OKUMURA, Hideo YAGITA, Ken OMURA, Miyuki AZUMA 第31回日本免疫学会，大阪，2001. 12. 11-13
- 3) マウス接触性過敏症モデルにおける PD-1 抑制シグナルの機能解析：津島文彦，茂木世紀，ヨアンナークボンバン，金丸史子，岩井秀之，大月典子，小園裕子，小村健，東みゆき．第31回日本免疫学会，大阪，2001. 12. 11-13
- 4) PD-1/PD-1 リガンド経路によるヒト CD4⁺T 細胞反応制御機構の解析：大月典子，町田詩子，津島文彦，岩井秀之，小園裕子，東みゆき．第31回日本免疫学会，大阪，2001. 12. 11-13
- 5) 新規 B7 ファミリー分子 PD-L1 と PD-L2 の発現と機能解析：山崎智英，秋葉久弥，岩井秀之，東みゆき，八木田秀雄，奥村康．第31回日本免疫学会，大阪，2001. 12. 11-13
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- a) 特許取得
なし
- b) 実用新案特許
なし
- c) その他
なし