

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hrada, N., M. Nakayama, H. Nakano, Y. Fukuchi, H. Yagita, and K. Okumura. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. BBRC 299. 488-493. 2002
- ② Nakayama, M., K. Ishidoh, Y. Kojima, N. Harada, E. Kominami, K. Okumura, and H. Yagita. Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Mediates Multiple Pathways of TWEAK-Induced Cell Death. J Immunol 170: 341-348. 2003.

2. 学会発表

- ① Nakayama, M., Ishidoh, K., Kojima, Y., Harada, N., Kominami, E., Yagita, H., and Okumura, K. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. TNF superfamily conference 2002. San Diego, USA, 2002.
- ② Harada, N., Nakayama, M., Nakano, H., Yagita, H., and Okumura, K. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). TNF superfamily conference 2002. San Diego, USA, 2002.

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

現在、申請中2件

腎細胞がん摘出術の実施指導と特殊免疫検査への助言

分担研究者： 赤座 英之 筑波大学大学院・腎泌尿器科学男性科学

研究要旨

腫瘍ワクチンの作用機序について基礎的検討を行なうとともに、腎癌転移に関連する遺伝子セットの検出を目的としてcDNA アレイによる腎癌遺伝子発現の基礎的解析を行なった。

A. 研究目的

本研究では前年度に引き続き Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) により惹起される抗腫瘍ワクチン効果の機序を解明する目的で、特に BCG と接触後の尿路上皮細胞のサイトカインの産生、ならびに Toll-like-receptor (TLR) family の発現について解析した。また、特異的免疫療法の今後の課題としてはさらに有効な治療法の開発とともにこれらの治療の対象としてもっとも適切であると考えられる早期転移例を確実に診断することが重要である。そのため本年度では微小転移腎癌の診断法の開発、特に新しい分子マーカーの開発を目的として腎癌における網羅的遺伝子発現解析の基礎的検討を行なった。

B. 研究方法

1) BCG と正常尿路上皮細胞の相互作用

正常尿路上皮細胞として不死化ヒト正常尿路上皮細胞株 HU35 を用いた。まず、RT-PCR 法にて HU35 における既知の TLR-family の発現を検討した。次に HU35 に生菌 BCG を添加し、一定時間共培養後上清中の各種サイトカイン（IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10）の濃度を測定した。同時に共培養後の HU35 より mRNA を抽出しノーザンブロット法にて TLR-2 の発現を解析した。

2) 網羅的遺伝子発現解析の基礎的検討として、既知癌遺伝子を含む約 4,000 クローンの cDNA アレイを用いて腎癌細胞株の遺伝子発現と細胞株の生物学的特徴の関連性を検討した。SKRC 腎癌細胞株 6 株（SKRC-1, 6, 17, 29, 52, 59）から Trizol 法により

total RNA を抽出し、33P ラベル下に逆転写反応により cDNA を合成、アレイ上にハイブリダイズし、シグナルを画像解析により検出した。腎近位尿管上皮細胞株を対照として遺伝子発現の亢進減弱およびそのパターンを GeneSpring によるクラスター解析により検討した。樹立時の細胞株の由来（転移巣由来 17, 29, 52、原発巣由来 1, 6, 59）と、形態的特徴と遺伝子発現のパターンについて検討した。

C. 研究結果

1) HU35 細胞における TLR-2, 3 及び 4 の mRNA の発現を確認した。これらのうち BCG 添加後の TLR-2 mRNA の発現を経時的に解析した。結果として BCG 添加 12 時間後に TLR-2 mRNA の発現が増強する傾向を認めた。また BCG 添加後の培養上清中では IL-6 が添加前の約 10 倍の濃度で検出された。これに対して、その他のサイトカインでは IFN- γ 及び IL-10 が微量に検出されたが BCG 添加前と比較して有意差は認めなかった。

2) SKRC 腎癌細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析では最終的に 62 遺伝子によるクラスター化が可能であった。転移巣由来株 3 株のうち SKRC-17 と 29 の 2 株は強い関連性を示し、SKRC-52 は他のどの株とも関連性が低かった。この SKRC-52 は他の細胞株と比較し顕著な線維芽細胞型を呈し、その遺伝子背景が異なることが RNA 発現プロファイリングでも示された。また転移巣由来株 SKRC-17, 29 と原発巣由来株 SKRC-1, 6, 59 の比較から転移巣由来株で発現が亢進している遺伝子セットが抽出された。

D. 考察

BCG 膀胱内注入療法は現在のところ最も臨床的有用

性が確立した免疫治療として表在性膀胱癌の標準的治療となっている。また、腎癌、大腸がんなどを対象として BCG を用いた自己癌ワクチン療法の有用性も検討されている。しかしながら、BCG の抗腫瘍効果の機序については不明の点が多く、その解明は更に有効な免疫療法を開発する上で重要な課題である。この点に関して我々はこれまでに、BCG 添加後の膀胱癌細胞では抗原提示細胞と類似した反応が惹起されること、及び BCG 接種後のマウスに長期間抗原特異的な免疫反応が惹起されることを報告してきた。本研究ではさらにその分子生物学的機序を解明する目的で TLR 分子に注目し、不死化ヒト正常尿路上皮細胞での発現を検討した。結果として BCG 添加後に尿路上皮細胞では TLR-2 の発現の増強とともに IL-6 が分泌されることを見出した。今後、これらの知見を踏まえてさらに各種免疫担当細胞との相互作用についても検討する。また、血中癌細胞の検出による微小転移腎癌の診断については以前より RT-PCR により末梢血液中の cadherin-6 mRNA の検出について検討してきた。本研究ではさらに cDNA アレイによる遺伝子発現解析を行なうとことにより、転移に関連する遺伝子セットの検出が可能と考えられた。今後、遺伝子数 20,000 以上のアレイを用いた網羅的遺伝子解析により、腎癌特異的あるいはその転移に特異的な遺伝子の検索を行う予定である。

E. 結論

正常尿路上皮と BCG の相互作用において TLR 分子が関与している可能性が示唆された。また、cDNA アレイによる遺伝子発現解析を行なうとことにより、転移に関連する遺伝子セットの検出が可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Kawai K., Tani K., Yamashita N., Tomikawa S., Eriguchi M., Makoto, 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 9:462-466, 2002

2. Iwasaki A., Kawai K., Hayashi H., Ikeda N., Toida I., Ohtani M., Akaza H.: Immunological protection induced by Bacillus Calmette-Guerin (BCG) treatment in murine bladder tumor model. Int J Urol 9:219-224, 2002

3. Akaza H., Homma Y., Okada K., Yokoyama M., Usami M., Hirao Y., Tsushima T., Ohashi Y., Aso Y. and the Prostate Cancer Study Group. A prospective and randomized study of primary hormonal therapy for patients with localized or locally advanced prostate cancer unsuitable for radical prostatectomy: results of the 2-year follow-up. Brit J Urol Int. 2003; 91: 33-36.

・及川剛宏、河合弘二、西條薫、大野忠夫、赤座英之
CTL 療法が奏効した腎細胞癌症例における臨床経過と免疫学的解析

・BCG・BRM 療法研究会会誌 26 : 41-43, 2003

学会発表

1. 河合弘二、及川剛宏、西條薫、大野忠夫、赤座英之：
転移腎癌に対する自家 CTL を用いた細胞療法、
第 61 回日本癌学会総会（東京）、平成 14 年 10 月
1 日-3 日

2. 及川剛宏、河合弘二、西條薫、塚本定、島居徹、
石渡勇、大野忠夫、赤座英之：腎摘除後に転移巣の
退縮をきたした腎癌症例における Th1/Th2 サイトカ
インの変動、第 61 回日本癌学会総会（東京）、平成
14 年 10 月 1 日-3 日

3. 島居徹、阿弥良浩、吉川和宏、内田和宏、清水一
宏、中村小源太、深津英捷、佐賀信介、三輪正直、
赤座英之：腎細胞癌におけるインターフェロン感受
性に関連する遺伝子の網羅的解析、第 61 回日本癌
学会総会（東京）、平成 14 年 10 月 1 日-3 日

H. 知的所有権の出願 取得状況

特になし

樹状細胞療法の基礎ならびに臨床研究

分担研究者: 森 正樹 九州大学生体防御医学研究所分子腫瘍学分野・教授

研究要旨

進行・再発癌に対する治療として MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた癌特異的ワクチン療法を19例の消化器癌患者に施行した。全例に副作用を認めず、3例に腫瘍縮小効果を認めた。ペプチドに対する特異的 CTL の誘導が8例中4例に認められ、Th1/Th2 バランスの上昇が、解析した6例中3例に認められこの療法の有効性を認める結果であった。

A. 研究目的

進行・再発癌に対する治療として手術・放射線・化学療法があげられるが、近年癌抗原の発見により癌特異的免疫療法が注目されつつある。手術不能の進行・再発消化器癌に対して我々は MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた癌特異的ワクチン療法を実施している。MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた癌特異的ワクチン療法の進行・再発癌総合的治療戦略における術前補助療法、また再発後療法としての有効性を検討する。

B. 研究方法

手術不能の消化器癌(HLA-A2 かつ MAGE-3 を発現、あるいは HLA-A24 かつ MAGE-1,2 または 3 を発現)患者に対して現在19症例目の治療を実施している。15例目までの解析は終了した。MAGE の発現は癌組織から RT-PCR 法または免疫組織化学染色法にて確認した。樹状細胞は末梢血単核球より GM-CSF, IL-4 存在下の混合培養にて作製した。

(倫理面への配慮)

われわれは平成12年5月(平成13年3月改訂)の「厚生科学審議会先端医療技術評価部会」による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(以下「指針」とよぶ)に基づき、「遺伝子解析等に関する標本採取に関する同意書」を当研究所倫理委員会に提出し、平成12年6月1日付けで承諾を受けている。現在(平成14年10月現在)まで、その同意書に基づく説明をヒト由来試料

提供者におこない、同意を得られた症例から試料を採取し保管している(指針の A 群試料に相当する)。一方、平成12年5月以前に収集した指針の B 群試料(医学的研究に用いることは同意するが、遺伝子解析に関する同意を得ていないもの)に関しては封書で再度確認をとり、同意を得たもののみ保管した。さらに指針の C 群試料(医学的研究と遺伝子解析のいずれに関しても同意を得ていないもの)から採取した試料は、1)「指針」に示されるがごとく、連結不可能匿名化された症例の試料あるいは、連結可能匿名化が可能な症例に関しては当研究所倫理委員会の承認のもと試料の保存を行った。B 群試料、C 群試料のなかで、標本の遺伝子解析に関して同意を得ることができなかった症例の試料に関しては焼却により廃棄した。われわれは「指針」にのっとり、患者のプライバシーの確保、匿名化には細心最大の注意を払っている。また、本臨床試験は九州大学医学部倫理委員会の審査・承認を受け、その指針にのっとり実施されている。

C. 研究結果

ワクチン投与に起因する grade3 以上の副作用は全例に認めていない。画像評価による腫瘍効果判定では3例が腫瘍縮小が得られた。治療開始後、腫瘍マーカの減少が8例に見られた。治療終了後のペプチドに対する特異的 CTL の誘導が8例中4例に認められた。Th1/Th2 バランスの上昇が、解析した6例中3例に認められた。そのうち、手術不能進行食道癌1症例では、腫瘍進展の改善が認められ手術実施が可能となった。また、食

道癌再発1症例では、化学療法・放射線耐性であったが本治療によりさ嗚声の改善など PS の向上が認められた。

D. 考察

1) 達成度について

九州大学医学部倫理委員会の承認を得て、治療に関する全く新しいシステムを作り上げ、実施することが可能となり、その安全性が15例ではあるが確認できたことは十分に評価できる。また、既存のすべての治療を受けたにもかかわらず治療効果が得られなかった症例が対象であったのに係わらず、腫瘍マーカーの減少、また画像解析での腫瘍退縮、さらにパフォーマンスステータスの改善が認められたことは、本治療が有意義であると考えることを強く示唆する。

2) 学術的・国際的・社会的意義について

本研究は進行消化器癌患者に対する新しい治療として「樹状細胞とペプチド投与」の安全性、免疫学的動態を確認できた。さらに画像診断上、抗腫瘍効果を認めた症例も確認でき、新しい知見を認めることができた。その結果の一部は本邦学会で発表するとともに、米国癌学会雑誌(Clin Cancer Res 誌)に掲載・報告した。本治療は新しい癌に対する総合治療戦略の一つとなり得る可能性を示し、多くの転移・再発癌患者に対して希望を与えることが可能と考えられる。

3) 今後の展望について

樹状細胞とペプチド投与による効果を解析するためには、多大な人的・施設の労力、また癌抗原の発現と HLA の一致という患者の選択制限、という条件のため、一施設での実施数には限りがある。そのために、統計学的な解析を行うには、多施設合同で本研究を行う必要がある。そこで我々は、東京大学、山梨大学、徳島大学と共同研究を2002年より開始し、3年以内で120症例に対して実施する予定である。

E. 結論

本療法は、抗癌剤や放射線に対して抵抗性を示す進行消化器癌に対しても効果を発揮することが示された。癌抗原 MAGE 発現を解析し、癌抗原特異的治療を実施することは、今までは積極的な治療をあきらめざるを得なかった進行癌症例に対しても既存の治療法とは異なったアプローチが可能となり、その有効性が示唆された。しかしながら、MAGE 発現の有無、また同じ癌の中での発現の不均一性に効果の有無が大きく関与することが今後

の問題点として考えられる。この問題を解決すべくマウスを用いた基礎的研究として、低濃度抗癌剤を全身投与した後に DC を腫瘍内局注するシステムを新規治療方法を、現在検討している。この方法により、癌抗原が明らかになっていない多発転移癌に対しても、生体内抗腫瘍免疫応答を強力に誘導し、腫瘍退縮および生存期間の著しい延長を得ることが明らかとなった(Int. J. Cancer, 2002)。この治療法を癌患者に応用することにより治療対象患者の拡大が期待される。

F. 健康危険情報

この研究の過程では危険情報は特に認められず、従って報告すべきもの無い。

G. 研究発表

1) 論文発表

海外

1. Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Mashino K, Sonoda H, Sadanaga N, Inoue H, and Mori M. Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo, *Int. J. Cancer*, 101: 265-9, 2002
2. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Ohta M, Yamaguchi H, Mori M. Effective Strategy of Dendritic Cell-based Immunotherapy for Advanced Tumor-bearing Hosts; The Critical Role of TH1-dominant Immunity, *Mol. Cancer Ther.*, 1: 785-94, 2002
3. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma, *Cancer Res*, 62: 2937-41, 2002

国内

1. 田中文明、山口博志、太田光彦、井上 裕、森 正樹：
抗癌剤全身投与と樹状細胞局注による癌特異的免疫化学療法
一マウス大腸癌を用いた基礎的研究とヒトへの応用の展開の可能性一。
Biotherapy 17(1): 9-14, 2003
2. 増野浩二郎、定永倫明、森 正樹、：
樹状細胞を用いた癌免疫治療。
消化器外科 25(6): 767-775, 2002
3. 森 正樹、定永倫明：樹状細胞。
医学のあゆみ 200(13): 1171-1172, 2002

2) 学会発表

海外

1. Mori M:
Dendritic Cell Vaccination with MAGE Peptide for Gastrointestinal Cancer.

The 28th Annual Meeting of the Korean Association.
June 21, 2002, Seoul, Korea

国内

1. 田中文明、増野浩二郎、山口博志、太田光彦、定永倫明、洪田健二、森 正樹
低濃度抗癌剤と樹状細胞の腫瘍内局注の併用による画期的な癌特異的免疫化学療法の開発
第102回 日本外科学会定期学術集会
2002年4月13日、京都（ワークショップ）
2. 増野浩二郎、定永倫明、田中文明、山口博志、太田光彦、園田英人、森 正樹
ケモカインレセプターCCR7 は胃癌リンパ節転移に関与する
第102回 日本外科学会定期学術集会
2002年4月11日、京都（ワークショップ）
3. 山口博志、定永倫明、太田光彦、増野浩二郎、長嶋秀樹、田中文明、井上 裕、森 正樹
癌に対するBRM療法の有効症例選択法の確立ーcDNA Microarray法による包括的遺伝子発現検索ー
第102回 日本外科学会定期学術集会
2002年4月11日、京都
4. 田中文明、増野浩二郎、山口博志、太田光彦、定永倫明、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹
一歩進んだ大腸癌特異的抗腫瘍免疫効果の誘導：低濃度抗癌剤と樹状細胞細胞内投与
第57回 日本消化器外科学会総会 2002年7月29日、京都（パネルディスカッション）
5. 田中文明、増野浩二郎、山口博志、太田光彦、井上 裕、森 正樹
樹状細胞の癌局所投与を用いた新しい腫瘍特異的免疫化学療法の開発
第61回 日本癌学会総会 2002年10月2日、東京
6. 山口博志、田中文明、太田光彦、増野浩二郎、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹
胃癌におけるCD40の発現とその生物学的意義
第61回 日本癌学会総会 2002年10月2日、東京（ワークショップ）
7. 太田光彦、定永倫明、田中文明、増野浩二郎、山口博志、井上 裕、森 正樹
Cancer-Testis AntigenであるTRAG-3の食道癌における発現とその意義
第55回 日本胸部外科学会総会 2002年10月11日、福岡
8. 山口博志、田中文明、太田光彦、増野浩二郎、白石 猛、三森功士、岸原文明、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹

樹状細胞とMAGE-3ペプチドを用いた癌ワクチン療法の効果増強への試み

第55回 日本胸部外科学会総会、2002年10月11日、福岡

9. 田中文明、定永倫明、増野浩二郎、白石 猛、三森功士、岸原文明、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹
MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた進行食道癌に対する治療効果の検討
第64回 日本臨床外科学会総会
2002年11月15日、東京

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)
なし。

抗腫瘍免疫誘導における
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 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。PD-L1 は種々の癌細胞に発現が認められ、癌細胞上の内在性に発現誘導される PD-L1 は、PD-1 を発現している活性化 T 細胞による免疫系からの攻撃を抑制するエスケープ機構として機能している可能性が示唆された。また、DC と T 細胞との反応においても、PD-1 を介した抑制系には、PD-L2 ではなく PD-L1 がトレランス誘導に関与していた。

A. 研究目的

癌免疫遺伝子治療の実施あるいは治療後の評価のためにも、癌浸潤リンパ球や癌患者末梢血リンパ球から腫瘍特異的 T リンパ球を得ることは重要なことであるが、未だ確立された技術はない。生体内および外においていかに効率よく腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)を誘導し、単離するかは腫瘍免疫において重要な課題である。抗腫瘍 CTL の誘導強化に、正のファクターである免疫補助シグナル分子やサイトカインの賦与あるいは有能な抗原提示細胞である成熟樹状細胞の応用が検討されてきた。また、逆に負のファクターである抑制性 T 細胞や抑制シグナル分子機能の解除の試みが検討されつつある。CTLA-4 による抑制シグナル解除による抗腫瘍免疫能増強が報告されてきた。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 PD-1 が報告されているが未だその機能に関しては不明な点が多い。昨年までの研究で、PD-1 リガンドは、多くの癌細胞株および組織において発現が認められることが明らかになったが、WEHI3B 白血病細胞株を用いた検討では、積極的な PD-1 経路の関与は認められなかった。本年は、扁平上皮癌細胞株 NRS1 におけるこれら分子の抗腫瘍免疫応答における関与について検討するとともに、抗原提示の際に樹状細胞(DC)上に発現される

PD-1 リガンドの抗原特異的 T 細胞反応に与える機能についても検討した。

B. 研究方法

1. PD-L1 遺伝子導入マウス癌細胞における抗腫瘍免疫応答への関与

扁平上皮癌細胞株 NRS1 に PD-L1 遺伝子導入を行い PD-L1 を強発現させたクローンを樹立した。親細胞株 NRS1 および PD-L1+NRS1 を同系マウスに接種し、腫瘍増殖および拒絶に関与する細胞および分子を抗体投与実験により検討した。

2. 抗原感作リンパ節 DC における PD-1 リガンド発現の解析

DNFB 塗布により誘導されるマウス接触性過敏症(CH)モデルにおける、PD-1/PD-L1, PD-L2 の関与を抗体投与により検討した。また、ハプテン感作後の所属リンパ節由来 DC における、CD86, PD-L1, PD-L2 発現を検討すると共に、T 細胞との反応における *in vitro* 抗体添加あるいは *in vivo* 抗体投与の増殖反応およびサイトカイン産生における影響を検討した。

C. 研究結果

1. PD-L1 遺伝子導入マウス癌細胞における抗腫瘍免疫応答への関与

PD-L1 遺伝子導入 NRS1(PD-L1⁺NRS1)におけ

る, 細胞表面分子の発現は PD-L2⁺CD86⁺CD8⁻CD54⁻MHC class I⁻MHC class II⁻で PD-L1 発現以外は親細胞株と同じであった. *in vitro* 培養系およびヌードマウスにおけるこれら腫瘍の増殖は同様であったが, 同系マウスに移植したところ, PD-L1⁻NRS1 のみが拒絶された(Fig. 1). この腫瘍拒絶は抗 CD4+CD8 抗体処理による宿主マウスの T 細胞除去により見られなくなったことから, PD-L1⁻NRS1 癌細胞の拒絶には T 細胞が関与していることが示された. しかしながら, 抗 PD-L1 あるいは抗 PD-1 抗体投与により親細胞株の腫瘍生着は拒絶されるのに対し, PD-L1⁺NRS1 接種における腫瘍拒絶は, 逆に解除され腫瘍が生着した(Table 1). 親細胞株 NRS1 においても, IFN- γ 存在下の培養により PD-L1 発現が誘導され, また, NRS1 移植後の腫瘍塊の組織において PD-L1 陽性である癌細胞が多く認められた.

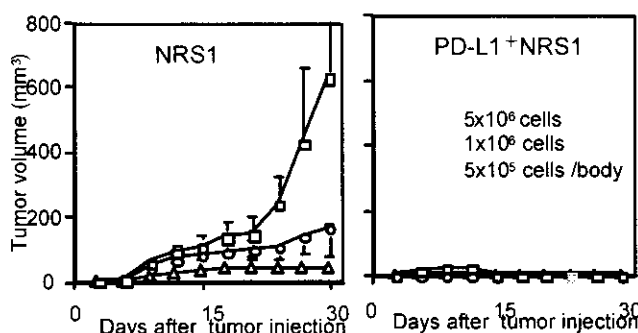


Fig. 1 PD-L1 expression on NRS1 reduces tumorigenicity

mAb treatment	Inoculated cells	Tumor incidence
Control Ig	NRS1	5 / 5
anti-PD-1 mAb	NRS1	1 / 5
anti-PD-L1 mAb	NRS1	0 / 5
Control Ig	PD-L1 ⁺ NRS1	0 / 5
anti-PD-1 mAb	PD-L1 ⁺ NRS1	5 / 5
anti-PD-L1 mAb	PD-L1 ⁺ NRS1	3 / 5

Table 1 Differential role of PD-1:PD-L1 in endogenous vs exogenous PD-L1 on tumor cells. Either anti-PD-1 (J43, 100 μ g/mouse), anti-PD-L1 (MIH5, 200 μ g/mouse) mAb, or control Ig was injected i.p. every other day after the inoculation with PD-L1⁺NRS1 (1 \times 10⁶ cells/ mouse).

2. 抗原感作リンパ節 DC における PD-1 リガンド発現の解析

DNFB 塗布により誘導されるマウス接触性過敏症(CH)モデルにおいて, 感作時の抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体投与において有為の

耳介腫脹の増強が認められたが, 抗 PD-L2 抗体投与では変化しなかった. 感作後所属リンパ節において, 抗 PD-1 抗体投与群で, 全リンパ球総数の増加が認められ, T 細胞に PD-1 および PD-L1 の発現が, CD11b⁺DC/マクロファージに PD-L1/L2 の発現が免疫組織染色において認められた. さらに, CD11b/ CD11c/ F4/80 と CD86 および PD-L1/PD-L2 のフローサイトメトリーによる多重染色の結果から, 抗原を獲得し所属リンパ節に遊走してきた DC のなかに CD86⁺PD-L1⁺PD-L2⁺と CD86⁺PD-L1⁻PD-L2⁻の DC サブセットが存在することが示された. 抗原感作リンパ節 DC 刺激によるナイーブ T 細胞の増殖反応および IFN γ 産生は, 抗 PD-L1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体投与により, 非常に強く増強された.

D. 考察

NRS1 細胞株を用いた結果では, 癌細胞上の PD-L1 の過剰発現は T 細胞による抗腫瘍免疫を増強させるのに対し, 癌細胞に endogenous に発現される PD-L1 は, 抗腫瘍免疫抑制に働いていることが示唆された. 最近 2 つのグループから癌細胞上の PD-L1 が抗腫瘍免疫抑制に働くことが報告されているが, そのメカニズムは異なり, 我々の結果も合わせて考えると癌細胞上の PD-L1 の機能は, 癌細胞の抗原性と本経路以外の補助刺激分子との相互関係により強く影響をうける可能性が考えられた. また, 種々の解析から PD-1 以外の T 細胞へ活性化シグナルをいれる第 2 レセプターの存在の可能性を示唆されている. 我々の PD-L1 遺伝子導入の系での, 腫瘍拒絶は, PD-1 ではなく, 第 2 レセプターを介して PD-L1 との反応に関わっている可能性もあり, 今後の検討が必要と思われた. CH モデルの検討から, PD-1:PD-L1 経路の障害が抗原特異的反応を増強させることから, PD-1:PD-L1 経路が抑制的に働くことが示された. 感作リンパ節において, PD-L2 の強い発現があるにもかかわらずその機能的関与が認められないことから, CD86 を強く発現している DC では, CD28 補助シグナルの正の強い刺激に圧されて PD-1 抑制シグナルは無効となり, わずかな CD86 を発現し, PD-L2⁺PD-L1⁻の DC において, PD-1:PD-L1 経路の抑制機能が発揮されている可能性が示唆された.

CD86⁺PD-L1⁺PD-L2⁻抗原提示 DC が、トレランス誘導 DC として抗原特異的 T 細胞反応抑制に関与している可能性が示された。DC によるトレランス誘導機序に PD-L1 が関与している可能性が示され、抗腫瘍免疫への応用が可能と思われた。

E. 結論

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。PD-L1 は種々の癌細胞に発現が認められ、癌細胞上の内在性に発現誘導される PD-L1 は、PD-1 を発現している活性化 T 細胞による免疫系からの攻撃を抑制するエスケープ機構として機能している可能性が示唆された。また、DC と T 細胞との反応においても、PD-1 を介した抑制系には、PD-L2 ではなく PD-L1 がトレランス誘導に関与していた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohata J, Sakurai J, Saito K, Tani K, Asano S, Azuma M. Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 co-stimulatory blockade after graft-versus-host disease prophylaxis. Clin Exp Immunol 2002;129:61-68.

Iwai H., Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M. Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of ICOS-B7h costimulation. J Immunol. 2002; 169:4332-4339.

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, Shin T, Tsuchiya H, Pardoll D M, Okumura K, Azuma M, Yagita H. Expression of PD-1 ligands by murine T cells and antigen-presenting cells. J Immunol. 2002; 169, 5538-5545.

Totsuka T, Knai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuam M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M. Ameliorating effect of anti-Inducible Co-stimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. Gastroenterology 124: 410-421, 2003.

2. 学会発表

Tsushima F, Iwai H, Omura K, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Role of PD-1 and its ligands in Murine Contact Hypersensitivity. Biology 2002 American Association of Immunologist, 20-24 April 2002.

Oyaizu N, Tani K, Nakazaki Y, Hase H, Takahashi K, Monna M, Ohata J, Watari K, Satho N, Tojo A, Yamashita N, Maekawa T, Eriguchi M, Tomikawa S, Hanazawa K, Wakumoto Y, Kawai K, Azuma M, Kakizoe T, Okumura K, Akaza H, Fuzime M, Mulligan R, Clift S, Ando D, Sherwin S, Asano S. Immunohistochemical determination of anti-renal cell carcinoma Immunity elicited by GM-CSF-gene transduced lethally Irradiated autologous tumor cell vaccine (GVAX). The Japan Society of Gene Therapy, The 8th Annual Meeting, Tokyo, July 2002.

津島文彦, 大月典子, 小村健, 東みゆき. 癌細胞における B7-H1 の発現と抗腫瘍免疫応答における役割; 第 61 回日本癌学会総会, 東京, 2002 年 10 月

大月典子, 津島文彦, 吉田英子, 金丸史子, 東みゆき. ヒト癌細胞における ICOSL の発現と CTL 誘導における役割 第 61 回日本癌学会総会, 東京, 2002 年 10 月

津島文彦, ヨアンナークポンパーン, 金丸史子, 岩井秀之, 大月典子, 小園裕子, 小村健, 東みゆき. 癌細胞における PD-L1(B7-H1)発現とその抗腫瘍免疫応答における役割について. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002 年 12 月.

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

患者検体の病理学解析

分担研究者: 小柳津 直樹 東京大学医科学研究所 付属病院検査部

研究要旨

腎癌 GM-CSF 遺伝子治療の病理組織解析を実施した。全4症例のワクチン接種局所および DTH 反応部位の詳細な免疫病理組織化学的解析の結果、ワクチン接種部位では全症例で積極的な免疫担当細胞の局所動員を観察した。またワクチン接種の priming phase で未熟樹状細胞が動員されかつ成熟樹状細胞へ分化する過程を同定し得た。DTH 反応では腎癌細胞のみならず正常腎細胞接種に対しても有意な細胞反応を観察し腎組織特異抗原への感作も示唆されたが一例において実施した治療後の腎組織解析では有意な腎障害は同定し得なかった。実施4例中唯一死亡された1例でその生検ならびに剖検標本を用いての effector phase 腫瘍局所解析が可能であったが、増殖分画抗原 Ki-67 との2重染色で同定し得た腫瘍内 CD8T 細胞の治療後の積極的増加と腫瘍細胞アポトーシス誘導所見は当該療法の影響免疫増強効果に対する確たる免疫病理学的証左と思われた。自己免疫性腎炎を含めこの療法に随伴しての有害事象は病理組織学的には認めなかった。総合的に当該療法はその実効性および安全性において主たる有害事象発生もなく完結し phase I トライアルとしての達成度は満足すべきものにあると思われた。

A. 研究目的

GM-CSF 遺伝子導入腎癌細胞をワクチンとして皮下に接種することにより抗腫瘍免疫活性化を意図した遺伝子療法的安全性・実効性をワクチン接種局所その DTH 反応および腎癌局所においての変化を免疫組織病理学的に解析・検討する

B. 研究方法

材料は上記療法を受けた患者 4 例につきプロコールに沿って採取されたワクチン接種箇所ならびに DTH 部位の皮膚生検、および一例において実施された治療前原発巣腎組織および治療後の腫瘍生検ならびに剖検材料を用いた 組織材料はすべてホルマリン固定後パラフィン包埋した H&E 染色に加え CD3, BMP, AE1/AE3, S100, CD68, HLA-DR, CD4/CD8 (2重染色)および CD20cy に対する免疫染色を加えた。一部の標本については樹状細胞の評価につき S100 に加え CD1a, Factor VIII(FVIII) を追加して検索した。腫瘍細胞のアポトーシス誘導につき TUNEL 法を用いて評価した。また一部の標本については免疫担当細胞の増殖を評価するため CD8 および CD4 と増殖分画マーカー抗原 Ki-67 との2重免疫染色を実施した。組織浸潤細胞の定量的評価はマイクロメーターを装着した顕微鏡にて連続標本上の同一視野、単位面積あたりの各浸潤細胞を計測した

(倫理面への配慮)

生検、剖検による材料採取はすべて書面によるインフォームドコンセントに基づいて実施した

C. 研究結果

[ワクチン接種部位皮膚病理解析]

浸潤細胞数は初回ワクチン接種後(day 8)の生検組織ではいずれの症例でも少数の単核球浸潤の増加を認めたのみであった。2回接種後(day 19)真皮上層の細血管周囲に有意な単核球浸潤の増加を認め、3例において3回接種後の(day35)に最大の単核球浸潤を観察、以後減少傾向を示した(1例のみ day 74にてピークを観察)。細胞浸潤の主座は初期には真皮表層、以後より深部の汗腺、毛胞周囲および皮下脂肪織へと波及した。その免疫組織学的解析では浸潤単核球主体は CD3+T 細胞であり CD20+B 細胞の浸潤は殆ど観察しなかった。また CD68 陽性単核球/マクロファージは3回目のワクチン接種以降主として真皮深部で有意に増加した。T 細胞の CD4:CD8 の構成比は常 CD4+T 細胞優位の細胞浸潤であった。表皮の形態変化は全検体を通じ明らかな変化は観察しなかった。樹状細胞の動向については表皮内 S100 陽性樹状細胞(DC; 狭義の Langerhans 細胞)はワクチン接種後一旦その数を減じ以後回復を示すパターンを示した。CD1a 染色を追加し連続切片を用いた解析では CD1a+ Langerhans 細胞と S100+ Langerhans 細胞は明らかに(表皮内で)異なる分布を示した。また真皮では一部の症例でワクチン接種3回目以降に FVIII+, CD1a+, S100- immature

phenotype を示す樹状細胞および FVIII-, CD1a-, S100+の mature phenotype を示す両者の樹状細胞出現を同定し得た。HLA-DR 発現は2回目接種以降浸潤 T 細胞でその発現が有意に増加した。上記の単核球浸潤とはほぼ同期して真皮深層に好酸球浸潤を観察した。BMP 染色により好酸球の多くは脱顆粒を示した。(付図1)

【DTH 反応の皮膚生検材料解析】

ワクチン接種前(day 0)の正常人組織(NRC)、腎癌細胞(RCC)接種による DTH 反応は両者共に有意な細胞反応は観察しなかった。2回目の DTH 反応(day28)では、以後の最終DTH反応まで共通する強いT細胞浸潤を観察しその構成は CD4+T 細胞優位でありこの構成に関してはNRC, RCCの両者に有意な差は見出せなかった。NRC, RCC に対する浸潤細胞構成についても有意な差は認めなかったが細胞浸潤数は RCC 接種部位周辺により強くまた HLA-DR も有意に増強していた。上述の T 細胞浸潤に加えマクロファージおよび好酸球浸潤を観察したが全検体を通じ B 細胞の浸潤は認めなかった(付図2)。

【腫瘍内浸潤細胞解析】

1 例においてのみワクチン投与前後の腫瘍組織における病理組織学的対比検討が可能であった。治療前原発巣材料を用いた解析では腫瘍内、腫瘍外腎組織ともに CD4<CD8T 細胞主体、B 細胞、マクロファージを混じる細胞浸潤を観察した。腫瘍細胞のアポトーシスは同定し得なかった。治療開始後7ヶ月にて施行された皮膚転移巣生検材料では腫瘍内 T 細胞は CD8T 細胞優位へと明らかに転換しかつ B 細胞数は減少、マクロファージの増加を観察した。TUNEL 法により有意な腫瘍細胞のアポトーシス誘導を同定し得た。治療開始後9ヶ月で施行された剖検材料の腎、肝および肺転移巣にての解析では腫瘍内浸潤 T 細胞は共通して CD8T 細胞優位でありマクロファージの浸潤も強く細胞性免疫の作動が示唆された。興味深いことに近傍の腫瘍外の腎、肝、肺組織に存在する T 細胞は依然 CD4T 細胞が優位であった(付図3)。この治療前後における CD4, CD8 phenotype をより詳細に解析するため CD4/Ki-67, CD8/Ki-67 の2重免疫染色を実施した。結果は、CD4T 細胞は治療の前後に関わらず Ki-67 で標識される増殖分画は殆ど観察しなかった。しかし CD8 T 細胞は治療後検体でその多くが Ki-67 標識され増殖分画にあることが明らかとなった。

剖検時の腎組織においては糸球体に明確な形態学的変化は観察せずまた間質への有意なリンパ球浸潤も認めず自己免疫性腎炎を示唆する所見は同定し得なかった。

D. 考察

当該腫瘍免疫活性化療法には理論的には以下の3フェーズが考えられる つまり priming phase:

GM-CSF の抗原提示増強作用によるワクチン接種局所での宿主抗原提示細胞(APC)への有効な(腫瘍)抗原提示、induction phase: APC の所属リンパ節への遊走と抗腫瘍免疫担当細胞の活性化、effector phase: 抗原提示を受けた免疫担当細胞の腫瘍局所への遊走と抗腫瘍効果作用の発揮;である。

(材料を得られなかった induction phase を除き)このような予期される免疫学的観点をもとに病理組織材料を通じてそれぞれの phase における安全性(有害事象の有無)、有効性(抗腫瘍免疫の作動状態)を解析した。

priming phase について:

ワクチン接種箇所での時系列に応じた T 細胞を主体とした有意な細胞浸潤誘導はなんからの免疫反応の惹起の帰結と考えられる。浸潤細胞の構成、時期については先行して米国において実施された臨床研究の報告結果と本質的に異なるものではなかった。今回の解析で得た新たな知見はこの priming phase での樹状細胞の動向であった。前述したよう理論的にはこの priming phase にて樹状細胞(DC)への抗原提示が期待される訳であるが、ワクチン3回接種以降に S100-の immature phenotype を示す樹状細胞および S100+の mature phenotype を示す両者の樹状細胞出現を同定し得た。さらに表皮 Langerhans 細胞にも CD1a+, S100-の未熟型と CD1a-, S100+の成熟型の移行を示唆する所見を得た。

DTH 反応について:

ワクチン接種後に有意な DTH 部位に対する細胞反応を同定し得たがいくつかの疑問点を残した。それは1)自己(正常)腎細胞接種部位にも有意な細胞反応を惹起した点と2)腎癌細胞への DTH は腫瘍浸潤 T 細胞と異なり CD4T 細胞数優位であった点である。1)に関しては FCS を用いた培養、放射線照射、皮膚という腎細胞にとっての異所性環境等、細胞調整、接種部位に関連しての反応あるいは腎組織特異抗原への感作の可能性が示唆された。しかしながら腎組織特異抗原の可能性については有害事象発現にも関与し得るので詳細に検討したが前述したよう治療後において自己免疫性腎炎惹起を示唆する像は認めなかった。

メラノーマに対する腫瘍免疫活性化療法で感作された細胞が正常メラニン産生細胞を攻撃しそれが白斑として認識されることは良く知られた事実である。しかし当該プロトコールでは検出レベルに上る自己免疫現象は組織学的には認めなかった。

2)に関しての評価は困難であるが、脈管構築を含め in situ に存在する腫瘍細胞に対する反応と培養、放射線照射を受けた上で異所性(皮下の意味)に接種された細胞という細胞調整手技および座の違い等の可能性は指摘できる。また腫瘍抗原特異的抗原提示増強の観点からは T 細胞活性化マーカーで

あるDR発現がRCC周囲浸潤T細胞でより強く発現していた事がこの点を間接的にはあるが示唆していた。細胞調整手技に関連しての腫瘍特異抗原発現低下等の可能性も否定出来ない。

effector phase について:

腫瘍局所, effector phase 解析であるが、治療後の腫瘍細胞の有意なアポトーシス誘導、CD8T 細胞優位への転換と意図した腎癌特異的腫瘍免疫誘導を強く示唆する所見を得た。ただ一例のみの解析所見であるが当該療法の有効性を客観的に評価し得た貴重な解析結果であると思われる。特にこの所見がIL-2 投与以前の生検検体で観察されることからワクチン接種に反応しての結果であると思われ、その意味で腫瘍抗原特異的の反応誘導の証左であると考えられる。また腫瘍外組織においてはこのような変化が観察されないことから感作腫瘍免疫担当細胞は高い特異性をもって腫瘍局所へ遊走・ホーミングしていることが示唆された。また当該症例は治療開始前のTILフェノタイプがCD4 優位であったため治療後のCD8 優位への転換を同定し得たがそのような観点で未治療腎癌組織のTIL CD4, CD8 分布を計測したがその数的偏移、優位性は個別でありCD8 優位な症例も存在した。このような症例においては単にCD4/CD8 の数的変動は治療効果の判定指標とはなり難い。しかしながらKi-67との併用で増殖分画にあると確定し得た腫瘍内CD8T 細胞の積極的増加の知見はアポトーシス誘導所見に加え当該療法の腫瘍免疫増強効果の確たる証左と考える。今後はFasL, granzyme, perforin等のCTL活性分子、また増殖能等浸潤細胞の機能評価に関する解析も必要と考えられる。加えて腫瘍抗原の内容、浸潤T細胞の抗原特異性ともに未確定であり今後の課題として残された。

D. 結論

GM-CSF遺伝子導入腎癌細胞の接種により、その抗原特異性は未確定ながら有意な腫瘍免疫誘導を強く示唆する組織所見をそのeffector phaseに同定し得た。自己免疫性腎炎を含めこの療法に随伴しての有害事象は病理組織学的には認めなかった。欧米に先行規範例はあるものの当該プロトコルは本邦において腫瘍に対して初めて実施された遺伝子治療である。その全体が有害事象の発生なく無事にPhase Iを終了し得た事実は、そのシステム、機構整備とあわせてその社会的意義は極めて高いと思われる。病理学的観点からはpriming phaseにおける樹状細胞の動向確定、effector phaseにおけるCTLの増殖は新知見であると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

A case of renal cell carcinoma with GM-CSF gene incorporated vaccine therapy:
Immuno histochemical evidence of mature dendritic cell induction in the priming phase and induction of CTL with proliferative capacity in the effector phase (in preparation)

2. 学会発表

Immunohistochemical evaluation of renal cell carcinoma treated with GM-CSF gene incorporated vaccine therapy

先端医療と病理; 第91回日本病理学会総会

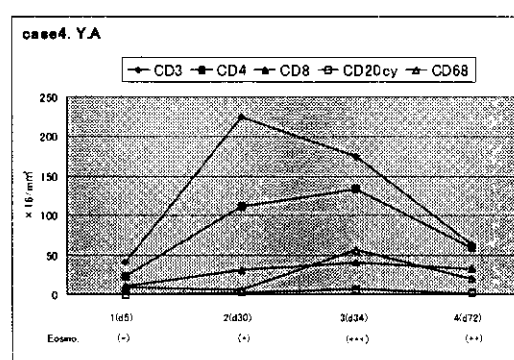
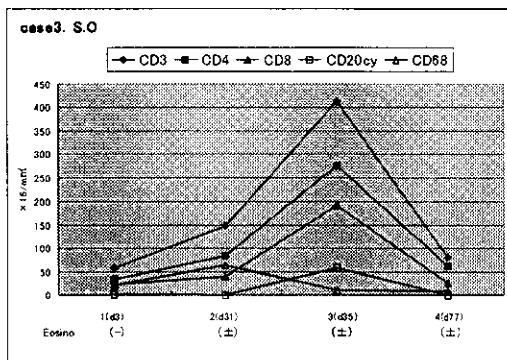
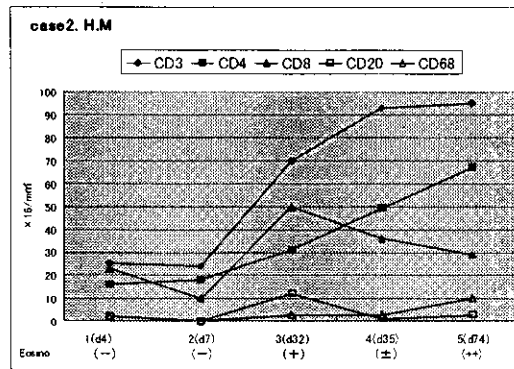
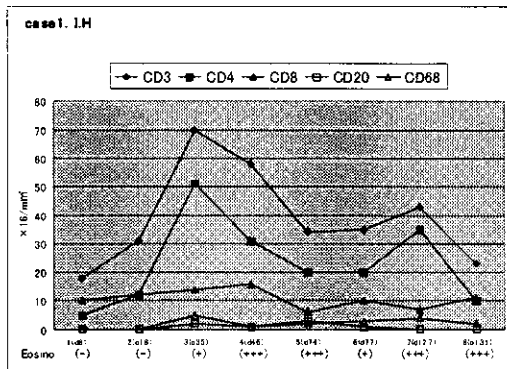
F. 健康危険情報

なし。

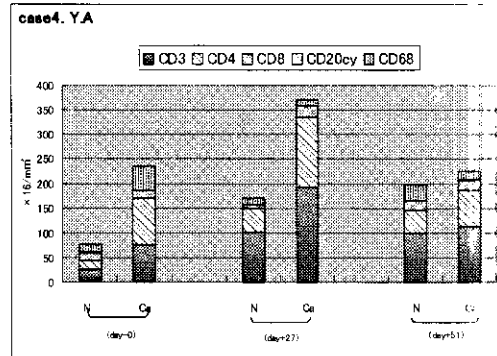
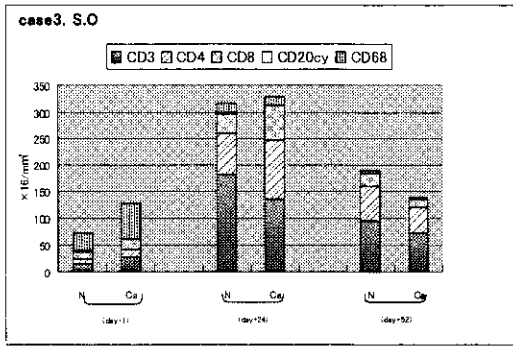
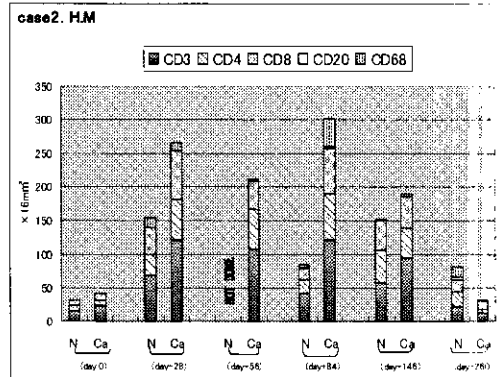
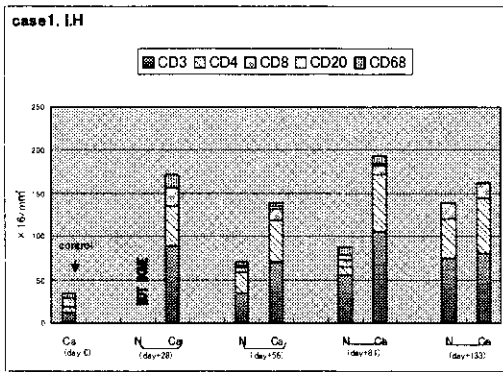
G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む。)

なし。

付図1: Vaccination site: phenotype of infiltrating cells



付図2: DTH site: phenotype of infiltrating cells



付図3 Summary: immunophenotype analysis of tumor infiltrating cells

	Pre-therapy Primary tumor			Post-therapy, 7M (-IL-2) Biopsy: skin metastasis				Post-therapy, 9M (+IL-2) liver lung			
	T-a	T-b	renal	T-a	T-b	T-c	T-d	T-a	liver	T-a	lung
CD3	124	33	176	84	34	72	49	80	104	65	25
CD4	114	19	138	9	3	29	8	11	96	3	16
CD8	53	16	54	71	13	47	45	74	14	44	6
4/8 R	2.2	1.2	2.6	0.1	0.2	0.6	0.1	0.1	6.8	0.6	2.7
CD79	87	13	116	1	0	0	0	1	29	5	38
CD56	6	0	10	0	0	3	0	1	0	0	0
CD68	23	66	14	37	12	15	54	36	8	15	8
S100	7	4	10	2	0	0	0	1	3	0	0

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki A., <u>Akaza H.</u> et al	Immunological protection induced by bacillus Calmette-Guerin(BCG) treatment in a murine bladder tumor model	Int J Urol	9	219-224	2002
Tanaka F, <u>Mori M.</u> , et al	Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo	Int J Cancer	101	265-269	2002
Mashino K, <u>Mori M.</u> , et al	Effective Strategy of Dendritic Cell-based Immunotherapy for Advanced Tumor-bearing Hosts: the Critical Role of Th1-dominant Immunity	Mol Cancer Therapy	1	785-794	2002
Ohata J, <u>Tani K.</u> , <u>Asano S.</u> , <u>Azuma M.</u> et al	Differential graft-versus-leukaemia effect by CD28 and CD40 co-stimulatory blockade after graft-versus-host disease prophylaxis	Clin Exp Immunol	129	61-68	2002
Yamazaki T, <u>Azuma M.</u> et al	Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T cells and antigen-presenting cells(APC)	J of Immunol	169	5538-5545	2002
Iwai H., <u>Okumura K.</u> , <u>Azuma M.</u> et al	Amelioration of Collagen-Induced Arthritis by Blockade of Inducible Costimulator-B7 Homologous Protein Costimulation	J of Immunol	169	4332-4339	2002
Duda DG, <u>Tani K.</u> , <u>Asano S.</u> , et al	Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor I suppresses efficiently tumour angiogenesis	Brit J of Cancer	86	490-496	2002
Kawai K., <u>Tani K.</u> , <u>Fujime M.</u> , <u>Okumura K.</u> , <u>Asano S.</u> , <u>Akaza H.</u> , et al	Advanced renal cell carcinoma treated with granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene therapy: A clinical course of the first Japanese experience	Int J of Urol	9	462-466	2002
Totsuka T, <u>Azuam M.</u> , <u>Okumura K.</u> et al	Ameliorating Effect of Anti-inducible Co-stimulator Monoclonal Antibody in a Murine Model of Chronic Colitis	Gastroenterology	124	410-421	2003

Nakayama, M., Okumura K, et al	Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Mediates Multiple Pathways of TWEAK-Induced Cell Death	J of Immunol	170	341-348	2003
Akaza H, et al	A prospective and randomized study of primary hormonal therapy for patients with localized or locally advanced prostate cancer unsuitable for radical prostatectomy: results of the 5-year follow-up.	Brit J Urol Int	91	33 - 36	2003
Bai Y., Asano S., Tani K., et al	Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector	Gene Ther	9	1-2	2003
Kojima T., Tani K., et al	GM-CSF Gene-Transduced Tumor Cells Combined with Tumor-Derived Gp96 Inhibit Tumor Growth in Mice	Hum Gene Ther (in press)	-	-	2003

書籍

発表者氏名	タイトル	編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
Tani K	Immunotherapy using GM-CSF gene for metastatic renal cell cancer. International Symposium	Ochiai, T., Matsubara, H.	Cancer Gene Therapy	へるす出版	東京	2002	213-223
Asano S	Maxizyme for lymphomas and leukemia	Ochiai, T., Matsubara, H.	Cancer Gene Therapy	へるす出版	東京	2002	255-274
Tani K	腎癌に対する免疫遺伝子治療臨床研究の現状	藤田 勝治	医学のあゆみ	医歯薬出版	東京	2002	213-223
Maeda T, Tani K	ゲノム医学	田村隆明、山本 雅	分子生物学イラストレイテッド	羊土社	東京	2002	361-373

20020840

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.32- P.33の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。