

201030002B

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と
発症予防ワクチンの開発に関する研究

平成 20～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿	1
II. 総合研究報告	
癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発	5
研究代表者 中面 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

I. 研究班構成員名簿

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と
発症予防ワクチンの開発に関する研究班
(平成 20 年度)

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 機能再生室	室長
研究分担者	木下 平	国立がんセンター東病院 上腹部外科	部長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科	教授
	池田 公史	国立がんセンター東病院 肝胆膵内科	医長
	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野	准教授
研究協力者	西村 泰治	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野	教授

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と
発症予防ワクチンの開発に関する研究班
(平成 21 年度)

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 機能再生室	室長
研究分担者	木下 平	国立がんセンター東病院	副院長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科	教授
	池田 公史	国立がんセンター東病院 肝胆膵内科	医長
	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
	河島 光彦	国立がんセンター東病院 放射線部 放射線治療室	医長
	野村 和弘	東京労災病院	院長
	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
研究協力者	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
	本間 定	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	准教授
	熊田 卓	大垣市民病院 消化器科	部長
	藤山 重俊	NTT 西日本九州病院	院長
	児島 辰也	東京労災病院 消化器内科	部長
	溝上 雅史	国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター	センター長

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と
発症予防ワクチンの開発に関する研究班
(平成 22 年度)

区分	氏名	所属	職名
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 がん治療開発部 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
	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
	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
	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
	河島 光彦	国立がん研究センター東病院 放射線部	医長
	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

Ⅱ. 総合研究報告

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発

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

肝がんは依然として予後不良であり、治療成績を上げるためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法に加えて予防法の開発、確立が急務である。本研究の3年間の成果を以下に示す。

(1)HCC 根治的切除後の再発予知における術後 AFP 値の有用性を示した。肝細胞がんの術後再発、および慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの超早期診断を目指して前向きに検体収集を行い、AFP、AFP-L3 分画、DCP、 β 2-ミクログロブリン、GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体について経時的変化を解析した。現在までの解析例は経過観察期間が短い中で再発、発がんを来した症例群であり、マーカー挙動につき論じるには不適切な症例が多く含まれたが、その中でも再発例 15 例中 2 例に DCP の経時的変化が再発の早期診断に有用な可能性が示された。一方、後ろ向きの大量検体を用いた検討では、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。(2)肝細胞がんにおいて、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、前向きな検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。(3)進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験により、GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。(4)治療前インドシアニン・グリーン滞留率 15 分値 (ICG R15%) と、30 Cobalt-Gray-Equivalent (CGE) 以上が投与された非癌部の体積 (V30%) は、切除不能 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た。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パ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、適応判断とスパ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 の併用効果を確認する臨床試験プロトコールを作成し、倫理審査委員会に提出した。(5)ペプチドワクチン投与患者 PBMC から GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、GPC3 陽性癌細胞株を傷害しうることを示した。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 γ δ 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。(6) iPS 細胞は、がん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、がん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。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。

本研究の成果により、我が国に 350 万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がんの発症抑制、肝がんの治療成績の向上等が期待される。

研究分担者

野村 和弘	東京労災病院 院長	小井戸薫雄	東京慈恵会医科大学 准教授
藤山 重俊	NTT 西日本九州病院 院長		慈恵医大附属柏病院消化器・肝臓内科
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	河島 光彦	国立がん研究センター東病院 放射線部 医長
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	豊田 秀徳	大垣市民病院 消化器科 医長
本間 定	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授	木下 平	国立がん研究センター東病院 副院長
		古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 教授

池田 公史 国立がん研究センター東病院
肝胆腫瘍科 副科長

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

A. 研究目的

肝炎研究7ヵ年戦略にあるように、肝がんは依然として予後不良であり、肝がんの治療成績を上げるためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法に加えて予防法の開発、確立が急務である。本研究は肝細胞がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発を主な目的とし、肝細胞がんの新規免疫細胞療法の開発も目指す。具体的には、(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発、(2)肝細胞がんのワクチンの開発、(3)CTL療法の開発、(4)ES-DCワクチン及び細胞療法の開発の4つの研究テーマを掲げている。本研究の成果により、我が国に350万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がんの発症抑制、肝がんの治療成績の向上等が期待される。

B. 研究方法

[平成20年度]

(1) 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第I相試験

対象と治療

HLA-A24 あるいは-A2 陽性の進行肝細胞がん患者に、HLA-A24 結合性または HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチドを、2週間に1回、計3回投与する。

主要評価項目

①有害事象の種類と発現割合。②免疫学的モニタリングによる特異的免疫反応の誘導の観察。

副次評価項目

①奏効割合(RECIST) ②腫瘍マーカーの推移

プロトコール改訂

ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は3mgまでの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg投与3例、30mg投与3例の計6例を第I相試験に追加して実施した。

(2) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

血清・血漿中 GPC3 および抗 GPC3 抗体、 β 2 ミクログロブリン測定

ELISA 法等を用いて GPC3 および抗 GPC3 抗体の定量的検出と β 2 ミクログロブリンの検出を行う。

免疫学的解析

以下の解析により、末梢血中の GPC3 ペプチド特

異的 T 細胞の頻度を調べる。

1) IFN- γ ELISPOT 解析

2) HLA-GPC3 ペプチド複合体ペンタマーによるフローサイトメトリー(FACS)解析

プロテオーム解析

血清及び血漿に対して、プロテインチップ解析を行う。

(3) Glypican-3 の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである

2001~2002 年、国立がんセンター東病院にて切除された HCC 症例(n=107)を対象とした。切除検体のパラフィンブロックより組織を薄切し(全染色枚数 137 枚) GPC3 免疫染色により HCC 癌部での GPC3 発現を検討した。臨床病理学的情報の収集は当院に保管されている診療録を参考とし、GPC3 染色性と予後および臨床病理学的項目の相関を検討した。

(4) ES 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの開発に関する研究

TAP1 遺伝子欠損 ES 細胞の作製

TAP は、細胞質内でプロテアソームによる分解により産生されたペプチドを MHC クラス I 分子へ負荷させるべく小胞体内へ輸送するペプチドトランスポーターである。TAP 遺伝子を標的破壊した細胞では、抗原ペプチドの供給が断たれるため、細胞表面への MHC クラス I 分子の発現が消失する。このような細胞に細胞外からクラス I 分子と結合親和性を有する合成ペプチドを加えることにより、加えたペプチドと当該クラス I 分子のみを発現する細胞を作成することができると考えられる。

群馬大学の根岸泉博士より、TAP1 遺伝子の標的破壊ベクターの供与を受け、E14ES 細胞(H-2b アリル)において TAP1 遺伝子の標的破壊を行った。さらに、TAP1 欠損 ES 細胞に H-2d ハプロタイプの MHC クラス I 分子(H-2Kd)の遺伝子を導入した。この ES 細胞に由来する ES-DC による、BALB/c マウス(H-2d ハプロタイプ)体内における抗原特異的 T 細胞活性化および抗腫瘍免疫誘導効果を検討した。

β 2-ミクログロブリン(β 2m)遺伝子欠損 ES 細胞の作製

β 2m は、クラス I 分子重鎖と会合する分子であり、この遺伝子を破壊すると全ての MHC クラス I の細胞表面への発現が消失する。米国ハーバード大学の R. Jaenish 博士より、 β 2m 遺伝子が標的破壊されたマウス ES 細胞(H-2b アリル)の供与を受けた。この細胞から、高濃度 G418 選択法によりホモ接合のノックアウト(β 2m^{-/-}) ES 細胞を作製した。さらに、この細胞に、 β 2m を共有結合させた H-2d ハプロタイプの MHC クラス I 分子(H-2Kd)の遺伝子を導入した。そして、TAP1 欠損 ES-DC の場合と同

様に、BALB/c マウス体内における抗原特異的 T 細胞活性化および抗腫瘍免疫誘導効果を検討した。

マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製

京都大学の山中教授よりマウス iPS 細胞の供与を受け、我々がこれまでにマウス ES 細胞を用いて確立してきた分化誘導培養法により、マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製を試みた。

[平成 21 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

・術前・術後の AFP および PIVKA-II の推移と術後再発の関係を retrospective に解析した。

・大垣市民病院にて血清保存がなされていた肝細胞癌 128 例、肝硬変非発癌例 148 例（肝硬変フォロー中 3 年以上非発癌）、肝硬変発癌例 66 例（2005 年以降発癌）の計 342 例を対象として、GPC3 陽性率を比較検討した。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

進行肝細胞がんを対象とした Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了するために、さらに 10mg、30mg 投与を 3 例ずつ追加した。

(3) CTL 療法の開発

ワクチン投与後の患者末梢血単核球(PBMC)を GPC3 ペプチドと IL-2 で刺激し、GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、CTL クローンを作製して機能を解析した。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

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、DVH 解析を用いた適及的検討を行った。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

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。さらに、ヒト iPS 細胞の作成、ヒト iPS 細胞からの iPS-DC の作製、およびヒト iPS-DC の機能評価を行った。

[平成 22 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

2008 年 5 月から 2010 年 12 月までに、国立がん研究センター東病院において 50 例の HCC 根治手術予定患者を術前に登録した。同患者について、術前、術後 1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、以後 3 ヶ月ごとを目安に、画像検査にて再発が確認されるまで血清および血漿の検体採取を行った。

② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーの探索

2009 年 9 月より症例集積を開始し、2010 年 12 月までの間に、東京労災病院および NTT 西日本九州病院において、HBV あるいは HCV 感染を有する CH・LC 患者を登録した。同患者について、外来受診ごとに血清および血漿の検体採取を行い、これを画像検査にて HCC 発がんが確認されるまで継続した。

③ 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に関する研究

2001 年 1 月～2009 年 12 月の 9 年間に大垣市民病院で診断された初発 HCC 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 114 例中、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 年間に大垣市民病院で経験した 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。

(2) 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

国立がん研究センター東病院を受診した肝細胞がん未治療の 21 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。

(3) 肝細胞がんの陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

陽子線治療前の 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パーサー挿入の安全性を適及的に検討した。

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

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。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 (all)、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。

(5) iPS 細胞由来の免疫細胞療法の開発

① ヒト iPS 細胞由来マクロファージ(iPS-MP)療法の開発

ヒト 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後に分分化誘導して、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。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。

② iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発

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ができるか検討した。

[倫理面への配慮]

本研究において、臨床試験や臨床検体を用いた研究は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、研究担当者は、ヘルシンキ宣言に従い臨床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、各施設の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。

ヒト ES 細胞および iPS 細胞の作製あるいは使用を伴う研究について

研究分担者の千住らが実施しているヒト ES 細胞の使用を伴う研究については、熊本大学医学薬学研究部倫理委員会ヒト ES 細胞分科会および、文部科学省ヒト ES 細胞倫理委員会からの承認を得たうえで、文部科学省および熊本大学の各々により策定されている倫理規定を遵守しつつ遂行している。また、ヒト iPS 細胞の作製および使用を行う研究については、熊本大学医学薬学研究部倫理委員会による研究計画の審査・承認を得た上で行っている。

C. 研究結果

[平成 20 年度]

(1) 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験

・1 回 0.3mg 投与から 30mg 投与まで 26 例全例に痒みや痛みを伴わない投与局所の発赤や硬結

を認めた以外、2 例に一過性の異所性の発疹、3 例に一過性の 38 度までの発熱を認めたが、計 26 例の安全性に問題はなかった。

- ・ほぼ全例に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出された。英文誌に報告した我々のマウスでの研究結果と同様、その頻度には投与量依存性が示唆された。実際、ワクチン後のがん組織内に、ワクチンによって CD8 陽性キラー T 細胞が多数浸潤していることが、複数の患者で証明できた。
- ・約 60% の症例において初回ワクチン投与後 2 ヶ月の間に腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認めた。その頻度にも投与量依存性が示唆された。
- ・3.0mg 投与の 6 例には腫瘍マーカーの減少だけでなく、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められた。ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は 3mg までの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg 投与 3 例、30mg 投与 3 例の計 6 例を第 I 相試験に追加して実施した。
- ・初回ワクチン投与 2 ヶ月後の RECIST 基準での評価では約 60% の症例が SD であった。
- ・30mg、3 回投与の 1 例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現した。

(2) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

- ・HLA-A24 あるいは A2 陽性の慢性肝炎・肝硬変患者 47 症例中 10 症例 (21%) の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する CTL の存在が認められた。
- ・その GPC3 ペプチド特異的 CTL 陽性患者血漿中に、SELDI/TOF-MS を用いたプロテオーム解析により、CTL 陰性の患者血漿では低く、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを見つけた。この蛋白は $\beta 2$ ミクログロブリンと考えられ、現在検証を進めている。
- ・我々はこれまでに血清中の GPC3 が肝細胞がんの腫瘍マーカーになることを報告してきたが、その感度は 40-50% である。現在作成中の GPC3 に対する新規抗体を用いて、血清 GPC3 の高感度検出法を確立し、既存の腫瘍マーカー、AFP・PIVKA-II と比較する。
- ・血清中の GPC3 に対する IgG 抗体価の測定も肝細胞がんの診断に有用であることを見出しつつある。

(3) Glypican-3 の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである

全症例の平均観察期間は 3.4 ± 2.0 年であった。HCC における GPC3 免疫染色陽性率は、87 例 (81.3%) であった。術後 5 年生存率は、GPC3 染色陽性群 54.5% に対し陰性群 87.7% であり、有意に陽性群は予後不

良であった(p=0.03)、さらに多変量解析においても、腫瘍個数と肝内転移の有無とともに有意であった(p=0.04)。さらに HCC における GPC3 発現の意義を探るため、GPC3 発現 HCC 組織と発現陰性の組織を用いて網羅的な遺伝子の発現解析を cDNA マイクロアレイにて行い、複数の遺伝子発現の差を認めた。

(4) ES 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの開発に関する研究

β 2-ミクログロブリン(β 2m)遺伝子あるいは TAP1 遺伝子を欠損 ES 細胞から作製した ES-DC は、MHC クラス I 分子の発現を完全に欠損していた。このような ES-DC は、H-2b ハプロタイプを認識するアロ反応性細胞傷害性 T 細胞から認識されなくなった。

β 2m を欠損させ、さらに β 2m-Kd を導入した ES-DC では、H-2Kd のみが発現していた。また、TAP を欠損させ、さらに、Kd を導入した ES-DC に、上述の RSV 由来のペプチドを負荷することにより、Kd のみを細胞表面へ発現させることができた。これらの遺伝子改変 ES-DC に Kd に結合性を有する Respiratory Syncytial Virus (RSV) 由来のペプチドを負荷し、BALB/c マウスに投与することにより、H-2Kd で RSV 特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導することができた。さらに、抗腫瘍免疫応答の誘導も可能であった。

マウス iPS 細胞 (Nanog-selected iPS cells) から、機能的な樹状細胞 (iPS-DC) を作製することができた。iPS 細胞へモデル抗原 (OVA) 遺伝子を導入し、これより OVA 発現 iPS-DC を作製した。OVA 発現 iPS-DC をマウス個体へ投与し、OVA 特異的な免疫応答および腫瘍拒絶効果を誘導することができた。

[平成 21 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

- ・術前、術中診断において根治的切除が施行できたと考えられても、術後 AFP が正常値まで下がりきらない症例が存在し、それらの症例の多くは術後再発をきたすことが確認された。このことから、術後 AFP 陽性例は術前画像検査でとらえられなかったミクロレベルでの腫瘍残存を表している可能性が示唆された。
- ・HCC 早期診断における GPC3 の有用性につき多数症例での検討を実施し、血清 GPC3 の肝細胞がんの超早期診断に対する有用性を示すことができた。現在、慢性肝炎・肝硬変の経過観察中に肝細胞がんを発症した症例を集積中である。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験により、GPC3 を標的と

するペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。

(3) CTL 療法の開発

HLA-A2 患者 3 名、HLA-A24 患者 3 名の合計 6 名から CTL クローンを樹立した。樹立した CTL クローンの GPC3 ペプチド特異性が認められた。樹立した HLA-A2 の CTL クローンは、癌細胞から内因性に提示された GPC3 に由来するペプチドを認識し、細胞を傷害しうることが示唆された。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

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、陽子線治療はきわめて良好な局所制御率と生存率を示した。治療前インドシアニン・グリーン滞留率 15 分値 (ICG R15%) と、30 Cobalt-Gray-Equivalent (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った。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

マウス iPS-DC にモデル抗原として OVA を発現させたものをマウス個体へ投与することにより、OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性化と OVA 抗原特異的な抗腫瘍免疫応答の誘導を行うことが可能であった。

OP9 細胞との共培養による血液細胞への分化誘導法に基づき、ヒト iPS 細胞を樹状細胞およびマクロファージへ分化させることができた。ヒト iPS-DC が、アロ T 細胞に対する刺激能力、抗原提示機能、サイトカイン産生能力など、樹状細胞としての機能を備えていることを確認した。

[平成 22 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

登録 50 症例中 15 例に HCC 再発を認めた。これら 15 例の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。

AFP、DCP、AFP-L3、 β 2-MG の中では、我々が仮説として想定した「理想的なマーカー挙動」を確認できたのは DCP の 15 例中 2 例のみであった。 β 2-MG は経過中の変動が小さく、術前や再発時に上昇していない症例が多かった。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の探索

2010年12月までの経過観察にて、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。

③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に関する研究

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。

(2) 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

肝細胞がん21例のCTCを検討した。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。

(3) 肝細胞がんの陽子線治療とGPC3ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

22例中2例で標的体積が消化管に近接していたためスペーサー挿入を行った。スペーサーの材料は大網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。

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

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が誘導可能であった(1.8×10^5 個~ 6.1×10^7 個、増加率:490倍~170,000倍)。さらに細胞ソーティングによりGPC3CTLクローンを作製し、細胞傷害活性等の機能評価を行った。*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できた。また培養前の*ex vivo* ELISPOTアッセイによるIFN γ 産生細胞数あるいは $\gamma\delta$ T細胞率からDay14のDextramer陽性細胞率の予測が可能であることが示唆された。

(5) iPS細胞由来の免疫細胞療法の開発

①ヒトiPS細胞由来マクロファージ(iPS-MP)療法の開発

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。

②iPS細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発

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 γ 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CMS4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。

D. 考察

[平成20年度]

(1) 30mg、3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現したが、投与局所の反応が3.0mg投与よりも強いことや、著明な効果が見られたのは1例だけということもあり、効果・安全性評価委員会では進行肝細胞がんに対する次相の推奨

投与量を決定できず、さらに 10mg、30mg 投与を 3 ないし 6 例ずつ追加して最終決定する方針にした。根治的治療後の再発予防効果を検証する臨床第 II 相試験の推奨投与量は 3.0mg に決定した。

(2) これまでの研究成果により、肝細胞がんの超早期診断につながる可能性のあるいくつかの方法を得た。

今後は、慢性肝炎・肝硬変の患者の多い東京慈恵会医科大学附属柏病院、東京労災病院、国立国際医療センター国府台病院、大垣市民病院、NTT 西日本九州病院との共同研究により、慢性肝炎・肝硬変の経過観察中に肝細胞がんを発症した症例 15 例を目指して症例を集積し、肝細胞がん発症例が 5 例集積するごとに解析を行う。

(3) GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になりうる可能性がある。GPC3 ペプチドワクチン療法を切除癌部の GPC3 発現陽性症例をハイリスク群とし、治療後再発予防を目的に用いることの有用性を秘めており、GPC3 を標的とした新規抗がん治療の開発にも貢献しうる。

(4) 遺伝的改変により樹状細胞上に発現する MHC クラス I 分子を置換することにより、レシピエントに適合する樹状細胞ワクチンとして使用し、腫瘍拒絶を誘導できることが判明した。また、マウス iPS 細胞から樹状細胞を作製することも可能であり、ES 細胞を用いて開発してきた技術は、iPS 細胞へも応用可能と予想される。以上の成果は、ES 細胞あるいは iPS 細胞から作製した人工樹状細胞による抗腫瘍ワクチン技術の実用化への有意義な技術的進歩であると考えられる。

[平成 21 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

これまでの研究成果により、肝細胞がんの超早期診断につながる可能性のあるいくつかの方法を得ている。現在、慢性肝炎・肝硬変の経過観察中に肝細胞がんを発症した症例を集積中である。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

進行肝細胞がんに対する臨床第 II 相試験において有効性を見出すためには、やはりプロトコルが重要であると考えられ、内科外科の先生方と議論を重ねているところである。

22 年度は、手術・ラジオ波による根治的治療後の再発予防ワクチンと進行がんを対象とする治療ワクチンの開発は、新たに採択された医療技術実用化総合研究事業で実施することとし、本研究では、慢性肝炎・肝硬変患者を対象とした予防ワ

クチンの開発のための臨床試験を計画し実施する。陽子線との併用も検討する。

(3) CTL 療法の開発

今後は、GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子をクローニングし、GPC3 ペプチド特異的 TCR 遺伝子導入細胞移行療法も目指した検討も行う。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

ICG R15%と V30%を用いて症例選択を行うことにより、陽子線治療の局所制御と GPC3 の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を適確に抽出できる可能性が示唆された。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

ヒトの iPS 細胞から樹状細胞が作製できるということは、技術的には、アフェレーシス操作を伴うことなく大量の樹状細胞を産生できることを意味する。これによって、患者の身体的負担なしに、任意の遺伝的背景の樹状細胞を作成し、細胞ワクチンとして利用できる。この技術の実用化には、さらに、ゼノ（異種成分）フリー培養法の開発が必要である。また、医療技術としての普及させるためには、日本人集団中で頻度の高い HLA ハプロタイプをカバーする iPS 細胞バンクが設立されるなどして、iPS-DC 作製に必要なコストの低減できることが必要であろう。

[平成 22 年度]

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

今回解析した 15 例は手術から再発までの期間が短く、多くが早期再発をきたした症例群であり、術後初回の画像検査で再発が確認された症例が多く含まれることを考えても、ミクロレベルにおいて、手術で完全切除が得られていなかった症例が多く含まれる可能性が高く、「理想的なマーカー挙動」を論じるには不適切な対象であったと言わざるを得ない。β2-MG は、今回の検討ではモニタリングにおける臨床的有用性は確認できなかった。

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の探索

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解析を継続する予定である。

③ 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に関する研究

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、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。

(2) 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

今回の結果を受けて、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、前向きな検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。

(3) 肝細胞がんの陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

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 ペプチドワクチン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国立がん研究センター倫理審査委員会に提出中である。

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

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は、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。

(5) iPS 細胞由来の免疫細胞療法の開発

① ヒト iPS 細胞由来マクロファージ (iPS-MP) 療法の開発

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、このような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。

② iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発

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

[平成 20 年度]

(1) 進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験により、GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的效果も見出すことができた。今後の臨床第 II 相試験において、進行肝細胞がんへの効果だけでなく、根治的治療後の再発予防効果に期待する。

(2) 一部の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する CTL の存在や、GPC3 蛋白、抗 GPC3-IgG 抗体、さらには $\beta 2$ ミクログロブリンの検出を認めており、今後はこれらが超早期診断に有用であるかを多施設による多検体の臨床研究で検討していく。

(3) GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になりうる可能性が示唆された。

(4) $\beta 2$ ミクログロブリンあるいは TAP1 の遺伝子

改変を行ったマウス ES 細胞を用いることにより、任意の MHC ハプロタイプのレシピエントに対して細胞ワクチンとして使用可能な樹状細胞を作製できることを明らかにした。さらに、マウスの iPS 細胞から機能的な樹状細胞とマクロファージを作製できることを確認した。

[平成 21 年度]

HCC 根治的切除後の再発予知における術後 AFP 値の有用性が示され、また、血清中 GPC3 値は肝細胞がんの超早期診断に有用である可能性が示唆された。

進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験により、GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。さらに、ワクチン投与患者 PBMC から GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、GPC3 陽性癌細胞株を傷害しうることを示した。

ICG R15%と V30%は、切除不能 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た。安全と考えられる ICG R15%と V30%での治療においては、標的となった腫瘍の制御率は 90%を超えており、再発予防のための GPC3 の併用効果に関する臨床試験を検討する意義があると考えられた。

ヒトの iPS 細胞は、機能的な樹状細胞を作成するための細胞ソースとなりうることを示された。樹状細胞療法が実用化できれば、肝臓がんに対するワクチン療法をより強力なものにすることが可能であると考えられる。

[平成 22 年度]

肝細胞がんの術後再発、および慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの超早期診断を目指して前向きに検体収集を行い、AFP、AFP-L3 分画、DCP、 $\beta 2$ -ミクログロブリン、GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体について経時的変化を解析した。現在までの解析例は経過観察期間が短い中で再発、発がんを来した症例群であり、マーカー挙動につき論じるには不適切な症例が多く含まれたが、その中でも再発例 15 例中 2 例に DCP の経時的変化が再発の早期診断に有用な可能性が示された。一方、大垣市民病院での後ろ向き的大量検体を用いた研究では、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。

肝細胞がんにおいて、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。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。

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。適格症例での再発予防のための GPC3 ペプチドワクチンの併用効果を確認する臨床試験プロトコルを作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会に提出した。

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。

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。また 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. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[平成 20 年度]

- 1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 34:649-656, 2009.
- 2) Ikuta Y*, Hayashida Y*, Hirata S, Irie A, Senju S, Kubo T, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H, Nishimura Y. (*These two authors contributed equally.) Identification of the H2-K^d-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci.* 100(1); 132-137, 2009.
- 3) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba

- H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted Glypican-3-derived peptide vaccine induce Specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 32:985-990, 2008.
- 4) Muchemwa F.C, Nakatsura T, Fukushima S, Nishimura Y, Kageshita T, Ihn H. Differential Expression of Heat Shock Protein 105 in melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* 18(3): 166-171, 2008.
 - 5) Harao M, Hirata S, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Komori H, Ikuta Y, Yokomine K, Imai K, Inoue M, Harada K, Mori T, Tsunoda T, Nakatsuru S, Daigo Y, Nomori H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer.* 123(11): 2616-25, 2008.
 - 6) Nakagohri T, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N. Surgical outcome of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 15(3):318-321, 2008.
 - 7) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99:159-165, 2008.
 - 8) Thomas MB, O'Beirne JP, Furuse J, Chan AT, Abou-Alfa G, Johnson P. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy and Immunotherapy. *Ann Surg Oncol.* 15:1008-1014, 2008.
 - 9) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol.* 67:8-15, 2008.
 - 10) Ishii H, Furuse J, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M. Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma Patients Who Meet the Milan Criteria. *Hepato-Gastroenterology* 55: 621-626, 2008.
 - 11) Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Sugiyama E, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Ikeda M, Morizane C, Yamamoto N, Yoshida T, Kamatani N, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Twenty novel genetic variations and haplotype structures of the DCK gene encoding human deoxycytidine kinase (dCK). *Drug Metab Pharmacokinet* 23:379-384, 2008.
 - 12) Sato Y, Laird NM, Nagashima K, Kato R, Hamano T, Yafune A, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kim SR, Furuse J, Ishii H, Ueno H, Okusaka T, Saijo N, Sawada JI, Yoshida T. A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies. *Pharmacogenomics J.* 9(2):137-46, 2009.
 - 13) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Kojima Y, Iwasa S, Hagihara A. Predictive Factors of Outcome and Tumor Response to Systemic Chemotherapy in Patients with Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 38: 675-82, 2008.
 - 14) Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tsunoda T, Nakatsuru S, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res.* 14:6487-6495, 2008.
 - 15) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata H, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y, Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by β 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 181: 6635-6643, 2008.
 - 16) Tsukamoto H, Irie A, Senju S, Hatzopoulos A.K, Wojnowski L, Nishimura Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.* 38:518-527, 2008.
 - 17) 中面哲也、肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第I相試験 リンパ学、31(2):66-70, 2008.
 - 18) 中郡聡夫、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人、盛川浩志、河合隆史、【最新の肝胆膵の3Dイメージ】肝門部胆管癌および肝内胆管癌のインタラクティブな胆管・門脈・肝動脈3DCG画像 胆と膵、臨増特大(29):1207-1212, 2008.
 - 19) 高橋遍、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、【再発癌への挑戦 肺・肝転移、手術でどこまで制御できるか】胃癌肝転移再発に対する外科的切除の検討 癌の臨床、54(10):847-851, 2008.
 - 20) 高橋遍、後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、化学療法が奏効し切除可能となった大腸癌肝転移の1例 *Liver Cancer*、

14(2):237-243, 2008.

- 21) 古瀬純司、仲地耕平、鈴木英一郎、清水怜、光永修一、特集 肝細胞癌の治療戦略、トピックス 分子標的治療 消化器外科、31:1017-1023, 2008.
- 22) 古瀬純司、特集 肝内胆管癌-2008,up-to-date-化学療法による治療成績 肝胆膵、57:135-142, 2008.
- 23) 古瀬純司、特集 国際共同臨床試験、国際共同臨床試験の現状と課題、肝・胆道・膵がん 腫瘍内科、2:197-204, 2008.
- 24) 古瀬純司、がん薬物療法学 - 基礎・臨床研究のアップデート- IV. 作用機序からみた抗悪性腫瘍薬の分類、殺細胞性抗悪性腫瘍薬、代謝拮抗薬(フッ化ピリミジン・非フッ化ピリミジン)日本臨床、67:224-230, 2009.
- 25) 古瀬純司、Sorafenibの分子作用機構と肝癌治療の基礎から臨床へ ベンチからベッドサイドへ、牛島俊和、後藤典子、西尾和人編、篠原出版新社 (東京)、p111-117, 2008.
- 26) 古瀬純司、肝細胞癌/胆道癌/膵癌 肝・胆道・膵癌化学療法の最近の動向 エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック2009、有吉寛監修、メディカルレビュー社 (大阪)、p239-247, 2008.
- 27) 古瀬純司、肝がん治療の方向性 ~今後の治療法~ 分子標的治療 (ソラフェニブ) インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝がん、沖田極、幕内雅俊編、医薬ジャーナル社 (大阪)、p72-75, 2009.
- 28) 西村泰治、中面哲也、千住 覚、新規癌胎児性抗原Glypican-3の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用 Jpn. J. Clin. Immunol. 31(5): 383-391, 2008.
- 29) 千住 覚、西村泰治、HLA分子による癌特異抗原の提示を利用した癌免疫療法の開発 日本組織適合性学会誌、15(1):51-60, 2008.
- 30) 千住 覚、西村泰治、ES細胞由来の樹状細胞による抗腫瘍免疫応答の誘導 腫瘍内科、2(2):164-170, 2008.
- 31) 千住 覚、iPS細胞由来の樹状細胞とマクロファージを用いた医療技術の開発 再生医療、7(3):43-45, 2008.
- 32) 千住 覚、ES細胞およびiPS細胞を用いた免疫療法 医学のあゆみ、227(5):413-418, 2008.
- 33) 千住 覚、免疫療法への応用を目指したES細胞からの樹状細胞の作製 実験医学、26(20):

212-217, 2008.

[平成 21 年度]

- 1) Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 22:149-54, 2009.
- 2) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 100(8): 1403-1407, 2009.
- 3) Kobayashi S, Gotohda N, Nakagohri T, Takahashi S, Konishi M, Kinoshita T. Risk factors of surgical site infection after hepatectomy for liver cancers. *World J Surg.* 33(2):312-317, 2009.
- 4) Ikeda M, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M, Sasaki Y. Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 45(1):60-67, 2010.
- 5) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Nishimura Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:1021-1031, 2009.
- 6) Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, Nishimura Y. An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2ry^{null} (NOG) mice. *Immunol. Lett.* 126:67-72, 2009.
- 7) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J. Immunotherapy* 32:219-231, 2009.
- 8) Homma S, Koido S, Sagawa Y, Suzuki H, Komita H, Nagasaki E, Takahara A, Horiguchi-Yamada J, Tajiri H, Zeldin D, Obata T. Antigenic stimulation with cytochrome P450 2J expressed in mouse hepatocellular carcinoma cells regulates host antitumor immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 156: 344-52, 2009.
- 9) Koido S, Hara E, Homma S, Ohkusa T, Gong J,

- Tajiri H. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells. *Immunotherapy* 1: 49-62, 2009.
- 10) 中面哲也、臨床編5.肝細胞がん—新規腫瘍抗原 (glypican-3<GPC3>) を利用したワクチン療法、がんペプチドワクチン療法 (中村祐輔編)、中山書店、p76-83, 2009.
 - 11) 中津川宗秀、中面哲也、第2章 がん化学療法の標的 12.がん免疫療法、がん化学療法・分子標的治療update、西條長宏、西尾和人編、中外医学社、p86-91, 2009.
 - 12) 古瀬純司、肝癌—基礎・臨床研究のアップデート. IX.肝癌の治療. 腫瘍因子からみた治療戦略. 多発肝細胞癌、日本臨床、67 supp3:421-425, 2009.
 - 13) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、肝細胞癌に対する抗癌剤治療の進歩、*Cancer Frontier*、11(1):161-169, 2009.
 - 14) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、肝細胞癌薬物治療の最前線. 進行肝細胞癌に対する分子標的薬の臨床試験、*The Liver Cancer Journal*、1(2):33-40, 2009.
 - 15) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、特集 消化器疾患に対する分子標的治療の最前線. 肝・胆道・膵癌治療の最前線—エルロチニブ、ソラフェニブ、*GIResearch*、17(5):419-424, 2009.
 - 16) 鈴木英一郎、長島文夫、古瀬純司、肝・胆道・膵がん治療の動向-最新のエビデンス. 肝がん全身化学療法の動向、腫瘍内科、4(4):328-335, 2009.
 - 17) 古瀬純司、原発性肝がん (肝細胞がん). *What's New in Oncology* がん治療エッセンシャルガイド、佐藤隆美、藤原康弘、古瀬純司、大山優編、東京、南山堂、p276-285, 2009.
 - 18) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、癌治療の現状と展望1—標準治療の連携と分子標的薬剤のバイオマーカー. 肝臓癌—ソラフェニブ導入と肝炎ウイルスキャリアの管理、*Current Therapy*、27(11):56-60, 2009.
 - 19) 古瀬純司、肝・胆・膵. 原発性肝がん. 入門腫瘍内科学、入門腫瘍内科学編集委員会編、東京、篠原出版新社、p155-158, 2009.
 - 20) 鈴木英一郎、古瀬純司、長島文夫、肝細胞がん、胆道がん、膵がん. 各臓器のがんの標準治療と臨床研究、がん化学療法・分子標的治療update、西條長宏、西尾和人編、東京、中外医学社、p656-666, 2009.
 - 21) 古瀬純司、原発性肝がん、新臨床腫瘍学改訂第2版、日本臨床腫瘍学会編、東京、南江堂、p518-527, 2009.
 - 22) 古瀬純司、長島文夫、標準的薬療法. 消化器がん、消化器研修ノート、永井良三総監修、東京、診断と治療社、p585-588, 2009.
 - 23) 古瀬純司、長島文夫、化学療法の副作用対策. 消化器がん、消化器研修ノート、永井良三総監修、東京、診断と治療社、p589-592, 2009.
 - 24) 古瀬純司編著、消化器がん化学療法看護完全マスターBOOK. 分子標的薬と従来型抗がん剤のケア 副作用 治療のしくみがやさしくわかる!、消化器外科NURSING210年臨時増刊、大阪、メディカ出版、2010.
 - 25) 福島 聡、西村泰治、千住 覚、ES細胞およびiPS細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン、臨床免疫・アレルギー科、52(3):331-338, 2009.
 - 26) 千住 覚、iPS細胞から樹状細胞への分化誘導技術と将来の臨床応用、再生医療、8(3):34-37, 2009.
 - 27) 千住 覚、多能性細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法、血液フロンティア、19(11):49-56, 2009.
 - 28) 千住 覚、多能性細胞由来の樹状細胞を用いたがんの免疫療法、*Biotherapy*、24(2):87-94, 2010.
- [平成 22 年度]
- 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
- 5) 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.
 - 6) 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. Dereglulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol. Int.* 60(5): 351-357, 2010.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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, Kohrogi 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Chen YZ, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y.