

C. 研究結果

① HCC 術後再発における早期診断マーカーとしての検討

登録 50 症例全てが肉眼的および組織学的に根治切除であった。このうち 15 例に HCC 再発を認めた。再発までの期間は中央値 5.0 ヶ月、範囲 1.4-24.5 ヶ月であった。再発までの採血回数は中央値で 4 回、範囲 3-8 回であった。術後初回の画像検査で再発を認めた症例が 15 例中 7 例であった。今回検討した術後再発 15 例の GPC3 値は再発前後を通じて低かったが、測定値の変動に着目すると、術後から再発にかけて上昇傾向のある症例が 9 例認められた。抗 GPC3 IgG 抗体は、手術対象となるような病期の術前担当がん状態での陽性率は低く (50 例中 4 例、8%)、術後経過中にあまり変動がみられない症例 (5 例) および術後一過性に上昇する症例 (5 例) を認めた。

② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーとしての検討

東京労災病院にて 3 例、NTT 西日本九州病院にて 5 例の HCC 発がんを認めた。研究全体としての採血回数は中央値で 3 回、範囲 1-6 回であったが、発がんまでの採血回数は中央値で 2 回、範囲 1-3 回であった。登録前 1 ヶ月以内の画像検査がない症例や、登録時から既に HCC を確認している症例も含まれていた。限られた症例数、条件ではあるものの発癌時 GPC3 陽性率は 28.6% (7 例中 2 例) および抗 GPC3-IgG 抗体陽性率は 42.9% (7 例中 3 例) であった。

D. 考察

① HCC 術後再発における早期診断マーカーとしての検討

今回の血清 GPC3 測定では全体的に Cut-off 値以下であったが、今回検討した再発 15 例は早期再発をきたした症例が多く含まれていることに加え、再発へ向けて GPC3 値が上昇する傾向のある症例を認めたこともあり、今後も再発症例を集めての再検討が必要と考えられた。抗 GPC3 IgG 抗体は、今回の検討では担当がん状態においても陽性率が低かったことから、今後再発症例に限らず、カットオフ値の評価を併せて検討が必要と考えられた。

② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーとしての検討

今回解析した 8 例はいずれも登録から発癌までの期間、および発癌前の採血回数が十分とは言えず、腫瘍マーカーの time course を論じるのは困難であった。すでに登録された未発がん症例については今後も検体採取と GPC3 の解析を継続する予定である。

E. 結論

研究開始から日が浅いこともあり症例数に限りがあり、今回の検討のみでは大規模な検証とはいええず、両腫瘍マーカーの有用性について言及できなかったため、既登録症例については今後も解析を予定したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中面哲也, 第5章がんワクチン がん抗原の同定法と種類、それを用いた免疫療法, 次世代ワクチンの産業応用技術 (神谷齊監修), シーエムシー出版, p213-218, 2010.
- 2) 中面哲也, ペプチドワクチン 国内で臨床試験の行われているペプチドワクチン療法 GPC3 (特集:がん免疫療法の進歩と問題点—ペプチドワクチン療法、抗体療法、細胞療法—), 月刊Mebio 2010年12月号 (vol.27 No.12), メジカルビュー社, p49-55, 2010.
- 3) 中面哲也, 免疫療法 (特集:がん治療の最前線), 理大科学フォーラム2010年11月号, 東京理科大学, p32-35, 2010.

2. 学会発表

- 1) 肝細胞がん免疫療法で立ち向かう、中面哲也 ランチョンセミナー6、第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (仙台)、2010年5月26~28日
- 2) Glypican-3-derived peptide vaccine therapy for cancer. (Workshop 3:The present status and the future perspective in cancer vaccine) Tetsuya Nakatsura. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (第9回アジア臨床腫瘍学会学術集会) (岐阜)、2010年8月25~27日
- 3) 肝細胞癌における血清腫瘍マーカーとしての Glypican-3の有用性、鈴木史朗、土原昌巳、齋藤由美、熊田卓、中面哲也 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 (大阪)、2010年9月21日
- 4) 国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み、中面哲也 第7回DIA日本年会 (東京)、2010年10月28~29日
- 5) Glypican-3を標的としたがんワクチン、中面哲也 シンポジウム20「がん免疫療法」第48回日本癌治療学会学術集会 (京都)、2010年10月28~30日
- 6) 国立がん研究センター東病院におけるがんペ

ブチドワクチン療法臨床試験の経験から、中面哲也 日本がん免疫学会緊急シンポジウム「がんワクチン治療の現状と臨床」（東京）、2010年10月30日

- 7) 肝がんの免疫療法、中面哲也 特別企画【最近の話題】1、第38回日本肝臓学会東部会（東京）、2010年12月2～3日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

腫瘍マーカーAFP・高感度 AFP-L3%・PIVKA-IIによる肝細胞癌の発癌予測

研究分担者 豊田 秀徳 大垣市民病院 消化器科 医長
研究協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長

研究要旨

本研究は現在日常臨床で使用されている肝細胞癌の腫瘍マーカーである AFP・AFP-L3%および PIVKA-II の肝細胞癌診断前の値を検討することにより各腫瘍マーカーに肝細胞癌の発癌予測の可能性を検討した。さらに AFP-L3%については、最近新しく開発された高感度化測定法による値を用いてその可能性を評価した。結果として、AFP・PIVKA-II による肝細胞癌診断 1 年前の発癌予測は困難であったが、高感度化 AFP-L3%では診断 1 年前の上昇により肝細胞癌の発癌予測の可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌（HCC）の 3 つの腫瘍マーカーAFP・AFP-L3%・PIVKA-IIは、HCC 患者の日常診療に広く使用されている。しかしながら、HCC 発癌前のサーベイランスにおけるその有用性は確立されているとはいえない。今回これらの腫瘍マーカーの発癌予測における有用性を検討した。また AFP-L3%については HCC に対する特異性が高いものの従来の測定法では測定感度が不足しており、かつ AFP 低値例での AFP-L3%の測定は困難であった。今回の検討では AFP-L3%は新しく高感度化された AFP-L3%の測定法を用いて評価した。

B. 研究方法

2001 年 1 月～2009 年 12 月の 9 年間に当院で診断された初発 HCC は 796 例であった。このうち B 型肝炎ウイルス（HBV）または C 型肝炎ウイルス（HCV）に感染しており、かつ診断時の腫瘍が 3cm 以下・3 個以下であり、診断 3 年以上前から当院にて follow-up されていたのは 114 例であり、さらに HCC の診断から 1 年前・2 年前・3 年前および HCC 診断日の血清検体が保存されていた HCC 症例 104 例を対象とした。コントロール症例（非 HCC 症例）としては、2001 年 1 月～2009 年 12 月の 9 年間に当院で経験した HBV または HCV 感染症例 2830 例中、3 年以上経過観察して HCC の発生がみられなかった 1100 例からプロペンシティブ・スコアにより 104 例を選抜し、最終観察日より 1 年前・2 年前・3 年前の血清検体を用いた。AFP・AFP-L3%・PIVKA-II の測定は、全自動蛍光免疫測定装置 ミュータスワコー i30 を使用した。

[倫理面への配慮]

なお検討は、施設の IRB の承認のもとに施行した。また検討は匿名化により本人が同定できないよう

に行い、保存血清の測定および臨床データの使用に関しては本人の同意を得た。

C. 研究結果

HCC 症例とコントロール症例各 104 例の臨床背景を比較では、年齢・性別・成因（感染ウイルス）・Child-Pugh 分類による残存肝機能・ALT 値・血小板数いずれにも有意差は認められなかった。また HCC 症例 104 例においては平均腫瘍径は 1.9 ± 0.6 cm、腫瘍個数は単発例 72 例（69%）・多発例 32 例（31%）であり、Stage 分類は Stage I・II・III はそれぞれ 49 例（47%）・41 例（39%）・14 例（14%）であった。

HCC 症例 104 例において AFP と PIVKA-II の HCC 診断日の値は、その 1 年前の値から有意に上昇しており（ $p=0.0062$ および $p=0.015$ ）、一方 AFP と PIVKA-II の 1 年前の値は 2 年前・3 年前の値と有意差を認めなかった（ $p=0.5615$ および $p=0.3652$ ）。すなわち AFP や PIVKA-II では 1 年以上前での HCC の発癌予測は困難であると考えられた。高感度 AFP-L3%の値は診断日と 1 年前の値とで有意差がみられなかったが（ $p=0.072$ ）、診断日および 1 年前の AFP-L3%の値は 2 年前・3 年前の値からは有意に上昇していた（診断日 vs. 2 年前： $p=0.0022$ 、診断日 vs. 3 年前： $p=0.0031$ 、1 年前 vs. 2 年前： $p=0.0227$ 、1 年前 vs. 3 年前： $p=0.039$ ）。すなわち HCC の診断の 1 年前の時点で高感度 AFP-L3%はすでに上昇しており、1 年前の時点での HCC 発癌予測が可能であることが示唆された。さらに AFP 濃度による層別化を行い、過去 3 年間で AFP が常に 10ng/mL 未満であった HCC42 症例とコントロール 67 症例において高感度 AFP-L3%の診断に対する評価を行った結果、cut-off を 7%とした場合、診断 1 年前の時点での AFP-L3%の HCC 診断に対する感度は 31.7%、特異度は 77.3%であった。一方 HCC 診断 1 年前の高感度 AFP-L3%と診断

時の腫瘍因子を比較した結果、腫瘍径・腫瘍個数・Stage 分類での比較で高感度 AFP-L3%に有意な差は見られなかった。

D. 考察

肝細胞癌患者の多くはその背景に肝硬変を有しており、これにより治療が制限される。このため肝細胞癌の早期発見と早期の適切な治療は重要と考えられる。ウイルス肝炎患者や肝硬変患者のような肝細胞癌発癌の高危険群と考えられる患者に対しては従来からサーベイランスの重要性が強調されてきた。現在まで、肝細胞癌のサーベイランスは主に腹部超音波・CT・MRIなどの画像検査によっているが、サーベイランスを必要とする症例数は膨大であり、採血等によりさらに発癌の超高危険群を同定することは火急の課題であると考えられている。

今回の検討では、診断1年前の高感度 AFP-L3%の上昇により腫瘍径が平均 1.9±0.6 cm と微小な HCC104 症例において HCC 発癌予測が可能であると考えられた。さらに AFP 濃度が 10 ng/ml 未満の症例においても、AFP-L3%の高感度化測定法により診断の1年前から高率にその上昇が認められた。画像診断において HCC の存在が確認されなくても、AFP-L3%の上昇が認められた症例は近い将来に HCC 発癌が疑われるため、発癌の超高危険群として慎重な観察が望まれるものと考えられた。しかしながら、特異度は高いもののその感度は高いとはいえず、腫瘍マーカーによるより正確な発癌予測のためには、AFP-L3%と AFP もしくは PIVKA-II との組み合わせや新規腫瘍マーカーの開発を含めた更なる検討が必要であると考えられた。また診断前の AFP-L3%値の上昇が、画像で捉えられないごく微小な肝細胞癌からの産生によるのかなど、その上昇のメカニズムについても今後解明が必要であると考えられる。

E. 結論

肝細胞癌の診断1年前の時点において高感度 AFP-L3%の上昇が認められた。高感度 AFP-L3%値が上昇している症例は肝発癌の超高危険群として慎重な観察が望まれるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Atsumi H, Takagi M, Arakawa T, Fujimori M. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection who have normal alanine aminotransferase values. *J. Med. Virol.* 82(4):539-545, 2010.

- 2) Yasuda E, Kumada T, Toyoda H, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Yoshimi N, Kozawa O. Evaluation for clinical utility of GPC3, measured by a commercially available ELISA kit with Glypican-3 (GPC3) antibody, as a serological and histological markers for hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* 40(5): 477-485, 2010.
- 3) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol. Int.* 60(5): 351-357, 2010.
- 4) Kudo M, Hatanaka K, Kumada T, Toyoda H, Tada T. Double-contrast ultrasound: a novel surveillance tool for hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 106(2): 368-370, 2011.
- 5) Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* in press.
- 6) Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kaneoka Y, Maeda A, Kanke F, Satomura S. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/mL. *Cancer. Sci.* in press.
- 7) Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, Maeda A. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are associated with post-operative recurrence and survival of patients with HCV genotype 1b-associated hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* in press.
- 8) Kumada T, Toyoda H, Arakawa T, Sone Y, Fujimori M, Ogawa S, Ishikawa T. Evolution of hypointense hepatocellular nodules observed only in the hepatobiliary phase using Gd-EOB-DTPA enhanced magnetic resonance imaging. *Am. J. Roentgenol.* in press.
- 9) 多田俊史、熊田 卓、桐山勢生、豊田秀徳 生存分析からみた進行肝細胞癌に対するソラフェニブ投与例の検討 *肝臓* 51(11): 684-685, 2010.

- 10) 小川定信、川地俊明、船坂佳正、石川照芳、熊田卓、豊田秀徳、曾根康博【肝臓のEOB・プリモビスト造影MRI 本検査を有効に活用するための理解すべき課題】肝細胞癌 肝細胞造影相で hypointensity を呈する乏血性結節（非濃染結節）のリスクについて 日独医報 55(2): 151-158, 2010.
- 11) 前田敦行、磯谷正敏、金岡祐次、高橋 祐、熊田卓、豊田秀徳、内山 良【肝癌治療とDPC】診断群包括評価（DPC）時代の肝細胞癌肝切除 消化器内科 51(3): 292-297, 2010.
- 12) 多田俊史、熊田卓、豊田秀徳、桐山勢生、竹島賢治、小川定信、乙部克彦、中野雅行 肝細胞癌の診断における perfluorobutane 造影超音波と Gd-EOB-DTPA 造影 MRI の有用性に関する検討 肝臓 51(3): 99-106, 2010.
- 13) 多田俊史、熊田卓、豊田秀徳、桐山勢生、谷川 誠、久永康宏【肝癌診療のアルゴリズム2010】肝癌の診断 肝癌スクリーニングにおける腫瘍マーカー 臨床消化器内科 25(4): 437-442, 2010.
- 14) 豊田秀徳、熊田卓、多田俊史、桐山勢生、谷川 誠、久永康宏、金森 明、藤森将志【早期肝細胞癌の診断ストラテジー】AFP 正常肝細胞癌症例における高感度 AFP レクチン分画による早期肝細胞癌の診断と予後の分別 消化器内科 51(5): 511-517, 2010
- 5) B型肝炎に起因する肝細胞癌の最近の特徴 山本健太、豊田秀徳、他【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 6) 肝特異性造影剤出現による肝細胞癌の治療戦略の変化 熊田卓、豊田秀徳、他【シンポジウム】第14回日本肝臓学会大会（横浜）、2010年10月13～14日
- 7) C型肝炎における高感度AFP-L3測定による肝細胞癌発生の予知 安田 諭、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会（横浜）、2010年10月13～14日
- 8) Gd-EOB-DTPA-MRIによる肝細胞癌治療後の多中心性発生の診断と治療戦略 藤森将志、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会（横浜）、2010年10月13～14日
- 9) C型肝炎に起因する肝細胞癌の変遷とサーベイランスの注意点 安東直人、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会（横浜）、2010年10月13～14日
- 10) 生存分析からみた進行肝細胞癌に対するソラフェニブ投与例の検討 多田俊史、豊田秀徳、他【ワークショップ】第38回日本肝臓学会東部会（東京）、2010年12月2～3日
- 11) Gd-EOB-DTPA造影MRIにおける非濃染結節の血管造影下CTにおける評価 三浦絵美梨、豊田秀徳、他【一般演題】第38回日本肝臓学会東部会（東京）、2010年12月2～3日

2. 学会発表

- 1) C型肝炎に起因する肝細胞癌は最近どう変化したか？ 田中達也、豊田秀徳、他【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 2) 肝細胞癌の治療前後における高感度AFP-L3%測定の臨床的有用性の検討 川勝章司、豊田秀徳、他【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 3) 肝細胞癌における高感度AFP-L3%測定の臨床的検討 山本健太、豊田秀徳、他【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 4) 超音波所見により肝細胞癌の肉眼分類の推定は可能か？ 多田俊史、豊田秀徳、他【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

肝細胞がんにおける血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討

研究代表者 中面 哲也 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長
研究分担者 野村 和弘 東京労災病院 院長
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科 准教授
豊田 秀徳 大垣市民病院 消化器科 医長
研究協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長

研究要旨

本研究は、血中循環がん細胞の検出が肝細胞がんの早期診断に寄与するか否かを検証することを目的とする。前研究として、肝細胞がんを含め多がん種において、ウイルスを使用した血中循環がん細胞検出技術が適用可能であることが示された。これを受け、今後、①肝細胞がんの術後再発、および②慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの早期診断を目指し、prospective な検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。

A. 研究目的

血液中に浮遊するがん細胞（血中循環がん細胞：circulating tumor cell：以下、CTC）を検出することは、現在のがん研究における大きなトピックスの一つである。

アデノウイルス由来のがん細胞検出マーカー（OBP-401 オンコリスバイオファーマ株式会社製）を用いて CTC を高感度に検出できる技術がシスメックス株式会社により開発された。大きさのみでがん細胞を捕捉したり、EpCAM などの上皮細胞接着分子に対する抗体を用いる従来の CTC 検出方法と大きく異なり、本技術は多くのがん細胞でテロメラーゼ活性が上昇していることに着目した新技術であり、国内外から大いに注目されている。本技術を用いることにより、がんの血行性転移に関する有益な知見を得ることができれば、微小転移の段階で治療を開始することができるようになり、患者の予後改善に貢献できると期待される。

以上のような背景のもと、我々はシスメックス株式会社と共同し、ウイルスを利用したがんマーカーによる CTC 検出技術を用いて肝細胞がんの早期診断を目指す研究をスタートした。

B. 研究方法

まず、本技術の信頼性と汎用性を確認するため、feasibility study として、多がん種における CTC 検出を確認した。国立がん研究センター東病院を受診した、大腸がん・胃がん・食道がん・膵がん・肝細胞がん・卵巣がん（名古屋大学産婦人科）の Stage

I～IV 期で未治療の症例を登録し、専用採血管に採取した末梢血 7.5ml 中の CTC 検出を行った。検体採取は 1 回のみとし、治療前の CTC 検出率を解析した。

[倫理面への配慮]

本研究は臨床検体を用いた研究であり、国立がん研究センターならびに関連する施設の倫理審査委員会に申請し承認を得た後に実施しており、本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針に従って本研究を実施している。患者に対しては倫理審査委員会で承認された説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認している。また、患者のプライバシー保護には最大の努力を払っている。

C. 研究結果

大腸がん 18 例、胃がん 11 例、食道がん 10 例、膵がん 12 例、肝細胞がん 21 例、卵巣がん 3 例と、全体で 75 例の登録を完了し、43% (32/75) の CTC を検出した。CTC の定義に死細胞染色陽性細胞も含めれば、CTC 検出率は 79% (59/75) であった。肝細胞がんでは、死細胞を含めないと 33% (7/21)、死細胞を含めると 86% (18/21) に CTC を検出した。

D. 考察

本技術は、程度の差はあるものの、大腸がん・胃がん・食道がん・膵がん・肝細胞がん・卵巣がんのいずれにおいても有用な CTC 検出技術であることが示された。

この結果を受けて、CTC が肝細胞がんの早期診断に寄与するか否かを検証する研究として、①肝細胞がんの術後再発、および②慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの早期診断を目指し、prospective な検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。

E. 結論

本技術による CTC 検出法は肝細胞がんにおいても適用可能であった。CTC は肝細胞がんの早期診断に寄与する可能性があり、今後の研究の成果が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.*24(2):521-528, 2010.
- 2) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of β 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 23(5): 1325-1330, 2010.

2. 学会発表

- 1) Prognostic value of postoperative alpha-fetoprotein level on recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yuichiro Kato, Naoto Gotohda, Shinichiro Takahashi, Masaru Konishi, Taira Kinoshita, Tetsuya Nakatsura. AACR 101th Annual Meeting 2010 (Washington,DC), April17-21, 2010.
- 2) 肝細胞癌における血清腫瘍マーカーとしての Glypican-3 の有用性、鈴木史朗、土原昌巳、齋藤由美、熊田卓、中面哲也 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会（大阪）、2010年9月21日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

肝細胞がんの放射線治療（陽子線含む）と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験

研究分担者 河島 光彦 国立がん研究センター東病院 放射線部 医長

研究要旨

本研究は、肝細胞癌（HCC）に対する放射線治療（特に陽子線治療）について、当院での基礎データ解析に基づいた治療適応の拡大と予後の向上を意図して GPC3 ペプチドワクチンを併用する臨床試験プロトコルを作成し、これを実施することを目的とする。昨年度の研究から、76 Cobalt-Gray-Equivalent（CGE）/20 分割の陽子線治療後の標的となった腫瘍の制御率は 90%を超えており、治療前インドシアニン・グリーン滞留率 15 分値（ICG R15%）と、30 CGE 以上が投与された非癌部の体積（V30%）が、陽子線治療後 6 カ月以内に生じる放射線誘発性肝不全の予測因子として重要であることがわかった。今年度は、前回解析の対象以後に治療が開始された 22 例を対象に、ICG R15%と V30%を用いた適応判断と消化管有害事象の予防目的でのスぺーサー挿入の安全性について遡及的に検討した。最終追跡時点で重篤な有害事象は発生しておらず、適応判断とスぺーサー挿入の妥当性が支持された。適格症例での再発予防のための GPC3 の併用効果に関する臨床試験プロトコルを作成し、倫理審査委員会に提出した。

A. 研究目的

切除不能肝細胞癌に対する陽子線治療の効果と安全性に関する遡及的検討。

B. 研究方法

昨年度の研究成果である治療前の ICG R15 と非癌部の V30%を指標とした適応判断の妥当性と、消化管有害事象の軽減のためのスぺーサー挿入の安全性を遡及的に検討した。

[倫理面への配慮]

対象となる HCC に対しては経動脈的（化学）塞栓療法が標準治療であるが、局所制御率は不十分であり、既報での結果より高い局所制御率が期待できる陽子線治療を施行することには意義があると考えられる。予想される効果、有害事象、費用について全例に治療開始前に文書による説明と同意を取得した。

C. 研究結果

22 例の内訳は、男/女=18/4、年齢中央値 72 歳（50~84）、ICG R15%は中央値 15.7（8.4~44.8）、腫瘍径は中央値 48 mm（10~150）であった。2 例で標的体積が消化管に近接していたためスぺーサー挿入を行った。スぺーサーの材料は大綱 1 例、ゴアテックスシート 1 例であった。

全例で治療に関連する重篤な有害事象なく治療が完遂できた。局所制御率、生存率については、観察期間が短いため引き続き経過観察を継続する予定である。

D. 考察

現在経動脈的（化学）塞栓術が標準と考えられる本症例群において、ICG R15%と V30%を用いた症例選択と消化管有害事象を避けるためのスぺーサー挿入は妥当であることが示唆された。これによりきわめて良好な局所制御率が期待できる陽子線治療と、GPC3 による再発予防との相乗効果が期待できるような臨床試験の対象が明らかとなり、プロトコルを作成して倫理審査委員会に提出中である。

E. 結論

ICG R15%と V30%は、HCC に対する陽子線治療の適応判断に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawashima M, Kohno R, Nakachi K, Nishio T, Mitsunaga S, Ikeda M, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Arahira S, Zenda S, Ogino T, Kinoshita T. Dose-volume histogram analysis of the safety of proton beam therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.* in press.

2. 学会発表

- 1) 肝細胞癌に対する陽子線治療の遡及的検討、河島光彦、第48回日本癌治療学会（京都）、2010年10月26日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新規癌関連抗原 CDC45L を標的とした癌免疫療法の開発

研究分担者 西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 教授

研究要旨

我々は従来の研究により、ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析が、腫瘍抗原の探索に有用であることを報告してきた。本年度は、同解析法により理想的な発現特異性を示す肺癌組織に高発現する新規癌関連遺伝子として、cells division cycle 45-like (CDC45L) を同定した。CDC45L は非小細胞肺癌および小細胞肺癌に高頻度に高発現していた。さらに、CDC45L は蛋白質レベルでも癌部において高発現していたが、精巣以外の正常臓器には、ほとんど発現は認められなかった。この CDC45L が癌免疫療法の標的となりうるか否かを検討することを目的として、HLA-A24 (A*24:02) 結合モチーフをもつ、CDC45L 由来のペプチドを 16 種類合成した。これらのペプチドを、健常人および肺癌患者の末梢血単核球由来の樹状細胞に負荷して CD8 陽性 T 細胞を刺激することにより、CDC45L 特異的 CTL を誘導可能な 3 種類のペプチドを同定した。誘導された CTL は、CDC45L 特異的かつ HLA-A24 拘束性に癌細胞を傷害した。さらに、CDC45L を高発現するヒト肺癌細胞株を生着させた nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) マウスに CDC45L 特異的 CTL を養子移入することにより、肺癌細胞株の *in vivo* における増殖が著明に抑制された。以上より、CDC45L は肺癌に対する免疫療法の標的抗原として有望であることが示唆された。

A. 研究目的

肺癌による死亡率は、本邦において男女とも増加の一途にあり、1993 年以降は男性の死亡率では悪性腫瘍の中で第一位を占める疾患である。また、新規抗癌剤の開発により、その予後はわずかに改善されているのみであり、5 年生存率は 10-15% と予後不良であることから、現在の標準治療（外科的切除、抗癌剤治療、放射線治療）のみでは不十分である。このため、肺癌に対する新たな治療法の確立は急務である。

一方、我々はゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析が腫瘍抗原の探索に有用であることを報告してきた。さらに、これらの方法で同定した抗原の一部をターゲットにした抗腫瘍免疫療法の臨床試験を、すでに開始している。

本研究では第一に、肺癌を対象として cDNA マイクロアレイ解析を用いた癌細胞と正常細胞における遺伝子発現の網羅的解析を行い、肺癌細胞において高発現し、正常細胞には発現が低い新規癌関連遺伝子を同定することを目的とした。第二に、同定した癌関連抗原を標的として、肺癌の免疫療法を開発することを目的とした。

肺癌細胞を特異的に傷害する HLA 拘束性 CTL を、癌関連抗原由来ペプチドで誘導する際に、どの HLA を対象とするかが重要となる。HLA-A24 (A*24:02) は日本人において最も頻度の高い HLA 対立遺伝子の一つであり、HLA-A24 拘束性の CTL

を誘導できる CTL エピトープの同定は、日本人の癌患者にとって有益となる可能性がある。そこで、免疫原性の高い新規癌関連抗原由来ペプチドを同定するにあたり、本研究では HLA-A24 拘束性の CTL を誘導できるペプチドを同定することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. 健常人および肺癌患者の末梢血単核細胞 (PBMC) からの CDC45L 反応性 CTL の誘導

まず全血より Ficol1 比重遠心法にて PBMC を分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec 社) を用いて CD8 陽性細胞と CD14 陽性細胞を分離して凍結保存した。CD14 陽性細胞を GM-CSF (100 ng/ml) と IL-4 (100 U/ml) を加えた 2% AIM-V メディウムで培養して 5 日目に OK432 (0.1 KE/ml) を加え、さらに 2 日培養して成熟樹状細胞 (DC) に分化させ抗原提示細胞として使用した。CTL の誘導には 2% 自己血清添加 AIM-V メディウムを使用した。この DC に 20 μ M のペプチドと 4 μ g/ml の β 2 ミクログロブリンを加え、2 時間後に 40 Gy の放射線を照射した。細胞を洗浄しペプチドを取り除いた後、24 穴プレートに 1 ウェルあたり凍結保存しておいた 2×10^6 個の CD8 陽性細胞と、ペプチドパルスした 1×10^5 個の DC を加え培養した。第 0 日目に IL-7 (5 ng/ml) を加え、第 2 日目には IL-2 (20 U/ml) を加えた。第 7 日および

第 14 日に同じドナー由来の PHA ブラスト細胞を準備し 20 μ M のペプチドを加え、2 時間後に 100 Gy の放射線を照射した。CD8 陽性細胞を AIM-V で 1 回洗浄後、PHA ブラスト細胞で再刺激した。この際翌日に IL-2 (20 U/ml) を加えた。第 20-21 日目に IFN- γ ELISPOT assay あるいは 51 Cr 放出試験を行った。

2. 細胞傷害活性の検討

抗原特異的細胞傷害活性の評価は、 51 Cr 放出法による細胞傷害性試験により行った。標的細胞を 51 Cr でラベルし、96 穴プレートに 1 ウェルあたり 5×10^3 個まき、その 10、20、40 倍の CTL を加え、6 時間後に培養上清を採取し、死細胞より放出された 51 Cr の放射活性を測定した。肺癌細胞を傷害する CTL の抗原特異的反応性の証明、および CTL の誘導に用いたペプチドの癌細胞内でのプロセッシングによる産生と、HLA-A24 と抗原ペプチドの複合体の癌細胞表面への提示を検討するために、CDC45L と HLA-A24 を共に発現している肺癌細胞株、CDC45L 特異的 small interfering (si) RNA にて CDC45L をノックダウンした肺癌細胞株、ならびにコントロール siRNA にて処理した肺癌細胞株を用いて、これらに対する CTL の細胞傷害活性を検討した。

3. 養子免疫療法モデル

6 週齢のメスの NOD/SCID マウスをチャールズリバー社より購入し、熊本大学の Center for Animal Resources and Development (CARD) にて SPF 環境下で飼育した。まず、ヒト肺癌細胞株 Lu99 3×10^6 個を NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。Lu99 が腫瘍を形成し、その大きさが約 25 mm² になったところで、 4×10^6 個の CDC45L 特異的な CTL 株をマウスの尾静脈より投与した。コントロールとして、HLA-A24 に結合性を有する HIV 由来ペプチド (ILKEPVHGV) で誘導した CD8 陽性 T 細胞株、あるいは PBS のみをマウスに静脈内投与した。移植後 7 日目と 14 日目に 2 回、各 CTLs を投与し、その後週 2 回腫瘍の大きさ (長径 \times 短径) を測定した。

[倫理面への配慮]

本研究において、ヒト血液検体および DNA を用いた研究に際しては、熊本大学医学薬学研究部の一般ならびにゲノム倫理委員会の承認を経た後に実施した。健常人は HLA-A24 (A*24:02) 陽性もしくは HLA-A2 (A*02:01) 陽性のボランティアからインフォームドコンセントを得た後に採取した。癌患者からの血液サンプルは、熊本大学外科にて治療中の癌患者からインフォームドコンセントを得た後に採取した。各患者が HLA-A24 を有しているか否かは、PBMC を抗 HLA 抗体と FITC 抗マウ

ス IgG 抗体により間接蛍光染色し、フローサイトメトリー (FACSscan, Becton Dickinson) ならびに HLA の DNA レベルでのタイピング法を用いて検討した。癌組織および非癌部組織についても同様に、インフォームドコンセントを得た後に採取した。全ての患者サンプルは、符号をつけて匿名化し、実験時まで -80 $^{\circ}$ C で保管し、その後使用した。

マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護管理基本指針に従って、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

1. cDNA マイクロアレイ解析を用いた腫瘍関連抗原遺伝子の選定

肺癌患者 18 例の癌部と非癌部の RNA をそれぞれ抽出し、27,648 種類の遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行った。そのうち、非癌部より癌部で 5 倍以上発現が増加している遺伝子として CDC45L に着目した (表 1)。CDC45L 遺伝子は小細胞肺癌 12 例全例において、非癌部と比して癌部で 5 倍以上の高発現を認め、癌部の非癌部に対する比の平均は約 163,000 倍と非常に高値であった。また、非小細胞肺癌 6 例中 4 例においても癌部において 5 倍以上の高発現を認め、癌部の非癌部に対する比の平均は約 15,000 倍と高値であった。さらに、同様の手法で肺癌以外の様々な癌種におけるこれらの遺伝子の発現を解析すると、CDC45L は乳癌や膀胱癌でも高発現を認めた (表 1)。

表 1 ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析による多様な悪性腫瘍における CDC45L 遺伝子の発現解析

腫瘍組織	陽性率*		発現比の平均値
	n	(%)	
小細胞肺癌	12/12	100	163,000
乳癌	6/8	75	8,700
膀胱癌	9/13	69	3,600
非小細胞肺癌	4/6	67	15,000
食道癌	4/25	16	2,400

*発現比 (癌部/非癌部) > 5 を陽性とした。

2. 正常組織における CDC45L mRNA の発現解析

23 種類の成人正常組織における CDC45L 遺伝子発現をノザンプロット法 (図 1) にて解析した。その結果、精巣以外の正常組織にはほとんど CDC45L 遺伝子の発現は認められなかった。以上より、CDC45L は肺癌細胞において高発現し、正常臓器には、ほとんど発現していないことを確認した。

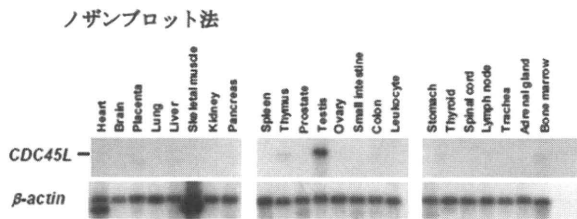


図1 ヒト正常組織におけるCDC45Lの発現解析

3. HLA-A24 陽性の健常人あるいは癌患者の PBMC からの CDC45L 特異的 CTL の誘導

ヒト CDC45L のアミノ酸配列の中から、特定の HLA に結合するペプチドの構造モチーフ探索データベース BIMAS ソフトウェアプログラム (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) を用いて、HLA-A24 (A*24:02) に高親和性を示すと推定される 9 個あるいは 10 個のアミノ酸により構成される CDC45L ペプチドを、binding score の高いものから 16 種類選択した。

これら 16 種類の CDC45L ペプチドを用いて、HLA-A24 陽性の健常人あるいは癌患者の PBMC から、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。HLA-A24 陽性のドナーより得られた PBMC から CD8 陽性細胞を分離し、CDC45L-A24-2₁₀₉₋₁₁₇、CDC45L-A24-3₂₉₄₋₃₀₂ あるいは CDC45L-A24-4₅₅₆₋₅₆₄ ペプチドを負荷した自己の DC で 1 回刺激し、1 週毎にペプチドを負荷した PHA ブラストで 2 回追加刺激して CTL を誘導した。これらの CTL は、CDC45L および HLA-A24 を発現しているヒト肺癌細胞株 Lu99 および EBC-1 に対して強い細胞傷害活性を示したが、siRNA にて CDC45L をノックダウンした細胞株に対する細胞傷害活性は著明に抑制された。一方、コントロール siRNA で処理した細胞に対する細胞傷害活性は抑制されなかった (図 2)。

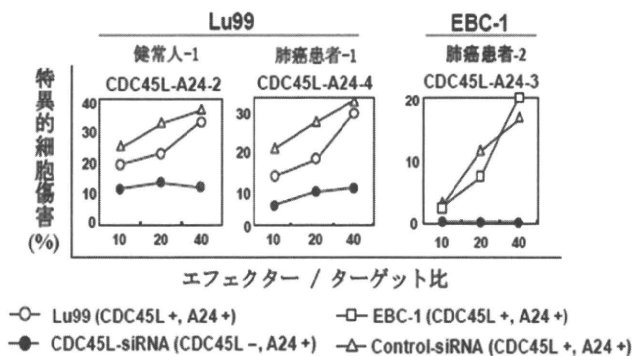


図2. 健常人および肺癌患者における、CDC45L特異的CTLの誘導

4. NOD/SCID マウスにおける CDC45L 特異的 CTL の養子免疫による、*in vivo*における抗腫瘍効果

NOD/SCID マウスに CDC45L を発現する HLA-A24 陽性ヒト肺癌細胞株 Lu99 を皮下接種して生着さ

せた後に、CDC45L-A24-2₁₀₉₋₁₁₇、CDC45L-A24-3₂₉₄₋₃₀₂ および CDC45L-A24-4₅₅₆₋₅₆₄ ペプチドの混合ペプチドで刺激して誘導したヒト CTL 株を、尾静脈より静脈注射にて養子免疫した。HIV 蛋白由来のペプチドで刺激した CD8 陽性 T 細胞株投与群、あるいは PBS のみの投与群をコントロールとして用いた。NOD/SCID マウスに生着した Lu99 細胞が形成した腫瘍の大きさの経時的変化を図 3 に示す。CDC45L のエピトープペプチドで誘導した CTL 株を養子免疫した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは PBS のみを投与した群と比較して、有意に腫瘍の増殖抑制が観察された。

D. 考察

本研究において我々は、肺癌における cDNA マイクロアレイ解析により、肺癌に高発現する新規腫瘍関連抗原として CDC45L を同定した。さらに、HLA-A24 拘束性の CDC45L 抗原特異的 CTL を誘導可能な CDC45L ペプチドを 3 種類同定した。

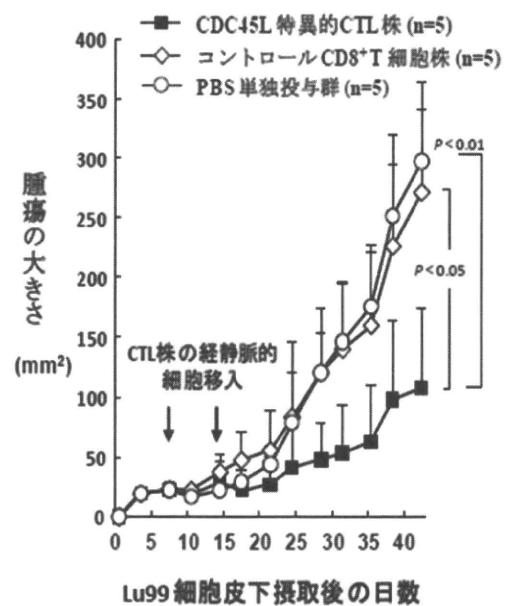


図3. NOD/SCIDマウスを用いた、CDC45L特異的CTL株の養子免疫による、*in vivo*における抗腫瘍効果の検討

腫瘍関連抗原を腫瘍免疫療法に利用するにあたり、腫瘍抗原が免疫系からの逃避が起こりにくい抗原であること、つまり癌細胞の悪性形質転換、細胞増殖に重要な役割を担っている分子で、癌細胞がその発現を失うと癌の悪性形質を失ってしまうようなものが望ましい。CDC45L は DNA ヘリカーゼの構成因子の一つで、DNA の複製開始および DNA 伸長に必要不可欠であるとされる。そのため、CDC45L の発現はヒト体細胞ではほとんど発現せず、癌細胞で高発現し増殖マーカーとして有用であることが報告されている。また、CDC45L を

ノックダウンすることにより癌細胞増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されることが報告されている。これらの報告より、CDC45Lは癌細胞の増殖、生存に重要な役割を果たしていると言える。さらに本研究において、CDC45Lは精巣以外の成人臓器にはほとんど発現を認めないことを確認した。これは、CDC45Lを標的とする腫瘍免疫療法を行うにあたって、正常組織に対する自己免疫現象を伴うことなく癌組織のみを傷害することができることを示唆する。

以上の結果より、新規癌関連抗原 CDC45Lは、肺癌の免疫療法の標的として有用である可能性が示唆された。

E. 結論

cDNA マイクロアレイ解析を用いて、肺癌における新規腫瘍関連抗原として CDC45L を同定した。CDC45L 由来のペプチドで HLA-A24 に結合し、健常人および肺癌患者の末梢血から CDC45L 特異的 CTL を誘導できるペプチドを 3 種類同定した。さらに、誘導した CTL は、*in vitro* および *in vivo* において、抗原特異的かつ HLA-A24 拘束性に腫瘍細胞を傷害できることが示された。以上より、CDC45L 抗原ペプチドは肺癌の免疫療法に応用できる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita Y, Imai K, Senju S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Shiraishi K, Mori T, Daigo Y, Tsunoda T, Ito T, Nomori H, Nakamura Y, Kohroggi H, Nishimura Y. A novel tumor-associated antigen, cell division cycle 45-like can induce cytotoxic T lymphocytes reactive to tumor cells. *Cancer Sci*. 2011 in press.
- 2) Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tomita Y, Tsunoda T, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2011 in press.
- 3) Tomita Y, Harao M, Senju S, Imai K, Hirata S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Mori T, Nomori H, Kohroggi H, Nishimura Y. Peptides derive from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. *Cancer Sci*. 102: 71-78, 2011.

- 4) Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int J Cancer*. 127: 1393-403, 2010.

2. 学会発表

- 1) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDC45L の同定、西村泰治 (他 12 名) 第 55 回人類遺伝学会(埼玉)、2010 年 10 月 27~30 日
- 2) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介 (他 13 名) 西村泰治 第 69 回日本癌学会学術総会(大阪)、2010 年 9 月 22~24 日
- 3) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDC45L の同定、富田雄介(他 11 名) 西村泰治 第 19 回日本組織適合学会(東京)、2010 年 9 月 17~19 日
- 4) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介 (他 13 名) 西村泰治 14th international congress of immunology(神戸)、2010 年 8 月 22~27 日
- 5) Identification of a novel tumor-associated antigen, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cystein), as a target for immunotherapy of gastric, colorectal, and pancreatic cancers. 林田裕希 (他 12 名) 西村泰治 14th international congress of immunology (神戸)、2010 年 8 月 22~27 日
- 6) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介 (他 13 名) 西村泰治 第 14 回日本がん免疫学会総会(熊本)、2010 年 7 月 22~23 日
- 7) 理想的ながん抗原を標的とするがん免疫療法の開発 西村泰治 第 14 回日本がん免疫学会総会 総会長講演 (熊本)、2010 年 7 月 22~23 日
- 8) がん免疫療法：基礎から臨床への橋渡し研究 西村泰治 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 教育講演 (熊本)、2011 年 1 月 27~28 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の基礎研究ならびに *in vivo* 試験

研究代表者 中面 哲也 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長

研究要旨

本研究は、より多くの患者に適応できる簡便で質の高いがん抗原特異的 CTL 細胞移入療法の開発を目的として行った。新規 CTL 誘導法により、簡便な方法で約 50ml の採血量から細胞移入療法を行う数の CTL を誘導することが可能となった。細胞の増加率には個人差がみられたが、培養前の PBMC の情報から培養後得られる CTL 数を予測出来る可能性が見込まれた。NOD/Scid マウスを用いた *in vivo* 試験において、GPC3 特異的 CTL と $\gamma\delta$ T 細胞、それぞれに起因する抗腫瘍効果が確認された。また、これまでに樹立した GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を単離しており、TCR 遺伝子導入細胞移入療法へ向けた検討も行っている。

A. 研究目的

がん患者に対する抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 療法の臨床応用を目指し、ペプチド特異的な CTL を効率良く誘導する培養方法を確立すること、及び、NOD/Scid 等の免疫不全マウスを用いたマウスモデル系の構築を通し、ペプチド特異的 CTL のがんに対する治療効果をマウスモデル系で実証することを目的とした。

B. 研究方法

GPC3 ワクチン投与患者末梢血単核球 (PBMC) を使用し、新規 CTL 誘導法により GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導した。誘導された CTL を Dextramer アッセイにより評価した。NOD/Scid マウス 1 匹につき両側に肝癌細胞株 SK-Hep-1/hGPC3 (SK/hG) と SK-Hep-1/vec (SK/vec) を移植し、誘導されたエフェクター細胞を 2 回尾静脈投与し、腫瘍径を測定した。エフェクター細胞としては、CTL クローン、誘導された細胞 (a11)、誘導された細胞中の CD8⁺T 細胞のみ、誘導された細胞から CD8⁺T 細胞を除いた CD8⁻群、コントロールとして PBS を使用した。

[倫理面への配慮]

本研究は国立がん研究センター倫理審査委員会の承認のもと実施しており、研究担当者は、ヘルシンキ宣言に従い研究を実施している。患者に対しては倫理審査委員会で承認された説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認している。また、患者のプライバシー保護には最大の努力を払っている。

さらに動物実験に際しては、動物実験指針を遵守し、動物愛護にも留意して研究を遂行するよう努めている。

C. 研究結果

GPC3 ペプチドワクチン投与患者 7 名 11 検体の少量の PBMC (2×10^6 個) から GPC3 ペプチド特異的 CTL が誘導可能である (1.8×10^5 個 $\sim 6.1 \times 10^7$ 個、増加率: 490 倍 $\sim 170,000$ 倍) ことが確認された。さらに細胞ソーティングにより GPC3CTL クローンの作製に成功しており、細胞傷害活性等の機能評価に用いることができた。*in vivo* 試験において、NOD/Scid マウスの系で CTL の抗腫瘍効果を評価した結果、GPC3 特異的 CTL と $\gamma\delta$ T 細胞、それぞれに起因する抗腫瘍効果が確認できた。また培養前の PBMC の情報から細胞の増え方の予測が可能となる因子の探索を行った。Day0 の *ex vivo* ELISPOT アッセイによる IFN γ 産生細胞数と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。また Day0 の $\gamma\delta$ T 細胞率と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。

D. 考察

これまで *in vitro* での GPC3 ペプチド特異的 CTL の誘導は困難であったが、今回用いたワクチン投与後の患者 PBMC からは、比較的容易に誘導可能であり、GPC3 ペプチドワクチンと CTL 療法を組み合わせた治療により、多くの患者に適応可能になると考えられた。今回行った新規 CTL 誘導法においても、細胞の増加率には個人差があるが、培養前の PBMC から予測できる可能性が見込まれた。今後細胞が増殖しにくい患者に対して細胞が増殖する培養条件を検討し、培養前の予測と至適培養条件を組み合わせるオーダーメイド細胞療法を確立することにより、より多くの患者に適応できる治療につながる可能性があると考えられる。

E. 結論

新規 CTL 培養法により、簡便な方法で約 50ml の採血量で細胞移入療法を行う数の CTL を誘導できる可能性が見込まれた。in vivo 試験において、GPC3 特異的 CTL と γ δ T 細胞、それぞれに起因する抗腫瘍効果が確認できた。細胞の増加率には個人差があるが、培養前の PBMC から予測できる可能性があり、今後さらに検体数を増やし確認を行う。

さらに、別の研究として行っている TCR 遺伝子導入細胞移入療法については、GPC3 ペプチドワクチン投与患者 PBMC から HLA-A2*, GPC3*癌細胞株を傷害し得る GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを複数樹立した。現在、CTL クローンからの TCR 遺伝子のクローニングが完了しており、TCR 遺伝子導入細胞移入療法へ向けた検討を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* in press, 2011.
- 2) 中面哲也, 第5章がんワクチン がん抗原の同定法と種類、それを用いた免疫療法, 次世代ワクチンの産業応用技術 (神谷齊監修), シーエムシー出版, p213-218, 2010.
- 3) 中面哲也, ペプチドワクチン 国内で臨床試験の行われているペプチドワクチン療法 GPC3 (特集:がん免疫療法の進歩と問題点—ペプチドワクチン療法、抗体療法、細胞療法—), 月刊Mebio 2010年12月号 (vol. 27 No. 12), メジカルビュー社, p49-55, 2010.
- 4) 中面哲也, 免疫療法 (特集:がん治療の最前線), 理大科学フォーラム2010年11月号, 東京理科大学, p32-35, 2010.

2. 学会発表

- 1) 肝細胞がん免疫療法で立ち向かう、中面哲也 ランチョンセミナー6、第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (仙台)、2010年5月26~28日
- 2) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン後の患者PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、土原昌巳、白川博文、黒沼俊光、中面哲也 第14回日本がん免疫学会総会 (熊本)、2010年7月22、23日
- 3) Simple and useful ex vivo expansion of antigen-specific CTLs and V γ 9V δ 2 T cells

simultaneously without DCs. Tomiyama M, Takahara M, Yoshikawa T, Sakemura N, Nakatsura T, Nieda M, Maekawa R. 14th International Congress of Immunology (第14回国際免疫学会議) (神戸)、2010年8月22~25日

- 4) Glypican-3-derived peptide vaccine therapy for cancer. (Workshop 3:The present status and the future perspective in cancer vaccine) Tetsuya Nakatsura. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (第9回アジア臨床腫瘍学会学術集会) (岐阜)、2010年8月25~27日
- 5) 国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み、中面哲也 第7回DIA日本年会 (東京)、2010年10月28、29日
- 6) Glypican-3を標的としたがんワクチン、中面哲也 シンポジウム20「がん免疫療法」第48回日本癌治療学会学術集会 (京都)、2010年10月28~30日
- 7) 国立がん研究センター東病院におけるがんペプチドワクチン療法臨床試験の経験から、中面哲也 日本がん免疫学会緊急シンポジウム「がんワクチン治療の現状と臨床」(東京)、2010年10月30日
- 8) 肝がんの免疫療法、中面哲也 特別企画【最近の話題】1、第38回日本肝臓学会東部会 (東京)、2010年12月2~3日
- 9) The Frequency of Glypican-3 Peptide-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Changes after Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yutaka Motomura, Hirofumi Shirakawa, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Mari Takahashi, Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Noriko Sakemura, Manami Shimomura, Kazutaka Horie, Toshiyoshi Fujiwara, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1~3日
- 10) Establishment of High Avidity CTL Clones from PBMCs of Patients Vaccinated with Glypican-3 Peptide. Toshiaki Yoshikawa, Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Hirofumi Shirakawa, Daisuke Nobuoka, Noriko Sakemura, Yutaka Motomura, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1~3日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

iPS 細胞由来の免疫細胞による癌治療

研究分担者 千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 准教授

研究要旨

本研究は、多能性幹細胞由来の樹状細胞およびマクロファージに関する研究の成果を、肝炎・肝癌に対する細胞ワクチンあるいは細胞治療として応用するために必要な技術の開発を行うものである。昨年度の研究では、マウス iPS 細胞に由来する樹状細胞(iPS-DC)に抗原遺伝子を導入し、マウスモデルを用いて細胞ワクチンとしての効果を評価した。今年度は、ヒト iPS 細胞からのマクロファージ(iPS-MP)の作製、および悪性腫瘍に対する細胞療法への応用の可能性について検討を行った。

A. 研究目的

近年、がん細胞表面に発現する分子に特異的な抗体を用いる抗体療法が実用化されている。抗体療法による抗腫瘍効果の機序としては、①補体依存性細胞障害 (CDC)、②細胞依存性細胞障害 (ADCC)、③抗体ががん細胞上の標的機能分子に結合することによる、細胞増殖の停止あるいは細胞死の誘導 等が考えられる。

ADCC は、NK 細胞あるいはマクロファージマウスが抗体が結合した標的細胞を認識し攻撃するものであるが、マウスを用いた研究の結果から、がんに対する抗体療法において主に働くエフェクター細胞は、多くの場合、マクロファージであることが報告されている。抗 GPC3 抗体による肝細胞癌に対する抗体療法の研究も行われており、この研究においても抗 GPC3 抗体療法の作用機序はマクロファージが関与する ADCC であると報告されている (Takai et al. Cancer Biology & Therapy, 8: 930, 2009)。

抗体療法の主な作用機序がマクロファージが関与する ADCC であるとするならば、その成否は、患者体内のマクロファージの数的・質的な状態に大きく左右されるものと考えられる。しかしながら、多くの場合、がん患者の体内に存在するマクロファージは、がんに対する攻撃性を失い、逆にがんの進展を促進する性質を有することが知られている。したがって、抗体療法をより有効な治療法とするために、抗体の投与と同時に強い抗腫瘍活性を有するマクロファージを移入することが有用であろう。さらに効果の高い治療法としては、がん細胞表面抗原に対する抗体を人為的に発現させたマクロファージの移入療法が考えられる。

マクロファージは、樹状細胞と同様に末梢血単球を材料として作製することが可能であるが、患者から得られる単球の数には限りがあるため、細胞治療に必要な細胞数を調整することは困難である。そこで我々は、iPS 細胞由来の樹状細胞(iPS-DC)による

ワクチン細胞ワクチン療法と並行して、がん抗原に対する抗体を発現するマクロファージ(iPS-MP)によるがん治療の研究を行った。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞は、以前に樹立したものを用いた。この iPS 細胞に電気穿孔法を用いて、ヒトの CD20 分子に対する単鎖抗体の発現ベクターを導入した。その後、この iPS 細胞を分化誘導することにより、CD20 分子に対する単鎖抗体を細胞表面上に発現する iPS-MP を作成した。ヒト iPS 細胞からの iPS-MP への分化誘導培養は、以前にヒト ES 細胞を用いて開発した方法に多少の変更を加えた方法により行った。そして、この iPS-MP による、CD20 分子を発現するヒト B リンパ球性白血病細胞株 BALL-1 に対する抑制効果を検討した。in vitro および in vivo において BALL-1 細胞の数を定量化するために、BALL-1 細胞には発光タンパク質であるルシフェラーゼの発現ベクターを導入した。

[倫理面への配慮]

ヒト iPS 細胞の作製ならびに使用研究は、機関内倫理委員会の承認を得た計画に沿って行った。

C. 研究結果

BALL-1 と iPS-MP の共培養を行う実験により、CD20 分子に対する抗体を発現する iPS-MP が BALL-1 を貪食する活性を有していることが判明した。そして、3 日間の iPS-MP との共培養により、BALL-1 細胞数が 1/100 以下に減少することを観察した。

さらに、scid マウスの腹腔内に BALL-1 細胞を移植する実験においても、抗 CD20 抗体を発現する iPS-MP により BALL-1 細胞の生着を阻害できることを観察した。

D. 考察

以上より、腫瘍細胞表面抗原に対する単鎖抗体を発現する iPS-MP による抗腫瘍効果が、in vitro および in vivo の実験により示された。がん治療に用いるためのマクロファージのソースとして iPS 細胞を用いることには、ドナーの負担なく大量の細胞を調整できることに加えて、遺伝的改変により、このようにがんを特異的に攻撃するマクロファージを作製できるという利点があると考えられる。

E. 結論

iPS 細胞は、癌に対する免疫療法を行うための樹状細胞のソースとしてのみならず、癌に対して直接的に抑制効果を発揮するマクロファージを作成するための細胞ソースとしても有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表 (英文・和文)

- 1) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, and Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. Gene Therapy, in press
- 2) Tomita Y, Harao M, Senju S, Imai K, Hirata S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Mori T, Nomori H, Kohrogi H, Nishimura Y. Peptides derived from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. Cancer Science, in press.
- 3) Ikeda T, Hirata S, Fukushima S, Matsunaga Y, Ito T, Uchino M, Nishimura Y, Senju S. Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. J. Immunol. 185(9):5259-5267, 2010.
- 4) Senju S, Matsunaga Y, Fukushima S, Hirata S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells-derived dendritic cells for immunotherapy. Front Biosci. 2: 1520-1527, 2010.
- 5) Chen YZ, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. Int J Immunopathol Pharmacol. 23(1): 165-177, 2010.

- 6) Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. Int. J. Hematol. 91(3): 392-400, 2010.
- 7) Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. Int. J. Cancer. 127(6): 1393-1403, 2010.
- 8) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. The Forkhead Box M1 Transcription Factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. Int. J. Cancer, 126(9):2153-2163, 2010.

2. 学会発表

- 1) iPS 細胞を用いた免疫細胞療法、千住覚、春田美和、松村桂子、松永雄亮、福島聡、入江厚、西村泰治、第 14 回日本がん免疫学会総会シンポジウム、熊本、7 月 22～23 日
- 2) iPS 細胞を用いた免疫細胞療法の開発、千住覚、平田真哉、松吉秀武、松永雄亮、福島聡、池田徳典、入江厚、西村泰治、第 19 回日本組織適合性学会大会シンポジウム、東京、9 月 17～19 日
- 3) iPS 細胞を用いた免疫細胞療法の開発、千住覚、京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成22年度学術講演会、京都、12月17日
- 4) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y, Generation of dendritic cells and macrophages from human iPS cells aiming at application to cell therapy, 14th International Congress of Immunology (ICI2010), Kobe, August 22～27, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法

研究分担者 本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授

研究要旨

血管内皮細胞に分化させた iPS 細胞を取り込ませた樹状細胞でマウスを免疫すると、免疫マウスは線維肉腫 CMS4 細胞の移植を強く拒絶した。この抗腫瘍効果は CMS4 細胞を免疫原として樹状細胞に取り込ませた場合よりも強力で、また、未熟な状態の iPS 細胞を免疫原とするより、血管内皮細胞に分化させた iPS 細胞を免疫原としたほうが明らかに効果的であった。免疫マウスの CD8+T 細胞は血管内皮に分化させた iPS 細胞に反応することが IFN-gamma ELISPOT assay により示された。免疫マウスに形成された小さな腫瘍は潰瘍形成傾向を示し、組織学的に腫瘍血管の形成が著しく不良であることが示された。また、この抗腫瘍効果は腫瘍血管に富む CMS-4 では強く、一方、腫瘍血管に乏しい C26 における効果は弱かった。

A. 研究目的

本研究は iPS 細胞を腫瘍血管内皮細胞に類似した性格を示す細胞に分化させ、この細胞ライセートを取り込ませた樹状細胞で免疫療法を行うことにより腫瘍血管の内皮細胞に対し免疫反応による傷害を誘導して抗腫瘍効果を得ることを目的とした研究である。

B. 研究方法

1) iPS 細胞の血管内皮細胞への分化誘導：用いたマウス iPS 細胞は iPS-MEF-Ng-20D-17 細胞である。血管内皮細胞への分化誘導は Narazaki ら (Circulation, 2008;118:498) の方法に従い、LIF(-), Feeder(-) の状態で collagen IV coated culture dish で未熟 iPS 細胞を 4.5 日培養することにより行った。以後、この iPS 細胞由来血管内皮様細胞細胞を iPS/ET と表現する。

2) 樹状細胞 (DC) ワクチンの作製：BALB/c マウスの骨髄細胞から GM-CSF, IL-4 を用いて DC を誘導した。凍結融解により免疫原とする細胞の lysate を得て DC にパルスした。その後、DC を OK-432 で成熟させ、マウスに一週間隔で 2 回皮下投与した。

3) 抗腫瘍効果の検討：マウスの背部皮下に腫瘍細胞 (CMS4 線維肉腫、BNL 肝癌、C26 大腸癌) を移植し、経時的に腫瘍径を測定した。

4) 免疫誘導能の検討：マウスの脾細胞から magnetic sorting 法により CD8+T 細胞を分離した。iPS 細胞、iPS/ET 細胞、CMS4 腫瘍細胞の lysate をパルスした DC で CD8+T 細胞を刺激し、IFN-gamma 産生を ELISPOT assay により測定した。

5) 腫瘍血管の観察：マウス皮下に形成された腫瘍組織の腫瘍血管の状態を CD31 抗体、 α -SMA 抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。

[倫理面への配慮]

動物実験に際しては本学の動物実験委員会の承認を得て、動物に与える苦痛は最小限となるよう配慮した。

C. 研究結果

1) iPS、または iPS/ET 細胞を直接マウス皮下に接種し、その後マウスに CMS4 腫瘍を移植すると、両群において無処置コントロールマウスに比較し腫瘍発育が有意に抑制された。抗腫瘍効果は iPS より iPS/ET を皮下接種した方が強かった。また、マウスの生存期間も iPS/ET>iPS>Control の順に延長した。最も効果的な iPS/ET の投与量は 10^5 /mouse であった。

2) iPS, iPS/ET, CMS4 の lysate をパルスした DC でマウスを免疫し、その後 CMS4 細胞を皮下移植し腫瘍発育とマウスの生存期間を測定した。腫瘍発生率は control 100%, DC alone 100%, CMS3 pulsed DC 75%, iPS pulsed DC 50%, iPS/ET pulsed DC 25% であった。生存期間も腫瘍発生の低い順に延長していた。

3) iPS, iPS/ET の lysate と OK-432 を混和して皮下接種したが、有意な抗腫瘍効果は得られなかった。

4) 腫瘍を完全に拒絶したマウスの CD8+T 細胞を用いた IFN-gamma ELISPOT assay による検討では、

iPS/ET で免疫したマウスの CD8+T 細胞を iPS/ET lysate でパルスした DC で in vitro 刺激した際に最も強い反応が認められた。しかし、CMS4 lysate を pulse した DC で刺激した際も反応が認められた。

5) iPS/ET で免疫したマウスは完全に腫瘍を拒絶することが多いが、経過中腫瘍が発生するマウスも存在する。このようなマウスは腫瘍径が小さいうちから腫瘍に潰瘍形成が見られた。また、免疫組織化学的検討では iPS/RT 免疫マウスでは CD31 陽性細胞と α -SMA 陽性細胞の配列は不正で腫瘍血管ネットワークの形成が極めて不良であることが認められた。

6) iPS/ET lysate pulsed DC による腫瘍細胞株別の抗腫瘍効果の検討では CMS4 に対する抗腫瘍効果が最も強く、次に BNL 肝癌細胞で、C26 大腸癌の順であった。腫瘍組織における腫瘍血管の発達は CMS4 が最も顕著で、C26 腫瘍組織は 3 者の中で最も腫瘍血管に乏しかった。

D. 考察

iPS/ET をパルスした DC で免疫したマウスは CMS4 腫瘍に対して強い抗腫瘍効果（予防効果）を示し、その効果は CMS4 lysate をパルスした DC による免疫よりも強かった。免疫マウスの CD8+T 細胞は iPS/ET に強く反応すること、免疫マウスに小さく形成された CMS4 腫瘍組織には血管形成が不良であること、腫瘍血管に富む CMS4 の方が腫瘍血管に乏しい C26 に比較して効果が強いことなどから、iPS/ET を免疫原とした樹状細胞療法では腫瘍血管が標的となった免疫反応が誘導され、これに起因する抗腫瘍効果が得られた可能性が示唆された。本治療法が確立されれば、腫瘍血管に富む肝細胞癌に対して本療法が抗腫瘍効果を示すことが期待される。

iPS/ET 免疫マウスでは ELISPOT assay により CD8+CTL は CMS4 腫瘍細胞にも反応していることが示された。これは腫瘍を完全拒絶したマウスの CTL を用いて検討したため、2 次的に獲得した CMS4 に対する免疫反応が示されたのか、または iPS/ET と CMS4 の間に共通抗原性が存在するのか現時点では明らかでない。今後、担癌状態ではないマウスを同様に免疫して解析することにより解明されることが予想される。

iPS/ET を取り込ませた DC の接種は CMS4 に対して強い抗腫瘍免疫を誘導したが、未熟な iPS を取り込ませた場合にも、弱いながら抗腫瘍効果が得られた。現在、iPS と iPS/ET の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析中で、iPS に弱く、iPS/ET に強く発現する遺伝子産物の中から標的抗原が同定されてくる可能性がある。

iPS/ET を用いて腫瘍血管を標的とした免疫反応

が誘導できれば、iPS 細胞を癌治療に使用する新たな方向性が期待できる。特に本研究で免疫原として用いた iPS/ET は lysate として用いられ DC に取り込まれているため、安全性の高い臨床応用が期待される。

E. 結論

iPS 細胞由来血管内皮細胞を免疫原とした樹状細胞療法は、腫瘍血管を標的とした有効な免疫療法となりうる可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表（英文・和文）

- 1) Ito M, Suzuki H, Sagawa Y, Homma S. The identification of a novel Paneth cell-associated antigen in a familial adenomatous polyposis mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;400(4), 548-553.
- 2) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions, *Clin. Develop. Immunol.* Volume 2010 (2010), Article ID 516768, 14 pages
- 3) Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Komita H, Takahara A, Nagasaki E, Ito M, Sagawa Y, Mitsunaga M, Uchiyama K, Satoh K, Arihiro S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: comparative functional analysis of healthy- versus patient-derived fusions. *Clin. Immunol.* 2010;135(3), 384-400.
- 4) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Okusa T, Gong J, Tajiri H. Antigen-specific polyclonal cytotoxic T lymphocytes induced by fusions of dendritic cells and tumor cells. *J. Biomed. Biotech.* Volume 2010 (2010), Article ID 752381, 12 pages doi:10.1155/2010/752381
- 5) Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Saito S, Homma S, Tajiri H, Zeniya M. Accumulation of functional regulatory T cells in a actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. *Clin. Immunol.* 2010;135(1), 156-166.
- 6) Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK-cell-mediated antitumor

activity via tumor necrosis factor-alpha pathway. J. Immunother. 2010; 33(5), 467-474.

2. 学会発表

- 1) 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム、本間定、高原映崇、小井戸薫雄 ワークショップ【消化器がんにおけるがんワクチン療法に臨床的エビデンスはあるのか】、第 96 回日本消化器病学会総会（新潟）、2010 年 4 月 22～24 日
- 2) 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム、本間定、高原映崇、小井戸薫雄 シンポジウム【癌免疫療法の最前線】、第 19 回日本癌病態治療研究会（東京）、2010 年 6 月 30 日～7 月 1 日
- 3) 抗腫瘍免疫反応により産生されるインターフェロンガンマはゲムシタピン活性化酵素の発現を上昇させる、本間定、佐川由紀子、高原映崇、永崎栄次郎、込田英夫、伊藤正紀、小井戸薫雄 第 69 回日本癌学会学術総会（大阪）、2010 年 9 月 22～24 日
- 4) 臨床応用に向けた樹状細胞と膵癌細胞との融合膵癌ワクチン、小井戸薫雄、本間定、込田英夫、高原映崇、大草敏史、田尻久雄 第 69 回日本癌学会学術総会（大阪）、2010 年 9 月 22～24 日
- 5) 切除不能・再発進行膵臓癌に対するゲムシタピン併用 WT1 ペプチドワクチン療法 第 1 相臨床試験、西田純幸、武田 裕、小井戸薫雄、岡芳弘、込田英夫、本間定、大草敏史、森 正樹、土岐祐一郎、川瀬一郎、田尻久雄、杉山治夫 第 69 回日本癌学会学術総会（大阪）、2010 年 9 月 22～24 日
- 6) 膵癌に対する WT1 ペプチド免疫療法、本間定、小井戸薫雄、込田英夫、高原映崇、大草敏史、西田純幸、武田 裕、岡 芳弘、伊藤壽記、坪井昭博、杉山治夫 パネルディスカッション【WT1 ペプチドがん免疫療法の現状と将来】、第 48 回日本癌治療学会学術集会（京都）、2010 年 10 月 28～30 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表