

厚生労働科学研究研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

癌治療ペプチドワクチン及びペプチド抗体開発：遺伝子同定から臨床試験まで
に関する研究

平成14年度～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 伊東 恭悟

平成17年（2005）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

癌治療ペプチドワクチン及びペプチド抗体開発：

遺伝子同定から臨床試験までに関する研究 1-14

伊東恭悟

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 15-17

III. 研究成果の刊行物・別刷

癌治療ペプチドワクチン及びペプチド抗体開発:遺伝子同定から臨床試験まで
に関する研究

主任研究者 伊東 恭悟 久留米大学医学部教授

研究要旨: (目的) 遺伝子同定から臨床試験実施までの一連の探索的臨床研究を通じて、上皮性癌に対する治療用ペプチドワクチン及びペプチド抗体を開発する。前立腺癌と脳腫瘍に対するペプチドワクチン臨床成績が予想以上に良好なため、最終年度は改めて共同研究者の2名(植村天受・奈良医科大学/山中龍也・新潟大学脳研究所)に加入してもらい、更なる進展を計画した。(結果) 3年間の研究期間内に初期の研究目的の多くを達成できた。即ち基礎研究では目的としたHLA-クラスI A及びBアレルに拘束される拒絶抗原遺伝子を新規に50以上、ペプチドでは100以上同定した。更にHLA-A3スーパーファミリーに拘束されるペプチドを複数同定し、その結果HLA型の差異にかかわらず癌症例全例へのペプチドワクチンの提供を可能とした。一方、臨床研究では目的としたHLA-A24及びA2癌ペプチドワクチン第I相及び早期第II相臨床試験を終了させ、前立腺癌と脳腫瘍においては企業主導型の医薬品化を可能としたために大学発ベンチャー「グリーンペプタイド社」を設立して医薬品承認を目的としての治験申請を開始した。またテラーメイド癌ペプチドワクチンの有効性を立証する前向き試験を実施し、治療目的のワクチンとしてテラーメイド癌ペプチドワクチンが優れていることを明らかとした。更に「臨床→基礎研究」では、これまで免疫療法はその臨床効果を反映するマーカーが皆無の状態であったが、我々はテラーメイド癌ペプチドワクチンによる臨床効果と抗ペプチド抗体(IgG)が相関する事を見出した。この発見は今後の免疫療法の進展に寄与するものと思われる。またこれまで有効性が得られなかった腫瘍形成型の癌種に対してのペプチドワクチン有効性をマウスモデルにて解析して新アジュバントとペプチド局所投与を併用する事により著明な抗腫瘍効果が得られた。今後の課題として腫瘍形成型の癌種に対してのペプチドワクチン開発が上げられる。

■ 分担研究者

植村 天受	近畿大学医学部教授
岡 正朗	山口大学医学部教授
嘉村 敏治	久留米大学医学部教授
七條 茂樹	久留米大学医学部助教授
藤堂 省	北海道大学医学部教授
野口 正典	久留米大学医学部助教授
山名 秀明	久留米大学医学部教授
山中 龍也	新潟大学脳研究所講師

A. 研究目的

遺伝子同定から臨床試験実施までの一連の探索的臨床研究を通じて、上皮性癌に対する治療用ペプチドワクチン及びペプチド抗体を開発する。基礎研究ではHLA-クラスI A及びBアレルに拘束される拒絶抗原遺伝子を新規に50以上、ペプチドでは100以上同定し、さらに抗ペプチド抗体の抗腫瘍性の分子機構解明や単クローン抗体による癌治療動物モデルなどを通して上皮性癌拒絶の分子基盤の全体像を明らかにする。抗ペプチド抗体の前臨床試験を開始する。一方、臨床研究では本研究期間内にHLA-A24及びA2癌ペプチドワクチン第I相及び早期第II相臨床

試験を終了させ、企業主導型の医薬品化を目指した臨床試験へ移行させる。この場合、再燃前立腺癌と脳腫瘍を優先させる。

B. 研究方法

基礎研究(伊東、七條研究者):①HLA-クラスI Aアレル(A24, A2, A26, A3スーパーファミリー)拘束性CD8⁺CTL株及びHLA-Bアレル(B46, B52)拘束性CD8⁺CTL株を癌局所浸潤リンパ球より樹立し、それらにより認識される抗原遺伝子とペプチドを同定し癌ペプチドワクチン分子を決定する。これによりペプチドワクチン候補の拡大と充実をはかる。②抗ペプチド抗体(IgG)産生機序や抗腫瘍性での基礎研究、さらにはSART3、Lck、PSMペプチドに対する単クローン抗体をまずマウスにて作製する。また、それらを用いてペプチド抗体の抗腫瘍作用誘導の分子レベル及び動物実験での解析を実施する。

臨床研究:①再燃前立腺癌(野口、植村研究者):1)新規開発ペプチドを追加した早期第II相臨床試験を開始する。②スキルス胃癌および子宮頸癌(藤堂、嘉村研究者):1)早期第II相臨床試験を実施する。④大腸癌(藤堂、山名研究者):第I相/早期第

II相臨床試験を実施する。⑤肺癌および肝臓癌(山名研究者):1)第I相臨床試験を実施する。⑥膀胱癌(岡研究者):1)第I相/早期第II相臨床試験を実施する。⑦脳腫瘍(山中研究者):1)第I相/早期第II相臨床試験を実施する。

(倫理面への配慮)

1) 本研究は「ヒトのクローンに関する研究等」に該当するおそれは全くないと判断される。2) in vitro にて癌特異的キラーT細胞を誘導することを目的として採血する場合は、本研究分担者ら及び他の研究協力医が直接患者に充分時間をとってその目的を説明し、理解と同意の得られた場合に限り15~30ml採血して研究に供している。3) 臨床試験についての配慮点:①GMPグレードのペプチドを米国NCI外科における臨床試験の基準にのっとり米国MPS社へ依頼して作成し(Nature Med.4:321,1998)無菌試験及びシーケンスを本研究室にて再確認した後、本学内での審査委員会での審査を経て臨床試験を実施する。4) 臨床試験実施においては、本研究の分担者(医師)が専任の臨床研究看護師とともに被験者から文書での自由意志による十分な説明を受けた上での同意(インフォームド・コンセント)を得て常時実施する。さらに、担当医師や看護師を中心として被験者及びその家族の疑問に答え不安に対応するための常時カウンセリングを行う体制を可及的にひいている。

C. 研究結果

3年間の研究期間内に初期の研究目的の多くを達成できた。即ち基礎研究では目的としたHLA-クラスIA及びBアレルに拘束される拒絶抗原遺伝子を新規に50以上、ペプチドでは100以上同定した。一方、臨床研究では目的としたHLA-A24及びA2癌ペプチドワクチン第I相及び早期第II相臨床試験を終了させ、前立腺癌と脳腫瘍においては企業主導型の医薬品化を可能とした。以下に年度別の結果を記載する。平成14年度の基礎研究結果として新規遺伝子を9種類とそれらの遺伝子のコードする新規ペプチド16種類を同定下。更に腫瘍マーカーや癌の標的分子由来ペプチドを同定した(HER2/neuより3ペプチド、CEAより2ペプチド、EGF-Rより3ペプチド、EZH-2より5ペプチド、PSCAより1種類)。14年度臨床試験結果としてテーラーメイド型第I相臨床試験を全て終了した(108症例)して早期第II相臨床試験を7種類の癌種にて開始した(52症例)。その結果テーラーメイド型レジメを採用した再燃前立腺癌にて良好な成績が得られつつある(3ヶ月評価でPR2, SD0, PD8例)。更にPDの8例についてもエストラムスチン併用でPR4例が得られた。また免疫モニタリングにはCTLアッセイよりもペプチド抗体測定が優れていることを明らかにした。15年度の基礎研究結果として新規ペプチド32種類をワクチン候補として同定し、更に多数のHLA

-A26、-A31、-B46及び-B52拘束性遺伝子群とペプチドを同定した。15年度臨床研究結果で特筆すべき事項は、テーラーメイド型レジメを採用した再燃前立腺癌にて良好な成績が得られたことであり、医薬品承認がえられるレベルに到達した。また当該研究テーマには記載されていなかった悪性脳腫瘍においても優れた臨床効果が得られつつある。16年度の基礎研究においても新規の多数の抗原及びペプチドを同定した。例えば大腸癌において抗癌剤抵抗性を付与するTYMS蛋白由来ペプチドがHLA-A2拘束性に大腸癌局所CTLによって認識されている事を見出したHLA-A3スーパーファミリーに拘束されるペプチドを複数同定し、癌ペプチドワクチンの分子基盤を構築した。臨床研究では所期の目的の如く2種類の癌種(前立腺癌と脳腫瘍)において医薬品化可能なレベルの臨床成績が確認できたために大学発ベンチャー「グリーンペプチド社」を設立して医薬品承認を目的としての治験申請を開始した。またテーラーメイド癌ペプチドワクチンの有効性を立証する前向き試験を実施し、治療目的のワクチンとしてテーラーメイド癌ペプチドワクチンが優れていることを明らかとした。更に「臨床→基礎研究」では、これまで免疫療法はその臨床効果を反映するマーカーが皆無の状態であったが、我々はテーラーメイド癌ペプチドワクチンによる臨床効果と抗ペプチド抗体(IgG)が相関する事を見出した。またこれまで有効性が得られなかった腫瘍形成型の癌種に対してのペプチドワクチン有効性をマウスモデルにて解析して新アジュバントとペプチド局所投与を併用する事により著明な抗腫瘍効果が得られた。

D. 考察

3年間の研究期間内に当初の研究目的の50%以上は達成できた。即ち基礎研究では目的としたHLA-クラスIA及びBアレルに拘束される拒絶抗原遺伝子を新規に50以上、ペプチドでは100以上同定した。一方、臨床研究では目的としたHLA-A24及びA2癌ペプチドワクチン第I相及び早期第II相臨床試験を終了させ、前立腺癌と脳腫瘍においては企業主導型の医薬品化を可能とした。しかし、残された課題のひとつはペプチド抗体の基礎及び臨床研究である。SART3-109ペプチドを認識するモノクローン抗体は15年度に樹立済みであったが、通常精製法では精製不可能であったため研究遅延の原因となった。しかし、最近になり、遺伝子レベルの解析を実施して新規のIgGサブクラスである可能性を見出した。また、今後の課題として腫瘍形成型の癌種に対してのペプチドワクチン開発が残された。しかし最近、ペプチドワクチン有効性をマウスモデルにて解析して新奇アジュバントとペプチド局所投与を併用する事によ

り著明な抗腫瘍効果が得られた。以下に年度別の考察を記載する。

14年度考察：目標を上回るペースで新規癌関連抗原やペプチドが同定された。また、臨床研究では再燃前立腺癌において医薬品申請を主目的とする後期第Ⅱ相臨床試験可能なレベルに達したと判断された。**15年度考察：**基礎研究にてA3スーパーファミリーに属するペプチド分子が多数同定されたことにより、従来の成果であるHLA-A24及びA2拘束性ペプチドワクチンでは日本人の75%。また世界では60%前後の癌患者に限定されていたペプチドワクチンがほぼ100%の症例まで適応拡大できる可能性が示された。臨床研究にて治験申請可能な癌種（ホルモン不応性再燃前立腺癌）が特定され、医薬品化の可能性が高まった。また進行性脳腫瘍においても優れた臨床効果が得られ次年度にて確認が必要となった。**16年度考察：**2種類の癌種（前立腺癌と脳腫瘍）において医薬品化可能なレベルの臨床成績が確認できたために大学発ベンチャー「グリーンペプタイド社」を設立して医薬品承認を目的としての治験申請を開始したことが特筆される。一方で腫瘍形成型のリンパ球浸潤困難な消化管癌や乳癌では臨床効果が殆ど得られなかったことは今後の課題として残った。更に子宮頸癌では奏効例は得られているものの、他の抗癌剤治療法に比して有意な生命予後の延長は得られていない。従ってそれらの癌種へ臨床応用可能なペプチドワクチン開発には更なる基礎及び臨床研究の必要性が示唆された。またペプチドワクチン有効性の得られた症例においてもその後増悪する症例が多数確認された。これらは癌細胞の免疫学的エスケープ現象によるものと判断される。文献的には癌細胞の免疫学的逃避（エスケープ現象）として、動物モデルでは癌細胞上のHLA-クラスI抗原や癌関連抗原の喪失が報告されている。しかしヒトにおいての能動的・特異免疫療法におけるエスケープ現象の詳細な解明は報告されていない。更に我々は、スキルス胃癌がペプチドワクチンに高い感受性を示すものの、増悪時にはHLA-クラスI抗原喪失のみならず腫瘍形成型となる事を経験した。これらのエスケープ現象の解明もペプチドワクチン開発には不可欠な研究課題として残された。更に癌細胞は抗癌剤やホルモン治療に対してもエスケープ現象を引き起こす。このような種々の治療法に対して抵抗性が付与された癌細胞は頑健性（ロバストネス）癌細胞と呼称され、進行期の癌細胞の特性である。従って頑健性（ロバストネス）の克服は21世紀の癌治療の重要課題といえる。

E. 結論

基礎研究：①HLA-A24及びA2癌ワクチンペプチドを多数同定し全体で86種類ペプチドにて

臨床試験可能として、臨床研究へ提供した。②HLA-A3スーパーファミリーに拘束されるペプチドを複数同定し、その結果HLA型の差異にかかわらず癌症例全例へのペプチドワクチンの提供を可能とした（HLA多型性は-A24、-A2及び-A3ファミリーでほぼ100%カバー可能）。③HLA-B46、-B52、-B60拘束性遺伝子およびペプチドを同定すると共に、ペプチドに対するCD4陽性ヘルパーT細胞反応を解明した。臨床研究では①前立腺癌と脳腫瘍においてテラーメイドペプチドワクチン臨床試験の成績が医薬品化可能なレベルと確認できた。②一方で腫瘍形成型のためリンパ球浸潤困難な消化管癌や乳癌では臨床効果が殆ど得られなかったことは今後の課題として残った。「臨床→基礎研究」では①テラーメイド癌ペプチドワクチンによる臨床効果と抗ペプチド抗体(IgG)が相関する事を見出した。②これまで有効性が得られなかった腫瘍形成型の癌種に対してのペプチドワクチン有効性をマウスモデルにて解析して新アジュバントとペプチド局所投与を併用する事により著明な抗腫瘍効果が得られた。

F. 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. Azuma K, Shichijo S, Maeda Y, Nakatsura T, Nonaka Y, Fujii T, Koike K and Itoh K, Mutated p53 gene encodes a nonmutated epitope recognized by HLA-B4601-restricted and tumor cell-reactive CTLs at tumor site. *Cancer Res*, 63:854-858, 2003.
2. Koga M, Shichijo S, Yamada A, Ashihara J, Sawamizu H, Kosukawa J and Itoh K, Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens*. 61:136-145,2003.
3. Nonaka Y, Tsuda N, Shichijo S, Ito M, Maeda Y, Harada M, Kamura T, Shigemori M and Itoh K, Recognition of ADP-ribosylation factor 4-like by HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumors. *Tissue Antigens*. 60:319-327,2002.
4. Tsuda N, Nonaka Y, Shichijo S, Yamada A, Ito M, Maeda Y, Harada M, Kamura T and Itoh K, UDP-Gal:βGlcNAc β1, 3-galactosyltransferase, polypeptide 3 (GALT3) is a tumor antigen recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumor. *Br J Cancer*, 87:1006-1012, 2002.

5. Maeda Y, Hida N, Niiya F, Katagiri K, Harada M, Yamana H, Kamura T, Takahashi M, Sato Y, Todo S and Itoh K, Detection of peptide-specific CTL-precursors in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Br J Cancer*, 87:796-804, 2002.
6. Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K and Itoh K, Phase I clinical study of cyclophilin B peptide vaccine for patients with lung cancer. *J Immunother*, 25:439-444, 2002.
7. Maeda Y, Ito M, Harashima N, Nakatsura T, Hida N, Imai N, Sato Y, Shichijo S, Todo S and Itoh K, Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)-derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients. *Int J Cancer*, 99:409-417, 2002.
8. Komatsu N, Shichijo S, Maeda Y and Itoh K, Measurement of interferon- γ by high-throughput fluorometric microvolume assay technology system. *J Immunol methods*, 263:169-176, 2002.
9. Ohkouchi S, Yamada A, Imai N, Mine T, Harada T, Shichijo S, Maeda Y, Saijo Y, Nukiwa T, Itoh K, Non-mutated tumor-rejection antigen peptides elicit type-1 allergy in the majority of healthy individuals. *Tissue Antigens*, 59:259-272, 2002.
10. Nakatsura T, Senju S, Ito M, Nishimura Y and Itoh K, Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol*, 32:826-836, 2002.
11. Sasatomi T, Suefuji Y, Matsunaga K, Yamana H, Miyagi Y, Araki Y, Ogata Y and Itoh K, Shirouzu K, Expression of tumor-rejection antigens in colorectal carcinomas. *Cancer*, 94:1636-1641, 2002.
12. Tanaka K, Harashima N, Niiya F, Miyagi Y, Hida N, Ochi M, Imai N, Harada M, Itoh K and Shichijo S, Serine proteinase inhibitor 9 can be recognized by cytotoxic T lymphocytes of epithelial cancer patients. *Jpn J Cancer Res*, 93:198-208, 2002.
13. Yutani S, Tanaka M, Mastumoto H, Imai N, Sata M, Shichijo S, Harada M and Itoh K, Elevation of serum MAGE-4 protein levels and prediction of hepatocellular carcinogenesis in patients with liver cirrhosis. *Jpn J Cancer Res*, 93:453-458, 2002.
14. Hida N, Maeda Y, Katagiri K, Takasu H, Harada M and Itoh K, A simple culture protocol to detect peptide-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in the circulation. *Cancer Immunol. Immunother*, 51:219-228, 2002.
15. Suzuki N, Tanaka S, Maeda Y, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M and Itoh K, Detection of peptide-specific Cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 98:45-50, 2002.
16. Yamada A, Kawano K, Koga M, Takamori S, Nakagawa M and Itoh K, Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, 63(11): 2829-2835, 2003.
17. Noguchi M, Kobayashi K, Suetsugu N, Tomiyasu K, Suekane S, Yamada A, Itoh K and Noda S. Induction of cellular and humoral immune responses to tumor cells and peptides in HLA-A24 positive hormone-refractory prostate cancer patients by peptide vaccination. *Prostate*, 57(1): 80-92, 2003.
18. Harada M, Kobayashi K, Matsueda S, Nakagawa M, Noguchi M and Itoh K, Prostate-specific antigen-derived epitopes capable of inducing cellular and humoral responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate*, 57(2): 152-159, 2003.
19. Kawamoto N, Yamada A, Ohkouchi S, Maeda T, Tanaka S, Hashimoto T, Saijo Y, Saijo S, Nukiwa T, Shichijo S, Aizawa H, Itoh K, IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigen*, 61(5): 352-361, 2003.
20. Tanaka S, Harada M, Mine T, Noguchi M, Gohara R, Azuma K, Tamura M, Yamada A, Morinaga A, Nishikori M, Katagiri K, Itoh K, Yamana H and Hashimoto T. Peptide vaccination for patients with melanoma and other types of cancer based on pre-existing peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors in the periphery. *J Immunother*. 26(4): 357-366, 2003.

21. Mine T, Gouhara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K and Yamana H. Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients. *Cancer Sci.*, 94(6): 548-556, 2003.
22. Kobayashi K, Noguchi M, Itoh K and Harada M. Identification of a prostate-specific membrane antigen-derived peptide capable of eliciting both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Cancer Sci.*, 94(7): 622-627, 2003.
23. Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, Kawamoto N, Takedatsu H, Shomura H, Sawamizu H, Maeda Y, Ito M and Itoh K. Identification of two novel tumor-associated antigens recognized by HLA-B46-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Mol. Med.*, 12(6): 895-902, 2003.
24. Azuma K, Shichijo S, Takedatsu H, Komatsu N, Sawamizu H and Itoh K. Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. *Br J Cancer*, 89(6): 1079-1085, 2003.
25. Ohkouchi S, Kawamoto N, Koga M, Sakanashi F, Shichijo S, Saijo Y, Nukiwa T, Itoh K and Yamada A. Identification of a CTL-directed epitope encoded by an intron of the putative tumor suppressor gene Testin of the common fragile site 7G region: a peptide vaccine candidate for HLA-B52+ and HLA-62+ cancer patients. *Eur J Immunol.*, 33(11): 2964-2973, 2003.
26. Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y, Kondo M, Takahashi S, Shinohara T, Katagiri K, Sato M, Okada S, Matsui K, Yamada A, Yamana H, Itoh K and Todo S. Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide. *Cancer Sci.*, 94(9): 802-808, 2003.
27. Harada M, Noguchi M, Itoh K. Target molecules in specific immunotherapy against prostate cancer. *Int J Clin Oncol.*, 8(4):193-199 (review), 2003.
28. Takedatsu H., Shichijo S., Azuma K., Takedatsu H., Sata M., Itoh K.: Detection of a set of peptide vaccine candidates for use in HLA-A31+ epithelial cancer patients. *Int. J. Oncol.* 24, 337-347, 2004.
29. Noguchi M., Itoh K., Suekane S., Yao A., Suetsugu N., Katagiri K., Yamada A., Yamana H., Noda S.: Phase I trial of patient-oriented vaccination in HLA-A2-positive patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Sci.* 95, 77-84, 2004.
30. Harada M., Gohara R., Matsueda S., Muto A., Oda T., Iwamoto Y., Itoh K.: In vivo evidence that peptide vaccination can induce HLA-DR-restricted CD4+ T cells reactive to a class I tumor peptide. *J Immunol.* 172, 2659-2667, 2004.
31. Tsuda N., Mochizuki K., Harada M., Sukehiro A., Kawano K., Yamada A., Ushijima K., Sugiyama T., Nishida T., Yamana H., Itoh K., Kamura T.: Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J. Immunother.* 27, 60-72, 2004.
32. Mine T., Sato, Y., Noguchi M., Sasatomi T., Gohara R., Tsuda N., Tanaka S., Shomura H., Katagiri K., Rikimaru T., Shichijo S., Kamura T., Hashimoto T., Shirouzu K., Yamada A., Todo S., Itoh K., Yamana H.: Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin. Cancer Res.* 10, 929-937, 2004.
33. Ishihara Y., Harada M., Azuma K., Tamura M., Shomura H., Fujii T., Itoh K., Shichijo S.: HER2/neu-derived peptides recognized by both cellular and humoral immune systems in HLA-A2+ cancer patients *Int. J. Oncol.* 24, 967-975, 2004.
34. Takedatsu H., Shichijo S., Katagiri K., Sawamizu H., Sata M., Itoh K.: Identification of peptide vaccine candidates sharing among HLA-A3+, -A11+, -A31+, and -A33+ cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 1112-1120, 2004
35. Koga M., Komatsu N., Kawamoto N., Shichijo S., Itoh K., Yamada A.: Analysis of cellular localization of SART3 tumor antigen by a newly established monoclonal antibody: Heterotopic expression of SART3 on the surface of B-lineage leukemic cells. *Oncol. Rep.*, 11, 785-789, 2004.
36. Kumamaru W., Nakamura S., Kadena T., Yamada A., Kawamura E., Sasaki M., Ohyama Y., Toyoshima T., Hayashida J., Itoh K., Shirasuna K.: T-cell receptor $\nu\beta$

- gene usage by T cells reactive with the tumor-rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 108, 686-695, 2004.
37. Noguchi M., Noda S., Yoshida M., Ueda S., Shiraishi T., Itoh K., The Kurume-Kumamoto Estracytstudy Group: Chemohormonal therapy as primary treatment for metastatic prostate cancer: A randomized study of estramustine phosphate plus luteinizing hormone-releasing hormone agonist versus flutamide plus luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Int. J Urol.* 11, 103-109, 2004.
38. Matsueda S., Kobayashi K., Nonaka Y., Noguchi M., Itoh K., Harada M.: Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2+ patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 53, 479-489, 2004.
39. Sato Y., Maeda Y., Shomura H., Sasatomi T., Takahashi M., Une Y., Kondo M., Shinohara T., Hida N., Katagiri K., Sato K., Sato M., Yamada A., Yamana H., Harada M., Itoh K., Todo S.: A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 90, 1334-1342, 2004.
40. Shomura H., Shichijo S., Matsueda S., Kawakami T., Sato Y., Todo S., and Itoh K. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides immunogenic for HLA-A2+ cancer patients. *Br. J. Cancer* 90, 1563-1571, 2004
41. Noguchi M., Itoh K., Suekane, S., Morinaga A., Sukehiro A., Suetsugu N., Katagiri K., Yamada A., Noda S. Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramustine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 60,32-45, 2004.
42. Takao Y., Yamada A., Yutani S., Sata M., Itoh K. Antibody reactive to a hepatitis C virus (HCV)-derived peptide capable of including HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes is detectable in the majority of HCV-infected individuals without HLA-A2 restriction. *Microbiol. Immunol.* 48, 507-517, 2004
43. Matsueda S., Yao A., Ishihara Y., Ogata R., Noguchi M., Itoh K., and Harada M. A prostate stem cell antigen-derived peptide immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate*, 60, 205-213, 2004
44. Azuma K., Shichijo, S., Shomura H., Matsueda S., Fujii T., Itoh K.: Identification of HER2/neu-derived peptides capable of inducing both cellular and humoral immune responses in HLA-A24 positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 86, 19-29, 2004
45. Harada M., Matsueda S., Yao A., Ogata R., Noguchi M., Itoh K.: Prostate-related antigen-derived new peptides having the capacity of inducing prostate cancer-reactive CTLs in HLA-A2+ prostate cancer patients. *Oncology Reports* 12, 601-607, 2004.
46. Yao A., Harada M., Matsueda S., Ishihara Y., Shomura H., Noguchi M., Matsuoka K., Hara I., Kamidono S., Itoh K.: Identification of parathyroid hormone-related protein-derived peptides immunogenic in human histocompatibility leukocyte antigen-A24+ prostate cancer patients. *Br J Cancer* 91, 287-296, 2004.
47. Sasada T., Takedatsu H., Azuma K., Koga M., Maeda Y., Shichijo S., Shomura H., Hirai T., Takabayashi A., Itoh K.: Immediate early response gene X-1, a stress-inducible antiapoptotic gene, encodes cytotoxic T-lymphocyte(CTL) epitopes capable of inducing human leukocyte antigen-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in gastric cancer patients. *Cancer Res* 64, 2882-2888, 2004
48. Mochizuki K., Sato Y., Tsuda N., Shomura H., Sakamoto M., Matsuura K., Ushijima K., Maeda Y., Katagiri K., Yamada A., Todo S., Kamura T., Harada M., Itoh K.: Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol* 25, 121-131, 2004.
49. Shomura H., Shichijo S., Komatsu N., Matsueda S., Mine T., Rikimaru T., Sato Y., Todo S., Itoh K.: Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognized by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 40, 1776-1786, 2004.
50. Takedatsu H., Okamura T., Yoshimoto K., Harada M., Koga M., Shichijo S., Sata M., Itoh K.: Expression of

epithelial cancer-related antigens in hematologic malignancies applicable for peptide-based immunotherapy. *J Immunother* 27, 289-297, 2004.

51. Ogata R., Matsueda S., Yao A., Noguchi M., Itoh K., Harada M.: Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2(EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate* 60, 273-281, 2004.
52. Shichijo S., Azuma K., Komatsu N., Ito M., Maeda Y., Ishihara Y., Itoh K.: Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2+ colon cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5828-5836, 2004.
53. Bednarczuk T., Hiromatsu Y., Seki N., Ploski R., Fukutani T., Kurylowicz A., Jazdzewski K., Chojnowski K., Itoh K., Nauman J: Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Human Immunology* 65, 632-639, 2004.
54. Azuma K., Sasada T., Takedatsu H., Shomura H., Koga M., Maeda Y., Yao A., Hirai T., Takabayashi A., Shichijo S., and Itoh K. *Ran*, a small GTPase gene, encodes Cytotoxic T Lymphocyte(CTL) epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 6695-6702, 2004
55. Fukuda K., Takao Y., Miyazaki Y., Itoh K., Yamada A.: New type of natural antibodies reactive to cytotoxic T lymphocyte-directed cancer vaccine peptides. *Immunobiology*. 209, 245-253, 2004.
56. Noguchi M., Itoh K., Yao A., Mine T., Yamada A., Obata Y., Furuta M., Harada M., Suekane S., Matsuoka K.: Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients. *Prostate* (in press), 2004.
57. Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, and Itoh K. :New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. *Scand J Clin Lab Invest*, 64, 535-546, 2004.
58. Harada M, Matsueda S, Yao A, Noguchi M, and Itoh K. Vaccination of cytotoxic T lymphocyte-directed peptides elicited and spread humoral and Th1-type immune responses to prostate-specific antigen protein in a prostate cancer patient. *Journal of Immunotherapy* (in press), 2004.
59. Shichijo S, Ishihara Y, Azuma K, Komatsu N, Higashimoto N, Ito M, Nakamura T, Ueno T, Harada M, and Itoh K. ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncology Reports* (in press), 2004.
60. Shichijo S., Keicho N., Long H.T., Quy T., Phi N.C., Ha L.D., Ban V.V., Itoyama S., Hu C.-J., Komatsu N., Kirikae T., Kirikae F., Shirasawa S., Kaji M., Fukuda T., Sata M., Kuratsuji T., Itoh K., Sasazuki T. Assessment of synthetic peptides of severe acute respiratory syndrome coronavirus recognized by long-lasting immunity. *Tissue Antigens* , 64, 600-607, 2004.
61. Yamada A., Yamana H., and Itoh K. : Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy. *Current Topics in Peptide & Protein Research* Vol.6.71-80, 2004.
62. Shichijo S., Ito M., Azuma K., Komatsu N., Maeda Y., Ishihara Y., Nakamura T., Harada M., and Itoh K. : A unique gene having homology with the kinesin family member 18A encodes a tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2⁺ colon cancer patients. *Eur. J. Cancer.* (in press), 2005.
63. Yao A., Harada M., Matsueda S., Ishihara Y., Shomura H., Takao Y., Noguchi M., Matsuoka K., Hara Isao., Kamidono S., and Itoh K. : New epitope peptides derived from parathyroid hormone-related protein which have the capacity to induce prostate cancer-reactive Cytotoxic T Lymphocytes in HLA-A2⁺ Prostate Cancer Patients. *The Prostate.* 62,233-242, 2005.

1-2. 論文発表 (和文査読誌掲載論文)

1. 末次典恵, 田村真由美, 久富瑞穂, 野口正典, 伊東恭悟:再燃前立腺癌患者に対する癌ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験におけるリサーチナースの役割. *日本がん看護学会誌*, 2002;16(2): 79-88.

2. 助廣亜希、津田尚武、望月一生、田村真由美、雲井加代子、伊東恭悟:癌ペプチドワクチン臨床試験を受ける再発婦人科がん患者の看護。日本がん看護学会誌, 17:43-54, 2003.

3. 田村真由美、伊東恭悟:臨床試験リサーチナーズの役割-臨床研究の立場から-。日本看護学会誌, 17:47-51, 2003.

4. 古田雅俊、由谷茂、峯孝志、伊東恭悟:医師主導型臨床試験における電子カルテ導入に向けての検討。医療とIT 2004/2

5. 末次典恵、田村真由美、野口正典、助廣亜希、伊東恭悟:癌ペプチドワクチン療法中の再燃前立腺癌患者のQOLについて。九大医保健紀要 2004, vol 4, 47-56.

1-3. 論文発表 (総説・プロシーディング・その他)

1. 峯孝志、伊東恭悟、山名秀明、白水雄:テラーメイドがん免疫治療:ゲノムからベッドへの先導役。外科, 南江堂, 2002;64:269-274.

2. 野口正典、平林康男、野田進士、山名秀明、末次典恵、伊東恭悟:再燃前立腺癌における癌ペプチド療法の展望。西日本泌尿器科, 2002;64:253-259.

3. 神田達夫、高橋益廣、海部勉、小杉伸一、中川悟、西巻正、伊東恭悟、島山勝義:高度進行・再発食道癌に対する腫瘍拒絶抗原ペプチドでパルスした樹状細胞による癌ワクチン療法。日本気管食道科学会会報, 2002:53(2):153-154.

4. 伊東恭悟、山名秀明、笹富輝男、峯孝志:テラーメイド癌免疫治療:ゲノムからベッドへの先導役。日本外科学会誌, 2002;103:42.

5. 峯孝志、伊東恭悟、山名秀明:腫瘍ワクチン療法:テラーメイド型ペプチドワクチン 創薬への展開。Surgery Frontier, 10:42-46, 2003.

6. 伊東恭悟:癌治療ペプチドワクチンの現状と展望。第26回日本医学会総会誌, 55, 2003.

7. 伊東恭悟:癌治療ペプチドワクチン開発〜3分子集合による生体反応の医薬への応用〜。Bioベンチャー, 3-4:71-74, 羊土社, 2003.

8. 末金茂高、野口正典、伊東恭悟:免疫療法 化学療法の領域19 増刊号:42-47, 医薬ジャーナル, 2003.

9. 峯孝志、由谷茂、伊東恭悟、山名秀明:患者オリエンテッド癌免疫療法

Medical Science Digest 30, 129-133, 2004

10. 由谷茂、峯孝志、伊東恭悟:癌ペプチドワクチン療法。血液・免疫・腫瘍9, 45-50, 2004

11. 野口正典、伊東恭悟、松岡啓:テラーメイド型ペプチドワクチン -第II相試験から創薬へ-。泌尿器外科 17 (臨増), 475-480, 2004.

12. 峯孝志、伊東恭悟、山名秀明:癌ワクチンを用いた免疫療法。FOCUS on ONCOLOGY No. 1, 20-22, 2004.

13. 上田龍三、伊東恭悟、首藤紘一:免疫療法の立場からのがん分子標的治療 -産学の接点を捜して。がん分子標的治療 2, 6-13, 2004.

14. 前田好章、峯孝志、佐藤裕二、藤堂省、伊東恭悟:腫瘍抗原ペプチド特異的キラーT細胞の簡易検出法。臨床免疫 42(5), 576-579, 2004.

1-4. 論文発表 (著書)

1. 伊東恭悟、片桐和子:免疫療法:初心者も活用できるがん医療・看護〜集学的治療・全人的ケアをめざして〜。南山堂, 16-22, 2002.

2. Akira Yamada, Hideaki Yamana and Kyogo Itoh: Development of peptide-based vaccines for epithelial cancer. Res. Adv. in Cancer 2. 241-247, 2002.

2. 学会発表

2-1. 海外学会発表(口頭・ポスター発表)

Harada M., Itoh K. Peptide-based Anti-cancer Vaccine Against Prostate Cancer. The 7th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, Maryland, USA (2004.3.4)

2-2. 国内学会発表(口頭・ポスター発表)

1. 伊東恭悟:ペプチド特異的T細胞同定に基づくペプチドによる癌特異免疫療法:予防ワクチンから治療ワクチンへ。第50回日本化学療法学会総会, 2002年5月9-11, 神戸

2. 伊東恭悟:テラーメイド癌免疫治療:ゲノムからベッドへの先導役。第102回日本外科学会定期学術集会, 2002年4月12-13, 京都

3. 伊東恭悟、峯孝志、山名秀明、佐藤裕二、藤堂省、岡 正朗:上皮性癌ペプチドワクチンの臨床試験;第一相から第二相へ。第15回バイオセラピー学会学術集会

相から第二相へ。第15回バイオセラピー学会学術集会
総会, 2002年11月7-8, 札幌

4. 佐藤裕二, 正村祐紀, 前田好章, 近藤正男, 高橋
周作, 伊東恭悟, 藤堂省: 臨床の有効例よりみた胃癌、
大腸癌に対するワクチン療法。第15回バイオセラピー学
会学術集会総会, 2002年11月7-8, 札幌

5. 正村祐紀, 佐藤裕二, 前田好章, 近藤正男, 高橋
周作, 矢吹英彦, 山名秀明, 伊東恭悟, 藤堂省:
Precursor-oriented peptideワクチンが有効であった進
行腎細胞癌の1例。第15回バイオセラピー学会学術集
会総会, 2002年11月7-8, 札幌

6. 伊東恭悟: 免疫療法: 過去の教訓と今後の展開。第
40回日本癌治療学会総会, 2002年9月10, 東京

7. 伊東恭悟: 上皮性癌ワクチンの臨床試験: 第一相
から第二相へ。第61回日本癌学会総会, 2002年10月
1-3, 東京

8. 七條茂樹, 東公一, 小松誠和, 伊藤雅昭, 伊東
恭悟: HLA-B46拘束性CTLに認識される癌抗原遺
伝子と抗原ペプチド同定。第61回日本癌学会総会, 2
002年10月1-3, 東京。

9. 古賀真, 七條茂樹, 山田亮, 伊東恭悟: HLA-A26
拘束性癌拒絶抗原としてのribosomal protein S2, L10a
の同定。第61回日本癌学会総会, 2002年10月1-3, 東
京

10. 大河内眞也, 山田亮, 原田守, 七條茂樹, 貫和敏
博, 伊東恭悟: 肺腺癌由来HLA-B52拘束性新抗原拒
絶抗原の同定。第61回日本癌学会総会, 2002年10月
1-3, 東京

11. 竹田津宏子, 東公一, 七條茂樹, 伊東恭悟:
HLA-A31拘束性CTLにより認識される癌拒絶抗原の
同定。第61回日本癌学会総会, 2002年10月1-3, 東京

12. 小林一彦, 原田守, 野口正典, 伊東恭悟:
HLA-A24陽性前立腺癌患者で細胞性・液性免疫を誘
導するPSM由来抗原ペプチドの同定。第61回日本癌
学会総会, 2002年10月1-3, 東京

13. 岩本修, 末藤祐一, 笹富輝男, 山名秀明, 伊東恭
悟: 口腔癌に対するp56^{kk}ペプチドワクチンの基礎研究。
第61回日本癌学会総会, 2002年10月1-3, 東京

14. 望月一生, 津田尚武, 牛嶋公生, 山名秀明, 伊東

恭悟, 嘉村敏治: 再発婦人科癌に対するCTL
precursor-oriented癌ペプチドワクチンの第一相臨床試
験。第61回日本癌学会総会, 2002年10月1-3, 東京

15. 小松誠和, 七條茂樹, 伊東恭悟: Fluorometric
Microvolume Assay Technologyによる細胞性免疫・液
性免疫モニタリング法。第61回日本癌学会総会, 2002
年10月1-3, 東京

16. 山田亮, 峯孝志, 合原るみ, 笹富輝男, 津田尚武,
望月一生, 田中聖子, 野口正典, 原田守, 山名秀明,
伊東恭悟: HLA-A24陽性高度進行癌を対象とした癌ペ
プチドワクチンの第1相臨床試験。第61回日本癌学会
総会, 2002年10月1-3, 東京

17. 原田守, 合原るみ, 伊東恭悟: システインを含む
class I 腫瘍ペプチドの二量体を認識するHLA-DR4拘
束性CD4陽性T細胞。第61回日本癌学会総会, 2002年
10月1-3, 東京

18. 七條茂樹, 東公一, 小松誠和, 伊藤雅昭, 伊東恭
悟: HLA-B46拘束性CTLに認識される癌抗原遺伝子と
抗原ペプチドの同定。第61回日本癌学会総会, 2002年
10月1-3, 東京

19. 東公一, 七條茂樹, 前田好章, 伊東恭悟: 大腸癌
組織浸潤リンパ球由来HLA-B4601拘束性CTL株により
認識される抗原ペプチドをコードする遺伝子の同定。
第61回日本癌学会総会, 2002年10月1-3, 東京

20. 山田亮, 松本知子, 福田久丹恵, 伊東恭悟: ヒト用
がんペプチドのマウスモデルにおける抗腫瘍効果とマ
スト細胞脱顆粒作用。第32回日本免疫学会総会, 2002
年12月4-6, 東京

21. 服部貴子, 小松誠和, 七條茂樹, 伊東恭悟: クレス
チンの白血病細胞に対する傷害性の解析。第32回日
本免疫学会総会, 2002年12月4-6, 東京

22. 福田久丹恵, 山田亮, 伊東恭悟: CTLエピトープと
して同定された非変異型自己抗原ペプチドに反応性を
示す自然抗体のマウスモデルでの解析。第32回日本
免疫学会総会, 2002年12月4-6, 東京

23. 河本直樹, 山田亮, 伊東恭悟: 非変異型自己抗原
ペプチドに対するIgG抗体のアトピー性皮膚炎患者に
おける異常: 第32回日本免疫学会総会, 2002年12月
4-6, 東京

24. 古田雅俊, 田村真由美, 錦織みさ, 末次典恵,

助廣亜希, 森永明子, 伊東恭悟: 大学主導型早期第II相臨床試験におけるリサーチナースの役割. 日本がん看護学会, 2003年2月8-9, 大阪

25. 助廣亜希, 田村真由美, 末次典恵, 森永明子, 古田雅俊, 伊東恭悟: 癌ペプチドワクチン療法の看護上の留意点-再発婦人科癌の第I相臨床試験を通して. 日本がん看護学会, 2003年2月8-9, 大阪

26. 末次典恵, 田村真由美, 助廣亜希, 森永明子, 野口正典, 伊東恭悟: 癌ペプチドワクチン療法を受ける再燃前立腺癌患者の看護~第I相臨床試験を終えて~. 日本がん看護学会, 2003年2月8-9, 大阪

27. 伊東恭悟: 癌治療ペプチドワクチンの現状と展望. 第26回日本医学会総会, 4/5/2003, 福岡.

28. 伊東恭悟: テーラーメイドがんペプチドワクチン; 第II相試験から創薬化へ. 第62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003. 名古屋.

29. 七條茂樹, 竹田津宏子, 伊東恭悟: HLA-A3 super type癌患者に対する癌ワクチン候補ペプチドの同定. 第62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

30. 竹田津宏子, 原田守, 峯孝志, 由谷茂, 七條茂樹, 山田亮, 岡村孝, 山名秀明, 佐田通夫, 伊東恭悟: 血液悪性腫瘍における上皮癌関連抗原の発現と抗原ペプチドによるワクチン療法. 第62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

31. 笹田哲朗, 東公一, 古賀真, 前田好章, 正村裕紀, 七條茂樹, 高林有道, 伊東恭悟: 胃癌患者由来の細胞傷害性T細胞株の認識するHLA-A33拘束性癌抗原の同定. 第62回日本癌学会総会. 9/25-27/2003, 名古屋.

32. 東公一, 七條茂樹, 正村裕紀, 藤井輝彦, 伊東恭悟: HLA-A24乳癌患者における細胞性及び液性免疫により認識されるHER2/neu由来抗原ペプチドの同定. 第62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

33. 田村真由美, 正村裕紀, 小松誠和, 東公一, 藤井輝彦, 七條茂樹, 伊東恭悟: がん患者血清中IgGによって認識されるHLA-A2拘束性HER2/neu抗原ペプチドによる癌特異的細胞傷害性T細胞の誘導. 第62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

34. 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, 正村裕樹, 白水雄, 藤堂省, 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, 9/25-27/2003, 名古屋.

35. 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: 膀胱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, 9/25-27/2003, 名古屋.

36. 正村裕紀, 佐藤裕二, 前田好章, 峯孝志, 山田亮, 山名秀明, 藤堂省, 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, 9/25-27/2003, 名古屋.

37. 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, 9/25-27/2003, 名古屋.

38. 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: テー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. 62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

39. 小松誠和, 七條茂樹, 伊東恭悟: ペプチドワクチン療法における免疫応答の多検体モニタリング法. 62回日本癌学会総会, 9/25-27/2003, 名古屋.

40. 伊東恭悟: テーラーメイド癌ペプチドワクチン - 第II相試験から創薬化へ-. 第68回日本泌尿器科学会東部総会 教育講演, 10/9-11/2003, 弘前.

41. 伊東恭悟: テーラーメイドがんペプチドワクチン. シンポジウム6. 第41回日本癌治療学会総会, 10/22-24/2003, 札幌.

42. 伊東恭悟: テーラーメイド癌ペプチドワクチンの現状と展望. 第1回泌尿器腫瘍免疫研究会 特別講演, 11/1/2003, 東京.

43. 高尾由香里, 山田亮, 由谷茂, 伊東恭悟: C型肝炎ウイルス特異的HLA拘束性CTLエピトープに対する血中抗体の解析. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 12/8-10/2003, 福岡.

44. 織田慶子, 山田亮, 伊東恭悟: 川崎病患児での自己抗原由来ペプチドに対するIgG, IgM抗体産生能. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 12/8-10/2003, 福岡.

45. 尾方里香, 原田守, 松枝智子, 八尾昭久, 伊東恭

悟:抗体とCTLに認識される前立腺癌関連蛋白EZH2由来抗原ペプチドの同定. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 12/8-10/2003, 福岡.

46. 八尾昭久、原田守、松枝智子、伊東恭悟:前立腺癌患者で免疫原性を有するparathyroid hormone related protein由来抗原ペプチドの同定. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 12/8-10/2003, 福岡.

47. 松枝智子、原田守、伊東恭悟:HLA-A2陽性前立腺癌患者において免疫原性を有するPSCA由来抗原ペプチドの同定. 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 12/8-10/2003, 福岡.

48. Itoh K., Yamada A., Yamana H., Mine T., Shichijo S., Harada N., Tsuda N., Azuma K., Sato Y. and Todo S. Phase I clinical trial of individual peptide vaccination for advanced cancer patients. The 34th International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, Japan (2003.12.11-13)

49. 伊東恭悟:テーラーメイド癌治療ペプチドワクチン:臨床研究から創薬研究へ. 第41回日本臨床分子医学会学術総会. 7/16-17/2004. 福岡

50. 山田亮、伊東恭悟:テーラーメイドペプチドワクチン療法の開発. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

51. 上野隆登、由谷茂、高尾由香里、山田亮、佐田通夫、桑野信彦、伊東恭悟:肝細胞癌の発症、再発予防に対するペプチドワクチン第I相臨床試験速報. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

52. 高尾由香里、山田亮、由谷茂、上野隆登、佐田通夫、伊東恭悟:HCV 肝癌再発予防用ペプチドワクチンの開発. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

53. 小野剛治、山田亮、伊東恭悟:癌ワクチンペプチドによるマスト細胞・好塩基球活性化. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

54. 王毅、原田守、山田亮、伊東恭悟:種々の癌細胞における prostatic acid phosphatase (PAP) の発現. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

55. 八尾昭久、原田守、松枝智子、野口正典、原勲、守殿貞夫、伊東恭悟:HLA-A2陽性前立腺癌患者で免疫原性を有するparathyro

id hormone-related protein 由来抗原ペプチドの同定. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

56. 石原愉希、七條茂樹、東公一、小松誠和、伊東恭悟:大腸癌患者由来HLA-A2拘束性CTLが認識するkinesin familyと考えられる新規遺伝子の同定. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

57. 正村裕紀、七條茂樹、松枝智子、前田好章、近藤正男、佐藤裕二、藤堂省、伊東恭悟:HLA-A2陽性肺非小細胞癌患者の細胞性および液性免疫の両者で認識される上皮成長因子受容体(EGFR)由来ペプチドの同定. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

58. 豊嶋健史、中村誠司、熊丸渉、石橋浩晃、大山順子、嘉手納勉、佐々木匡理、川村英司、林田淳之将、森山雅文、山田亮、伊東恭悟、白砂兼光:口腔扁平上皮癌患者における腫瘍周囲のリンパ球浸潤と抗腫瘍細胞傷害性T細胞のin vitro誘導との関連. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

59. 東公一、七條茂樹、石原愉希、小松誠和、伊東恭悟:HLA-A2大腸癌患者におけるCTLにより認識されるThymidylate synthase由来抗原ペプチドの同定. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

60. 矢島直樹、山中龍也、峯孝志、山田亮、伊東恭悟、田中隆一:悪性神経膠腫に対するCTL precursor-oriented peptide vaccine therapy—第I/II相臨床試験一. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

61. 穴見日米子、田中正俊、由谷茂、伊東恭悟:肝癌患者にみる代替療法の現状. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

62. 笹田哲朗、東公一、竹田津宏子、古賀真、前田好章、正村裕紀、七條茂樹、高林有道、伊東恭悟:胃癌組織由来の細胞傷害性T細胞株を用いた新たなHLA-A33拘束性癌抗原エピトープの同定. 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

63. 前田好章、佐藤裕二、正村裕紀、本間重紀、近藤正男、藤堂省、伊東恭悟:胃癌、大腸癌に対する、ペプチドワクチン臨床試験(長期投与例の臨床試験を中心に). 第63回日本癌学会学術総会, 9/29-10/1/2004, 福岡.

64. 望月一生、牛嶋公生、正村裕紀、坂本優、前田好章、山田亮、原田守、嘉村敏治、伊東恭悟：治療不応癌、再発癌に対するpre-designated peptide vaccine療法の評価。第63回日本癌学会学術総会，9/29-10/1/2004，福岡。3
65. 小松誠和、七條茂樹、伊東恭悟：フローメトリーによるペプチド抗体測定とワクチンモニタリング。第63回日本癌学会学術総会，9/29-10/1/2004，福岡。
66. 松枝智子、原田守、八尾昭久、野口正典：HLA-A24陽性前立腺癌患者において免疫原性を有するPSCA由来抗原ペプチドの同定。第63回日本癌学会学術総会，9/29-10/1/2004，福岡。
67. 伊東恭悟：テーラーメイド癌ペプチドワクチン。第56回日本皮膚科学会西部支部学術大会，11/6-7/2004，久留米。
68. 竹田津宏子、伊東恭悟：TP0由来ペプチドの免疫反応性誘導能。第34回日本免疫学会総会・学術集会 12/1-3/2004。北海道
69. 田中将博、小松誠和、七條茂樹、伊東恭悟：ペプチド抗体価測定による膀胱癌診断の検討。第34回日本免疫学会総会・学術集会 12/1-3/2004。北海道
70. 原美穂、原田守、松枝智子、田村真由美、伊東恭悟：子宮頸癌特異的CTLを誘導できるヒトローマウイルス由来でsplicing variantにコードされるエピトプの同定。第34回日本免疫学会総会・学術集会 12/1-3/2004。北海道
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
 1. 細胞性免疫検出法およびその医薬への応用：PCT/JP02/06298 (2002.6.24)
特開2002-365286 (2002.12.18)
 2. 前立腺癌マーカー由来A24拘束性腫瘍抗原ペプチド：PCT/JP02/12893 (2002.12.10)
 3. 大腸癌(SW620)由来A31拘束性腫瘍抗原：特願2002-126764 (2002/4/26)
 4. 肺腺癌由来(11-18細胞)由来のB52&B62拘束性腫瘍抗原：特願2002-286676 (2002/9/30)
 5. 腫瘍抗原：特願2003-124482 (2003.4.28)
 6. HER2/neu由来ペプチド：特願2003-275465 (2003.7.16)
 7. 造血器腫瘍の予防および/または治療剤：特願2003-287208 (2003.8.5)
 8. C型肝炎ウイルス由来ペプチド：特願2003-330258 (2003.9.22)
 9. PROGNOSIS IN CANCER PATIENTS: PCT/JP03/12057 (2003.9.22)
 10. 腫瘍抗原：特願2003-338402 (2003.9.29)
 11. ホルモン不応性再燃前立腺癌にたいするテーラーメイドペプチドワクチンと低容量エストラムスチン併用療法：PCT/JP03/14010(2003.10.31)
 12. 抗ペプチド抗体測定法：特願2003-348853 (2003.11.27)
 13. CD4陽性T細胞に認識されるペプチド：特願2003-404911 (2003.12.3)
 14. 副甲状腺ホルモン関連タンパク質のHLA-A24結合ペプチド：特願2003-408891(2003.12.8)
 15. Zesteホモログ2エンハンサーのHLA-A24結合ペプチド：特願2003-408895(2003.12.8)
 16. 抗SART3モノクローナル抗体：特願2004-003223(2004.1.8)
 17. p53由来癌予後に関与するペプチド抗体の同定：出願依頼済み
 18. 上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)由来ペプチド：特願2004-015676号(2004.1.23)
 19. ストレス誘導抗アポトーシス分子(IEX-1)由来ペプチド：特願2004-026691号(2004.2.3)
 20. 癌治療ペプチドワクチン：特願2004-182811号(2004.6.21)
 21. 前立腺関連抗原由来HLA-A24結合ペプチド：特願2004-179311号(2004.6.17)

22. 上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) 由来ペプチド : PCT/JP2005/000786 (2005. 1. 21)

2. 実用新案登録
なし

3. その他

本研究で同定した遺伝子およびペプチドは特許取得申請中(申請者:伊東恭悟 主任研究者)

研究成果の刊行に関する一覧表

英文査読誌 (29編抜粋)

1. Azuma K, Shichijo S, Maeda Y, Nonaka Y, Fujii T, Kenta K and Itoh K
Mutated p53 gene encodes a non-mutated epitope recognized by HLA- B4601- restricted and tumor-reactive CTLs at tumor site.
Cancer Research, 63: 854-858, 2003.
2. Gohara R, Imai N, Rikimaru T, Yamada A, Hida N, Ichiki M, Kawamoto M, Matsunaga K, Ashihara J, Yano S, Tamura M, Ohkouchi S, Yamana H, Oizumi K and Itoh K
Phase I Clinical Study of CyclophilinB Peptide Vaccine for Lung Cancer Patients.
Journal of Immunotherapy, 25: 439-444, 2002.
3. Nakatsura R, Senji S, Ito M, Nishimura Y and Itoh K
Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, CLP, originally defined by the SEREX method.
European Journal of Immunology, 32: 826-836, 2002.
4. Suzuki N, Tanaka S, Maeda Y, Hida N, Mine T, Yamamoto K, Oka M and Itoh K
Detection of peptide-specific Cytotoxic T lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer.
International Journal of Cancer, 98: 45-50, 2002.
5. Yamada A, Kawano K, Koga M, Takamori S, Nakagawa M and Itoh K.
Gene and peptide analyses of newly defined lung cancer rejection antigens recognized by HLA-A2402-restricted tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.
Cancer Research, 63(11): 2829-2835, 2003.
6. Noguchi M, Kobayashi K, Suetsugu N, Tomiyasu K, Suekane S, Yamada A, Itoh K and Noda S.
Induction Of Cellular And Humoral Immune Responses To Tumor Cells And Peptides In HLA-A24 Positive Hormone-Refractory Prostate Cancer Patients By Peptide Vaccination.
Prostate, 57(1): 80-92, 2003.
7. Harada M, Kobayashi K, Matsueda S, Nakagawa M, Noguchi M and Itoh K.
Prostate-specific antigen-derived epitopes capable of inducing cellular and humoral responses in HLA-A24+ prostate cancer patients.
Prostate, 57(2): 152-159, 2003.
8. Mine T, Gohara R, Hida N, Imai N, Azuma K, Rikimaru T, Katagiri K, Nishikori M, Sukehiro A, Nakagawa M, Yamada A, Aizawa H, Shirouzu K, Itoh K and Yamana H.
Immunological evaluation of CTL precursor-oriented vaccines for advanced lung cancer patients.
Cancer Science, 94(6): 548-556, 2003.
9. Ohkouchi S, Kawamoto N, Koga M, Sakanashi F, Shichijo S, Saijo Y, Nukiwa T, Itoh K and Yamada A.
Identification of a CTL-directed epitope encoded by an intron of the putative tumor suppressor gene Testin of the common fragile site 7G region: a peptide vaccine candidate for HLA-B52+ and HLA-62+ cancer patients.
European Journal of Immunology, 33(11): 2964-2973, 2003.
10. Sato Y, Shomura H, Maeda Y, Mine T, Une Y, Akasaka Y, Kondo M, Takahashi S, Shinohara T, Katagiri K, Sato S, Okada S, Matsui K, Yamada A, Yamana H, Itoh K and Todo S.
Immunological evaluation of peptide vaccination for patients with gastric cancer based on pre-existing cellular response to peptide.

11. Harada M, Gohara R, Oda T, Iwamoto Y and Itoh K.
In vivo evidence that peptide vaccination can induce HLA-DR-restricted CD4+ T cells reactive to a class I tumor peptide.
The Journal of Immunology, 172: 2659-2667, 2004.
12. Tsuda N, Mochizuki K, Harada M, Sukehiro A, Kawano K, Yamada A, Ushijima K, Sugiyama T, Nishida T, Yamana H, Itoh K and Kamura T.
Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers.
Journal of Immunotherapy, 27(1): 60-72, 2004.
13. Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T, Shichijo S, Kamura T, Hashimoto T, Shirouzu K, Yamada A, Todo S, Itoh K and Yamana H.
Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing peptide-specific cellular responses.
Clinical Cancer Research, 10: 929-937, 2004.
14. Takedatsu H, Shichijo S, Katagiri K, Sawamizu H, Sata M, Itoh K.
Identification of peptide vaccine candidates sharing among HLA-A3+, -A11+, -A31+ and -A33+ cancer patients.
Clinical Cancer Research, 10: 1112-1120, 2004
15. Matsueda S., Kobayashi K., Nonaka Y., Noguchi M., Itoh K., Harada M.: Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2+ patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother* 53, 479-489, 2004.
16. Sato Y., Maeda Y., Shomura H., Sasatomi T., Takahashi M., Une Y., Kondo M., Shinohara T., Hida N., Katagiri K., Sato K., Sato M., Yamada A., Yamana H., Harada M., Itoh K., Todo S.: A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients *Br. J. Cancer* 90, 1334-1342, 2004
17. Shomura, H., Shichijo, S., Matsueda, S., Kawakami, T., Sato, Y., Todo, S., and Itoh, K. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides immunogenic for HLA-A2+ cancer patients. *Br. J. Cancer* 90, 1563-1571, 2004
18. Noguchi M., Itoh K., Suekane, S., Morinaga A., Sukehiro A., Suetsugu N., Katagiri K., Yamada A., Noda S. :Immunological monitoring during combination of patient-oriented peptide vaccination and estramustine phosphate in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 60,32-45, 2004.
19. Matsueda, S., Yao, A., Ishihara, Y., Ogata, R., Noguchi, M., Itoh, K., and Harada M. A prostate stem cell antigen-derived peptide immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate*, 60, 205-213, 2004
20. Azuma K., Shichijo, S., Shomura H., Matsueda S., Fujii T., Itoh K.: Identification of HER2/neu-derived peptides capable of inducing both cellular and humoral immune responses in HLA-A24 positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 86, 19-29, 2004
21. Yao A., Harada M., Matsueda S., Ishihara Y., Shomura H., Noguchi M., Matsuoka K., Hara I., Kamidono S., Itoh K.: Identification of parathyroid hormone-related protein-derived peptides immunogenic in human histocompatibility leukocyte antigen-A24+ prostate cancer patients. *Br J Cancer* 91, 287-296, 2004.
22. Sasada T., Takedatsu H., Azuma K., Koga M., Maeda Y., Shichijo S., Shomura H., Hirai T., Takabayashi A., Itoh K.: Immediate early response gene X-1, a stress -inducible antiapoptotic gene, encodes cytotoxic T-lymphocyte(CTL) epitopes capable of inducing human leukocyte antigen-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in gastric cancer patients. *Cancer Res* 64, 2882-2888, 2004

23. Mochizuki K., Sato Y., Tsuda N., Shomura H., Sakamoto M., Matsuura K., Ushijima K., Maeda Y., Katagiri K., Yamada A., Todo S., Kamura T., Harada M., Itoh K.: Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol* 25, 121-131, 2004.
24. Shomura H., Shichijo S., Komatsu N., Matsueda S., Mine T., Rikimaru T., Sato Y., Todo S., Itoh K.: Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognized by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 40, 1776-1786, 2004.
25. Takedatsu H., Okamura T., Yoshimoto K., Harada M., Koga M., Shichijo S., Sata M., Itoh K.: Expression of epithelial cancer-related antigens in hematologic malignancies applicable for peptide-based immunotherapy. *J Immunother* 27, 289-297, 2004.
26. Ogata R., Matsueda S., Yao A., Noguchi M., Itoh K., Harada M.: Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2(EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24+ prostate cancer patients. *Prostate* 60, 273-281, 2004.
27. Shichijo S., Azuma K., Komatsu N., Ito M., Maeda Y., Ishihara Y., Itoh K.: Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2+ colon cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5828-5836, 2004.
28. Azuma K., Sasada T., Takedatsu H., Shomura H., Koga M., Maeda Y., Yao A., Hirai T., Takabayashi A., Shichijo S., and Itoh K. *Ran*, a small GTPase gene, encodes CTL epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 10, 6695-6702, 2004
29. Noguchi M., Itoh K., Yao A., Mine T., Yamada A., Obata Y., Furuta M., Harada M., Siekane S., Matsuoka K.: Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24+ HRPC patients. *Prostate* (in press), 2004.

Mutated *p53* Gene Encodes a Nonmutated Epitope Recognized by HLA-B*4601-restricted and Tumor Cell-reactive CTLs at Tumor Site¹

Koichi Azuma, Shigeki Shichijo,² Yoshiaki Maeda, Tetsuya Nakatsura, Yoichi Nonaka, Teruhiko Fujii, Kenta Koike, and Kyogo Itoh

Departments of Immunology [K. A., S. S., Y. M., T. N., Y. N., K. I.] and Surgery [T. F., K. K.], Kurume University School of Medicine, Kurume 830-0011, Japan

ABSTRACT

Mutations of *p53* gene occur in approximately 50% of human cancers, and accumulated *p53* protein may be an appropriate target molecule to use for cancer immunotherapy. Indeed, mutated or nonmutated *p53*-derived peptides can induce HLA class I-restricted and tumor cell-reactive CTLs *in vitro*. However, to our knowledge, evidence that *p53*-derived peptides are truly recognized by CTLs at tumor sites has not yet been obtained. This study revealed that a mutated *p53* gene encoded a nonmutated nonapeptide recognized by a HLA-B46-restricted and tumor cell-reactive CTL line that was established from T cells infiltrating a colon cancer lesion with the *p53* mutation. This *p53* peptide, at amino acid positions 99-107, had the ability to induce HLA-B46-restricted and peptide-specific CTLs reactive to tumor cells with the *p53* mutation from the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients, but not from those of healthy donors. These peptide-induced CTLs did not react to either HLA-B46⁺ tumor cells without the *p53* mutation or to HLA-B46⁺ phytohemagglutinin-blastoid cells. These results provide a scientific basis for the development of *p53*-directed specific immunotherapy for HLA-B46⁺ cancer patients.

INTRODUCTION

Mutations of the *p53* gene occur in approximately 50% of human cancers (1-3). As a consequence of this mutation, dysfunctional *p53* protein accumulates in cancer cells (3). In contrast, the half-life of the functional *p53* protein in normal cells is so brief that normal cells have undetectable levels of *p53* (4-6). Such findings suggest that accumulated *p53* protein provides an appropriate target for cancer immunotherapy. Several reports showed that mutated or nonmutated *p53*-derived peptides were capable of inducing HLA-A allele-restricted and tumor cell-reactive CTLs from human PBMCs³ *in vitro* (6, 7). However, it remains to be clarified whether or not *p53*-derived epitopes are indeed recognized by CTLs *in vivo*.

A large number of antigenic peptides recognized by HLA-A (HLA-A1, -A2, -A3, and -A24) allele-restricted CTLs have been reported during the past decade (8-11). In contrast, only a few peptides on HLA-B alleles (HLA-B35 and -B53) have been reported (12, 13). The frequency of HLA-A2 or -A24 allele is relatively high in many ethnic groups, allowing prompt study of CTL-directed peptides from the viewpoint of their clinical implications. In contrast, the frequency of HLA-B alleles is generally low due to their great diversity. One such allele is the HLA-B46 allele, which is expressed exclusively in

Asians. This allele is expressed in 30% of Singapore Chinese, 28% of the Thai population, 9% of Japanese, and 8% of Koreans, whereas it is expressed in <1% of Caucasians, blacks, and Indians (14, 15). We have reported in this study that a mutated *p53* gene encodes a nonmutated nonapeptide recognized by a HLA-B46-restricted and tumor cell-reactive CTL line.

MATERIALS AND METHODS

Generation of HLA-B46-restricted CTLs. The HLA-B46-restricted and tumor cell-reactive CTL line OKB-CTL was established from TILs of a patient with colon cancer (HLA-A*0207/3101, -B46/51, and -Cw1) by incubation with IL-2 (100 units/ml) alone for more than 50 days by the methods reported previously (11). The surface phenotypes of the CTLs were investigated by immunofluorescence assay with anti-CD3, -CD4, and -CD8 mAbs (Nichirei, Tokyo, Japan). To inhibit CTL activity, anti-HLA class I (W6/32, IgG2a), anti-HLA-A2 (BB7.2, IgG2b), anti-HLA-B/C (B1-23, IgG2a; Ref. 16), anti-CD8 (Nu-Ts/c, IgG2a), anti-HLA class II (H-DR-1, IgG2a), and anti-CD4 (Nu-Th/i, IgG1) mAbs (20 µg/ml) were used (11). Anti-CD14 (JML-H14, IgG2a) mAb served as a control. A two-tailed Student's *t* test was used for the statistical analysis in this study.

Identification of the cDNA Clone. The expression gene cloning method was used to identify genes coding for tumor antigens recognized by the OKB-CTL line obtained by the methods reported previously (10-11). In brief, cDNA of SW620 was inserted into the expression vector *pCMV-SPORT2* (Invitrogen, San Diego, CA). Wild-type *p53*, HLA-B*4601, HLA-B*5201, or HLA-A*0207 was amplified by reverse transcription-PCR and cloned into *pCR3* (Invitrogen). DNA sequencing was performed with a dideoxynucleotide sequencing method using a DNA Sequencing kit (Perkin-Elmer, Foster, CA) and analyzed by an ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

Construction of Deletion Mutants. The *p53/pCMV-SPORT2* plasmid was digested with *Bam*HI and *Sph*I for the preparation of deletion mutants. *Exo*III nuclease/Mung bean nuclease was used for the digestion according to the manufacturer's instructions (TaKaRa, Otsu, Japan) to obtain four deletion mutants of *p53* (*p53*₁₋₆₀ corresponding to nucleotide positions 1-60, *p53*₁₋₆₃₀, *p53*₁₋₁₁₄₇, and *p53*₁₋₁₆₁₁).

Peptides and CTL Assay. Eleven kinds of wild-type peptides (>70% purity; *p53*₁₁₋₁₉, *p53*₄₆₋₅₄, *p53*₉₉₋₁₀₇, *p53*₁₁₈₋₁₂₆, *p53*₂₀₄₋₂₁₂, *p53*₂₆₂₋₂₇₀, *p53*₃₁₉₋₃₂₇, *p53*₃₂₀₋₃₂₈, *p53*₃₃₀₋₃₃₈, *p53*₃₃₃₋₃₄₁, and *p53*₃₇₇₋₃₈₅) with HLA-B46 binding motif (15) were synthesized for screening. For additional studies, two peptides (*p53*₉₉₋₁₀₇ and *p53*₃₃₀₋₃₃₈) with >90% purity were obtained. For detection of antigenic peptides, HLA-B*4601 or HLA-B*5201 cDNA (as negative control)-transfected COS-7 (5 × 10³) cells were pulsed with a peptide at a final concentration of 10 µM for 2 h, and the CTLs were then added and incubated for 18 h. One hundred µl of supernatant were collected to measure IFN-γ by ELISA (limit of sensitivity, 10 pg/ml) in a duplicate assay.

CTL Induction from PBMCs of Cancer Patients. PBMCs from six HLA-B46⁺ cancer patients and three HLA-B46⁺ healthy donors served as subjects for the CTL induction assay. Informed consent was obtained from all patients. HLA class I PBMCs were serotyped by conventional serological methods, as reported previously (11). Nine HLA-B46 molecules from three healthy donors and six cancer patients were genotyped, and all those tested were HLA-B*4601 (data not shown). HLA-B*4601 would be the expected serological identification because the genotype is predominantly (>95%) HLA-B*4601 in the case of B46 (18). For induction of peptide-specific CTLs, PBMCs (1 × 10⁵ cells/well) were incubated with 10 µM of each peptide in the wells of a 96-well microculture plate (Nunc, Roskilde, Denmark) in 200 µl of culture medium containing IL-2, as reported previously (17). On the 10th day, the cells were harvested, washed, and tested for their ability to produce IFN-γ

Received 4/11/02; accepted 12/11/02.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (Grant-in-Aid 12213134 to K. I.), from the Japan Society for the Promotion of Science (Grant-in-Aid 14570526 to S. S.), and from the Ministry of Health and Welfare, Japan (Grants-in-Aid H14-trans-002, 11-16, and H12-cancer-004 to K. I. and Grant-in-Aid H14-cancer-033 to S. S.).

² To whom requests for reprints should be addressed, at Department of Immunology, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan. Phone: 81-942-31-7551; Fax: 81-942-31-7699; E-mail: shichijo@med.kurume-u.ac.jp.

³ The abbreviations used are: PBMC, peripheral blood mononuclear cell; aa, amino acid(s); IL, interleukin; PHA, phytohemagglutinin; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; mAb, monoclonal antibody; LSAB, labeled streptavidin-biotin.