

別紙1

厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、
免疫遺伝子治療に資する研究 (H22-3次がん一般-007)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 青木 一教

平成25(2013)年 5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、 免疫遺伝子治療に資する研究-----	1
青木 一教	
II. 分担研究報告	
1. 固形がんの免疫遺伝子・細胞複合療法の開発-----	15
青木 一教	
2. 前向きトランスクリプトーム解析研究に基づく食道がんの予知医療の開発---	20
佐々木 博己	
3. 上部消化管がんの予知医療開発のための病理学的解析-----	25
大上 直秀	
4. 固形がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発-----	30
菅野 康吉	
5. 肺がんのゲノム・遺伝子解析情報に基づく予知医療の開発-----	33
村上 善則	
6. がんの遺伝子・核酸医薬の開発-----	37
金田 安史	
7. 核酸医薬によるがん診断・治療標的の開発-----	39
加藤 尚志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	別添

厚生労働科学研究費補助金(第3次対がん総合戦略研究事業)
総括研究報告書

ゲノム・遺伝子解析情報に基づく、臨床応用可能な固形がんの予後予測法の開発と、
免疫遺伝子治療に資する研究

研究代表者 青木 一教 国立がん研究センター 研究所 遺伝子免疫細胞医学研究分野 分野長

研究要旨 ゲノム・遺伝子解析技術や核酸導入技術、腫瘍免疫学の進歩を、より優れたがんの診断・治療法開発に橋渡すことを目的に研究を行い、以下の成果を得た。①食道がん根治的化学放射線療法の治療前生検サンプル用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、予後良好なサブタイプBと不良なサブタイプDを同定した。サブタイプBはMET制御転写因子SIM2のシグナル伝達経路が、サブタイプDはEMT制御転写因子SIX1のシグナル伝達経路が、それぞれ活性化していた。SIX1下流分子のpodoplaninが腫瘍胞巣全体で染色される症例は、有意に予後不良であった。②小細胞肺がん、細胞接着分子CADM1のスプライシング・バリエーションを血清診断マーカーとして確立するため、CADM1断片の検出並びに糖鎖構造の解析を行った。③腫瘍内インターフェロン遺伝子導入と自家造血幹細胞移植の複合療法の開発を進めた。造血幹細胞移植後には、腫瘍内VEGF-Dの発現上昇により樹状細胞を活性化してIL-6の分泌を促し、制御性T細胞を抑制することにより腫瘍局所の免疫抑制環境を解除することを明らかとした。④不活性化ヘンダイウイルスを基にしたHVJ-EにRad51siRNAを封入して、Dacarbazineとともにメラノーマ細胞に投与することにより、抗がん剤の効果が増強されることを示した。⑤マルチキナーゼ阻害剤であるBIBF1120は、FGFR3遺伝子変異陽性膀胱がん細胞株に対して特異的に増殖抑制効果を示す一方、Mouse xenograft modelでは、腫瘍組織内の血管新生を阻害して増殖抑制効果を発揮することを明らかとした。⑥新たに発見した低酸素応答性の非翻訳小分子RNAであるmiR-210による細胞内鉄代謝制御系の腫瘍細胞における機能の解明と、造血器腫瘍と固形腫瘍に共通する造血因子応答性分子の検討による新たな標的遺伝子の探索を進めた。

研究分担者

青木 一教	国立がん研究センター研究所 分野長
佐々木博己	国立がん研究センター研究所 ユニット長
大上 直秀	広島大学大学院 准教授
菅野 康吉	栃木県立がんセンター研究所 技幹
村上 善則	東京大学医科学研究所 教授
金田 安史	大阪大学大学院 教授
加藤 尚志	早稲田大学大学院 教授

A. 研究目的

ゲノム解析や腫瘍免疫学等の進歩に基づく個別化がん診療法確立を目的とし、A. ゲノム等解析情報に基づく予知医療の開発と、B. 免疫遺伝子・核酸治療の開発を2つの柱とする。Aでは、食道がん、膀胱がん及び肺がんの診断や治療効果予想に有用な分子群の同定と臨床応用を、B. では、難治固形がんに対する新たな免疫遺伝子治療・核酸医薬の開発を目指す。がん治療では多角的な治療戦略と治療薬剤のデリバリー技術の開発が重要であり、以下のサブテーマを分担して、遺伝子解析技術やベクター開発技術、試料・情報を共有しながら総合的に研究を推進した。

【A. ゲノム等解析情報に基づく予知医療の開発】

①食道がん化学放射線治療(CRT)前生検試料の遺伝子発現情報を基に、治療効果を予測する技術を開発し、それらの分子情報の評価・検証を行い、治療の個別化に貢献する。CRT 感受性例、非感受性例の分類・診断のため、治療前生検サンプルの遺伝子発現プロファイルを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。本年度は、サブタイプに特異的に高発現または低発現する遺伝子を解析し、固有の生物学的特徴を有することを示した。また、podoplanin など扁平上皮の分化マーカーの免疫染色を合わせて行い、ステージや予後との相関を検討した。

②肺がん、乳がん、泌尿器がんなど種々の腫瘍の発生、進展に関わり、診断・治療の標的分子候補となる分子群を同定し、診断マーカーや治療標的として確立することを目的に、特に小細胞肺がんにおける細胞接着分子 CADM1 の有用性について検討した。

【B. 免疫遺伝子・核酸治療の開発】

③腫瘍特異的免疫を賦活する効果をもつ I 型インターフェロン (IFN) 免疫遺伝子治療に、新鮮な免疫系を再構築する効果の期待できる造血幹細胞移植を合理的に組み合わせた新たな免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を目指している。現在、骨軟部肉腫に対する免疫遺伝子・細胞複合療法の臨床開発を目指し、前臨床研究と抗腫瘍機序解明のための免疫学的検討を行っている。本年度は、自家造血幹細胞移植により腫瘍局所の免疫抑制環境を解除できる機序を腫瘍内の樹状細胞に着目して検討した。

④活性化ウイルス粒子を利用した (hemagglutinating virus of Japan envelope) HVJ envelope vector (HVJ-E) は、それ自身が抗腫瘍作用を有する。HVJ-E に遺伝子や合成核酸を封入してその抗腫瘍機能の増強を図る。

⑤表在性膀胱がんではチロシンキナーゼ受容体である繊維芽細胞成長因子受容体 3 型 (FGFR3) 遺伝子の変異が約 50~70% に認められる。FGFR3 遺伝

子変異陽性膀胱がんは、浸潤性膀胱がんへの進展は少ないが、高率に再発し、定期的な経過観察と再発例に対しては再切除やその他の治療が必要となる。この FGFR3 をターゲットとする分子標的治療の開発を行う。

⑥がんとその微小環境の関係はがんの悪性化に重要な役割を果たしているが、特に低酸素環境下におけるがん細胞の挙動は転移や薬剤耐性と関わっている。低酸素環境下において発現が上昇する miR-210 とがん細胞の関係を解明し、がん診療における新たなバイオマーカーあるいは治療標的分子としての有用性を検討する。また、がん化学療法に伴う貧血治療薬として、組換え赤血球造血因子エリスロポエチン (EPO) 投与の臨床症例が集積され、腫瘍増殖の促進のリスクが報告されている。そこで、EPO などの造血因子の固形腫瘍への作用を解析することにより、新たな創薬標的・診断分子の探索を試みる。

B. 研究方法

上記研究目的に記載した①~⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①本研究で用いられた治療前生検サンプル (II-III 期) は、国立がん研究センター東病院において 2004 年-2008 年の 4 年間に収集された 197 例、および中央病院にて 2004 年-2007 年の 3 年間に収集された 77 例の全 274 例である。全てのサンプルについてマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを取得し、GeneSpring GX, EXCEL, Cluster & Treeview 等の解析プログラムを用いたトランスクリプトーム解析を行った。従来の教師ありクラスター解析 (SV clustering) と機械学習による判別器の作製に加え、教師なしクラスター解析 (USV clustering) による症例のサブタイプ分類、および、CRT 感受性と相関しているサブタイプの同定も行った。また、サブタイプ特異的に高発現または低発現している遺伝子を選抜することにより、各サブタイプで活性化しているシグナル伝達経路を推定すると共に、診断キット開発向け qRT-PCR によるサブタイプ分類に有効と思わ

れる遺伝子の選抜を行った。

また、広島大学病院で術前治療を施行せずに切除された食道扁平上皮がん 143 例を材料に、SIX1、SOX2、podoplanin の免疫染色を施行した。さらに、分化マーカーとしてサイトケラチン 14 とサイトケラチン 4 の免疫染色を施行した。

② 小細胞肺癌手術組織における CADM1 の発現を、抗 CADM1 抗体に対する免疫組織染色法にて検討した。また、CADM1 タンパク質の糖鎖解析は、CADM1 細胞外ドメイン+Fc 融合タンパク質の精製物、並びに細胞抽出物から、抗 CADM1 抗体を用いて免疫沈降し、トリプシンにて分解した後、質量分析法によりその糖鎖構造を決定した。

③ 自家造血幹細胞移植が腫瘍の免疫抑制環境を解除する機序を明らかとするために、BALB/c マウス骨髄移植モデルを用いて、造血幹細胞移植が腫瘍の制御性T細胞に及ぼす影響を検討した。これまで、腫瘍内の CD11c⁺ 樹状細胞から、制御性 T 細胞を抑制する IL-6 の発現が上昇していることを示してきたが、IL-6 発現の機序として、腫瘍内の VEGF-D の濃度上昇と樹状細胞での VEGFR3 発現の関連に着目し、抗 VEGFR3 抗体、IL-6R 抗体や CD25 抗体を用いて、樹状細胞の IL-6 分泌や腫瘍内制御性 T 細胞の頻度及び腫瘍増殖に関する影響を検討した。

また、自家造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導は、ドナーリンパ球のがん関連抗原に対するプライミングの状態により異なる可能性がある。そこで、ドナーの CT26 皮下腫瘍内に IFN- α 遺伝子を導入してプレイミュナイゼーションを行うことにより、造血幹細胞移植後のレシピエントでの抗腫瘍効果を増強できるか検討した。

④ マウスメラノーマ細胞株 B16F10 に、抗がん剤 Dacarbazine (DTIC) を投与し、DNA 修復に関与する遺伝子の発現を検討した。また、Rad51siRNA を封入した HVJ envelope (HVJ-E) vector を B16F10 細胞に DTIC とともに投与し、ゲノムに二重鎖切断箇所を集積する γ -H2AX の経時的变化やアポトーシス誘導を解析した。ついで、C57BL/6 mouse に

B16F10 細胞を移植し、臨床で用いられている相当量の DTIC(80 mg/kg)を 5 回腹腔内投与 (day7-day11)、Rad51siRNA(2.5 nmol)封入の HVJ-E は 2 日ごとに 3 回投与(day6, 8, 10)し、腫瘍容積を測定した。

⑤ 各種膀胱がん培養細胞株を対象として、チロシinkinアーゼ受容体阻害薬 BIBF1120 の in vitro の増殖抑制効果と Ki-67, p27/Kip1 等の発現を検討した。更に、SHO マウスを用いた xenograft model において、増殖抑制効果を検討すると共に、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現を免疫染色法により評価した。

⑥ これまで、miR-210 が細胞内鉄代謝を調節する新たな因子であることを報告してきた。miRNA は標的遺伝子を複数持つことが知られている。そこで、miR-210 の別の標的遺伝子を探索した。

また、EPO などの造血因子の固形腫瘍への作用を解析するために、ヒト巨核芽球系白血病細胞株 UT-7 細胞株を用いて、UT-7 細胞株の中でも多分化能を有する UT-7/GM 亜株や、EPO 特異的に増殖して赤血球系へ分化する UT-7/EPO 亜株、TPO 特異的に巨核球系細胞へと増殖・分化する UT-7/TPO 亜株に発現する遺伝子を、マイクロアレイ(Human Genome U133 Plus2.0 : Affymetrix)により網羅的に解析した。ついで、パスウェイ解析ツール MetaCore (Thomson Reuters) を用いて UT-7/EPO 細胞(赤血球系)および UT-7/TPO 細胞(血小板系)で特異的に変動を示す分子を抽出した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料の生殖細胞系列の遺伝子解析が含まれる研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、それ以外の臨床試料等の観察研究は「疫学研究に関する倫理指針」、動物実験は施設の動物実験倫理規程など、それぞれの研究の種類に応じて求められる国や施設の指針・規程に従い、施設の倫理審査委員会の審査や機関の長の承認を受ける等の上、研究を行った。

C. 研究結果

①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①これまで、根治的 CRT が施行された食道がん症例を用いた遺伝子発現プロファイルの解析により、4つのサブタイプ(B, C1, D, F3)を同定し、このうちサブタイプ B は3年生存率 80%と高く、感受性例を多く含んでいる一方、サブタイプ D は3年生存率が 40%と低く、非感受性例を多く含んでいることを明らかとしてきた。本年度、サブタイプ B および D の生物学的特徴を解析したところ、サブタイプ B または D で特異的に高発現している遺伝子 ($p < 0.05$, t-test、平均 2 倍以上) は、それぞれ 599 個と 453 個であった。サブタイプ B は、正常食道扁平上皮の管腔側の分化細胞のマーカー遺伝子の発現が顕著で、それら分化マーカーの発現は間質-上皮分化転換 (MET) を誘導する転写因子 SIM2 で支配されていることが分かった。一方、サブタイプ D は、正常食道扁平上皮の基底および傍基底細胞といった未分化細胞のマーカーの発現が顕著で、こちらは上皮-間質分化転換 (EMT) を誘導する転写因子 SIX1 によって多くが支配されていることが分かった。

次に、食道がんにおける SIM2 と SIX1 のシグナル伝達経路に関連した遺伝子セットをサンプル間の発現パターンの相関性を利用して抽出したところ、それぞれ 442 個と 162 個同定することができ、サブタイプ B は SIM2 のシグナル伝達経路が、サブタイプ D は SIX1 のシグナル伝達経路が、それぞれ活性化していることを確かめた。2つのサブタイプとも、活性化しているシグナル伝達経路と病理組織学的分化度との相関はほとんどなく、新たな分類指標となる可能性が示された。得られた遺伝子リストは、qRT-PCR により両サブタイプを生物学的な特徴を踏まえて分別できるだけでなく、治療標的遺伝子の探索にも有用である。

ついで、食道扁平上皮がん 143 例を材料に、SIX1、SOX2 及び SIX1 下流分子である podoplanin の免疫染色を施行したが、これらの 3 分子は同様の

染色像を示していたため、最も染色性のよかった podoplanin を使用しさらに検討を行った。podoplanin は腫瘍胞巣全体に染色される症例は 19%、腫瘍胞巣辺縁に染色される症例は 31%、全く染色されない症例は 51%であり、podoplanin が腫瘍胞巣全体に染色される症例はそれ以外の症例と比較し有意にステージが進行していて、予後不良であった。一方、サイトケラチン 14 や 4 についても免疫染色により評価したが、臨床病理学的因子や予後解析との関連は認められなかった。

②小細胞肺がん組織の免疫組織染色では 34 例中 9 例 (26%)、小細胞肺がん細胞の RT-PCR、ウェスタン・ブロット解析では 13 例中 12 例 (92%) で、CADM1 の発現を検出した。小細胞肺がんが発現する CADM1 は、正常組織では精巣のみで発現が認められるエクソン 8,9 を含むバリエーション (CADM1v8/9) であった。また、CADM1v8 では細胞外ドメインが ADAM10 で切断され、続いて細胞内ドメインが γ -セクレターゼで切断されることを示した。CADM1 v8/9 を小細胞肺がんの新規診断マーカーとして確立するために、v8/9 に対する特異的抗体と特異的検出法の開発が必要であると考えられた。

次に、CADM1 の細胞外ドメインに 6 か所存在する N-型糖鎖、並びにエクソン 8,9 に存在する O-型糖鎖の構造を、質量分析によって解析した。その結果、上皮細胞に発現する CADM1 のスプライシングバリエーション (v8, v8/9) の N-型糖鎖は、主に複合型 4 分岐構造にフコース、およびシアル酸が付加した構造を示すこと、O-型糖鎖はコア 1, 2 構造およびシアル酸を含むことを明らかにした。

③これまでの検討で、造血幹細胞移植後の腫瘍においては VEGF-D の発現上昇により、腫瘍内の VEGFR3 を発現する樹状細胞を活性化して IL-6 分泌を促し、制御性 T 細胞を抑制するといった仮説を考えていた。本年度は、この仮説をさらに検証するために、CD11c⁺樹状細胞で VEGFR3 を介して VEGFD の刺激を受けること、樹状細胞から分泌された IL-6 の制御性 T 細胞への抑制効果、腫瘍内制御性 T 細胞の頻度と抗腫瘍効果の関連を明らかとする

ために、VEGFR3 抗体、IL-6R 抗体、CD25 抗体を用いて、それぞれのシグナルを阻害して影響を解析した。VEGF-D の受容体である VEGFR-3 に対する中和抗体を、造血幹細胞移植マウスに投与すると、腫瘍内の CD11c⁺細胞からの IL-6 の分泌は低下し、腫瘍内の制御性 T 細胞の頻度が増加して腫瘍増殖は促進されることが示された。また、IL-6R 抗体投与すると、樹状細胞からの IL-6 分泌は亢進しているが、造血幹細胞移植による制御性 T 細胞の抑制効果はなくなり腫瘍の増殖は抑制されること、また、VEGFR-3 抗体に制御性 T 細胞を除去する CD25 抗体を併用することにより、VEGFR-3 抗体の腫瘍増殖促進効果はなくなることを示した。これらの結果により、上記仮説が確かめられた。

また、CT26 皮下腫瘍を有するドナーマウスに IFN- α 発現アデノウイルスを注入して、10 日後に脾細胞を解析すると、腫瘍特異的 T 細胞が増えており、がん関連抗原に対するプライミングが促進されること示された。さらに、IFN 遺伝子導入したドナーの脾細胞を用いて自家造血幹細胞移植を行うことにより、レシピエント 14 匹中 9 匹で腫瘍は完全に消失した。このように、ドナーをプレイミュナイゼーションすることにより造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を著明に増強できることを明らかとした。

臨床開発として、再発骨軟部肉腫 10 例を対象として、IAB-1 (ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤) の腫瘍内直接注入を繰り返し行う遺伝子治療単独の第 I 相臨床試験 (用量設定試験) の臨床研究実施計画を策定し、国立がん研究センターの遺伝子治療研究審査委員会での審査を受け承認された。

④Rad51 遺伝子発現は DTIC の量に依存して増強されることが分かった。そこで、Rad51siRNA を HVJ-E vector に封入してマウスメラノーマ細胞株 B16F10 に導入したところ、DTIC による DNA 二重鎖切断の修復が抑制され、 γ -H2AX の核内での著明な集積が起り、アポトーシス細胞が有意に増加した。マウスメラノーマモデルにおいては、DTIC と Rad51siRNA 封入 HVJ-E を投与した群が最も強い腫瘍増殖抑制

を示した。さらに、この群では DTIC の投与下においても CD4, CD8 の発現が増加し、メラノーマに対する細胞傷害性 T 細胞の活性化が示された。

⑤各種膀胱がん培養細胞株を用いた *in vitro* の実験では、FGFR3 遺伝子変異陽性膀胱がん細胞株である UM-UC-14 および MGHU3 に対する特異的な増殖抑制効果が示された。一方、マウス xenograft model を用いた検討では、FGFR3 遺伝子が野生型である細胞株に対しても増殖抑制効果が認められた。また、CD31 染色により血管内皮細胞の腫瘍内密度を測定すると、BIBF1120 投与群では腫瘍内血管密度が著しく低下していた。FGFR3 遺伝子変異陽性細胞腫瘍では、更に強い増殖抑制効果が認められた。

⑥miR-210 の標的遺伝子の探索を行い、ミトコンドリアのエネルギー産生に関わる NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa (NDUFA4) も標的遺伝子とすることを明らかにした。NDUFA4 の発現抑制はミトコンドリアのエネルギー産生低下を導き、細胞の増殖に影響を与えられられる。

つぎに、EPO などの造血因子の固形腫瘍への作用を解析した。EPO 刺激下、UT-7/EPO 細胞で発現増加し、UT-7/TPO 細胞で発現減少する mRNA は 1 種類であり、EPO 刺激下で UT-7/EPO 細胞で発現減少し、UT-7/TPO 細胞で発現増加する mRNA は、4 種類 (ラクトフェリン, c-fes 等) であった。

さらに、これら発現が増減する分子の mRNA 発現と連鎖すると考えられる miRNA をクロス検索したところ、ラクトフェリンについては、連鎖しうる miRNA が 10 種抽出され、そのうちの 1 種 (hsa-miR-449a) は、UT-7/GM 細胞において実際に EPO あるいは TPO 刺激によって発現量に変動する分子であることを見出した。UT-7 細胞各種はヒト白血病細胞株であるが、一部の乳がんでも EPO 受容体を発現することが報告されている。そこで、乳がん細胞株 MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR3 での EPO 受容体の発現を調べたところ、いずれも陽性であった。これらの結果より、造血器腫瘍 (白血病) と固形がん (乳がん) に共通した分子相互作用の例として、E2F1 経路が

miR-449a に干渉し、ラクトフェリンの発現調節系に関わることが示唆された。

D. 考察

①～⑥のサブテーマ毎に以下の通り。

①マイクロアレイの普及に伴い、がんの新たなサブタイプ同定が進んできた。しかし、多くの報告では、「発生源細胞や特定の転座や遺伝子増幅などの機序」が異なるタイプの分類に留まっているのが現状である。我々が分類を行った食道がんは分化度以外の病理組織学的分類指標のない扁平上皮がんであり、約半数の症例で、治療法の選択上有用な2つのサブタイプの存在を示した意義は大きい。今後、診断においては、サブタイプ D を除くことにより予後の底上げを図り、さらにサブタイプ B を同定することにより、治療効果が見込まれる症例を分類できることが期待される。診断法の確立以外にも、各サブタイプの本態解明を通じて創薬に繋がる研究が展開されるものと考えられる。

また、GeneChip 解析から予後不良な症例において発現している podoplanin を、免疫染色により解析した。podoplanin の染色パターンで分類すると腫瘍胞巣全体が染色される症例で予後不良であった。podoplanin の発現はステージと関連しており、独立した予後予測因子ではなかったことから、直接的に予後に関わるのではなく、食道扁平上皮がんの進行と関連しているものと考えられる。また、podoplanin が幹細胞の機能に関わっていることを考慮すると、腫瘍胞巣全体に podoplanin が染色される症例は分化の過程が障害されているものと考えられる。今後は、放射線化学療法施行後の食道扁平上皮がんを用いて podoplanin の免疫染色を施行し、放射線化学療法耐性との関連を検討する。

②CADM1 が小細胞肺癌の診断マーカーとして有望な点としては、1) CADM1 v8/9 は精巢を除き、小細胞肺癌特異的に発現する。2) CADM1v8 断片は ADAM10, γ -セクレターゼによる切断をうける、3)CADM1 v8/9 は 小細胞肺癌培養細胞抽出物

の 13 例中 12 例 (92%) で発現し、既存マーカーである Pro-GRP や NSE とは独立した発現様式を示し、しかも頻度が高い、ことがあげられる。今後は、v8/9 を認識する単クローン抗体を作成することが必要であり、来年度は、この見地から、小細胞肺癌に特異的な CADM1 の糖鎖修飾の解析、ならびに高度特異的な抗体作成を進める予定である。

③近年、自家造血幹細胞移植では、がん関連抗原を認識するリンパ球が優先的に増殖するなど、様々な機序により抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかとなっている。加えて、造血幹細胞移植が腫瘍の免疫寛容環境を解除できることを明らかとした。さらに、ドナーリンパ球をプレイミュナイゼーションしてがん関連抗原へのプライミングを促進することにより、自家造血幹細胞移植を明らかに増強できることを示した。自家造血幹細胞移植による腫瘍免疫の誘導は、腫瘍内 IFN 遺伝子導入だけでなく、腫瘍ワクチンなど様々な免疫療法と複合することが可能であり、免疫療法全体に対して発展性がある。来年度は、自家造血幹細胞移植後に腫瘍免疫を担うリンパ球の特徴を明らかとし宿主細胞との相互作用を解明し、抗腫瘍免疫をさらに効率よく誘導する治療戦略の開発に役立てる。

また、骨軟部肉腫に対する IFN 遺伝子治療の臨床研究に関しては、機関内承認後、厚生労働省での承認を得て、臨床研究を実施する予定である。本臨床研究に附随して、免疫モニタリングや血清・組織を用いた免疫学的解析を行い、効果と安全性に関する汎用性のある評価技術の開発や、新規バイオマーカー及び新たな診療標的の探索を行う。

④DTIC と Rad51siRNA を用いることによりゲノムの 2 重鎖切断の修復が抑制され、アポトーシスが誘導されると考えられる。HVJ-E による抗腫瘍免疫活性は抗がん剤投与下でも機能し、細胞傷害性 T 細胞の誘導が起こることが明らかになった。

⑤マルチキナーゼ阻害剤である BIBF1120 の表在性膀胱がん培養細胞株に対する増殖抑制効果は、G1/G0 の細胞周期停止による増殖抑制が主体と考えられる。一方、in vivo の実験では、SHO マウスに

における腫瘍内の血管密度が減少していることから、マルチキナーゼ阻害剤によって宿主の血管内皮における VEGFR の抑制が関わっていることが示された。FGFR3 遺伝子に変異を認める細胞株では、腫瘍細胞への直接的な増殖抑制効果によって、さらに治療効果が増強されるものと考えられる。

⑥miR-210 が複数遺伝子の発現を抑制することを裏付けた。今後は細胞増殖抑制効果がどのような腫瘍細胞で認められるのか、また、正常細胞への影響があるのか検討する。また、1000 個以上の分子から効率的に機能分子を抽出してくる方法として、パスウェイ解析を適用し、従来の手法では絞り込めなかった腫瘍特異的連鎖遺伝子群のサブセットを得ることができた。今後は、これら抽出されてきた遺伝子の固形がん細胞内における機能の解明を進める。

E. 結論

①根治的 CRT の 3 年生存率が良好なサブタイプ B と不良なサブタイプ D の存在が確認された。また、サブタイプ B と D は病理組織学的分化度との相関がないにもかかわらずそれぞれ SIM2 と SIX1 に関するシグナル伝達経路が活性化しており、固有の細胞生物学的特徴を有することが示された。以上より、本研究で抽出した食道がんにおける SIM2 や SIX1 のシグナル伝達経路に関連した遺伝子セットは、サブタイプ分類診断薬や治療薬の開発に役立つ可能性が高いと考えられた。

また、podoplanin は SIX1 の下流に位置していると想定しているが、podoplanin が腫瘍胞巣全体に染色された症例はステージが進行しており、podoplanin は食道扁平上皮がんの幹細胞にある特定の機能を有していると予想される。

②CADM1 v8/9 バリエントが小細胞肺がん疾患特異的に過剰発現すること、CADM1 の N-型、O-型糖鎖に特徴的な修飾が認められることを見出した。これらの結果は、CADM1 v8/9 断片の検出による小細胞肺がん診断が可能であることを示す。

③自家造血幹細胞移植が、腫瘍内の樹状細胞から

の IL-6 分泌促進を介し、腫瘍局所の免疫抑制環境を解除する機序を明らかとした。ドナーのがん関連抗原へのプライミングを促進することにより、自家造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を明らかに増強できることを示した。GVHD 発症が無い自家造血幹細胞移植と、I 型 IFN 発現プラスミドを用いた腫瘍内遺伝子導入の複合は安全性が高く、新たな免疫治療戦略となりうる。将来的な、IFN 遺伝子治療と自家造血幹細胞移植の複合療法の臨床開発を目指し、段階的臨床研究として IFN 遺伝子治療単独の臨床研究の準備を進めている。

④Rad51siRNA 封入 HVJ-E は DTIC の効果を増強させ、かつ抗腫瘍免疫の活性化能を維持して、多彩な抗腫瘍効果を発揮することができることを明らかとした。

⑤マルチキナーゼ阻害剤である BIBF1120 は腫瘍組織の血管新生の抑制と、細胞内での細胞周期停止という二つの作用を通じて薬理作用を発揮していると考えられた。本薬剤は浸潤性膀胱がんの治療のみならず、FGFR3 遺伝子変異陽性の表在性膀胱がんにおいて経尿道的膀胱腫瘍切除術実施後の再発予防薬としても期待できる。

⑥ミトコンドリアのエネルギー産生に関わる NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa (NDUFA4)も、miR-210 の標的遺伝子とすることを明らかにした。また、造血器腫瘍(白血病)と固形がん(乳がん)に共通した分子相互作用の例として、E2F1 経路が miR-449a に干渉し、ラクトフェリンの発現調節系に関わることを示した。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishimoto T, Yamamoto Y, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Aoki K. Development of peritoneal

- tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library. *PLoS ONE* 7; e45550, 2012.
2. Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective Oncolytic Adenovirus Developed by High-throughput Screening of Adenovirus-formatted Library. *Mol Ther*, 21:139-148, 2013
 3. Kimura J, Ono H, Kosaka T, Makino H, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Hirai S, Ohno S, Aoki K, Davydova J, Yamamoto M, Kunisaki C, Endo I. Conditionally replicative adenoviral vectors for imaging the effect of chemotherapy on pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* (in press).
 4. Ono H, Hiraoka N, Lee Y-S, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Sakamoto H, Chiwaki F, Sasaki H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 51:30-41, 2012.
 5. Satoh Y, Mori K, Kitano K, Kitayama J, Yokota H, Sasaki H, Uozaki H, Fukayama M, Seto M, Nagawa H, Yatomi Y, Takai D. Analysis for the combination expression of CK20, FABP1, and MUC2 is sensitive for the prediction of peritoneal recurrence in gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 42: 148-152, 2012.
 6. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Ichiro Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Kazuto Nishio, K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 106: 727-732, 2012.
 7. Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 79: 290-306, 2012.
 8. Suzuki M, Narita M, Ashikawa M, Furuta S, Matoba M, Sasaki H, Yanagihara K, Terawaki K, Suzuki T, Uezono Y. Changes in the melanocortin receptors in the hypothalamus of a rat model of cancer cachexia. *Synapse* 66: 747-751, 2012.
 9. Suzuki M, Narita M, Hasegawa M, Furuta S, Kawamata T, Miyano K, Yanagihara K, Chiwaki F, Ochiya T, Suzuki T, Matoba M, Sasaki H, Uezono Y. Sensation of abdominal pain induced by peritoneal carcinomatosis is accompanied by changes in the expression of substance P and m-opioid receptors in the spinal cord of mice. *Anesthesiology* 117: 847-856, 2012.
 10. Imoto A, Mitsunaga S, Inagaki M, Aoyagi K, Sasaki H, Ikeda M, Nakachi K, Higuchi K, Ochiai A. Neural invasion induces cachexia via astrocytic activation of neural route in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 131:2795-2807, 2012.
 11. Fujita T, Yanagihara K, Takeshita F, Aoyagi K, Takigahira M, Chiwaki F, Fukagawa T, Katai H, Ochiya T, Sakamoto H, Konno H, Yoshida T, Sasaki H. Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice. *Cancer Sci.* 104: 214-222, 2013.
 12. 佐々木博己、五十畑則之、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、千脇史子、青柳一彦、EMTと食道扁平上皮癌、*Surgery Frontier* 19: 51-55 (2012)
 13. Akagi I, Okayama H, Schetter AJ, Robles AI, Kohno T, Bowman ED, Kazandjian D, Welsh JA, Que N, Saito M, Miyashita M, Uchida E, Takizawa T, Takenoshita S, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Harris CC: Combination of protein coding and non-coding gene expression as a robust prognostic classifier in stage I lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, in press.
 14. Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Que N, Yasui W: Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion. *Histopathology*, in press.
 15. Mori R, Yoshida K, Tanahashi T, Yawata K, Kato J, Okumura N, Tsutani Y, Okada M, Que N, Yasui W: Decreased FANCI caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer*, in press.
 16. Naito Y, Que N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W: Reg IV is a direct target of intestinal transcriptional factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One*, 7(11):e47545, 2013.
 17. Shinmei S, Sakamoto N, Goto K, Sentani K, Anami K, Hayashi T, Teishima J, Matsubara A, Que N, Kitada Y, Yasui W: MicroRNA-155 is a predictive marker for survival in patients with

- clear cell renal cell carcinoma. *Int J Urol*, 20(5):468-77, 2013.
18. Hayashi T, Sentani K, Oue N, Ohara S, Teishima J, Anami K, Sakamoto N, Matsubara A, Yasui W: The search for secreted proteins in prostate cancer by the Escherichia coli ampicillin secretion trap: expression of NBL1 is highly restricted to the prostate and is related to cancer progression. *Pathobiology*, 80(2):60-9, 2013.
 19. Anami K, Sentani K, Sakamoto N, Uraoka N, Oue N, Yasui W: Infantile adenomyoma subclinically excreted into the patient's diaper. *Pathol Int*, 62(8):532-7, 2012.
 20. Sakamoto N, Oue N, Sentani K, Anami K, Uraoka N, Naito Y, Oo HZ, Hinoi T, Ohdan H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer. *Cancer Sci*, 103(9):1744-50, 2012.
 21. Okayama H, Saito M, Oue N, Weiss JM, Stauffer J, Takenoshita S, Wiltout RH, Hussain SP, Harris CC: NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. *Int J Cancer*, 132(1):9-18, 2013.
 22. Sentani K, Oue N, Naito Y, Sakamoto N, Anami K, Oo HZ, Uraoka N, Aoyagi K, Sasaki H, Yasui W: Upregulation of HOXA10 in gastric cancer with the intestinal mucin phenotype: reduction during tumor progression and favorable prognosis. *Carcinogenesis*, 33(5):1081-8, 2012.
 23. Gersemann M, Becker S, Nuding S, Antoni L, Ott G, Fritz P, Oue N, Yasui W, Wehkamp J, Stange EF: Olfactomedin-4 is a glycoprotein secreted into mucus in active IBD. *J Crohns Colitis*. 6(4):425-34, 2012.
 24. Takami H, Sentani K, Matsuda M, Oue N, Sakamoto N, Yasui W: Cytokeratin expression profiling in gastric carcinoma: clinicopathologic significance and comparison with tumor-associated molecules. *Pathobiology*, 79(3):154-61, 2012.
 25. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, Sentani K, Oue N, Yasui W: Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int*. 2012 Feb;62(2):112-9, 2012.
 26. Oue N, Noguchi T, Anami K, Kitano S, Sakamoto N, Sentani K, Uraoka N, Aoyagi K, Yoshida T, Sasaki H, Yasui W: Cytokeratin 7 is a predictive marker for survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 19(6):1902-10, 2012
 27. Tahara M, Inoue T, Miyakura Y, Horie H, Yasuda Y, Fujii H, Kotake K, Sugano K. Cell diameter measurements obtained with a handheld cell counter could be used as a surrogate marker of G2/M arrest and apoptosis in colon cancer cell lines exposed to SN-38. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Apr 11.
 28. Hirasawa A, Masuda K, Akahane T, Tsuruta T, Banno K, Makita K, Susumu N, Jinno H, Kitagawa Y, Sugano K, Kosaki K, Aoki D. Experience of Risk-reducing Salpingo-oophorectomy for a BRCA1 Mutation Carrier and Establishment of a System Performing a Preventive Surgery for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in Japan: Our Challenges for the Future. *Jpn J Clin Oncol*. 43:515-9, 2013.
 29. Shiozawa M, Miyakura Y, Tahara M, Morishima K, Kumano H, Koinuma K, Horie H, Lefor AT, Sata N, Yasuda Y, Gonda K, Takenoshita S, Tamura A, Fukushima N, Sugano K. Partial duplication of MSH2 spanning exons 7 through 14 in Lynch syndrome. *J Gastroenterol*. 2013 (in press).
 30. Hirasawa A, Akahane T, Tsuruta T, Kobayashi Y, Masuda K, Banno K, Fujii T, Susumu N, Itsubo T, Kameyama K, Sugano K, Aoki D. Lobular endocervical glandular hyperplasia and peritoneal pigmentation associated with Peutz-Jeghers syndrome due to a germline mutation of STK11. *Ann Oncol*. 23:2990-2, 2012.
 31. Miyakura Y, Sugano K, Nomizu T, Lefor A, Yasuda Y. Pathogenicity of A600V variant in exon 12 of the MSH2 gene detected in a Japanese kindred with Lynch syndrome. *Jpn J Clin Oncol*. 42: 78-82, 2012.
 32. Ishimura M, Sakurai-Yageta M, Maruyama T, Ando T, Fukayama M, Goto A, Murakami Y. Involvement of miR-214 and miR-375 in malignant features of non-small-cell lung cancer by down-regulating CADM1. *J Cancer Ther*, 3:379-387, 2012.
 33. Ito A, Mimae T, Yamamoto Y-S-Z, Hagiwara M, Nakanishi J, Ito M, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. Novel application for

- pseudopodia proteomics using excimer laser ablation and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Lab Invest*, 92:1374-1385, 2012.
34. Nakata H, Wakayama T, Adthapanyawanich K, Nishiuchi T, Murakami Y, Takai Y, Iseki S. Compensatory upregulation of myelin protein zero-like 2 expression in spermatogenic cells in cell adhesion molecule-1-deficient mice. *Acta Histochem Cytochem* 45:47-56. 2012.
 35. Kikuchi S, Iwai M, Sakurai-Yageta M, Tsuboi Y, Ito T, Masuda T, Tsuda H, Kanai Y, Onizuka M, Sato Y, Murakami Y. Expression of a splicing variant of the CADM1 specific to small cell lung cancer. *Cancer Sci*. 103: 1051-1057, 2012.
 36. Ito A, Ichiyangi N, Ikeda Y, Hagiyaama M, Inoue T, Kimura KB, Sakurai MA, Hamaguchi K, Murakami Y. Adhesion molecule CADM1 contributes to gap junctional communication among pancreatic islet α -cells and prevents their excessive secretion of glucagon. *Islets*, in press.
 37. Mimae T, Okada M, Hagiyaama M, Miyata Y, Tsutani Y, Inoue T, Murakami Y, Ito A. Upregulation of Notch2 and Six1 Is Associated with Progression of Early-Stage Lung Adenocarcinoma and a More Aggressive Phenotype at Advanced Stages. *Clinical Cancer Research*, 18, 945-955, 2012.
 38. Nagara Y, Hagiyaama M, Hatano, N, Futai, E, Suo S, Takaoka Y, Murakami Y, Ishiura S, Ito A. Tumor suppressor cell adhesion molecule 1 (CADM1) is cleaved by A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and subsequently cleaved by gamma-secretase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 417:462-467, 2012.
 39. Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors, CADM1 and 4.1B, in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer*, 19:242-252, 2012.
 40. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer*, 130:1329-1337, 2012.
 41. Kiyohara, E., Tamai, K., Katayama, I., and Kaneda, Y.: The combination of chemotherapy with HVJ-E containing Rad51 siRNA elicited diverse anti-tumor effects and synergistically suppressed melanoma. *Gene Ther.* (in press).
 42. Kaneda Y. Virosome A novel vector to enable multi-modal strategies for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 730-738, 2012.
 43. Maekawa S, Iemura H, Kato T. Enhanced erythropoiesis in mice exposed to low environmental temperature. *J Exp Biol*. 2012 (in press).
 44. Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T. Micromanaging iron homeostasis: Hypoxia-inducible miR-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*. 2287:34110-9, 2012.
 45. Maekawa S, Iemura H, Kuramochi Y, Nogawa-Kosaka N, Nishikawa H, Okui T, Aizawa Y, Kato T. Hepatic confinement of newly-produced erythrocytes caused by low-temperature exposure in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol*. 2215:3087-3095, 2012.
 46. Okamoto M, Kobayashi S, Ikeuchi H, Yamada S, Korehito, Yamanouchi K, Nagasawa K, Maekawa S, Kato T, Shimizu I. Synthesis and bioassay of a boron-dipyrromethene derivative of estradiol for fluorescence imaging in vivo. *Steroids*. 77:845-849, 2012.
 47. 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志. 新たなバイオマーカーとしてのエクソソームと診断技術: エクソソームはバイオマーカーの宝箱?. 細胞工学, (特集) 疾患エクソソーム: 病をもたらすパンドラの箱がいま開かれる~エクソソームを制するものが疾患を制する~, (監修) 落谷孝広, 細胞工学, Vol.32, No.1, 66-70 頁, 学研メディカル秀潤社刊, 2013 年
 48. 加藤尚志, 坂本明彦, 船津高志, 宮崎洋. 巨核球・血小板産生における TPO-c-Mpl 系の分子動態. 特集: 巨核球・血小板の細胞運命制御機構, 血栓止血誌, 日本血栓止血学会, 23(6)1-8, 2012 年 12 月
 49. 宮崎洋, 加藤尚志. 2. トロンボポエチン研究の歴史とクローニング, トロンボポエチンの基礎を知る. 『トロンボポエチン受容体作動薬のすべて』(編) 池田康夫, PART1: 血小板産生機構とトロンボポエチンの基礎をみる, 10-18 頁, 先端医学社刊, 2012 年 10 月
 50. 谷崎祐太, 加藤尚志. 1. 巨核球造血の最新知見から血小板産生機構を知る. 『トロンボポエチン受容体作動薬のすべて』(編) 池田康夫, PART1: 血小板産生機構とトロンボポエチンの基礎をみる, 19-30 頁, 先端

医学社刊, 2012年10月

51. 吉岡祐亮, 小坂展慶, 加藤尚志, 落谷孝広. がん細胞の代謝異常と microRNA 制御. 実験医学 (増刊) がんと代謝, 第 3 章低酸素, 酸化ストレス, (編) 曾我朋義, 江角浩安, 第 30 卷 15 号 121 (2455) -127 (2461) 頁, 羊土社刊, 2012年9月10日
2. 学会発表
52. Narumi K, Udagawa T, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. The American Society of Gene Therapy's 15th Annual Meeting. May 16-19, 2012 (Philadelphia).
53. Aoki K, Narumi K, Udagawa T. Combination therapy of hematopoietic stem cell transplantation and intratumoral interferon gene transfer to sarcoma (Symposium). 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
54. Yamamoto Y, Nishimoto T, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by in vivo screening with a random peptide-displaying adenovirus library. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
55. Aoki K, Udagawa T, Narumi K. Suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
56. Aida K, K Suzuki K, R Miyakawa R, K Narumi K, N Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Suppression of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- α gene transfer to pancreatic cancer. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
57. Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation differs by a priming status of donor cells. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
58. Miyakawa R, Suzuki K, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
59. Yamamoto Y, Goto N, Ohnami S, Miura Y, Yamamoto M, Yoshida T, Aoki K. New method to produce peptide-displaying adenovirus library. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
60. Ikarashi Y, Aoki K, Kim S-W, Imai T, Hoffman RM, Nakagama H. NKT cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
61. 青木一教. 固形がんに対する新たな免疫遺伝子・細胞療法の開発. 第 6 回日本緩和医療薬学会. Oct 6-7, 2012.
62. Narumi K, T Udagawa T, Miyakawa R, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of regulatory T cells within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 41 回日本免疫学会総会. Dec 5-7, 2012.
63. Narumi K, Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity induced by autologous hematopoietic stem cell transplantation is enhanced by a priming of the donor T lymphocytes to tumor-associated antigens. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. February 21-25, 2013 (Maui).
64. 藤田剛、青柳一彦、柳原五吉、佐々木博己、今野弘之、びまん性胃癌で特異的に発現するプロテアーゼの探索、第 17 回日本病態プロテアーゼ学会、2012.
65. 藤田剛、高橋陵宇、千脇史子、柳原五吉、青柳一彦、坂本裕美、深川剛生、片井均、落谷孝広、今野弘之、吉田輝彦、佐々木博己、腹膜播種におけるびまん性胃癌幹細胞に対する TGF- β の二元的機能、第 71 回日本癌学会、ワークショップ、2012.
66. 千脇史子、浜口哲弥、山田康秀、島田安博、柳原五吉、坂本裕美、吉田輝彦、佐々木博己、未分化胃癌患者腹水からの新規 34 がん細胞株および 2 マウス中皮細胞株の樹立、第 71 回日本癌学会、2012.
67. 小野弘恵、千原大、千脇史子、佐々木博己、坂本裕美、吉田輝彦、松尾恵太郎、佐伯宣久、胃がん・膀胱がん易罹患性関連遺伝子 PSCA 上のミスセンス SNP は胆のうがん細胞において PSCA のがん抑制機能を減弱させる、第 71 回日本癌学会、2012.
68. 大上直樹、野口剛、阿南勝宏、坂本直也、仙谷和弘、浦岡直礼、青柳一彦、吉田輝彦、佐々木博己、北野正剛、安井弥、食道扁平上皮癌に対する Adjuvant therapy 効果予測因

- 子としてのサイトケラチン7、第71回日本癌学会、2012.
69. 玉置将司、青柳一彦、三梨桂子、日月裕司、小松崎理絵、落合淳志、武藤学、千葉勉、吉田輝彦、佐々木博己、手術標本で認められる人為的に誘導された上皮間質転換：癌研究における意味、第71回日本癌学会、2012.
 70. 小松崎理絵、青柳一彦、山田康秀、加藤健、西村公男、玉置将司、三梨桂子、武藤学、吉田輝彦、佐々木博己、腫瘍特異的 CTL の活性化が化学放射線療法感受性例で起きている、第71回日本癌学会、2012.
 71. 西村公男、青柳一彦、千脇史子、小松崎理絵、三梨桂子、武藤学、坂井義治、吉田輝彦、佐々木博己、SIX1 は食道扁平上皮癌においてがん幹細胞の維持に関与する、第71回日本癌学会、2012.
 72. 松本和子、荒尾徳三、浜口哲弥、島田安博、加藤健、小田一郎、谷口浩和、小泉史明、柳原五吉、佐々木博己、西尾和人、山田康秀、胃がんにおける FGFR2 遺伝子増幅の検討、第71回日本癌学会、ワークショップ、2012.
 73. 市川寛、神田達夫、谷口浩和、畠山勝義、佐々木博己、近藤格、胃がんリンパ節転移に関わるタンパク質の同定、第71回日本癌学会、2012.
 74. 青柳一彦、三梨桂子、山田康秀、西村公男、玉置将司、小松崎理絵、武藤学、大津敦、吉田輝彦、佐々木博己、遺伝子発現プロファイルを用いた教師無しサブタイプ分類による食道がんの化学放射線療法感受性例の治療前診断、第71回日本癌学会、2012.
 75. 佐々木博己、体外診断薬としての発現解析型 DNA チップ、第32回日本分子腫瘍マーカー研究会、特別企画、2012.
 76. 大上直秀、野口 剛、仙谷和弘、阿南勝宏、坂本直也、浦岡直礼、安井 弥、食道扁平上皮癌におけるサイトケラチン7の免疫染色は術後補助化学療法の効果予測マーカー、予後予測マーカーとして有用である。第23回日本消化器癌発生学会、ワークショップ4、11月15-16日、徳島、2012.
 77. Oue N, Sakamoto N, Naito Y, Sentani K, Harris CC and Yasui W: Alteration of microRNA expression in gastrointestinal cancer. The 22nd Hiroshima Cancer Seminar and the 4th Japanese Association for RNA interference Joint International Symposium “MicroRNAs in cancer”, Hiroshima (Japan), August 30, 2012.
 78. 大上直秀 : SAGE 法、CAST 法から明らかに
なつた胃型・腸型胃癌の生物学的・臨床的特徴. 第5回消化器 Research Seminar、特別講演、6月19日、広島、2012.
 79. Sugano K et al. Risk assessment for BRCA1/2 mutations based on recursive partitioning analysis in Japanese HBOC cohort. BRCA: From Theory to Practice Fourth International Symposium on Hereditary Breast and Ovarian Cancer Centre Mont-Royal, 2200 Mansfield Street, Montréal, April 25-27 (2012)
 80. 菅野康吉、他：日本人の遺伝性乳がん卵巣がん(HBOC)症例に対する BRCA1/2 遺伝子検査—遺伝子検査費用の軽減と高リスク群同定に関する研究— 第18回日本家族性腫瘍学会学術集会 大阪市 6月15日~16日 (2012)
 81. 菅野康吉：遺伝性大腸がん (FAP, Lynch 症候群等) 第15回家族性腫瘍セミナー 京都市 8月24日~26日 (2012)
 82. Sugano K, et al. Splicing variants caused by mutations of exonic splicing enhancer (ESE) elements in MLH1 or MSH2. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, September 19-21 (2012)
 83. 菅野康吉：がんの遺伝カウンセリング 文部科学省平成24年度大学病院人材育成機能強化事業地域躍動型専門医養成一貫教育プログラム シンポジウム「若き医師に必須の遺伝カウンセリング講座」 新宿区 9月29日 (2012)
 84. Murakami Y. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 3rd Joint Symposium of the Max-Planck Society and University of Tokyo Graduate School of Medicine. 2013年3月8日、東京、日本。
 85. Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Mika Sakurai-Yageta, Yumi Tsuboi, Daisuke Matsubara and Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本
 86. Yoshinori Murakami, Masanao Miwa, Hideo Tanaka, Masakazu Yamamoto and Puangrat Yongvanit. Towards the control of cholangiocarcinoma by international collaboration between Thailand and Japan. The International Symposium on Cholangiocarcinoma, Tokyo, 2013. 2013年2月8日、東京都、日本

87. Yoshinori Murakami. Roles of a cell adhesion molecule CADM1 in malignant progression of non-small cell lung cancer. The 2nd France-Japan Cancer Workshop, 2012年11月30日、鳴門市、日本
88. Yoshinori Murakami. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human oncogenesis. The 18th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2012年6月29日、ウルム市、ドイツ
89. Yoshinori Murakami, Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. The 9th AACR-JCR Joint Conference of Cancer Research. マウイ市、米国ハワイ州、2013年2月24日
90. Mika Sakurai-Yageta and Yoshinori Murakami. The oncogenic role of a cell adhesion molecule, CADM1, in adult T-cell leukemia and small cell lung cancer. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本
91. Yumi Tsuboi, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Akihiko Ito, Yoshinori Murakami. Analysis of cell adhesion molecule 1 (CADM1)-mediated inactivation of c-Src pathway. The 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 2013年2月14日、鹿児島市、日本
92. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Kaoru Kaneshiro, Sadanori Sekiya, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka and Yoshinori Murakami. The 19th International Mass Spectrometry Conference. 2012年9月18日、京都市、日本
93. 桑野秀規、中島淳、村上善則、ヒト肺腺がんのゲフィチニブ耐性機構における細胞接着分子 CADM1 の意義、第9回東京呼吸器リサーチフォーラム、2012年11月14日、東京
94. Mika Sakurai, Takeshi Ito, Hideki Kuwano, Daisuke Matsubara, Akiteru Goto. Dual roles of a cell adhesion molecule, CADM1, in human lung oncogenesis based on the molecular pathological analyses. 第71回日本癌学会学術総会、シンポジウム、2012年9月21日、札幌市
95. Mika Sakurai-Yageta, Tomoko Maruyama, Megumi Ishimura and Yoshinori Murakami. Analysis of the structures and functions of N-glycans on a cell adhesion molecule, CADM1, in various cancer cells. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌市、日本
96. Hideki Kuwano, Miwako Iwai, Taketo Kawai, Takeshi Ito, Mika Sakurai-Yageta, Akiteru Goto, Jun Nakajima, Kenji Tamura and Yoshinori Murakami. Possible involvement of a cell adhesion molecule, CADM1 in acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-TKIs. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日、札幌市
97. 金田安史：新規抗がん剤としての不活化ウイルス粒子のポテンシャル第71回日本脳神経外科学会学術集会（特別医学セミナー）2012年10月18日 大阪
98. 金田安史：Future direction of Gene Therapy 第18回日本遺伝子治療学会（理事長講演）2012年6月28日 熊本
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 1) 発明の名称：抗がん剤の作用を増強する医薬組成物、がん治療用キット、診断薬、及びスクリーニング方法
出願番号：
特願 2012-29907/PCT/JP2013/53522
出願日：平成25年2月14日
発明者：佐々木博己、上園保仁、鈴木雅美、長瀬博、鈴木勉、成田年
出願人：独立行政法人国立がん研究センター
- 2) 発明の名称：がんの診断、処置および/または予防、および/または浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法
特許：第5131946号（2012/11/16登録）日本
発明者：村上善則、増田万里
出願人：国立大学法人東京大学
- 3) 発明の名称：がんの診断、処置および/または予防、および/または浸潤・転移の抑制のための方法、システムおよび組成物ならびに関連するスクリーニング方法
特許第5131751号（2012/11/16登録）・日本
発明者：村上善則、増田万里
出願人：国立大学法人東京大学

2. 実用新案登録

無し

3. その他

政策、ガイドライン作成

1) 佐々木博己

平成 23-24 年厚生労働省次世代医療機器評価指標作成事業、テーラーメイド医療診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）審査 WG 委員として審査指標案を作成、平成 24 年に 11 月 20 日厚労省より公表（薬食機発 1120 第 5 号）

固形がんの免疫遺伝子・細胞複合療法の開発

研究分担者 青木一教 国立がん研究センター 研究所 遺伝子免疫細胞医学研究分野・分野長

研究要旨

我々は、難治固形がんに対するインターフェロン遺伝子導入と造血幹細胞移植の複合療法の開発を行っている。これまで、自家造血幹細胞移植を行ったマウスにおいて、腫瘍局所では制御性T細胞の浸潤・増殖が強く抑制されており、抗腫瘍免疫誘導を誘導するのに適した環境を作り出していることを明らかにした。本年度は、この造血幹細胞移植により腫瘍特異的に免疫抑制環境を解除できる機序として、造血幹細胞移植後には、腫瘍内のVEGF-Dの発現上昇により樹状細胞を活性化してIL-6の分泌を促し、制御性T細胞が抑制されることを、VEGFR3、IL-6RやCD25に対する抗体を用いた阻害実験により明らかとした。また、臨床開発として、IFN遺伝子治療と造血幹細胞移植の複合療法開発の第1段階として、再発骨軟部肉腫10例を対象とした正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン発現プラスミドの腫瘍内注入を行う遺伝子治療単独の第I相臨床試験の実施計画書の機関内での審査を受けた。

A. 研究目的

I型インターフェロン(IFN)は、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死誘導といった直接的な抗腫瘍効果と、腫瘍免疫賦活や血管新生抑制などの間接的な抗腫瘍効果の両者を発揮できる。我々は、このI型インターフェロンを遺伝子導入することにより、特徴的に骨軟部肉腫細胞に対して効率よく増殖抑制や腫瘍細胞死誘導効果を発揮できることを報告してきた。従来のIFN蛋白質を用いた臨床試験では、組換えIFN蛋白質を皮下・筋肉・静脈内投与など全身投与していたが、IFNの血中での半減期が短いために、投与した量の0.01%しか標的臓器に到達しないというデリバリー上の問題があった。しかし、遺伝子治療ではベクターを用いて腫瘍局所に強く持続的にIFN蛋白質を発現することにより、局所のコントロールと全身の抗腫瘍免疫を強く誘導することが可能であり、新たな骨軟部肉腫に対する治療戦略となる可能性を示してきた。

一方、がんは免疫寛容状態を確立しているために、免疫療法に不応性であることが多い。そこで、我々は、腫瘍特異的免疫を賦活する効果をもつ

IFN免疫遺伝子治療に、免疫抑制性の環境を破壊し新鮮な免疫系を再構築する効果の期待できる造血幹細胞移植を合理的に組み合わせた新たな免疫遺伝子・細胞複合療法の開発を目指している。これまで、骨肉腫や大腸がんマウスモデルにおいて、複合療法が相乗的に抗腫瘍効果を発揮できることを示してきた。また、昨年度、自家造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導機構の機序として、自家造血幹細胞移植後の腫瘍では制御性T細胞の浸潤・増殖が強く抑制されており、腫瘍免疫を誘導するのに適した環境を作り出されていることを明らかにした。本年度は、この自家造血幹細胞移植により腫瘍特異的に免疫抑制環境を解除できる機序を、種々の抗体での阻害実験によって明らかとした。

本研究では、上記のような、1. 前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究と、2. 複合療法の臨床試験の実施を2つの柱としている。臨床試験に関しては、将来的な複合療法の開発を目指し、その第一段階として骨軟部肉腫に対するIFN遺伝子治療単独の臨床研究の準備を進めている。

B. 研究方法

1. 前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究

1-A. 造血幹細胞移植による腫瘍免疫誘導機序の解明

自家造血幹細胞移植により腫瘍の免疫抑制環境を解除できる機序を明らかとするために、BALB/c マウス骨髄移植モデルを用いて、造血幹細胞移植が腫瘍の制御性T細胞に及ぼす影響を免疫学的に検討した。昨年度は、腫瘍内のCD11c⁺樹状細胞の分泌するサイトカインを解析し、制御性T細胞を抑制するIL-6の発現が上昇していることを示した。本年度は、この樹状細胞からのIL-6の発現上昇の機序として、腫瘍内のVEGF-Dの発現増強と樹状細胞VEGFR3の関連を明らかとするために、抗VEGFR3抗体、IL-6R抗体やCD25抗体を用いて、樹状細胞からのIL-6発現や腫瘍内制御性T細胞の頻度及び腫瘍増殖に関する影響を検討した。

1-B. ドナー・プレイミュナイゼーションによる腫瘍免疫の増強

自家造血幹細胞移植による抗腫瘍免疫誘導は、ドナーリンパ球のがん関連抗原に対するプライミングの状態により異なる可能性がある。そこで、ドナーのCT26皮下腫瘍内にIFN- α 遺伝子を導入してプレイミュナイゼーションを行うことにより、ドナーでの腫瘍特異的リンパ球を増やすことができるか、MuLV env gp70を認識するAH-1テトラマーアッセイより検討した。さらに、ドナーをプレイミュナイゼーションすることで、造血幹細胞移植後のレシピエントでの抗腫瘍効果を増強できるか検討した。

2. 複合療法の臨床試験の実施

造血幹細胞移植とIFN免疫遺伝子治療複合療法開発の第1段階として、再発骨軟部肉腫を対象としたIFN- β 遺伝子治療の第I相臨床試験の臨

床研究実施計画書を策定し、機関内の遺伝子治療研究審査委員会の審査を受けた。

(倫理面への配慮)

本研究は、所属する研究施設の遺伝子組み換え実験や動物実験に関わる各種委員会の審査を受け理事長の承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1. 前臨床研究と抗腫瘍機構解明のための免疫学的研究

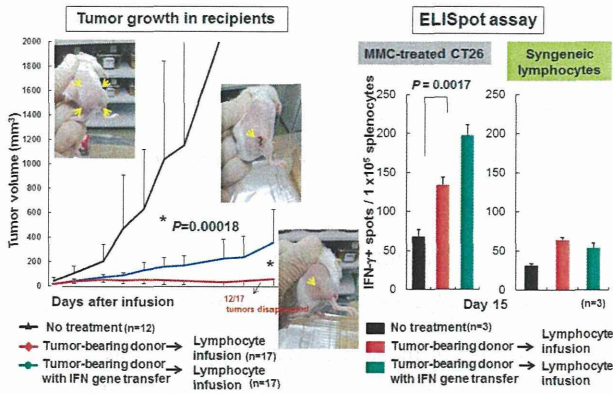
1-A. 造血幹細胞移植による腫瘍免疫誘導機序の解明

我々は、自家造血幹細胞移植マウスにおいては、腫瘍局所で制御性T細胞の浸潤・増殖が明らかに抑制されていることを明らかにした。この機序として、昨年までの検討で、造血幹細胞移植後の腫瘍において特徴的にVEGF-Dの濃度が上昇し、そのレセプターであるVEGFR3を発現する腫瘍内樹状細胞を活性化してIL-6分泌を促し、制御性T細胞を抑制するといった仮説を考えた。

本年度は、この仮説をさらに検証する目的で、CD11c⁺樹状細胞でVEGFR3を介してVEGF-Dの刺激を受けること、樹状細胞から分泌されたIL-6の制御性T細胞への抑制効果、腫瘍内制御性T細胞の頻度と抗腫瘍効果の関連を明らかとするために、VEGFR3抗体、IL-6R抗体、CD25抗体を用いて、それぞれのシグナルを阻害して影響を解析した。VEGF-Dの受容体であるVEGFR-3に対する中和抗体を、造血幹細胞移植マウスに投与すると、腫瘍内のCD11c⁺細胞からのIL-6の分泌は低下し、腫瘍内の制御性T細胞の頻度が増加して腫瘍の増殖は促進されることが示された。また、IL-6R抗体投与すると、樹状細胞からのIL-6分泌は亢進しているが、造血幹細胞移植による制御性T細胞の抑制効果はなくなり腫瘍の増殖は抑制されること、また、VEGFR-3抗体に制御性T細胞を除去するCD25抗体を併用することにより、VEGFR-3抗体の腫

瘍増殖促進効果はなくなることを示した(図1)。

図2 IFNによるプライミング促進は、リンパ球輸注の抗腫瘍効果を著明に増強する

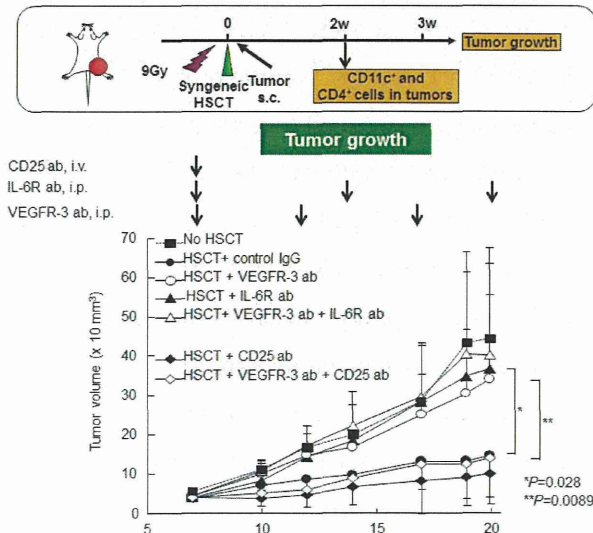


これらの結果により、自家造血幹細胞移植後に腫瘍内の VEGF-D の濃度が高まり、CD11c⁺細胞に作用して IL-6 の分泌を促すことで腫瘍内の制御性 T 細胞が抑制されることが確かめられた。

1-B. ドナー・プレイミュナイゼーションによる腫瘍免疫の増強

CT26 皮下腫瘍を有するドナーマウスに 1×10^8 PFU の IFN- α 発現アデノウイルスを注入して、10 日後に脾細胞を解析すると、AH-1 tetramer⁺ CD8⁺ T 細胞が増えており、がん関連抗原に対するプライミングが促進されていること示された。さらに、IFN 遺伝子導入したドナーの脾細胞と骨髄細胞を用いて自家造血幹細胞移植を行うことにより、レシピエントでは AH-1⁺ CD8⁺ T 細胞はさらに増え、腫瘍の増殖は顕著に

図1 造血幹細胞移植後の、VEGF-D を介した腫瘍内樹状細胞からの IL-6 分泌亢進による Treg 抑制と抗腫瘍効果



抑制されて、14 匹中 9 匹で腫瘍は完全に消失した。このように、ドナーを免疫療法によりプレイミュナイゼーションすることにより造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を顕著に増強できることを明らかとした(図2)。

2. 複合療法の臨床試験の実施

再発骨軟部肉腫 10 例を対象として、IAB-1 (ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤) の腫瘍内直接注入を繰り返し行う遺伝子治療単独の第 I 相臨床試験(用量設定試験)の臨床研究実施計画を策定し、国立がん研究センターの遺伝子治療研究審査委員会での審査を受け承認された。

D. 考察

近年、自家造血幹細胞移植では、がん関連抗原を認識するリンパ球が優先的に増殖するなど、様々な機序により抗腫瘍免疫を誘導できることが明らかとなっている。加えて、本研究では、造血幹細胞移植が腫瘍の免疫寛容環境を解除することも示した。さらに、ドナーリンパ球をプレイミュナイゼーションしてがん関連抗原へのプライミングを促進することにより、自家造血幹細胞移植を明らかに増強できることを示した。自家造血幹細胞移植による腫瘍免疫の誘導は、腫瘍内 IFN 遺伝子導入だけでなく、腫瘍ワクチンなど様々な免疫療法と複合することが可能であり、免疫療法全体に対して発展性がある。来年度は、自家造血幹細胞移植後に腫瘍免疫を担うリンパ球の特徴を明らかとし宿主細胞との相互作用を解明し、抗腫瘍免疫をさらに効率よく誘導する治療戦略の開発に役立てる。

また、骨軟部肉腫に対する IFN 遺伝子治療の臨床研究に関しては、機関内の承認後、厚生労働省での承認を得て、臨床研究を実施する予定である。本臨床研究に附随して、免疫モニタリングや血清や組織を用いた免疫学的解析を行い、効果と安全性に関する汎用性のある評価技術の開発や、新規

バイオマーカー及び新たな診療標的の探索を行う予定である。

E. 結論

自家造血幹細胞移植が、腫瘍内の樹状細胞からの IL-6 分泌促進を介し、腫瘍局所の免疫抑制環境を解除する機序を明らかとした。また、ドナーのがん関連抗原へのプライミングを促進することにより、自家造血幹細胞移植の抗腫瘍効果を明らかに増強できることを示した。

将来的な、IFN 遺伝子治療と自家造血幹細胞移植の複合療法の臨床開発を目指し、段階的臨床研究として IFN 遺伝子治療単独の臨床研究の準備を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

●論文発表

1. Nishimoto T, Yamamoto Y, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by *in vivo* screening with a random peptide-displaying adenovirus library. PLoS ONE 7; e45550, 2012.
2. Miura Y, Yamazaki S, Julia D, Brown E, Aoki K, Vivkers S, Yamamoto M. Infectivity-selective Oncolytic Adenovirus Developed by High-throughput Screening of Adenovirus-formatted Library. Mol Ther 21:139-148, 2013
3. Kimura J, Ono H, Kosaka T, Makino H, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Hirai S, Ohno S, Aoki K, Davydova J, Yamamoto M, Kunisaki C, Endo I. Conditionally replicative adenoviral vectors for imaging the effect of chemotherapy on pancreatic cancer cells. Cancer Sci (in press).

●学会発表

1. Narumi K, Udagawa T, Aida K, Suzuki K, Makimoto A, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma. The American Society of Gene Therapy's 15th Annual Meeting. May 16-19, 2012 (Philadelphia).
2. Aoki K, Narumi K, Udagawa T. Combination therapy of hematopoietic stem cell transplantation and intratumoral interferon gene transfer to sarcoma (Symposium). 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
3. Yamamoto Y, Nishimoto T, Yoshida K, Goto N, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Development of peritoneal tumor-targeting vector by *in vivo* screening with a random peptide-displaying adenovirus library. 第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2012.
4. Aoki K, Udagawa T, Narumi K. Suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
5. Aida K, K Suzuki K, R Miyakawa R, K Narumi K, N Goto N, Ikarashi Y, Ohnami S, Yoshida T, Aoki K. Suppression of regulatory T cells enhances antitumor immunity induced by intratumoral IFN- α gene transfer to pancreatic cancer. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
6. Suzuki K, Miyakawa R, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. Antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation differs by a priming status of donor cells. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.
7. Miyakawa R, Suzuki K, Aida K, Goto N, Narumi K, Yoshida T, Aoki K. VEGF-D-mediated suppression of immune-tolerant microenvironment within tumors by hematopoietic stem cell transplantation. 第 71 回日本癌学会総会. Sep 19-21, 2012.