

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

PETを用いた免疫療法の効果判定に関する研究

分担研究者 畑澤 順 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：Positron Emission Tomography (PET) と<sup>11</sup>C

<sup>11</sup>C-methionineを用いて、悪性腫瘍のアミノ酸代謝を評価する手法を開発した。原発巣および転移巣の検出には全身撮像を要するため、標識薬剤の合成収率の向上、最適撮像条件の検討を行なった。WT1免疫療法治療前後にアミノ酸代謝の変化を測定し、悪性胸腺腫再発例で治療後代謝抑制を認めた。

A. 研究目的

<sup>11</sup>C-methionine PETにより悪性腫瘍のアミノ酸代謝を評価することが可能である。一方、<sup>11</sup>C-methionineは短半減期（20分）であるため全身撮像は困難と考えられてきた。本研究は全身撮像法を開発すること、WT1免疫療法の効果を<sup>11</sup>C-methionine PETで検証することを

B. 研究方法

- 1) 投与量と被曝線量：<sup>11</sup>C-methionineによる被曝線量は0.12mSv/370MBqと推定されている（Hatazawa J, et al. JNH, 1989）。職業人の年間許容線量（20mSv）よりも充分低い4mSv以下の被曝線量となるよう、一回最大投与量を1110MBqとした。
- 2) 全身撮像法の最適化：<sup>11</sup>C-methionineは投与後約20分で組織中濃度が一定になった。従って、撮像開始は投与後20分とした。物理的半減期を考慮し、20分で全身撮像が終了するよう条件を設定した。吸収補正はEmission-transmission同時収集法で行なった。
- 3) 症例：胸腺がんと結腸がんの症例でWT1免疫療法施行前と施行後に<sup>11</sup>C-methionine PETを施行し、治療に伴う変化を評価した。

C. 研究結果

症例1：46才男。前縦隔腫瘍（胸腺がん）切除後、放射線治療後、化学療法後（-2004.7）。肺転移。WT1療法開始前には前縦隔に高集積巣を認めるが、治療開始後1ヶ月には集積低下。胸壁の腫瘍へは治療前検査で集積なし。なお、腸管への<sup>11</sup>C-methionineの高集積を認めた。  
症例2：69才女。S状結腸がん切除術後。化学療法後。局所再発、肺転移、肝転移。WT1療法開始前の<sup>11</sup>C-methionine PETで局所再発巣、

転移巣ともに低集積であった。治療後も同様の結果であった。同時期に行なわれたPETでは知慮馬、治療後ともに高集積を認めた。

D. 考察

<sup>11</sup>C-methionine PET全身撮像は物理的半減期が短いために困難と考えられていたが、投与放射線量、撮像条件の最適化により充分可能であった。今後標識合成の最適化により収量が増加すれば、被験者数を増すことが可能と考えられた。今回検討を行なった症例はいずれも化学療法終了後に本検査を行なっており、そのため<sup>11</sup>C-methionine集積は治療前に低下していたと推定される。しかし、胸腺がんでは局所再発が疑われる病巣の<sup>11</sup>C-methionine集積がWT1療法後に低下しており、治療効果を示すものと考えられた。

E. 結論

撮像条件の最適化により全身<sup>11</sup>C-methionine PETが可能である。胸腺がんの一例でWT1免疫療法後に<sup>11</sup>C-methionine集積の低下を認めた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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
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（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

三次元画像診断を用いた免疫療法の効果安定に関する研究

分担研究者 上甲 剛 大阪大学大学院医学系研究科 教授

**研究要旨** 早期肺癌のCT像に対する3次元解析法の有用性を確かめるために、再現性の検討と病理組織学的悪性度との対比を、従来法との比較の上で行い精度評価を行った。

**A. 研究目的**

従来、発見が困難だった早期の肺腺癌が近年のMDCT (Multi Detector Computed Tomography) の出現によって発見されるようになってきた。3大癌死の一つである肺癌は増加の一途をたどり、組織学的には腺癌の増加が著しい。腺癌のスリガラス状陰影 (ground-glass opacity: GGO) の病変に占める面積と予後は良好に逆相関する。以前は全肺葉摘出手術が主流で患者の負担が大きかったが、予後と良好な相関を持つ野口分類が提唱され、縮小手術の傾向にある。縮小手術の流れにより、非侵襲的な方法である画像による解析が有用とされ、様々な画像解析方法が提唱されているが、その多くが主観的であるという問題点を抱えている。その一方で客観的評価を得られるものとして3次元画像解析ソフトが提唱されたが、その精度・性能評価は行われていない。よって本研究では3次元画像解析ソフトによる再現性の検討及び病理組織学的悪性度との対比を目的とした。

**B. 研究方法**

対象は1998年6月から2003年12月の間に大阪大学医学部附属病院で手術を施行しCTにおける結節部分のthin section dataが入手できた2cm以下の小型肺腺癌49症例である。大阪大学附属病院内画像より取得した腺癌術前のCTデータに対して%solid (腫瘍体積に占める軟部組織濃度部分の割合) を計算し、病理標本と比較した。%solidは、客観的方法としてALA2を用いて求めた。また従来の主観的方法と比較した。CT画像はwindow値の設定により画像表現は変化する。肺野条件 (ww:1200、wl:-700) と縦隔条件 (ww:300、wl:35) での腫瘍面積及び腫瘍径をそれぞれ求め、%solidを算出した。病理標本は野口分類を用いて分類した。胸膜浸潤している症例は悪性度との比較対象から除外した。データの計測は時期をずらして2回行った。そのデータの計測の再現性と、%solidと病理のtype分類との相関についてはSpeaman's rank correlationを用いて統計解析した。

(倫理面への配慮)

性別以外の患者さんの情報を用いず、画像解析のみの研究であったため、個人情報の漏洩は乏しい。

**C. 研究結果**

ALA2のデータの再現性についての相関係数は0.989~0.999 ( $p < 0.001$ ) であった。従来法の再現性は、0.750~0.969 ( $p < 0.001$ ) であった。病理と%solidとの相関については、ALA2を用いた場合、相関係数は0.559 ( $p < 0.001$ )、従来法の場合、相関係数0.543~0.647 ( $p \leq 0.001$ ) であった

**D. 考察**

再現性はALA2が極めて良好であった。病理と各方法で求めた%solidとの相関はどれもほぼ同等で、ALA2と病理の相関はそれほどいいものとはならなかった。これは、ソフトの中に病理学的な意義あいが十分に盛り込まれていないことや、病理標本は2次元の断面であるのに対しALA2は3次元で解析している点が考えられる。また、充実部とすりガラス状陰影の境界の決定にWatershed法を用いているためにその識別に誤りが生じ、病理との相関は悪くなってしまったのかもしれない。

**E. 結論**

データ計測の再現性は自動抽出ソフトであるALA2が良好であった。今後、病理 (野口分類) との相関関係についてさらに検討を加えて、診断能の向上を目指したい。

**F. 健康危険情報** なし

**G. 研究発表**

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

**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
  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（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

三次元画像診断を用いた免疫療法の効果安定に関する研究

分担研究者 上甲 剛 大阪大学大学院医学系研究科 教授

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし  
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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
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（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

WT1発現の病理診断に関する研究

分担研究者 青笹 克之 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

WT1蛋白は癌に対する免疫療法の標的となる物質であり、その発現を免疫組織化学的に確認することは本治療の適応の判定上、必須である。今回、我々は免疫染色により様々な悪性腫瘍においてWT1蛋白を腫瘍細胞細胞質内に高率に検出した。

A. 研究目的

WT1蛋白は種々の増殖関連因子遺伝子の発現を制御する転写因子であり、白血病や各種固形腫瘍において発現が亢進していることが明らかにされている。しかし、腎芽腫、中皮腫などの特定の腫瘍以外では、免疫組織化学的手法を用いたWT1蛋白発現の検出率のデータは、現在までのところ報告は少なく不明である。WT1蛋白は、現在、臨床治験が進められている癌ワクチン療法の標的となる蛋白であり、癌ワクチン療法の適応判定のためには、腫瘍細胞におけるWT1蛋白発現の免疫組織化学的検出の精度のデータは欠くことができない。

B. 研究方法

各種悪性腫瘍の生検ないし切除組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本を対象に、avidin-biotin complex法によるWT1蛋白に対する免疫染色を施行した。使用した抗体は抗WT1ポリクローナル抗体(C-19, Santa Cruz Biotechnology)である。染色を施行した標本は、病理医によって腫瘍細胞における染色の局在性、染色強度が判定された。

（倫理面への配慮）本研究は大阪大学の医学倫理委員会で審査され、承認を受けた様式に則って、試料提供者のインフォームドコンセントを得た上で、標本の収集を行なっている。試料を収集した時点で提供者の個人情報等を匿名化し、プライバシーの保護を行っている。さらに本研究は診療上必要な病理検査の検体を用いて行う研究であるので、研究遂行のために試料提供者より新たに試料を得る必要はない。

C. 研究結果

肺癌の5/6例（83%）、膵癌の30/40例（75%）、食道癌の36/38例（95%）、脳膠腫および膠芽腫の23/24例（96%）において腫瘍

細胞におけるWT1蛋白発現の陽性所見を認めた。大腸癌においてはRT-PCRによりWT1 mRNAの発現が確認されている症例のうち14/15例、mRNAの発現が未確認の症例のうち27/31例で陽性所見を認めた。その他、甲状腺癌、骨軟部肉腫、頭頸部扁平上皮癌においても、mRNAの発現が確認されている症例のうち、各々20/21例、4/4例、6/6例に陽性所見を認めた。免疫染色における陽性シグナルは、主に腫瘍細胞の細胞質内に確認したが、頭頸部扁平上皮癌など一部の腫瘍では、

D. 考察

従来、免疫染色により腎芽腫や中皮腫の腫瘍細胞の核にWT-1蛋白の発現が確認されていたが、本研究において、他の悪性腫瘍でも高率に細胞質内にWT1蛋白が発現していることを確認した。但し、免疫染色の特異性には検討の余地が残されているため、モノクローナル抗体による染色結果のデータ等を現在蓄積中である。

E. 結論

各種の悪性腫瘍において、免疫染色により腫瘍細胞細胞質内にWT1蛋白発現を高率に確認した。

F. 健康危険情報

本研究は患者から採取された組織を対象に行なうため、患者に対する健康危険情報は特にない

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Oji Y, Yano M, Nakano Y, Abeno S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. *Anticancer Res.* 2004 ;24(5B):3103-8.

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

WT1発現の病理診断に関する研究

分担研究者 青笹 克之 大阪大学大学院医学系研究科 教授

- 2: Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. *Cancer Sci.* 2004 ;95(10):822-7.
- 3: Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2003 ;94(8):712-7.
- 4: Oji Y, Yamamoto H, Nomura M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2003 ;94(8):712-7.
- 5: Oji Y, Miyoshi Y, Koga S, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Sci.* 2003 ;94(7):606-11.
- 6: Ueda T, Oji Y, Naka N, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Sci.* 2003 ;94(3):271-6.
- 7: Oji Y, Inohara H, Nakazawa M, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2003 ;94(6):523-9.
- 8: Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer.* 2002 20;100(3):297-303.
2. 学会発表
1. 中野陽子, 尾路祐介, 山本浩文, 野村昌哉, 中塚伸一, 池場愛, 阿倍野咲恵, 池田正孝, 大植雅之, 関本貢嗣, 青笹克之, 門田守人, 杉山治夫: WT1遺伝子の犬腸がんにおける過剰発現: 第62回 日本癌学会総会, 名古屋, 2003年9月27日
2. 尾路祐介, 瀧口修司, 池場愛, 中野陽子, 中塚伸一, 藤原義之, 山本浩文, 矢野雅彦, 安田卓司, 岡芳弘, 青笹克之, 門田守人, 杉山治夫: WT1遺伝子の食道癌における特異的免疫の誘導によるがんの治療: 第62回 日本癌学会総会, 名古屋, 2003年9月25日
3. 阿部野咲恵, 尾路祐介, 介, 川上学, 青笹克之, 野口新三郎, 川瀬一郎, 杉山治夫: 悪性腫瘍に対するWT1ワクチン療法の第一相臨床試験: 第8回 基盤的癌免疫研究会, 札幌, 2004年7月16日
5. 中島博子, 川崎琴美, 岡芳弘, 坪井昭博, 川上学, 尾路祐介, 東市郎, 川瀬一郎, 青笹克之, 杉山治夫: WT1ペプチドワクチンとBCG-CWSを用いた癌免疫療法のマウス治療モデルの作成: 第8回 基盤的癌免疫研究会, 札幌, 2004年7月16日
6. Hiroko Nakajima, Kotomi Kawasaki, Yshihiro Oka, Akihiro Tsuboi, Manabu Kawakami, Yusuke Oji, Ichiro Azuma, Ichiro Kawase, Katsuyuki Aozasa, Haruo Sugiyama: WT1 peptide vaccination combined with BCG-CWS is more efficient for leukemia than WT1 peptide vaccination alone: The Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, 名古屋, 2004年9月2日
7. 阿倍野咲恵, 尾路祐介, 中塚伸一, 青笹克之, 門田守人, 杉山治夫: WT1遺伝子の発現検索による食道粘膜の腫瘍性変化の診断: 第51回日本臨床検査医学会総会, 東京, 2004年9月4日
8. 辰巳直也, 尾路祐介, 中森正二, 藤川正博, 中塚伸一, 岡芳弘, 青笹克之, 門田守人, 杉山治夫: WT1遺伝子の膵管癌における過剰発現: 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日
9. 中島博子, 川崎琴美, 岡芳弘, 坪井昭博, 川上学, 尾路祐介, 東市郎, 川瀬一郎, 青笹克之, 杉山治夫: BCG-CWSの併用によるWT1ペプチドワクチンの腫瘍拒絶能の増強: 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日
10. 岡芳弘, 坪井昭博, 田口哲也, 大崎匡, 川上学, 中島博子, 尾路祐介, 許泰一, 土肥博雄, 青笹克之, 野口眞三郎, 川瀬一郎, 杉山治夫: 悪性腫瘍に対するWT1ペプチド癌ワクチン療法第I相臨床試験: 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日
11. 岡芳弘, 坪井昭博, 田口哲也, 大崎匡, 川上学, 尾路祐介, 西田純幸, 許泰一, 土肥博雄, 青笹克之, 野口眞三郎, 川瀬一郎, 杉山治夫: 造血器腫瘍および固形癌に対するWT1ペプチド癌ワクチン療法学第I相臨床試験: 第3回日本臨床腫瘍学会総会, 横浜, 2005年3月4日

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分研究報告書

WT1発現の病理診断に関する研究

分担研究者 青笹 克之 大阪大学大学院医学系研究科 教授

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
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（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

WT1エピトープの同定にする研究

分担研究者 安川 正貴 愛媛大学医学部 助教授

**研究要旨** WT1を標的としたがんワクチン療法開発の目的で研究を遂行し、以下の成果を得た。1) 骨髄腫細胞はリンパ腫細胞と比べて、WT1特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) によるパーフォリン依存性細胞傷害感受性が高いことが明らかとなった。2) CD4陽性およびCD8陽性CTLにおけるパーフォリン発現と細胞周期との関連を調べたところ、CD8陽性CTLでは細胞周期に関わらず恒常的に発現が認められたが、CD4陽性CTLではG2/M期に転写が促進することが明らかとなった。この違いは、STAT5のパーフォリンプロモーターへの結合の差によることが判明した。3) 腫瘍細胞に強い細胞傷害性を示すWT1特異的CD8陽性CTLクローンからT細胞レセプター $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖遺伝子をクローニングし、正常CD4陽性およびCD8陽性T細胞に遺伝子導入することによって、白血病細胞に対してHLAクラスI拘束性に細胞傷害性が獲得されることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、造血幹細胞移植を併用した大量化学療法法の進歩によって造血器腫瘍の治療成績は目覚ましい向上を遂げているが、いまだ多くの症例では一時的寛解に留まり治癒に至らない場合が多い。骨髄移植患者のHLAマッチングと再発率との関連の長期的観察や、再発患者へのドナーリンパ球輸注の臨床効果などから、従来の化学療法のみによる腫瘍細胞の撲滅には限界があり、造血器腫瘍の治療達成には免疫学的監視機構が重要であることが明確になってきた。しかし、これまで白血病などの造血器腫瘍に対して特異的なCTLの誘導は、標的抗原が明らかでなかったことから困難であり、しばしば重篤な副作用をきたすGVHD効果による臨床効果を期待せざるを得ないのが現状である。WT1はほとんどの造血器腫瘍ならびに固形がんを高発現しているが、正常細胞での発現レベルは極めて低く、がん免疫療法の理想的な標的抗原と考えられる。このような背景のもと、本研究ではWT1を標的としたがん免疫療法の確立の目的で、CTLの細胞傷害機構の中心を担うperforinの発現調節機構や、腫瘍細胞のWT1特異的CTLのperforin依存性細胞傷害感受性の差、WT1特異的CTL由来T細胞レセプター (TCR) 遺伝子導入による新たな免疫遺伝子治療の開発などを行った。

B. 研究方法

1) 骨髄腫とB細胞性悪性リンパ腫におけるWT1発現と細胞表面HLAクラスI分子の発現を検討した。さらに、これら2種の腫瘍細胞のWT1特異的CTLの細胞傷害感受性の差を検討し、細胞傷害機構を解析した。ヒトNK細胞株からperforinを精製し、精製perforinに対する感受性の違いを検討した。また、骨髄腫患者からWT1特異的CTL誘導を試み、骨髄腫細胞に対する細胞傷害性を確認した。

2) CD4陽性CTLおよびCD8陽性CTLにおける細胞周期と細胞傷害活性ならびにperforin発現調節との関連を検討した。単純ヘルペスウイルス特異的CD4陽性CTLクローンおよびEBウイルス特異的CD8陽性CTLクローンを樹立し、抗原刺激後活性化状態である時期と休止期での、細胞傷害活性とperforin発現を比較検討した。さらに、Perforin発現調節機構をEMSA法にて検討した。

3) われわれが樹立したWT1ペプチド特異的HLA-A24拘束性CTLクローンTAK-1からTCR $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖遺伝子をクローニングし、レンチウイルスベクターを用いて正常CD4およびCD8陽性T細胞に遺伝子導入した。TCR遺伝子導入CD4およびCD8陽性T細胞の白血病細胞に対するWT1特異的免疫応答を検討した。

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

WT1エピトープの同定にする研究

分担研究者 安川 正貴 愛媛大学医学部 助教授

（倫理面への配慮）

これらの研究は全て、愛媛大学医学部臨床倫理委員会の承諾を得て実施した。血液・細胞ドナーからは全てインフォームドコンセントを得て検体を採取した。

C. 研究結果

1) 白血病細胞や肺がん細胞に加えて、骨髄腫細胞もWT1特異的CTLによる細胞傷害性に強い感受性を有することを示した。他方、悪性リンパ腫細胞はWT1発現量が比較的強く、WT1特異的CTLは細胞傷害性を示さなかった。しかし、骨髄腫細胞におけるWT1発現レベルも悪性リンパ腫細胞とほぼ同じ程度に強く、リンパ腫細胞に比べCTLによる細胞傷害性に対して高い感受性を有することが示唆された。WT1特異的CTLの骨髄腫細胞に対する細胞傷害性は、EGTAならびにconcanamycin Aによってほぼ完全に抑制されたことから、Ca依存性でperforin依存性経路が主要な細胞傷害機構と考えられた。さらに、骨髄腫細胞とリンパ腫細胞のperforin感受性の差を検討したところ、骨髄腫細胞は精製perforinに対して強い感受性を有することが明らかとなった。また、骨髄腫患者末梢血中に、骨髄腫細胞を傷害するWT1特異的CTLが存在することを証明した。

2) 単純ヘルペスウイルス特異的CD4陽性CTLクローンおよびEBウイルス特異的CD8陽性CTLクローンを樹立し、抗原刺激後活性化状態である時期と休止期での細胞傷害活性とperforin発現を比較検討したところ、CD8陽性CTLは細胞周期に関わらず恒常的にperforin発現が認められ細胞傷害活性にも大きな変化は認められなかったが、CD4陽性CTLでは細胞傷害活性とperforin発現はG2/M期に上昇することが判明した。Perforin発現は転写レベルで調節されており、活性化に伴ってperforinプロモーターへのSTAT5の結合活性上昇が認められ、このことがperforin発現の差の要因と考えられた。

3) われわれが樹立したWT1ペプチド特異的HLA-A24拘束性CTLクローンTAK-1はWT1由来ペプチドとHLA-A24複合体に高い結合性を有し、極めて効率的にWT1発現腫瘍細胞を傷害する。そこで、TAK-1からTCR- $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖遺伝子をクローニングし、レンチウイルスベクターを用いて正常CD4およびCD8陽性T細胞に遺伝子

導入した。導入後2回のペプチド抗原刺激を加えたところ、TAK-1由来TCR発現効率は70～80%と高率であった。TCR遺伝子導入細胞は親株のTAK-1同様にWT1発現腫瘍細胞をHLA-A24拘束性に傷害することが示された。また、TCR遺伝子導入CD4陽性T細胞は、HLA-A24陽性、HLAクラスII発現白血病細胞に対して細胞傷害性とTh1サイトカイン産生を示した。

D. 考察

1) WT1は白血病ならびに固形がん関連抗原として注目されている。一般に、標的細胞のCTL感受性は、標的抗原と細胞表面の拘束HLA分子の発現量によって規定されると考えられている。今回、リンパ腫細胞と骨髄腫細胞がWT1とHLA-A24をほぼ同じレベルで発現していたにも関わらず、骨髄腫細胞のみがWT1特異的CTLに細胞傷害を受けたことは、CTL感受性に他の因子が関与していることを示唆するものである。この点を明らかにする目的で、perforinを精製し、リンパ腫細胞と骨髄腫細胞とのperforin感受性の差を検討したところ、骨髄腫細胞が選択的にperforin感受性が高いことが示された。このことは、CTL由来細胞傷害惹起物質に対する感受性が疾患単位で規定されていることを示唆するものであり、細胞免疫療法に適した疾患群を明らかにする指標の一つになるかもしれない。また、造血幹細胞移植におけるGVHDとGVL効果との違いを、従来の標的分子の発現組織の差とは異なった見地から説明できる現象かもしれない。

2) CTL養子免疫療法において問題になる点に、CTLの誘導ならびに長期大量培養が困難であることが挙げられる。本研究で実施したTCR遺伝子導入による腫瘍特異的CD8陽性CTLの作製はこの問題を克服できる有力な手段であると思われる。さらに、自殺遺伝子を組み込むことによって安全性が確保されると考えられ、現在NOD-SCIDマウスを用いたin vivo実験系を遂行している。また、CD4陽性T細胞にCD8陽性CTL由来TCRを導入することによって、単一ペプチド・HLA複合体を介してCTLとヘルパーT細胞を同時に効率よく誘導することが可能となり、より効果的な細胞免疫療法が可能となるとと思われる。



厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

WT1エピトープの同定にする研究

分担研究者 安川 正貴 愛媛大学医学部 助教授

E. 結論

- 1) 骨髄腫はWT1発現が比較的低いにも関わらず、WT1特異的CTLに感受性が高いことから、WT1を標的としたがん免疫療法の対象疾患となりうることを示された。
- 2) WT1特異的CTL由来TCR遺伝子導入によるがん免疫遺伝子療法は効果が期待できる治療法である。

F. 健康危険情報

該当する問題点はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji, T., Yasukawa, M., Matsuzaki, J., Ohkuri, T., Chamoto, K., Wakit, D., Azuma, T., Niiya, H., Miyoshi, H., Kuzushima, K., Oka, Y., Sugiyama, H., Ikeda, H., Nishimura, T.: Generation of human tumor-specific, HLA class I-restricted Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T cell receptor genes. *Blood* 2005 in press.
2. Ishii, E., Ueda, I., Shirakawa, R., Yamamoto, K., Horiuchi, H., Ohga, S., Furuno, K., Morimoto, A., Imayoshi, M., Ogata, Y., Sako, M., Koike, K., Sakata, A., Takada, H., Hara, T., Imashuku, S., Sasazuki T., Yasukawa, M.: Genetic subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions. *Blood* 2005 in press.
3. Takeuchi, K., Sakai, I., Narumi, H., Yasukawa, M., Minamoto, Y., Fujisaki, T., Tanimoto, K., Masamichi M., Numata, A., Gondo, H., Takahashi, M., Fujii, N., Masuda, K., Fujita, S.: Expression of SOCS3 in bone marrow cells from chronic myelogenous leukemia patients is associated with the cytogenetic response to interferon-alpha. *Leuk. Res.* 29:173-178
5. Ishikawa, F., Yasukawa, M., Yoshida, S., Shimoda, K., Shimoda, S., Nakamura, K., Nagatoshi, Y., Kanemaru, T., Kawano, N., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Fukuda, T., Okamura, J., Shultz, L.D., Harada, M.: Human cord blood- and bone marrow-derived CD34+ cells regenerate gastrointestinal epithelial cells. *FASEB J.* 18:1958-1960, 2004.
6. Yamamoto, K., Ishii, E., Sako, M., Ohga, S., Furuno, K., Suzuki, N., Ueda, I., Imayoshi, M., Yamamoto, S., Morimoto, A., Takada, H., Hara, T., Imashuku, S., Sasazuki, T., Yasukawa, M.: Identification of novel MUNC13-4 mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Genet.* 41:763-767, 2004.
7. Azuma, T., Otsuki, T., Kuzushima, K., Froelich, C., Fujita, S., Yasukawa, M.: Myeloma cells are highly sensitive to granule exocytosis pathway mediated by WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 10:7402-7412, 2004.
8. Niiya, H., Azuma, T., Jin, L., Uchida, N., Inoue, A., Hasegawa, H., Fujita, S., Tohyama, M., Hashimoto, K., Yasukawa, M.: Transcriptional down-regulation of DC-SIGN in human herpesvirus 6-infected dendritic cells. *J. Gen. Virol.* 85:2639-2642, 2004.
9. Yakushijin, Y., Hamada, M., Yasukawa, M.: The expression of the Aurora-A gene and its significance with tumorigenesis in non-Hodgkin's lymphoma. (Review) *Leuk. Lymphoma* 45:1741-1746, 2004.
10. Tsuboi, A., Oka, Y., Osaki, T., Kumagai, T., Tachibana, I., Hayashi, S., Murakami, M., Nakajima, H., Elisseeva, O.A., Fei, W., Masuda, T., Yasukawa, M., Oji, Y., Kawakami, M., Hosen, N., Ikegar K., Yoshihara, S., Udaka, K., Nakatsuka, S., Aozasa, K., Kawase, I., Sugiyama, H. WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiol. Immunol.* 48:175-184, 2004.
11. Yamanouchi, J., Hato, T., Tamura, T.

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）  
分担研究報告書

WT1エピトープの同定にする研究

分担研究者 安川 正貴 愛媛大学医学部 助教授

11. Yamanouchi, J., Hato, T., Tamura, T., Fujita, S., Yasukawa, M.: Identification of an epitope on glycoprotein IIb-IIIa that is recognized by HLA-DRB1\*0405-restricted CD4+ T cells from a patient with immune thrombocytopenic purpura. J. Thromb. Haemostasis 2:348-350, 2004.

2. 学会発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 安川正貴：骨髄腫に対する免疫療法 第44回日本リンパ網内系学会シンポジウム「骨髄腫の分子病態と分子治療」 京都 2004年7月16日

2. 安川正貴：造血器腫瘍に対する細胞免疫療法の開発 第63回日本癌学会総会シンポジウム「造血器腫瘍の最先端研究と治療への展開」 福岡 2004年9月29日

3. 東 太地、新谷泰成、内田直之、大槻剛巳、葛島清隆、藤田 繁、安川正貴：WT1を標的とした多発性骨髄腫に対する細胞免疫療法 第8回基盤的癌免疫研究会総会 札幌 2004年7月16日

4. 東 太地、新谷泰成、内田直之、藤田 繁、安川正貴：WT1およびテロメラーゼを標的としたがんペプチドワクチン療法の開発 第101回内科学会講演会 東京 2004年4月8日

5. 東 太地、新谷泰成、内田直之、薬師神芳洋、酒井郁也、羽藤高明、藤田 繁、大槻剛巳、葛島清隆、坪井昭博、岡 芳弘、杉山治夫、安川正貴：WT1を標的とした骨髄腫に対する細胞免疫療法の開発 第66回日本血液学会総会 第46回日本臨床血液学会総会 京都 2004年9月19日

6. 新谷泰成、金磊、酒井郁也、東 太地、内田直之、薬師神芳洋、羽藤高明、藤田 繁、安川正貴：CD4陽性およびCD8陽性細胞傷害性T細胞におけるパーフォリン発現調節の違い 第66回日本血液学会総会 第46回日本臨床血液学会総会 京都 2004年9月18日

7. Yasukawa, M. : Antileukemia and antitumor cancer effects of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. First International Conference on WT1 in Human Neoplasia Berlin 2004年3月12日

8. Yasukawa, M., Niiya, H., Azuma, T., Uchida, N., Yakushijin, Y., Sakai, I., Hato, T., Fujita, S., Tsuiji, T., Nishimura, T. : Generation of tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes and CD4+ Th1 helper T cells by transfer of T-cell receptor genes isolated from a WT1-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte clone. The 46th Annual Meeting of the American Society of Hematology San Diego. U.S.A. 2004年12月5日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
（予定を含む）

1. 特許取得

1) 「ヒト由来免疫担当細胞の製造方法」

出願番号：特願2003-171420

発明者氏名：石川文彦（九州大学学術振興会特別研究員）、安川正貴、原田実根（九州大学教授）

平成15年6月16日出願

平成16年6月16日PCT国際出願（株式会社産学連携機構九州）

出願番号：PCT/JP2004/008784

2) 「改変標的化T細胞の製造方法及び医薬」

出願番号：特願：2003-425009

発明者氏名：西村孝司（北海道大学遺伝子病制御研究所教授）、安川正貴

平成15年12月22日出願

平成16年12月22日PCT国際出願（北海道

ティー・エル・オー株式会社）

出願番号：PCT/JP2004/019714

2. 実用新案登録

3. その他

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Haruo Sugiyama	Wilms tumor Gene WT1 as a Tumor Marker for Leukemic Blast Cells and Its Role in Leukemogenesis	J. Boulwood and C. Fidler	Methods in Molecular Medicine	Humana Press	Totowa	2004	223-237
杉山 治夫	WT1 由来ペプチドによる癌ワクチン臨床試験	奥村康、平野俊夫、佐藤昇志	Annual Review 免疫 2005	中外医学社	東京	2004	209-215

## 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
杉山 治夫	WT1 ペプチドを用いた癌の免疫療法	Biotherapy	18 巻 1 号	1-8	2004
杉山 治夫	WT1 ペプチドを用いたがんの免疫療法	血液・腫瘍科	48 巻 6 号	603-609	2004
杉山 治夫	免疫療法の可能性	カレントセラピー	22 巻 8 号	93-96	2004
杉山 治夫	WT1 ペプチドを用いた癌の免疫療法	獣医畜産新報	57 巻 9 号	762-766	2004
杉山 治夫	癌抗原ペプチドを用いた癌の免疫療法 “WT1 ワクチン療法”	癌の臨床	50 巻 10 号	803-808	2004