

5. S. Tanaka, M. Harada, T. Mine, M. Noguchi, R. Gohara, K. Azuma, M. Tamura, A. Yamada, A. Morinaga, M. Nishikori, K. Katagiri, K. Itoh, H. Yamana, and T. Hashimoto. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancers based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the periphery. *J. Immunother.*, 26: 357-366, 2003.
6. T. Mine, R. Gouhara, N. Hida, N. Imai, K. Azuma, T. Rikimaru, K. Katagiri, M. Nishikori, A. Sukehiro, M. Nakagawa, A. Yamada, H. Aizawa, K. Shirouzu, K. Itoh, and H. Yamana. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci.*, 94: 548-556, 2003.
7. S. Ohkouchi, N. Kawamoto, F. Sakanashi, S. Shichijo, Y. Saijo, T. Nukiwa, K. Itoh, and A. Yamada. Identification of cytotoxic T lymphocyte-directed epitope encoded by an intron of putative tumor suppresser gene Testin of the common fragile site 7G region at 7q31.2: Peptide vaccine candidate for HLA-B52<sup>+</sup> and -62<sup>+</sup> cancer patients. *Eur. J. Immunol.*, 33: 2964-2973, 2003.
8. Y. Sato, H. Shomura, Y. Maeda, T. Mine, Y. Une, Y. Akasaka, M. Kondo, S. Takahashi, T. Shinohara, K. Katagiri, M. Sato, S. Okada, K. Matsui, A. Yamada, H. Yamana, K. Itoh, and S. Todo. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.*, 94:802-808, 2003.
9. N. Tsuda, K. Mochizuki, M. Harada, A. Sukehiro, K. Kawano, A. Yamada, K. Ushijima, T. Sugiyama, T. Nishida, H. Yamana, K. Itoh, and T. Kamura. Vaccination with pre-designated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J. Immunother.*, 27:60-67, 2004.
10. W. Kumamaru, S. Nakamura, T. Kadena, A. Yamada, E. Kawamura, M. Sasaki, Y. Ohyama, T. Toyoshima, J. Hayashida, K. Itoh, and K. Shirasuna. T cell receptor V $\beta$  gene usage by T cells reactive with the tumor rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *In. J. Cancer*, 108:686-695, 2004.
11. M. Noguchi, K. Itoh, S. Suekane, A. Yao, N. Suetsugu, K. Katagiri, A. Yamada, H. Yamana, S. Noda. Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2 positive patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Cancer Sci.*, in press.
12. A. Yamada, H. Yamana, K. Itoh. Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. In "Current Topics in Peptide & Protein Research". Research Trend, India, in press.

## 2. 学会発表

1. Akira Yamada, Hideaki Yamana, Kyogo Itoh. New Development of Tailor-made Peptide Vaccine for Cancer Immunotherapy. The International Symposium held by Catholic Research Institutes of Medical Science and Catholic Cancer Center, The Catholic University of Korea "Recent Advances in Medical Science; Cancer Immunotherapy and Neural Science" (May 23, 2003, Seoul, Korea)

2. 山田 亮、峯 孝志、合原るみ、笹富輝男、野口正典、津田尚武、望月一生、田中聖子、正村裕紀、佐藤裕二、山名秀明、伊東恭悟：テラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後との相関。第7回基盤的癌免疫研究会（2003年7月、岡山）
3. 矢島直樹、山中龍也、土屋尚人、山田 亮、伊東恭悟、田中隆一。再発悪性神経膠腫に対する CTL precursor-oriented ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験。第7回基盤的癌免疫研究会（2003年7月、岡山）
4. 山田 亮。テラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後との相関。第3回トランスレーショナルリサーチ研究会（2003年9月、淡路）
5. 峯孝志、佐藤裕二、野口正典、笹富輝男、合原るみ、津田尚武、田中聖子、正村裕紀、白水和雄、籾堂省、山田亮、山名秀明、伊東恭悟。癌ペプチドワクチン療法における予後判定マーカーの検討。第62回日本癌学会総会（2003年9月26日、名古屋）
6. 正村裕紀、佐藤裕二、前田好章、峯孝志、山田亮、山名秀明、籾堂省、伊東恭悟。高度進行・再発胃癌に対する CTL precursor-oriented 癌ペプチドワクチンの第一相臨床試験。第62回日本癌学会総会（2003年9月27日、名古屋）
7. 矢島直樹、山中龍也、土屋尚人、山田亮、伊東恭悟、田中隆一。再発悪性神経膠腫に対する CTL precursor-oriented ペプチドワクチン療法の第一相臨床試験。第62回日本癌学会総会（2003年9月27日、名古屋）
8. 山田亮、峯孝志、合原るみ、笹富輝男、野口正典、津田尚武、望月一生、田中聖子、正村裕紀、佐藤裕二、山名秀明、伊東恭悟。テラーメイドワクチン投与患者における抗ペプチド抗体と臨床予後の相関。第62回日本癌学会総会（2003年9月27日、名古屋）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

##### 1. 特許取得

名称：C型肝炎ウイルス由来ペプチド

出願日：平成15年9月22日

出願No.：特願2003-330258

発明者：伊東恭悟、山田 亮、佐田通夫

出願人：久留米大学

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

分担研究報告書

難治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：本研究では、マウス腫瘍を用いた検討で、in vivo での腫瘍拒絶抗原であることを実証し得た HER2 由来 CTL エピトープペプチドが、多数の日本人が所有する HLA-A2402 拘束性の HER2 特異的 CTL を誘導し得ることを明らかにしたことにより、マウスモデル及びヒトでの基礎的臨床的研究を並行させて検討し得るという極めてユニークなシステムを用いる。我々はこの CTL エピトープ配列を含んだ HER2 抗原蛋白分子と疎水化多糖類の複合体により、抗原蛋白を MHC クラス I およびクラス II の両経路に提示し得るといふ他に類を見ない抗原デリバリーシステムの開発をした。現在本システムにより HER2 発現難治性癌に対する臨床第 I 相試験を行っている。

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原癌遺伝子 c-erbB2/HER2(後 HER2)を標的とした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、同定した HER2 ペプチドを含む組み換え蛋白と疎水化多糖類の複合体によるワクチンの臨床第 I 相試験を進め各種のペプチド又は蛋白特異的な免疫的モニタリング法を用いて被験者における免疫動態を詳細に解析する。本研究で用いる疎水化多糖類は、複合体を作る抗原蛋白由来のペプチドを、MHC クラス I およびクラス II の両経路で提示することが可能である。HER2 特異的 CD8<sup>+</sup>CTL および CD4<sup>+</sup>ヘルパー T 細胞の両者を活性化することが可能な癌ワクチンの免疫的、臨床的評価を行う。

B. 研究方法

- 1)HER2 発現腫瘍を対象とした HLA-A2402 所持患者に対する HER2 蛋白と疎水化多糖類の複合体につき、臨床第 I 相試験をおこなう。
- 2)上記 1) の被験者由来末梢血リンパ球および血清を、ELISPOT、ELISA、Tetramer 等で解析して、特異的免疫をモニターする。
- 3)多価性ワクチンのモニターの為に、複数のエピトープに対する T 細胞免疫応答の解析システムを開発する。

(倫理面への配慮)

疎水化多糖類・HER2 蛋白複合体による臨床研究は、三重大学医学部研究等に関する倫理

委員会の最終承認を受けた。尚、当臨床計画はルドウィック癌研究所 (Ludwig Institute for Cancer Research) の Protocol Review Committee の承認を受け、臨床試験にはアメリカ合衆国の FDA 基準に該当したクリニカルグレードの分子を用い臨床試験をすでに開始している。全ての臨床試験は対象患者さんへの十分な説明と書面によるインフォームドコンセントを前提とする。

C. 研究結果

我々は HER2 抗原を標的とした癌ワクチンを開発しその探索的臨床研究を展開している。

1.HER2 蛋白を用いる CHP-HER2 癌ワクチン臨床試験

癌免疫反応において CD4<sup>+</sup>T 細胞による CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化が重要と考えられる。CD4 ヘルパーエピトープを含む多価性ワクチンとして HER2 短縮型蛋白 (N 末端より 146 個のアミノ酸よりなる) と疎水化多糖類との複合体 (CHP-HER2) を作製し、BALB/c マウスモデルにおいて in vitro, in vivo での免疫応答の解析を行った。その結果 HER2 特異的 IgG の誘導が誘導されると同時に p63-71 ペプチド特異的な CTL も誘導された。またそのペプチド特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導は CHP-HER2 免疫において HER2p63 ペプチド単独に比較して増強していた。さらには HER2 陽性腫瘍細胞肺転移モデルにおいて CHP-HER2 処理樹状細胞で免疫したマウスではペプチドパルス樹状細胞免疫マウスにくらべてより著明な腫瘍拒絶が得られた。ヒトでの CHP-HER2 癌ワクチン臨床試験である“HER2 抗原発現腫瘍で HLA-A2402 を有する患者に対するコレステリル疎水化多糖類・HER2 蛋白複合体 (CHP-HER2 複合体) による免疫的治療—第 I 相試験—”を開始した。本試験は CHP-HER2 の安全性と免疫反応能をエン

ドポイントとする試験で、HER2 蛋白 300 $\mu$ g に相当する CHP-HER2 を 2 週間隔で 3 回皮下投与するものである。現在の 1 例の登録例では注射部位の発赤・腫脹を一過性に認めるがその他有害事象は観察されていない。登録症例 9 例の予定で試験を行っている。

## 2. 抗原 mRNA 導入リンパ球の免疫モニタリングへの応用

我々は HER2 抗原を標的とした癌ワクチンを開発する中で、とりわけこれまで各種 HLA クラス I 分子への結合性ペプチドを提示することができ、又 CD8<sup>+</sup>T 細胞と共に CD4<sup>+</sup>T 細胞を特異的に活性化できる MHC クラス II 結合性抗原ペプチドを提示できる多価性癌ワクチンについて検討を進めてきた。

この様な多価性癌ワクチンの臨床試験では、従来の T2 細胞等を用いた単独抗原ペプチド発現細胞によるモニタリングと共に、複数の抗原ペプチド (同定及び未同定の両者を含み) 発現細胞を標的としたモニタリングシステムの開発が非常に重要である。これ迄にウイルスベクターによる遺伝子導入を行った自家標的細胞の応用が報告されている。我々は様々な遺伝子を簡便に免疫モニタリングに用いるべく、抗原 mRNA 導入リンパ球の免疫モニタリングへの応用について検討を進めた。

この目的に沿って、146HER2、SAGE 及び EBNA3A の mRNA を *in vitro* transcription の手法で作製し、polyA を付加して調整し、EGFP mRNA と共にリンパ球細胞への導入を試みた。導入対象細胞には EB ウイルスによる LCL ライン、PHA 刺激 CD4<sup>+</sup>T 細胞、及び CD40L 産生細胞との共培養により調整した B 細胞群を用いた。mRNA は、amaxa biosystem 社の Nucleofector™ を用いた電気穿孔法で導入した EGFP mRNA を用いた検討では、何れの細胞系においても、50%以上の高い導入効率が示された。しかしながら、導入後の細胞の回収は、約 5%から 30%と実験ごとに違いが認められた。146 HER2、SAGE、EBNA3A に対して感作された CD8<sup>+</sup>T 細胞又はそのクローンは、各々該当する抗原 mRNA を導入した細胞に特異的な活性を示し、とりわけ PHA 刺激 CD4<sup>+</sup>T 細胞は、高い MHC クラス I とクラス II の発現と共に強い CD86 の発現も認められ免疫的モニタリングに用いる標的細胞として適している可能性が示された。

## D. 考察

マウス MHC クラス I 分子 K<sup>d</sup> とヒト MHC クラス I 分子 HLA-A2402 に結合し得る抗原ペプチドのアンカーモチーフは類似している。先にマウスモデルを用いて同定したマウス

CD8<sup>+</sup> K<sup>d</sup> 拘束性 CTL により認識されるペプチド HER2p63 及び HER2p780 は、HLA-A2402 に結合し得るモチーフを有している。事実、これらのペプチドを用いて HLA-A2402 を有する健康人及び癌患者末梢血から誘導された CD8<sup>+</sup>CTL は、各種 HER2 発現癌細胞を HLA-A2402 拘束性に傷害し、両ペプチドがヒトにおいても腫瘍拒絶抗原となり得ることが示された。既に HER2p63 ペプチドを用いた HER2 発現難治性癌に対する臨床第 I 相試験をほぼ終了しており、ペプチドの安全性は確認された (300mg 投与量迄)。臨床的には PD 症例 9 例、NC 症例 2 例であるが HER2p63 ペプチドに対する免疫応答の変化はほとんど検出し得なかった。

我々はこれ迄に、癌特異的 CTL エピトープに対する、CTL の活性化には、腫瘍内分子に由来するヘルパーエピトープを合わせての免疫が極めて重要であることを示して来た。そこで HER2p63 ペプチドの配列を含む組み換え蛋白と疎水化多糖類の複合体により、同じ特異性を有する CD8<sup>+</sup>CTL を誘導できる事を明らかにすると共に、蛋白中に含まれるヘルパーエピトープにより、CD4<sup>+</sup>ヘルパー T 細胞を活性化し得ることを明らかにした。マウスを用いての *in vivo* 効果の結果に基づいて、我々は既に GMP 基準のクリニカルグレードの HER2 抗原-疎水化多糖類を作製し、現在臨床第 I 相試験として、この癌ワクチンの安全性評価をおこなっている。今後、この多価性癌ワクチンの臨床試験を完遂すると共に、新たに開発したモニタリングシステムも併用して、詳細な免疫応答の解析を続けて行く。

## E. 結論

今後 CD4<sup>+</sup>エピトープおよび CD8<sup>+</sup>エピトープの両者を含んだ多価性の癌ワクチンの開発が重要である。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

1. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L.J. and Shiku, H.: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.100:10902-10906, 2003.

2. Wang, L., Miyahara, Y., Kato, T., Wang, L., Aota, T., Kuribayashi, K. and Shiku, H.: Essential roles of tumor-derived helper T cell epitopes for an effective peptide-based tumor vaccine. *Cancer Immun.* 3:16, 2003.
  3. Shiku, H.: Importance of CD4<sup>+</sup> helper T-cells in antitumor immunity. *Int. J. Hematol.* 77:435-438, 2003.
  4. Ishihara, M., Tawara, I., Wang, L., Takahashi, Y. and Shiku, H.: Elimination of CD4<sup>+</sup> T cells may overcome suppression of anti-HER2 immune responses in tumor-bearing hosts. *Int. J. Oncol.* 22:1135-1139, 2003.
  5. Kobayashi, T., Yamaguchi, M., Kim, S., Morikawa, J., Ogawa, S., Ueno, S., Suh, E., Dougherty, E., Shmulevich, I., Shiku, H. and Zhang, W.: Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5<sup>+</sup> and CD5<sup>-</sup> diffuse large B-Cell lymphomas. *Cancer Res.* 63:60-66, 2003.
  6. Suguro-Katayama, M., Suzuki, R., Kasugai, Y., Nakamura, T., Suzuki, H., Hosokawa, Y., Shiku, H., Nakamura, S. and Seto, M.: Heterogeneous copy numbers of API2-MALT1 chimeric transcripts in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leukemia* 17:2508-2512, 2003.
  7. Iwamura, K., Furukawa, K., Uchikawa, M., Sojka, BN., Kojima, Y., Wiels, J., Shiku, H., Urano, T. and Furukawa, K.: The blood group P1 synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. A clue to the solution of the P1/P2/p puzzle. *J. Biol. Chem.* 278:44429-44438, 2003.
  8. Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. and Bernstein, ID.: Notch signalling in hematopoiesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14:143-150, 2003.
  9. Lorenzo, FV., Nishii, K., Usui, E., Katayama, N. and Shiku, H.: AML with t(8;21) and trisomy 4: possible involvement of c-kit?/Reply to SE Langabeer et al. *Leukemia* 17: 1915-1916, 2003.
  10. Nishii, K., Usui, E., Katayama, N., Lorenzo, FV., Nakase, K., Kobayashi, T., Miwa, H., Mizutani, M., Tanaka, I., Nasu, K., Dohy, H., Kyo, T., Taniwaki, M., Ueda, T., Kita, K. and Shiku, H.: Characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive subtype of t(8;21) AML. *Leukemia* 17: 731-737, 2003.
  11. Morikawa, J., Li, H., Kim, S., Nishii, K., Ueno, S., Suh, E., Dougherty, E., Shmulevich, I., Shiku, H., Zhang, W. and Kobayashi, T.: Identification of signature genes by microarray for acute myeloid leukemia without maturation and acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12) (PML/RAR $\alpha$ ). *Int. J. Oncol.* 23: 617-625, 2003.
- H.知的財産権の出願、登録状況（予定含）  
現時点では該当するものはなし。

## 膵癌の免疫療法に関する研究

分担研究者 岡 正朗 山口大学医学部教授

研究要旨：本研究は難治性癌の一つである膵癌に対する新しい癌免疫療法を確立することを目的とし、細胞療法と癌ワクチン療法について検討した。細胞療法としては、膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法と膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法を検討した。癌ワクチン療法としては、高度進行膵癌患者を対象に腫瘍抗原ペプチドワクチン療法とMUC1ペプチドワクチン療法を検討した。臨床効果として、細胞療法に関しては、肝転移抑制と予後の改善を認め、特に膵癌切除例におけるMUC1-CTL療法では、1年生存率は80.0%、5年生存率20.0%と従来の成績に比べ、良好であった。また、肝再発が15例中1例(6.7%)と有意に肝転移再発を抑制した。腫瘍抗原ペプチドワクチン療法に関しては後腹膜リンパ節転移症例に対して延命効果を認めた。  
今後、細胞療法における肝転移抑制効果と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法における後腹膜再発抑制効果を期待し、新たな複合的免疫療法の研究を要する。

### A. 研究目的

悪性腫瘍は世界で800万人以上が罹患しており、また、我が国の国民死亡原因の第1位を占め国民の最も関心の高い疾患である。なかでも膵癌は消化器癌の中で最も予後不良であり、有効な治療法が無い。罹患率、死亡率とも増加しており、効果的な治療法の確立が望まれる。本研究は膵癌に対する新しい免疫療法を検証し、臨床応用されることを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. 膵癌に対する細胞療法

##### A) 膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法

膵癌切除例において、術後補助療法として細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を用いた細胞療法を3回施行し、安全性と臨床効果を検討した。施行した細胞療法は患者末梢血リンパ球を採取し、糖鎖抗原MUC1高発現ヒト膵癌細胞株YPK-1と混合培養して誘導したMUC1-CTLを用いた。

##### B) 膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法

膵癌非切除・再発例に対して、細胞療法を繰り返し施行し、安全性と臨床効果を検討した。施行した細胞療法としては上述のMUC1-CTLに加え、患者末梢血より樹状細胞(DC)を採取し、105merMUC1ペプチド(GMP grade)にて刺激・誘導したMUC1-DCを用いた。

#### 2. 膵癌に対する癌ワクチン療法

##### A) 腫瘍抗原ペプチドワクチン療法

多数の腫瘍抗原ペプチドの中から、個々の患者に有効なペプチドを決定する新細胞性免疫定性法を用いた第I相臨床試験を施行し、安全性と臨床効果を検討した。対象はHLA-A24もしくはHLA-A2陽性で本研究への参加を同意した高度進行膵癌患者で、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(IFA)を混和したペプチドワクチンを2週間隔で3回投与した。

##### B) MUC1ペプチドワクチン療法

105merMUC1ペプチド(GMP grade)を用いて第I相臨床試験を施行し、安全性と臨床効果を検討した。ペプチド1回投与量は300、1,000、3,000 $\mu$ gの3段階のdose escalationとし、MUC1ペプチド3mgとIFAを混和したペプチドワクチンを2週間隔で3回投与した。

(倫理面への配慮)本研究における各種治療法は山口大学審査委員会での審査承認を得たのち、当該研究分担者(医師)が被験者から文書での十分な説明を受けた上での自由意志による同意(インフォームド・コンセント)を得て実施している。

### C. 研究結果

#### 1. 膵癌に対する細胞療法

##### A) 膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法

15例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。15例中2例が術後60ヶ月、

36ヶ月と無再発生存中である。1年生存率は80.0%、5年生存率20.0%と従来の成績に比べ、予後の改善を認めた。また、肝再発が15例中1例(6.7%)と有意に肝転移再発を抑制した。

#### B) 膵癌非切除・再発例に対するMUC1-CTL+DC療法

12例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。12例施行した中で切除後多発肺転移1例が47ヶ月生存し、H2(肝両葉にわたり少数散在性の転移が認められる)の1症例が12ヶ月後死亡と治療効果を認めた。

### 2. 膵癌に対する癌ワクチン療法

#### A) 腫瘍抗原ペプチドワクチン療法

12例に施行し、安全性に関しては、局所発赤・腫脹が8例(grade I ; 4例, grade II ; 3例, grade III ; 1例)、発熱3例(grade I ; 1例, grade II ; 2例) 食欲不振1例(grade I)、全身倦怠感1例(grade I)を認めた以外は副作用を認めず、安全性が確かめられた。臨床効果については、3回投与終了後SD5例、PD7例であった。SD症例の内訳は腹腔内リンパ節再発2例、腹腔内リンパ節再発および骨転移1例、局所再発1例、術後補助療法1例であった。予後に関しては、最低3ヶ月で死亡したが、NCの1症例は29ヶ月生存中であり、継続投与を行っている。

#### B) MUC1ペプチドワクチン療法

9例に施行し、安全性に関しては、副作用を認めず、安全性が確かめられた。臨床効果については、3回投与終了後NC1例、PD8例であった。NC症例の内訳は腫瘍マーカー上昇例で、本療法により腫瘍マーカーの低下を認めた。予後に関しては、最低3ヶ月で死亡したが、NCの1症例は32ヶ月生存中で、腫瘍マーカーの再上昇は認めていない。

#### D. 考察

本研究で施行した細胞療法および癌ワクチン療法は安全に施行できると考えられる。

臨床効果に関しては、細胞療法においては肝転移の抑制と予後の改善を認めた。特に膵癌切除例に対するMUC1-CTL療法においては、肝再発が15例中1例(6.7%)と有意に肝転移再発を抑制しており、その機序としては術前・中から存在する微小肝転移細胞に対し、細胞性免疫が低下する周術期に、膵癌特異的CTLを移入することで抗腫瘍効果を発揮するものと考えられ、移入する細胞が膵癌特異的であることと移入する時期が肝要と考えられた。また、腫瘍抗原ペプチドワクチン療法においては、CR症例は得られなかったものの、後腹膜リンパ節転移3例、局所再発1例においてはSDが得られており、うち1例において29ヶ月生存中の症例が得られている。本症例は、long SDの状態であり、膵癌の予後を考えると、ペプチド療法には延命効果があると考えられる。これらS

D症例における臨床効果の機序として、癌ペプチドワクチン投与が大腿部皮下に行われ、リンパの流れから投与されたペプチドは後腹膜沿いのリンパ管から、後腹膜リンパ節に到達し、同部の抗原提示細胞に取り込まれ、CTLを誘導して抗腫瘍活性が増強されたとも考えられる。

#### E. 結論

本研究で施行した細胞療法および癌ワクチン療法の安全性と有効性が確認された。有効性に関しては、特に細胞療法における肝転移抑制効果と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法における後腹膜再発抑制効果を認めた。今後、細胞療法と腫瘍抗原ペプチドワクチン療法を併用した新たな複合的免疫療法の検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

本研究における各種治療法では重篤な有害事象は認めなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1-1. 論文発表(英文査読誌掲載論文)

1. Matsuoka K, Ueno T, Morita K, Kawano H, Yamaguchi K, Maekawa T, Tangoku A, Oka M. Effects of Moderate Hypothermia on Proinflammatory Cytokines Production in Rat Model of Caerulein-Induced Pancreatitis. *Pancreas*. 26(1): E12-E17, 2003.

2. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H, Hamada K, Nakayama H, Ishitsuka H, Miyamoto T, Hirabayashi A, Uchimura S, Hamamoto Y. Use of oligonucleotide microarray as a novel approach for prediction of early intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet*. 361: 923-929, 2003.

3. Iizuka N, Mori H, Tamesa T, Tangoku A, Oka M. Nm23-H2 protein expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 23: 43-47, 2003.

4. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Hashimoto K, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Differential Gene Expression in Distinct Virologic Types of Hepatocellular Carcinoma: Association with Liver Cirrhosis. *Oncogene* 22: 3007-3014, 2003.

5. Arai H, Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Kawauchi S, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K. Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* 146: 16-21, 2003.
6. Iizuka N, Oka M, Yamamoto K, Tangoku A, Miyamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. *Int J Cancer.* 107: 666-672, 2003.
7. Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Toshimitsu H, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Oka M, Sasaki K. Prediction of Nodal Metastasis by Comparative Genomic Hybridization in Biopsy Specimens from Patients with Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9: 5137-5141, 2003.
8. Okada T, Oka M, Iizuka N, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Takemoto N, Hashimoto K, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Gene expression profile linked to p53 status in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* 555: 583-90, 2003.
9. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Identification of the heat shock protein 70 family as biomarkers against hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by proteomic profiling. *Proteomics* 3: 2487-2493, 2003.
10. Hinoda Y, Ikematsu Y, Horinochi M, Sato S, Yamamoto K, Nakano T, Fukui M, Suehiro Y, Hamanaka Y, Nishikawa Y, Kida H, Waki S, Oka M, Imai Y, Yonezawa S. Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 38: 1162-1166, 2003.
11. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Hamada K, Nakayama H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Matoba K, Takashima M, Sakamoto K, Hashimoto K, Tangoku A, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Molecular signature in three types of hepatocellular carcinoma with different viral origin by oligonucleotide microarray. *Int J Oncol.* 24: 565-574, 2004.
12. Tangoku A, Yamamoto S, Suga K, Nagashima Y, Hida M, Sato T, Sakamoto K, Oka M. Sentinel biopsy using computed tomography lymphography to detect sentinel lymph node in breast cancer. *Surgery* 135: 258-565, 2004.
- 1-2. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)
1. 岡正朗: 消化器癌のワクチン療法. *山口医学*, 2003 ; 52 : 52-54.
  2. 河岡徹, 山本光太郎, 岡正朗: 癌退縮抗原. *コンセンサス癌治療*, 2003 ; 2 : 168.
  3. 河岡徹, 山本光太郎, 岡正朗: 浸潤性膵管癌と紛らわしい疾患. *臨床外科*, 2003 ; 58 : 1235-1241.
  4. 山本光太郎, 岡正朗: 膵頭十二指腸切除術後の再建法とその意義. *消化器外科*, 2003 ; 26 : 1779-1786.
- 1-3. 論文発表 (著書)
1. 河岡 徹、吉野茂文、岡 正朗. 消化器外科学レビュー. 総合医学社. 監修: 跡見 裕、炭山嘉伸、門田守人. 癌の補助療法(免疫療法). P34-39, 2003
  2. 安部俊宏、岡 正朗. 消化器外科別冊. 新ベッドサイドアトラス. へるす出版. 末梢静脈確保. P778-784, 2003.
2. 学会発表
- 2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)  
なし
  - 2-2. 国内学会発表
    1. 山本光太郎, 上野富雄, 矢原昇, 河岡徹, 丹黒章, 岡正朗: 膵頭十二指腸切除術における上腸間膜動脈左半周神経温存郭清. 日本肝胆膵外科関連会議, 2003年5月14-16日, 金沢
    2. 河岡徹, 山本光太郎, 上野富雄, 矢原昇, 岡正朗: 膵癌術後免疫療法の成績. 日本肝胆膵外科関連会議, 2003年5月14-16日, 金沢
    3. 山本光太郎, 上野富雄, 矢原昇, 河岡徹, 年光宏明, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗: 膵癌に対する手術適応の再考と新たな複合免疫療法. 第103回日本外科学会定期学術集会, 2003年6月4-6日, 札幌
    4. 河岡徹, 裕彰一, 矢原昇, 山本光太郎, 吉野茂文, 丹黒章, 岡正朗: 切除不能・再発膵癌に対する細胞・ワクチン療法の治療方針. 第103回日本外科学会定期学術集会, 2003年6月4-6日, 札幌
    5. 山本光太郎, 鈴木伸明, 河岡徹, 吉野茂文, 裕彰一, 伊東恭悟, 岡正朗: 膵癌に対する癌ペプチドワクチン療法の第I相試験. 第62回日本癌



学会総会, 2003年9月25-27日,名古屋

6. 河岡徹, 吉野茂文, 裕彰一, 丹黒章, 岡正朗: 癌性胸腹水に対するレンチナン+OK-432胸腹腔内投与の基礎的及び臨床的検討. 第24回癌免疫外科研究会第25回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング,2003年6月18-19日,千葉
7. 山本光太郎, 上野富雄, 矢原昇, 河岡徹, 年光宏明,丹黒章, 岡正朗: 切除適応膵癌に対する複合的免疫療法による治療戦略. 第34回日本膵臓学会大会,2003年7月10-11日,千葉
8. 河岡徹, 上野富雄,山本光太郎, 矢原昇, 裕彰一,丹黒章, 岡正朗: Stage4膵癌に対する免疫療法を中心とした多角的治療選択. 第58回日本消化器外科学会総会,2003年7月16-18日,東京
9. 山本光太郎, 鈴木伸明, 上野富雄, 矢原昇, 河岡徹,丹黒章, 伊東恭悟, 岡正朗: 膵癌に対する癌抗原ペプチドワクチン療法の可能性. 第58回日本消化器外科学会総会,2003年7月16-18日,東京
10. 河岡徹, 山本光太郎, 吉野茂文, 裕彰一,丹黒章, 岡正朗: 癌性胸腹水に対するレンチナン+OK-432胸腹水腔内投与の臨床的検討. 第16回日本バイオセラピー学会学術集会総会,2003年12月4-5日, 富山
11. 山本光太郎, 鈴木伸明, 河岡徹, 吉野茂文, 裕彰一,伊東恭悟, 岡正朗: 膵癌に対する癌ペプチドワクチン療法を併用した集学的治療戦略. 第16回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 2003年12月4-5日, 富山

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし(予定を含む)
2. 実用新案登録  
なし(予定を含む)
3. その他  
なし(予定を含む)

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)  
分担研究報告書

CEAエピトープペプチドの化学合成とそのCTL誘導活性に関する研究

分担研究者 望月 徹 静岡県立がんセンター研究所

研究要旨

Carcinoembryonic antigen (CEA) 分子内の HLA-A24 拘束性 CTL 誘導エピトープを同定する目的で BioInformatics & Molecular Analysis (BMA) により推定した HLA-A24 に結合親和性が高いと予測された9アミノ酸残基からなる10種類のCEA 関連ペプチドを化学合成し、それらペプチドで刺激した樹上細胞から誘導される CTL 活性を IFN- $\gamma$  放出活性を指標として検討した。健常人の末梢血から採取した単核球から誘導した樹上細胞4例のうち2例において CEA(101-109) および CEA(276-284) は有意な CTL 誘導活性を示し、特にCEA(101-109) には比較として用いたCMVpp65 の約2倍の高いCTL 誘導活性が認められ、CEA(101-109) がHLA-A24 拘束性 CTL誘導エピトープの一つであることが示唆された。

A. 研究目的

CEA は多種類のがん細胞で産生される蛋白であり、分子内に多くの HLA 結合親和性モチーフを有している。本研究では CEA を標的とするがん免疫療法において応用可能な高CTL誘導活性を有する CEA がん抗原エピトープの同定を目的として BMA により上位1-10位にランクされる9アミノ酸残基のエピトープ候補ペプチドを化学合成し、それらペプチド刺激により樹上細胞から誘導される CTL 活性を検討した。

B. 研究方法

CEA蛋白質全配列について、HLA-A24に高親和性でCTL誘導エピトープとなり得る配列をBMA により推定し、HLA-A24結合親和性モチーフ1-10位にランクされる Table 1に示す10種類の9アミノ酸残基からなるペプチドを化学合成した。

合成は、自動ペプチド合成機(ABI 433A)を用いる固相法で行った。各ペプチドのC末端に相当するアミノ酸が導入されたHMP 樹脂上に、順次対応する Fmoc-アミノ酸誘導体をDIEA(N,N-diisopropylethylamide) 存在下HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium)により縮合してペプチド鎖を

Table 1 Synthetic CEA-related Peptides

BMB-rank	Position	Sequence
1	425-433	TYYRPGVNL
2	652-660	TYACFVSNL
3	318-326	VYAEPPKPF
4	101-109	IYPNASLLTI
5	234-242	LYGPDAPTI
6	590-598	LYGPDTP I
7	624-632	QYSWRINGI
8	412-420	LYGPDDPTI
9	276-284	TFQQSTQEL
10	492-450	KT I TVSAEL

延長した。得られた保護ペプチド樹脂500mgを、phenole (0.75g), ethandithiole (0.25ml), thioanisole (0.5ml) および H<sub>2</sub>O (0.5ml) 含有TFA (10ml) で室温 2 時間攪拌処理することによりペプチドを樹脂から解裂し同時に全側鎖保護器を除去した。遊離の樹脂を濾去した後濾液にエーテルを加えペプチドを固化した。固形物を濾取乾燥後3M酢酸で抽出・凍結乾燥して粗製ペプチドを得た。粗製ペプチドは、Mightysil RP-18 カラム(2x25cm) を用、0.01N

HCl/CH<sub>3</sub>CN 系溶出溶媒による逆相 HPLC で高純度に精製した。

合成した 10 種類のペプチドの CTL 誘導活性は以下の方法で検討した。

インフォームドコンセントに基づき採血した HLA-A24 陽性健常人の末梢血より採取した単核球を 6 穴プレートに添加し 37°C で 90 分静置後、未接着細胞はリンパ球として回収し凍結保存した。接着した単球は 3 日目に GM-CFS/IL4 (2 μg/mL) を最終濃度 40ng/mL で加え、5 日目には GM-CFS/IL4 (2 μg/mL) と TNF-α (1 μg/mL) をそれぞれ最終濃度 40ng/mL、10ng/mL で添加し合計 7 日間培養して樹状細胞 (DC) へと分化誘導した。得られた DC は cell dissociation buffer を用いてプレートから剥離し、50mL のチューブに移して遠心分離した。沈査を 1% HSA-PBS で 1 回洗浄後同一 buffer に懸濁した。100 μg/mL に調整した各ペプチドおよび対照として用いた CMVpp65 (150 μg/mL) の 1% HSA-PBS 溶液 100 μL をアシストチューブに分注後、各チューブに 10 μL の β2 ミクログロブリン/1% HSA-PBS および先に調整した DC 懸濁液 100 μL を添加した。X 線照射後 37°C で 2 時間インキュベート後遠心分離してペプチドで刺激された DC を回収し、5% HSA, pyr, 2-ME, PS を含む RPMI 培地に再懸濁した。先に凍結保存したリンパ球を DC : リンパ球 = 1 : 50 細胞数となるように加え IL-7 (10ng/mL) 存在下 37°C で 7 日間培養 (培養中 2 日目と 5 日目には IL-2 (3ng/mL) を添加) し CTL を誘導した。誘導された CTL 活性は標的細胞であるヒト B リンパ腫細胞 TISI と 37°C 24 時間共培養して培養液に放出される IFN-γ 量を ELISA で測定することにより検討した。

(倫理面への配慮)

健常人からの末梢血の採取においてはインフォームド・コンセントを得た。

### C. 研究結果

10 種類の合成 CEA-関連ペプチドは、逆相 HPLC による純度検定、酸分解物のアミノ酸分析および FAB 質量分析により高純度単一物質であることを証明した。

4 人の HLA-A24 陽性健常人の末梢血由来の

DC を各合成ペプチドで刺激し、誘導される CTL 活性を標的細胞である TISI から放出される IFN-γ 量を指標として検討した結果、2 例に於いて HLA-A24 結合親和性モチーフ 4 位にランクされる CEA (101-109) が有意に高い CTL 誘導活性を示し、その内 1 例では比較に用いた CMVpp 65 に比し約 2 倍高値の CTL 誘導活性を示した。また、ランク 9 位の CEA (276-284) にも 2 例に於いて有意な CTL 誘導活性が認められた。

### D. 考察

CEA 蛋白中の HLA A-24 拘束性 CTL 誘導活性を有するエピトープ配列を同定する目的で、BMA 解析により HLA A-24 に高親和性が推定された 10 種類の CEA 関連ペプチドを化学合成し、その CTL 誘導活性を樹上細胞を用いて検討した。その結果 BMA 解析により 4 位にランクされた CEA (101-109) 配列ペプチドが、有意に高い CTL 誘導活性を示し、その CTL 誘導能は比較に用いた CMVpp65 の約 2 倍と強力なものであった。従来 CEA においては、BMA ランク 2 位の CEA (652-660) が強い CTL 誘導活性を示すことが報告されているが、本研究により CEA (101-109) が HLA A-24 拘束性で、強く CTL を誘導することが可能な新しい CEA のがん抗原エピトープであることを明らかにした。

### E. 結論

本研究では、CEA 蛋白の全配列について日本人の 90% 以上に見られる HLA-A24 に親和性が高く、かつ CTL 誘導エピトープと成り得る配列を BMA により推定し、スコアが上位 10 位にランクされる 9 アミノ酸残基からなる 10 種類のペプチドを化学合成し、逆相 HPLC により高純度に精製後その CTL 誘導活性を樹上細胞を用いて検討した。その結果、CEA (101-109) が HLA-A24 拘束性で強く CTL を誘導するエピトープであることを始めて見出した。

### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiyama Y, Maruyama K, Nara N, Mochizuki T, Yamamoto A, Yamazaki N, Kawashima I, Nukaya I, Takesako K, Yamaguchi K. Cytotoxic T cell induction against human malignant melanoma cells using HLA-A24-restricted melanoma peptide cocktail. *Anticancer Res.* 2004 (in press).

2. Matuda K, Kawaura H, Onoue S, Kashimoto K, Uchiyama M, Mochizuki T, Kikuyama S. Regional concentration and chromatographic characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the brain of the bullfrog, *Rana Catesbeiana*. *Zoological Science.* 2003, 20: 1003-1009.

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）  
分担研究報告書

ミリガウス低周波交流磁界による免疫応答誘導のための新技術開発の基礎的検討

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

癌治療に応用出来る全く新しい簡便かつ安価で安全な、宿主の腫瘍に対する抵抗性、免疫を増強するための新技術開発に前年度に着手し、研究を進めてきた。前年度に、ミリガウス低周波交流磁界（mG-ULF）を印加したリン酸緩衝液（PBS）がヒト好中球の貪食能を著しく亢進するほか、NK 活性を促進することを見出し報告したが、今年度は大型の mG-ULF 発生装置（ヘルムホルツコイル直径 1.6m 幅 80cm）を製作し、その植物、動物、そして人への効果を検討した。その結果、例えば、10mG、7Hz 磁界内で生育した和金は、コントロールに比し、17 週の時点で磁界無しのグループの約 1.8 倍の平均体重に達していた。また、鉢植えミニトマトを育てたところ、コントロールに比し1期目 20%、2期目 30%の増、3期目の収穫は倍増していた。同磁界内に共同研究者が 10 分間入ったところ、6 名中 5 名で磁界浴後には血流アドミタンス（=流量/血圧・脈拍数）が向上した。

以上、mG-ULF は明らかに、植物、動物、そして人の生体の活力に対して、様々な効果を有していることが判明した。まだ直接的に、担がん生体の抗腫瘍免疫の増強効果を見出すには至っていないが、一連の実験で、磁界印加の条件も明らかにされ、大型の mG-ULF が完成したことにより、今後医療への応用実験への途が拓かれた。また、今年度は精密な実験を繰り返し、磁界の水分子への影響を説明するサイクロトロン周波数共振による、水分クラスター安定化・自己組織化モデル（磁気プロトニクス）を提唱した。

A. 研究目的

これまでに非常に多くの研究がなされ、臨床にも一部応用されているがデータがまちまちで、結論が出ていない磁界の生体免疫への影響に着目し、系統的に研究を行う。

本研究の目的は、癌治療に応用できる全く新しい簡便かつ安価で安全な、癌に対する免疫応答誘導、免疫増強するための、非侵襲の新技術として、微弱交流磁界の医療応用への道を拓くことである。

B. 研究方法

ミリガウス低周波交流磁界（mG-ULF）の生体への影響を調べるため、人が中に入れるサイズの直径 1.6m、高さ 80cm のヘルムホルツコイルを製作した。10mG、6～、7Hz の磁界を発生させて、植物、動物の成育状況への影響、並びにヒトの血流への効果を観測した。

i 12 匹の和金稚魚を 2 グループに分けて 6 匹を同上磁界内、定温（22℃）で飼育し、残り 6 匹をコントロールとして磁界外で育てた。各金魚の体重を毎週測定した。

ii 鉢植えミニトマト 4 鉢を 2 つに分けて、同上磁界内外において育て、1 期-3 期の収穫量を測定した。

iii 成人男性の血流に及ぼす効果を見るため、共同研究者が自ら被験者となり、磁界浴前後の血圧、血流を測定した。

モデル実験として mG-ULF を超純水に印加し、電気抵抗の低下現象を精密に検討し、最もよい条件を明らかにして、水分子の状態に関する物理化学仮説を打ち立てる。

（倫理面への配慮）

mG-ULF を生体に印加するが、その振幅は地磁気の 50～100 分の 1 であり、周波数は 40Hz 以下で、生体内での渦電流の誘導もない。これは、自然の磁気変動レベルであり、人体への危険性はない。我々研究者が自らの意志で実験台になる以外のヒトへの曝露はない。

C. 研究結果

・ミリガウス低周波交流磁界の生体への影響  
i 当初 1g 程度であった和金の重量は経時的に増加して、10 週後には磁界群、コントロール群ともに約 5g に成長した。しかしながら、12 週を境に、10mG、7Hz 磁界群の金魚の重量増加が著明となり、17 週の時点で前者 8g に比し後者は 15g と、約 1.8 倍の平均体重に達した。

ii ミニトマトの育成実験では、mG-ULF 中で育

てた場合、I期収穫量64.4g vs 56.2g, II期33.7g vs 23.5g, III期24.0g vs 10.1gと磁界内で育ったトマトの収穫量が有意に勝っていた。

iii 食後30分以上経った状態で10分間横臥安静し、磁界印加60分前、30分前、15分前、10分間10mG、6Hzの磁界浴後15分、30分、60分の6点で血圧(最高血圧、最低血圧、脈拍数)、血流(脈拍、平均血流量、流体、血管径)を3回ずつ測定、平均し、被験者の血流アドミタンス(=流量/血圧・脈拍数)を計算したところ、6名中5名で磁界浴後、有意に向上していた。

・ミリガウス低周波交流磁界による超純水の電気抵抗低下の物理化学  
磁界印加した超純水の経時的電気抵抗の低下、NMRスペクトルにおける半値幅拡大等のデータから、地磁気下サイクロトロン共振による水分子クラスターの自己組織化長距離プロトントランスポートモデルを提唱し、磁気プロトニクスという全く新しい生命工学分野を切り拓いた。

#### D. 考察

今年度の研究により、ミリガウス低周波交流磁界の生体へのポジティブな効果は明らかであり、医療のみならず、農学、水産学への応用の可能性が示された。今回製作された大型ヘルムホルツコイルにより、ヒトでの実験が可能なが示され、予備的ではあるが、血流促進効果があることが示唆された。小型デバイスと共に今後、褥創治癒促進、脳卒中後リハビリ促進等の臨床試験を計画する基礎データが得られた。また、超純水を用いた精密な実験を基に微弱磁気印加水分子の状態について、独創的なモデルを提唱した。このモデルは、磁気プロトニクスという新しい研究分野を拓くものである。

#### E. 結論

前年度明らかにした、mG-ULFを印加したPBSがヒト白血球の貧食能を亢進し、NK活性を高めること、そして、今回は植物、動物の成長促進効果が実証され、ヒトにおいては血行が促進されることが示唆され、磁気プロトニクスのバイオ/医療への応用の手掛かりが作られた。今後さらに、研究を進める価値があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

ミリガウス低周波交流磁界に長時間曝露された場合に生態に影響を受けることは確実である。医学的な効果については、今後の研究を待たねばならない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mohri K, Fukushima M. Milli-Gauss magnetic field triggering reliable self organization of water with long range ordered proton transport through cyclotron resonance. IEEE Trans Mag. 36. 3328-3330. 2003.

2. Hosoe S, Komuta K, Shibata K, Harada H, Iwamoto Y, Ohsaki Y, Morioka Y, Origasa H, Fukushima M, Furuse K, Kawahara M. Gemcitabine and vinorelbine followed by docetaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer: a multi-international phase II trial of non-platinum sequential triplet combination chemotherapy (JMTO LC00-02). Br J Cancer. 88. 342-347. 2003.

3. Nishiyama H, Habuchi T, Watanabe J, Teramukai S, Tada H, Ono Y, Oshima S, Fujimoto K, Hirano Y, Fukushima M, Ogawa O. Clinical outcomes for locally advanced bladder cancer in Japan: A survey including 1131 patients treated during 1990-2000. Eur Urol. 45(2), 176-81. 2004.

##### 2. 学会発表

毛利佳年雄, 片岡卓治, 福島雅典. mG, U-VLF 磁気・水分子プロトニクスと環境・生物活性化, 浜松ホトニクス分光ワークショップ予稿, pp.1, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)

##### 1. 特許取得

1. 平成15年1月15日「水分子および生命の活性化磁界発生方法及び装置」, 毛利佳年雄, 福島雅典, 科学技術振興事業団, 日本, 特願2003-011759.

2. 平成15年10月14日「水分子の自己組織化方法及び装置」, 毛利佳年雄, 福島雅典, 科学技術振興事業団, 日本, 特願2003-353610.

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

(本研究は、名古屋大学大学院工学研究科教授毛利佳年雄、浜松ホトニクス株式会社 片岡卓治との共同研究である。)

平成15年度研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maruyama K, Akiyama Y, Yamaguchi K. et al.	Structure and characterization of hamster IL-12 p35 and p40	Mol. Immunol	40	319-326	2003
Hideyuki I, Wakasugi H. et al.	Determining the Levels of Matrix Metalloproteinase -9 in Portal and Peripheral Blood is Useful for Liver Metastasis of Colorectal Cancer.	Jpn J Clin Oncol.	33	186-191	2003
Hiroyoshi N Wakasugi H. et al.	CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses.	Proc Natl Acad Sci US	100	10902-10906	2003
Rumiko Asada -Mikami, Wakasugi H. et al.	Increased expansion of V $\alpha$ 24+ T cells derived from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells as compared to peripheral blood mononuclear cells following $\alpha$ -galactosylceramide stimulation.	Cancer Science	94	383-388	2003
Mitsuzi Y, Wakasugi H. et al.	Involvement of PKC beta II in Anti-Proliferating Action of a New Antitumor Compound Gnidimacrin.	Int. J. Cancer	105	601-606	2003
Kunihisa N, Wakasugi H. et al.	Anti-thymocyte globulin affects the occurrence of acute and chronic graft-versus-host disease after a reduced-intensity conditioning regimen by modulating mixed chimerism induction and immune reconstitution.	Transplantation	75	2135-2143	2003
Hiroyoshi N, Wakasugi H. et al.	CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. Immune reconstitution following reduced intensity transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte: globulin serial comparison with conventional myeloablative transplantation.	Bone Marrow Transplantation.	32	601-608	2003
M. Koga, A. Yamada, et al.	Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor-rejection antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL.	Tissue Antigens	61	136-145	2003
A. Yamada, et al.	Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.	Cancer Res.	63	2829-2835	2003

N. Kawamoto, <u>A. Yamada</u> , et al.	IgG reactive to CTL-directed epitope peptides is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients.	Tissue Antigens	61	352-361	2003
M. Noguchi, <u>A. Yamada</u> et al.	Induction fo cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination.	Prostate	57	80-92	2003
S. Tanaka, <u>A. Yamada</u> ,et al.	Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancers based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the periphery.	J. Immunother	26	357-366	2003
T. Mine, <u>A. Yamada</u> ,et al.	Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients.	Cancer Sci	94	548-556	2003
S. Ohkouchi, <u>A. Yamada</u> , et al.	Identification of cytotoxic T lymphocyte-directed epitope encoded by an intron of putative tumor suppresser gene Testin of the common fragile site 7G region at 7q31.2: Peptide vaccine candidate for HLA-B52 <sup>+</sup> and -62 <sup>+</sup> cancer patients.	Eur. J. Immunol.	33	2964-2973	2003
Y. Sato, <u>A. Yamada</u> ,et al.	Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide.	Cancer Sci.	94	802-808	2003
N. Tsuda, <u>A. Yamada</u> ,et al.	Vaccination with pre-designated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers.	J. Immunother.	27	60-67	2004
W. Kumamaru, <u>A. Yamada</u> ,et al.	T cell receptor V $\beta$ gene usage by T cells reactive with the tumor rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma.	In. J. Cancer	108	686-695	2004
Wang, L., <u>Shiku</u> , <u>H.</u> et al.	Essential roles of tumor-derived helper T cell epitopes for an effective peptide-based vaccine.	Cancer Immun	3	16	2003
<u>Shiku</u> , H.	Importance of CD4 <sup>+</sup> helper T-cells in antitumor immunity.	Int. J. Hematol	77	435-438	2003
Ishihara, M., <u>Shiku</u> , H. et al.	Elimination of CD4 <sup>+</sup> T cells may overcome suppression of anti-HER2 immune responses in tumor-bearing hosts.	Int. J. Oncol.	22	1135-1139	2003
Kobayashi, T., <u>Shiku</u> , H. et al.	Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5 <sup>+</sup> and CD5 <sup>-</sup> diffuse large B-Cell lymphomas.	Cancer Res.	63	60-66	2003



Suguro-Katayama, M., <u>Shiku, H.</u> et al.	Heterogeneous copy numbers of API2-MALT1 chimeric transcripts in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma.	Leukemia	17	2508-2512	2003
Iwamura, K., <u>Shiku, H.</u> , et al.	The blood group P1 synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. A clue to the solution of the P1/P2/p puzzle.	J. Biol.Chem	278	44429-44438	2003
Matsuoka K, <u>Oka M.</u> et al.	Effects of Moderate Hypothermia on Proinflammatory Cytokines Production in Rat Model of Caerulein-Induced Pancreatitis.	Pancreas	26(1)	E12-E17	2003
Iizuka N, <u>Oka M.</u> , et al.	Use of oligonucleotide microarray as a novel approach for prediction of early intrahepatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection.	Lancet.	361	923-929	2003
Iizuka N, <u>Oka M.</u> et al.	Nm23-H2 protein expression and telomerase activity in hepatocellular carcinoma.	Anticancer Res.	23	43-47	2003
Iizuka N, <u>Oka M.</u> , et al.	Differential Gene Expression in Distinct Virologic Types of Hepatocellular Carcinoma: Association with Liver Cirrhosis.	Oncogene	22	3007-3014	2003
Arai H, <u>Oka M.</u> , et al.	Detection of amplified oncogenes by genome DNA microarrays in human primary esophageal squamous cell carcinoma: comparison with conventional comparative genomic hybridization analysis.	Cancer Genet Cytogenet	146	16-21	2003
Iizuka N, <u>Oka M.</u> , et al.	Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray.	Int J Cancer	107	666-672	2003
Ueno T, <u>Oka M.</u> , et al.	Prediction of Nodal Metastasis by Comparative Genomic Hybridization in Biopsy Specimens from Patients with Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	Clin Cancer Res	9	5137-5141	2003
Okada T, <u>Oka M.</u> , et al.	Gene expression profile linked to p53 status in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	FEBS Lett	555:	583-90	2003
Takashima M, <u>Oka M.</u> , et al.	Identification of the heat shock protein 70 family as biomarkers against hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by proteomic profiling.	Proteomics	3	2487-2493	2003

Hinoda Y, <u>Oka M</u> , et al.	Increased expression of MUC1 in advanced pancreatic cancer.	J Gastroenterol	38	1162-1166	2003
Iizuka N, <u>Oka M</u> , et al.	Molecular signature in three types of hepatocellular carcinoma with different viral origin by oligonucleotide microarray.	Int J Oncol	24	565-574	2004