

- injection may enhance efficacy of peptide-specific cancer immunotherapy) Nobuoka D, Yoshikawa T, Takahashi M, Iwama T, Horie K, Shimomura M, Suzuki S, Sakemura N, Nakatsugawa M, Yagi T, Fujiwara T, Nakatsura T, 第 70 回日本癌学会、名古屋、2011 年 10 月 3 日～5 日
- 46) 婦人科癌に対する特異的癌免疫療法—明細胞腺癌を対象とした GPC 3 特異的ペプチドワクチン療法の第 I, II 相臨床試験 (Specific immunotherapy for gynecologic cancer —A clinical trial of GPC3 peptide vaccine for clear cell adenocarcinoma), 柴田清住、鈴木史朗、廣澤友也、梶山広明、梅津朋和、中面哲也、吉川史隆、第 70 回日本癌学会、名古屋、2011 年 10 月 3 日～5 日
- 47) T 細胞移入療法を目指した Glypican-3 ペプチド特異的 CTL の大量培養法の検討 (Investigation of large scale expansion of Glypican-3 (GPC3) peptide specific Cytotoxic T Lymphocytes for adoptive immunotherapy.)、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贅田美江、前川隆司、中面哲也、(Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Kuroda A, Shirakawa H, Nobuoka D, Sawada Y, Sakemura N, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T)、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日～29 日
- 48) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来 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、(Establishment of Glypican-3 (GPC3)-derived peptide specific CTL clones from PBMCs of patient showed remarkable clinical effect by GPC3 peptide vaccination.) Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Shirakawa H, Nobuoka D, Sawada Y, Nakatsura T、第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日～29 日
- 49) Identification of H2-K^b or -D^b restricted and glypican-3-derived CTL epitope peptide, Iwama T, Horie K, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shimomura M, Nakatsura T, 第 40 回日本免疫学会学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日～29 日
- 50) glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法における多施設共同研究の現状と展望、中面哲也、吉川聡明、澤田雄、信岡大輔、水野正一、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人、光永修一、池田公史、鈴木史朗、柴田清住、吉川史隆、細野亜古、原純一、真部淳、塩田曜子、木下義晶、孝橋賢一、シンポジウム 2 「癌ワクチン療法における多施設共同研究の現状と展望」第 24 回日本バイオセラピー学会、和歌山、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 51) ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、岩間達章、堀江和峰、下村真菜美、鈴木史朗、酒村智子、中津川宗秀、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也、第 24 回日本バイオセラピー学会、和歌山、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 52) 細胞療法の実現化に向けたゾレドロン酸を使用した Glypican-3(GPC3)ペプチド特異的 CTL の大量培養法の開発、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贅田美江、前川隆司、中面哲也、第 24 回日本バイオセラピー学会、和歌山、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 53) GPC3 ペプチドワクチン投与後、顕著な抗腫瘍効果とともに急性炎症反応、肝機能障害をきたした肝細胞がんの 1 例、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、下村真菜美、水野正一、中面哲也、第 24 回日本バイオセラピー学会、和歌山、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 54) Glypican-3 は卵巣明細胞腺がんに対して有効な免疫療法のターゲットとなりうる ～抗癌剤併用療法の可能性について～、鈴木史朗、吉川聡明、柴田清住、吉川史隆、中面哲也、第 24 回日本バイオセラピー学会、和歌山、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 55) 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
- 56) 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
- 57) Glypican-3-derived peptide vaccine therapy for cancer. (Workshop 3:The present status and the future perspective in cancer vaccine) Nakatsura T. 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
- 58) 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

- 59) 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
- 60) 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
- 61) 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
- 62) The Frequency of Glypican-3 Peptide-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Changes after Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Suzuki S, Nakatsugawa M, Sakemura N, Shimomura M, Horie K, Fujiwara T, Nakatsura T. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference、浦安 2011 年 3 月 1 日～3 日
- 63) Establishment of High Avidity CTL Clones from PBMCs of Patients Vaccinated with Glypican-3 Peptide. Yoshikawa T, Suzuki S, Nakatsugawa M, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Nakatsura T. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference、浦安、2011 年 3 月 1 日～3 日

G. 知的財産等の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

科学的・行政的背景をふまえた、細胞免疫療法の臨床開発に関する研究

研究分担者 平家 勇司 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野ユニット長

研究要旨

本研究班では、主として細胞免疫療法開発に焦点を絞り、研究を実施した。

1) ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球“Add-back”療法・ハプロ設定でのCD34陽性細胞移植+HSV-TK遺伝子導入細胞Tリンパ球Add back療法の臨床開発を行った。登録症例は2例ながら、臨床的・科学的目的を達成していることが証明できた。症例登録促進のため、プロトコルの改定と共に、韓国との共同治験に向けた取り組みを行った。

2) NKT・NK細胞療法・NKT細胞療法の臨床研究計画は承認されたものの、新たな免疫治療薬剤の承認や再生医療関連法規の成立に伴い、戦略の練り直しが必要となった。NK細胞療法で使用される細胞製造法開発に合わせて、臨床使用可能な培養液並びに関連機器の開発を行い、マスターファイル(MF)への登録、特許申請を行った。

3) 規制面での対応

再生医療関連新法の成立により、免疫細胞療法の置かれている環境が大きく変化した。国際細胞治療学会並びにアジア細胞治療学会を通じて、各国の規制当局者と開発手法、規制に関する議論をするとともに、その成果を厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金(革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業：珠玖班)を通じて省令に反映されるように働きかけた。

A. 研究目的

本研究の目的は、細胞免疫療法の開発手法の確立をめざして、遺伝子導入細胞製剤、NKT・NK細胞療法をモデルとして、細胞製剤の製造、品質管理並びに臨床評価方法の検討を行うことである。それに加えて、本研究の実施途中で、細胞製剤の承認申請に係る指針や高度医療、先進医療B、再生医療関連法案と、根幹にかかわる規制面での変化が見られたため、それらの問題点も踏まえ、提言を行うことも念頭に議論を進めることにした。

B. 研究方法

1) ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球
“Add-back”療法：本研究は、①遺伝子導入製剤の製造法並びに品質管理法の確立と、②細胞製剤の臨床的有用性の検証法の確立を目指して行った。①遺伝子導入細胞製剤の製造法並びに品質管理法の検証は、タカラバイオと共同して実施して行った。②の遺伝子治療臨床試験部分に関しては、先行するMolMed社の国際共同治験に参加することを目的に、原則共通の臨床研究計画を作成し実施した。その際、わが国において、代替ドナーの主体が臍帯血であることを踏まえ、臍帯血移植が治療

的有用性をもたらさない範囲に限って対象とすることとした。臨床評価に加えて、その科学的根拠を明確とするため、投与細胞並びに治療患者の免疫学的解析を行った。

2) NKT細胞療法・NK細胞療法

NKT細胞療法・NKT細胞培養法を確立し、確認申請で要求される項目に従って検討を行い、それを踏まえて臨床研究計画の承認を得た。本研究では、標準治療前に患者細胞を採取し、標準治療抵抗性となった段階で、Non-GMP下で治療用細胞を製造投与する計画とした。

NK細胞療法・健常者末梢血液を用いて、臨床で使用可能な最適化された培養液を選択開発した。共同研究機関が、米国において培養液のMaster Fileの取得を行った。クリーンルーム外での治療用細胞製造を目指して、共同研究機関と閉鎖系の細胞培養・洗浄・濃縮システムを構築し、特許申請を行った。

3) 規制面での対応：

再生医療関連法案の通過に伴い、治療用細胞製造の委託が可能となった。また薬事法下での条件付き承認等、免疫細胞療法を取り巻く環境が大きく変化している。国際細胞治療学会並びにアジア細

胞治療学会を通じて、海外の規制当局者と免疫細胞療法の規制に関して議論するとともに、その成果を厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金（革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業：珠玖班）を通じて行政に反映されるように試みる。

（倫理面への配慮）

患者あるいはボランティア検体を用いた研究実施に際しては、臨床研究倫理指針等の関連指針を踏まえた研究計画を作成し、国立がん研究センター内の倫理審査委員会の承認を受けた上で行った。

C. 研究結果

1) ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球“Add-back”療法：

①ハプロ設定でのCD34陽性細胞移植+HSV-TK遺伝子導入細胞Tリンパ球Add back療法の臨床試験に2例の症例を登録した。その内1例で、免疫再構築が得られ、臨床的にも有用性が確認された。また、GVHDがGCVでコントロールされるなど、POCも得ることができた。他の1例は、免疫再構築が得られる前に、感染症で死亡した。

②上記症例で投与した細胞並びに投与後の患者免疫細胞の詳細な解析を行った。（投与細胞の品質管理は別途行った）投与細胞は、Ki67陽性活性化リンパ球で、GVHD発症時に患者体内で増加していることが確認された。Ki67陽性リンパ球は、GCV投与によって減少し、臨床症状並びに病理所見と連動することが示された。これにより、本遺伝子治療において、HSV-TKが機能し、GVHDの改善につながっていることが科学的に証明された。併せて、末梢リンパ球のレパトア解析を行い、T細胞の多様性が回復していることも示された。これにより、本症例では、臨床的・科学的に、治療の目的すべてが達成されていることが、示された。

③2例目は、免疫再構築が達成されるまでに、感染症により死亡した。重篤な有害事象として報告すると共に、診療科内で協議し、スケジュール通りの遺伝子導入細胞製剤の投与を実施することで合意され、試験を継続することとなった。

④最終的には、症例登録を加速化するため、登録条件の変更をすることになり、現在変更手続きを行っている。

⑤上記に併せて、対象患者を広げた上で日本・韓国での共同治験を実施することで共同研究企業と合意し、韓国の医療機関、規制当局との打ち合わせを行った。

⑥遺伝子導入細胞製剤製造に必要な抗体の製造元が変更になったため、新たな製造法で製造された

細胞製剤の同等性の確認を実施した。

⑦⑤を実施するために、規制当局の視察を受け、治験用遺伝子導入細胞製剤製造施設としての評価並びに助言を受けた。現在、それに対する対応を協議中である。

2) NK・NKT細胞療法：

①NKT細胞療法・・症例登録を保留している。i 新たな分子標的薬剤の承認により、標準治療終了後の細胞免疫療法のWindow幅が狭まっている、ii 抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体等の免疫チェックポイントの承認により、本試験の前に免疫治療が入ることになり、適格から外れてしまう、iii 再生医療関連新法の成立により、院内調製品を用いた臨床試験の最終ゴールが不明瞭となったため、戦略を練り直す必要があると判断したためである。

②NK細胞療法：健常者の細胞を用いて、培養液並びに培養バッグ、洗浄・濃縮バッグの開発を行った。これらの開発は、企業との共同研究にて行い、米国におけるMaster Fileの取得と共に、わが国初のGMPに対応可能な培地製造設備に結び付いた。培養バッグ並びに洗浄濃縮バックに関しても、共同研究者と特許を取得した。NK細胞療法に関しては、担癌患者における培養試験を実施の後、臨床試験を行う予定である。

規制面での対応：

再生医療関連法案により、細胞免疫療法の開発手法も大きな影響を受けている。国際細胞治療学会、アジア細胞治療学会を通じて、韓国、台湾、シンガポールさらには欧州の規制当局等の、細胞療法に関する規制当局対応の情報を入手した。その成果を厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金（革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業：珠玖班）の議論の中に反映させた。珠玖班を通じて省令等の制定さいし提言を出していく予定である。

3) 規制面での対応：

再生医療関連法案により、細胞免疫療法の開発手法も大きな影響を受けている。国際細胞治療学会、アジア細胞治療学会を通じて、韓国、台湾、シンガポールさらには欧州の規制当局等の、細胞療法に関する規制当局対応の情報を入手した。その成果を厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金（革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業：珠玖班）の議論の中に反映させた。珠玖班を通じて省令等の制定さいし提言を出していく予定である。

D. 考察

ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球“Add-

back”療法：

登録症例の臨床並びに基礎的解析にて、本遺伝子治療が狙ったメカニズムで機能し、患者治療に結びつくことが示された。臍帯血移植が普及するなど、わが国の臨床的な特殊性から患者登録が進んでいないが、プロトコルを改定し本試験を完遂し、その成果を生かして開発を継続すべきと考えている。

NKT・NK細胞療法：

標準治療の変化、再生医療関連法案・ガイドラインの変化に伴い、現在のNKT細胞療法は実行可能性が乏しく患者にメリットも少ないと考え、中止する方針で関係者と協議を進めている。NK細胞療法の準備を通じて、臨床用細胞製造のための培養液、培養バッグの開発、マスターファイルへの登録、閉鎖系培養システムの構築をおこなった。今後、患者検体を用いた実行可能性の検証を加えながら、臨床試験実施に向けた準備を進めていく。

規制面での対応：

再生医療関連法案の成立により、治療用細胞製造の委託が可能となり、さらに条件付き承認が認められるようになった。この中で、Central CPCでの細胞製剤製造と医療機関での院内調製品としての治療用細胞製造が区別され、また薬事法下での条件付き承認と医療法下での先進医療Bとの区別もなされる予定である。当施設では、治療用細胞製剤を院内調製品として製造してきたが、開発戦略を根本的に見直す必要があると考える。同時に、現在までの経験を活かせるように、関連省令等作成において提言をしていくことが必要と考える。

E. 結論

抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体の承認により、治療戦略における免疫細胞療法の位置づけが大きく変化している。また、再生医療関連法案の成立により、その開発戦略の変更も迫られている。これらを十分踏まえ、遺伝子導入細胞製剤やNK細胞療法の臨床開発戦略を再検討する必要がある。実施中の細胞療法において、患者にとって有用な症例もみられていることから、今までの経験を無にせず、活かしながら進めていけるよう体制を整えるとともに、再生医療関連新法にかかわる省令作成時に働きかけを行う必要があると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanosaki R, Kumazawa T, Yoshida A, Oguni S, Nakano A, Yamagata S, Takahashi N, Kurosawa S, Kim SW, Yamashita T, Mori S, Heike Y, Fukuda T, Hamaguchi Y, Tsuda H. Novel and rapid

enumeration method of peripheral blood stem cells using automated hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*. 2013 Dec 27. doi: 10.1111/ijlh.12182. [Epub ahead of print]

- 2) Hiramoto N, Kurosawa S, Tajima K, Okinaka K, Tada K, Kobayashi Y, Shinohara A, Inoue Y, Ueda R, Tanaka T, Kim SW, Yamashita T, Heike Y, Fukuda T. Positive impact of chronic graft-versus-host disease on the outcome of patients with de novo myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a single-center analysis of 115 patients. *Eur J Haematol*. 2013 Oct 15. doi: 10.1111/ejh.12214. [Epub ahead of print]
 - 3) Yamasaki S, Miyagi-Maeshima A, Kakugawa Y, Matsuno Y, Ohara-Waki F, Fuji S, Morita-Hoshi Y, Mori M, Kim SW, Mori S, Fukuda T, Tanosaki R, Shimoda T, Tobinai K, Saito D, Takaue Y, Teshima T, Heike Y. Diagnosis and evaluation of intestinal graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced-intensity and myeloablative conditioning regimens. *Int J Hematol*. 2013 Mar;97(3):421-6. doi: 10.1007/s12185-013-1297-9. Epub 2013 Feb 23
 - 4) Morita-Hoshi Y, Mori SI, Soeda A, Wakeda T, Ohsaki Y, Shiwa M, Masuoka K, Wake A, Taniguchi S, Takaue Y, Heike Y. Identification of molecular markers for pre-engraftment immune reactions after cordblood transplantation by SELDI-TOF MS. *Bone Marrow Transplant*,45(11):1594-601,2010.
2. 学会発表
- 1) Kitano S, Jianda Yuan, Tada K, Itoh A, Ueda R, Hashimoto H, Michael A Postow, Alexander M Lesokhin, Jedd D Wolchok, Heike Y. Immunomonitoring for anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) therapy in metastatic melanoma. 第17回日本がん免疫学会総会2013
 - 2) 平家勇司 免疫療法開発を支えるための、バイオマーカー解析の標準化「HLA-Class I 免疫染色の標準化の試み」第26回 日本バイオセラピー学会学術集会総会2013
 - 3) Heike Y. Standardization of immunostaining and evaluation of HLA class I expression in tumor

- tissues. Cancer Immunotherapy Consortium, 2013 Scientific Colloquium
- 4) 分田貴子、西岡琴江、菊池弥寿子、多田敬一郎、小川利久、平家勇司。がん治療に伴う外見変化へのカバーメイク：患者に使いやすい製品の開発と評価。第72回日本がん学会学術集会総会2013
 - 5) 松山卓哉、今井俊夫、平家勇司、青木一教、加藤和則、金成元、中釜斉、五十嵐美德。NKT細胞リガンドはドナーT細胞の増殖を抑制することによって移植片対宿主病を制限する。第72回日本がん学会学術集会総会2013
 - 6) 平家勇司：がんに対する免疫療法の確立を目指して～同種造血幹細胞移植科から免疫治療へ～：第8回九州小児免疫フォーラム、2012
 - 7) Heike Y：Overview of Peptide Therapeutics and Vaccines in Development. :IBC's4th Annual AsiaTIDES Oligonucleotide and Peptide Research,Technology and Product Development.2012
 - 8) 平家勇司：Overview of peptide Therapeutics and Vaccines in Development：Asia TIDES、2012
 - 9) Heike Y,Hoshi Y, Wakeda T, Yamagata S,Takahashi N, Manita T, Nakano K,Fukuda T, Kurosawa S, Yamashita T, Kim SW, Hiramoto N, Okinaka K：Donor-recipient chimerism analysis of CD3(-) cells is a useful tool for prediction and early detection of relapse after allogeneic stem cell transplantation.：38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation、2012
 - 10) 五十嵐美德、青木一教、金成元、今井俊夫、Rovert M. Hoffman、中釜斉、平家勇司。NKT-cell-ligand inhibits donor engraftment after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 第71回日本癌学会学術総会2012
 - 11) 分田貴子、西田純幸、坪井昭博、保仙直毅、尾路祐介、梅田智恵、種村篤、片山一朗、岡芳弘、杉山治夫、平家勇司。がんワクチン治療と患者QOL接種痕に対するカバーメイクの導入 第71回日本癌学会学術総会2012
 - 12) Ueda R, Hiramoto N, Mori S, Kurosawa S, Tanaka T, Tada K, Kobayashi Y, Morikawa N, Shinohara A, Okinaka K, Yamashita T,Heike Y, and Fukuda T. Immunochromatography Method Was Useful in Prompt Diagnosis of Potentially Fatal Norovirus Gastroenteritis After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; 118: 4542.
 - 13) Hiramoto N, Tajima K, Kurosawa S, Yamashita T, Okinaka K, Morikawa N, Tada K, Tanaka T, Ueda R, Kobayashi Y, Shinohara A, Kim SW, Mori S, Heike Y, and Fukuda T. Alloimmune Effect May Improve Survival of De Novo Myelodysplastic Syndrome After allogeneic hematopoietic cell transplantation: A Single Center Analysis of 115 Patients. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; 118: 2033.
 - 14) Tanosaki R, Kumazawa T, Yoshida S, Nakano A, Yamagata S, Takahashi N, Kurosawa S, Mori S, Heike Y, Fukuda Y, Furuta K, and Tsuda H, A Novel Enumeration Method for Hematopoietic Progenitor Cells in Collecting Peripheral Blood Stem Cell for Transplantation. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2011; 118: 1922.
 - 15) 平家勇司、個別化医療とチーム医療「個別化治療とは何か」第11回オンコロジーセミナー、2011年11月12日
 - 16) Heike Y, Wakeda,T Fukuda,T Mori,M Nukaya,I Mieno,J Takesako,K and Takaue,Y. Phase-I trial of T cell-depleted haplo-identical stem cell transplantation (Haplo-SCT) combined with HSV-TK gene modified T cell add-back. 二国間交流事業セミナー2011
 - 17) Heike Y, Phase-I Trial of cell-Depleted Haplo-Identical Stem Cell Transplantation (Haplo-SCT) Combined with HSV-TK Gene Modified T cell Add-Back, The fifth International Conference on Cell Therapy. November1,2011
 - 18) Heike Y, Multidisciplinary approach for cancer immunotherapy based on the results of immunomonitoring obtained from allogeneic stem cell transplantation. France-Japan Symposium on Cancer Research November1-2,2011
 - 19) 平家勇司：国立がん研究センターにおける、WT1ペプチドワクチン療法開発戦略：第13回WT1ペプチド癌免疫治療法研究会、2011
 - 20) 分田貴子、平家勇司、西田純幸、坪井昭博、保仙直毅、尾路祐介、梅田智恵、種村篤、片山一朗：ワクチン投与局所反応への対処 カバーメイクとQOL：第13回WT1ペプチド癌免疫治療法研究会、2011
 - 21) 上野誠、奥坂拓志、平家勇司：切除不能、再発胆道癌を対象としたゲムシタビン+CDDP治療の第I/II相試験：第13回WT1ペプチド癌免疫治療法研究会、2011
 - 22) 平家勇司、星百合子、分田貴子、八牧愉二、山形静香、福田隆浩、森慎一郎、金成元、田野崎隆二、朝倉義崇、平本展大、高上洋一：キメラ解析並びにWT1 mRNA発現定量解析によ

- る、同種造血幹細胞移植後の早期再発予想並びに早期発見の試み：第33回日本造血細胞移植学会総会、2011
- 23) Tada Y, Kim SW, Asakura Y, Hiramoto N, Yakushijin K, Kurosawa S, Ueno N, Kamiyama Y, Fukuhara S, Mori S, Heike Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, and Fukuda T. Comparison of Outcomes After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation (Allo-HCT) In 73 Patients with Follicular Lymphoma (FL), Transformed Follicular Lymphoma (TL), or *De Novo* Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Favorable Outcome for TL Similar to FL. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 3508.
- 24) Maeda T, Yakushijin K, Asakura Y, Hiramoto N, Kurosawa S, Kamiyama Y, Fukuhara S, Ueno N, Kim SW, Mori S, Tanosaki R, Heike Y, Tobinai K, Takaue Y, and Fukuda T. Engraftment Syndrome (ES) After Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation (RIST): ES May Have a Negative Impact on Survival In Standard-Risk Patients. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 2318.
- 25) 平家勇司、星百合子、開田美保、分田貴子、八牧愉二、高橋典子、山形静香、眞仁田智世、島田真紀子：ドナー患者キメラ解析とWT1mRNA発現定量解析を用いた、同種造血幹細胞移植後早期再発の診断並びに予想法の開発：第2回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、2010
- 26) 平家勇司、分田貴子、星百合子、八牧愉二、：WT1ペプチドワクチン臨床開発における、国立がん研究センターの役割：第48回日本癌治療学会学術集会、2010
- 27) 奥坂拓志、上野秀樹、森実千種、近藤俊輔、山口智宏、星百合子、開田美保、分田貴子、八牧愉二、平家勇司：進行膵胆道がんに対するゲムシタビン+WT1ペプチドワクチン併用療法の第1相試験：第48回日本癌治療学会学術集会、2010
- 28) 五十嵐美徳、青木一教、平家勇司、山崎貴裕、中釜斉、高上洋一：移植細胞対宿主病マウスモデルを用いたドナー細胞の浸潤の生体内蛍光イメージングによる非侵襲性モニタリング：第69回日本癌学会学術総会がん征圧へ向けての知の統合、2010
- 29) Wakeda T, Yamaki Y, Kaida M, Hoshi Y, Takahashi N, Yamagata S, Shimada M, Takaue Y, Heike Y : A NOVEL SELECTIVE CULTURE METHOD OF NETURAL KILLER CELLS STIMULATED WITH ALPHA-GALACTOSYL CERMIDE AND RETRONECTIN LEADS TO THE GENE-TRANSDUCTION TO NK CELLS : 第16回日本遺伝子治療学会学術総会、2010
- 30) Yamaki Y, Wakeda T, Kida M, Hoshi Y, Takahashi N, Yamagata S, Shimada M, Ikarashi Y, Aoki K, Takaue Y, Heike Y : LYMPHOCYTE EXPANSION FROM PERIPHERAL BLOOD USING RECOMBINANT HUMAN FIBRONECTIN FRAGMENT(CH-296;RETRONECTIN) : 第16回日本遺伝子治療学会学術総会、2010
- 31) Yamaki Y, Wakeda T, Hoshi Y, Takahashi N, Yamagata S, Ikarashi Y, Aoki K, Enoki T, Ideno M, Mineno J, Takaue Y, Heike Y : Ex-vivo Expansion of Lymphocytes from Cord Using Recombinant Human Fibronectin Fragment(CH-296;RETRONECTIN) : The 1st ISCT Asia-Pacific Regional Meeting, 2010
- 32) Ikarashi Y, Aoki K, Heike Y, Yamazaki T, Takaue Y : Screening of Immunomodulating Drugs for Graft-versus-host disease by in vivo Fluorescence Imaging : The 1st ISCT Asia-Pacific Regional Meeting, 2010
- G. 知的所有権の取得状況
- 1.特許取得
- 1) 遠心分離用容器、遠心分離用容器の姿勢保持用アダプター及び遠心分離用具、平家勇司、特願2009-288141、PCT/JP2010/073473、CN201080057787.5、EP10837731、出願日2009/12/18
- 2) 出願日細胞培養容器、細胞培養用具、及び細胞培養方法、平家勇司、特願2012-288994、出願日2012/12/28
- 2.実用新案登録
- 該当なし
- 3) その他
- 該当なし

がん特異的蛍光発現ウイルス製剤による診断研究に関する研究

－ウイルス製剤のがん診断・治療への応用－
がん特異的蛍光発現ウイルス製剤による診断研究（H22～24年度）
抗癌剤併用ウイルス療法の前臨床研究（H25年度）

研究分担者 藤原 俊義 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学・教授

研究要旨

テロメラーゼ活性依存性に癌細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起すアデノウイルス製剤 Telomelysin および癌細胞で選択的に増殖して GFP 蛍光遺伝子を発現する TelomeScan のがん診療への応用を研究してきた。

H22～24年度には、TelomeScan を用いて消化器がん患者の腹腔内遊離癌細胞の新たな検出法を確立し、トランスレーショナル・リサーチとしてその有用性を検討した。胃癌患者の手術の際に腹腔洗浄液中の細胞を回収し、TelomeScan を感染させ、24時間培養後に蛍光顕微鏡にて GFP 発現細胞をカウントした。進行胃癌患者 31 例において、GFP 陽性細胞が多い症例では予後不良であり、一方、細胞診が陽性であった症例でも、GFP 陽性細胞が 0 あるいは 1 個であった症例では補助化学療法で比較的長期に生存が得られることが明らかとなった。

H25年度は、今後の Telomelysin の放射線化学療法との併用のための前臨床研究として、各種抗癌剤と Telomelysin の相乗効果を検討した。抗癌剤（5-FU あるいはシスプラチン）を先行、Telomelysin を先行、両者を同時投与の 3 群の容量依存曲線から CI（combination index）を算出して比較したところ、Telomelysin 先行後にシスプラチンを投与するスケジュールで効果的な相乗効果が認められた。

A. 研究目的

消化器癌の死亡原因として、腹膜播種（癌性腹膜炎）は重大な予後規定因子である。最近では、胃癌などの手術時にも治療方針決定の最重要因子となる術中洗浄細胞診が一般に広く行われているが、その正診率は必ずしも十分ではない。本研究では、がん特異的 GFP 蛍光発現アデノウイルス製剤である TelomeScan を用いて、より簡便かつ再現性を持って生きた癌細胞を可視化できる方法を開発し、臨床応用することを目的とする。また、予後との相関を検討し、治療方針の決定に寄与することを目指す。

Telomelysin はウイルスの生活環に由来する巧妙な分子機構を基盤とする遺伝子改変生物製剤であり、従来の抗癌治療とは全く異なる作用機序を有することから独創性の高いシーズである。ヒトへの Telomelysin 局所投与の安全性は、米国食品医薬品局（US FDA）の承認のもと、2006年より米国で実施した各種固形癌に対する第 I 相臨床試験で実証されている。本研究では、前臨床研究として各種抗癌剤と Telomelysin の相乗効果を検討し、今後の集学的治療としての Telomelysin の有用性を検証する。

B. 研究方法

1) Telomelysin（OBP-301）は、「かぜ」症状の原因となるアデノウイルス 5 型を基本骨格とし、ウイルス増殖に必須の *E1* 遺伝子を 80% 以上のヒト悪性腫瘍でその活性の上昇が認められているテロメラーゼのプロモーターで制御することで、癌細胞のみで増殖し細胞死を誘導するように遺伝子改変された国産のウイルス製剤である。また、TelomeScan（OBP-401）は、Telomelysin のウイルスゲノムの *E3* 領域に GFP 遺伝子を搭載した診断用ウイルス製剤である。

2) 進行胃癌症例 31 例において、開腹手術あるいは腹腔鏡補助下手術の際に、同意を得た上で腹腔洗浄液を採取し、TelomeScan を感染させて GFP 陽性細胞と細胞診陽性の癌細胞の検出感度を検討した。生細胞数の比率や細胞診陽性の癌細胞の viability、さらに予後との相関などを検討した。

3) 食道癌細胞をはじめとして各種癌細胞、肉腫細胞などを用いて、各種抗癌剤と Telomelysin の併用効果を検討した。容量依存曲線を作成し、CI（combination index）を算出することで相乗効果の確認を行った。また、抗癌剤先行、Telomelysin 先

行、あるいは同時投与など投与スケジュールと投与量を比較し、至適プロトコルを検討した。
(倫理面への配慮)

自立的な増殖力及び感染力を保持しているテロメスキャンを用いた研究は「大臣確認実験」となるため、平成16年8月に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を作成、学内の担当部署での検討の後に文部科学省に申請し、研究計画実施の承認を得ている。平成24年6月、期間延長のため再度申請し、文部科学省にて拡散防止措置の確認を得ている。

C. 研究結果

1) 31例の胃癌患者 (Stage Ia : 2例、Ib : 1例、IIa : 3例、IIb : 1例、IIIa : 4例、IIIb : 3例、IIIc : 5例、IV : 12例) の手術の際に腹腔洗浄液中の細胞を回収し、遠心にてペレットを形成した。細胞のviabilityは19.75%から99.8%であった。必要に応じて赤血球を溶血にて除去した。初期15例では 1×10^4 plaque forming units (PFU)のTelomeScanを感染させ、24時間培養後、蛍光顕微鏡にてGFP発現細胞をカウントした。Multiplicity of infection (MOI)は0.00027から0.31であり、細胞診Class Vの1例では39個のGFP発現細胞が検出されたが、2例のClass V、1例のClass IV症例ではGFP細胞陰性であった。16例目では洗浄液中の生細胞数をカウントしてTelomeScanを10 MOIに固定して感染させた。細胞診はClass IIであったが、1000個以上のGFP陽性細胞が認められた。17例目から31例目までは1 MOIに固定して検討を行ったが、Class V 7例のうち5例で1000個以上、1例で1個、1例で陰性であった。予後との相関では、GFP陽性細胞が10個以上みられた症例は7例であり、そのうち5例は死亡、1例は細胞診が陰性であったがGFP陽性細胞は1000個以上認められており、術後半年で卵巣転移と腹膜播種を来した。また、死亡例中1例は細胞診陽性でGFP陽性細胞1000個以上みられ、胃切除を行ったが術後3ヶ月で再発し術後8ヶ月目に死亡した。GFP陽性細胞が0あるいは1個で細胞診がClass IVあるいはVであった6例中5例は、術後1~2年になるが化学療法を受けながら生存中である。

2) 上皮系腫瘍細胞として、食道癌細胞株 (TE8、SEG1) を用いて検討を行ったところ、Telomelysinと5-FU、シスプラチンの併用でTE8ヒト食道扁平上皮癌細胞株、SEG1ヒト食道腺癌細胞株、いずれでも相乗効果が認められた。また、抗がん剤先行、同時投与、Telomelysin先行の3パターンを比較したところ、Telomelysin先行後に抗がん剤を投与するスケジュールにおいて、より効果的な相乗効果を認めた。非上皮系腫瘍細胞として骨肉腫細胞株

(HOS、MNNG/HOS、143B、SaOS-2) を用いて、各種抗癌剤 (シスプラチン、5-FU、ドキソルビシン) とTelomelysinの併用効果を検討したところ、Telomelysinとドキソルビシン、シスプラチンの併用ですべての骨肉腫細胞で相乗効果が認められた。

D. 考察

生物製剤であるTelomeScanによる癌細胞の可視化は、免疫染色やPCRによる方法と異なり、生きた癌細胞のみを検出するため、検出結果と予後との相関もより正確な関連性が認められると期待される。また、腹膜播種の引き金となる腹腔内遊離細胞の生物学的特性を解明していくことで、新たな消化器癌治療戦略の開発にもつながると考えられる。

現在までの検討で、GFP陽性細胞が多い症例では予後不良である傾向がみられている。一方、細胞診が陽性であった症例でも、GFP陽性細胞が0あるいは1個であった症例では補助化学療法で評価病変が出現せず、比較的長期に生存が得られている。この結果は、細胞診陽性よりもGFP陽性細胞数の方が術後の臨床経過を反映している可能性を示唆している。今後、さらに症例数を増やしながらか細胞診陽性の患者とGFP発現細胞陽性の患者のprogression free survival (PFS) およびoverall survival (OS) を比較検討していく予定である。

Telomelysinは癌細胞で選択的に増殖・複製する機能を有しており、自立的に癌細胞を破壊することで増殖したウイルスが拡散していく。テロメラーゼという多くのヒト癌細胞で活性化されている分子を標的として用いることで、広範な癌種に対応することが可能である。また、Telomelysinによる細胞死は、放射線や抗癌剤によるアポトーシスとは異なるオートファジーなどの機序により生じるため、既存の治療法に耐性の癌細胞にも有効であると推測される。

本研究で、実際に上皮系の食道癌細胞ならびに非上皮系の骨肉腫細胞でTelomelysinと抗癌剤 (シスプラチン、5-FU、ドキソルビシン) の相乗効果が明らかとなり、またTelomelysinを先行するプロトコルでより顕著な効果が観察された。今後は、Telomelysinが抗癌剤の感受性を増強するメカニズムについて詳細な解析を行っていくとともに、ヌードマウスと各種癌細胞株を用いて背部腫瘍あるいは同所性腫瘍モデルを作成し、*in vivo*における抗癌剤の全身投与とTelomelysinの局所投与の併用効果を検討していく予定である。

Telomelysinは従来の抗癌剤とは全く作用機序の異なる生物製剤であり、難治癌である食道癌や頭頸部癌に対する放射線化学療法にウイルス療法を

併用する集学的治療を確立することで、より低侵襲な局所制御療法として患者の生活の質 (QOL) の向上に貢献すると期待される。

E. 結論

- 1) TelomeScan により進行胃癌腹膜播種患者において、腹腔内浮遊癌細胞を可視化することができ、予後との相関がみられる可能性が示唆された。
- 2) Telomelysin は、上皮系および非上皮系ヒト悪性腫瘍細胞において、抗癌剤と相乗効果を示す。

F. 研究発表

- 1) Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Osaki, S., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Kagawa, S., Uno, F., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. A simple detection system for adenovirus receptor expression using a telomerase-specific replication-competent adenovirus. *Gene Ther.*, 20: 112-118, 2013.
- 2) Hasei, J., Sasaki, T., Tazawa, H., Osaki, S., Yamakawa, Y., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Dual programmed cell death pathways induced by p53 transactivation overcome resistance to oncolytic adenovirus in human osteosarcoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 12: 314-325, 2013.
- 3) Nobuoka, D., Yoshikawa, T., Takahashi, M., Iwama, T., Horie, K., Shimomura, M., Suzuki, S., Sakemura, N., Nakatsugawa, M., Sadamori, H., Yagi, T., Fujiwara, T., Nakatsura, T. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 62: 639-652, 2013.
- 4) Ohara, T., Noma, K., Urano, S., Watanabe, S., Nishitani, S., Tomono, Y., Kimura, F., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. A novel synergistic effect of iron depletion on anti-angiogenic cancer therapy. *Int. J. Cancer*, 132: 2705-2713, 2013.
- 5) Shigeyasu, K., Kagawa, S., Uno, F., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Gochi, A., Kimura, T., Takahata, T., Nonaka, Y., Ninomiya, M., Fujiwara, T. Multicenter phase II study of S-1 and docetaxel combination chemotherapy for advanced or recurrent gastric cancer patients with peritoneal dissemination. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 71: 937-943, 2013.
- 6) Nobuoka, D., Yoshikawa, T., Takahashi, M., Iwama, T., Horie, K., Shimomura, M., Suzuki, S., Sakemura, N., Nakatsugawa, M., Sadamori, H., Yagi, T., Fujiwara, T., Nakatsura, T. Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 62: 639-652, 2013.
- 7) Li, G.D., Kawashima, H., Ogose, A., Ariizumi, T., Hotta, T., Kuwano, R., Urata, Y., Fujiwara, T., Endo, N. Telomelysin shows potent antitumor activity through apoptotic and non-apoptotic cell death in soft tissue sarcoma cells. *Cancer Sci.*, 104: 1178-1188, 2013.
- 8) Yano, S., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Uno, F., Nagasaka, T., Urata, Y., Kagawa, S., Hoffman, R. M., Fujiwara, T. A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells into S/G2/M-phases. *Clin. Cancer Res.*, 19:6495-6505, 2013.
- 9) Hashimoto, Y., Tazawa, H., Teraishi, F., Kojima, T., Watanabe, Y., Uno, F., Yano, S., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. The hTERT promoter enhances the antitumor activity of an oncolytic adenovirus under a hypoxic microenvironment. *PLoS One*, 7: e39292, 2012.
- 10) Yoshida, R., Yagi, T., Sadamori, H., Matsuda, H., Shinoura, S., Umeda, Y., Sato, D., Utsumi, M., Nagasaka, T., Okazaki, N., Date, A., Noguchi, A., Tanaka, A., Hasegawa, Y., Sakamoto, Y., Fujiwara, T. Branched-chain amino acid-enriched nutrients improve nutritional and metabolic abnormalities in the early post-transplant period after living donor liver transplantation. *J. Hepato-Bil- Panc. Sci.*, 19: 438-448, 2012.
- 11) Nobuoka, D., Motomura, Y., Shirakawa, H., Yoshikawa, T., Kuronuma, T., Takahashi, M., Nakachi, K., Ishii, H., Furuse, J., Gotohda, N., Takahashi, S., Nakagohri, T., Konishi, M., Kinoshita, T., Komori, H., Baba, H., Fujiwara, T., Nakatsura, T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Oncol.*, 40: 63-70, 2012.
- 12) Yamasaki, Y., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kojima, T., Kuroda, S., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Mizuguchi, H., Ohtsuru, A., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. A novel apoptotic mechanism of genetically engineered adenovirus-mediated tumour-specific p53 overexpression through E1A-dependent p21 and MDM2 suppression. *Eur. J. Cancer*, 48: 2282-2291, 2012.
- 13) Tazawa, H., Yano, S., Yoshida, R., Yamasaki, Y., Sasaki, T., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Ouchi, M., Onishi, T., Uno, F., Kagawa, S., Urata, Y., Fujiwara, T. Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int. J. Cancer*, 131, 2939-2950, 2012.
- 14) Yoshida, R., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Yano, S., Onishi, T., Sasaki, T., Shirakawa, Y., Kishimoto, H., Uno, F., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T. Mechanism of resistance to trastuzumab and molecular sensitization via ADCC activation by exogenous expression of HER2-extracellular

- domain in human cancer cells. *Cancer Immuno. Immunother.*, 61: 1905–1916, 2012.
- 15) Watanabe, Y., Hashimoto, Y., Kagawa, S., Kawamura, H., Nagai, K., Tanaka, N., Urata, Y., Fujiwara, T. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-specific oncolytic adenovirus with valproic acid against human cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, 19: 767-772, 2012.
- 16) Sadamori, H., Yagi, T., Matsuda, H., Shinoura, S., Umeda, Y., Fujiwara, T. Intractable bile leakage after hepatectomy for hepatocellular carcinoma in 359 recent cases. *Dig. Surg.*, 29: 149-156, 2012.
- 17) Fujiwara, T., Kagawa, S., Tazawa, H. Synergistic interaction of telomerase-specific oncolytic virotherapy and chemotherapeutic agents for human cancer. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13: 1809-1816, 2012.
- 18) Kuroda, S., Urata, Y., Fujiwara, T. Ataxia-Telangiectasia Mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 Complex: Promising Targets for Radiosensitization. *Acta Med. Okayama*, 66: 83-92, 2012.
- 19) Fujiwara, T. In vivo imaging of human cancer with telomerase-specific replication-selective adenovirus. In “In Vivo Vellular Imaging Using Fluorescent Proteins” (Hoffman, R. B., ed.), pp129-139, Humana Press, c/o Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA, 2012.
- 20) Sasaki, T., Tazawa, H., Hasei, J., Kunisada, T., Yoshida, A., Hashimoto, Y., Yano, S., Yoshida, R., Uno, F., Kagawa, S., Morimoto, Y., Urata, Y., Ozaki, T., Fujiwara, T. Preclinical evaluation of telomerase-specific oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17: 1828-1838.
- 21) Sugio, K., Sakurai, F., Katayama, K., Tashiro, K., Matsui, H., Kawabata, K., Kawase, A., Iwaki, M., Hayakawa, T., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin. Cancer Res.*, 2011, 17: 2807-2818.
- 22) Ohara, T., Takaoka, M., Toyooka, S., Tomono, Y., Nishikawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Tanaka, N., Fujiwara, T., Naomoto, Y. Inhibition of mTOR by temsirolimus contributes to prolonged survival of mice with pleural dissemination of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 2011, 102: 1344-1349.
- 23) Kishimoto, H., Aki, R., Urata, Y., Bouvet, M., Moriyama, M., Tanaka, N., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Tumor-selective adenoviral-mediated GFP genetic labeling of human cancer in the live mouse reports future recurrence after resection. *Cell Cycle*, 2011, 10: 2737-2741.
- 24) Li, G., Kawashima, H., Ogoose, A., Ariizumi, T., Xu, Y., Hotta, T., Urata, Y., Fujiwara, T., Endo, N. Efficient virotherapy for osteosarcoma by telomerase-specific oncolytic adenovirus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2011, 137: 1037-1051.
- 25) Fujiwara, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S. Telomerase-specific oncolytic virotherapy for human gastrointestinal cancer. *Expert Rev. Anticancer Th.*, 2011, 11: 525-532.
- 26) Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T. MicroRNA as potential target gene in cancer gene therapy of gastrointestinal tumors. *Expert Opin. Biol. Th.*, 2011, 11: 145-155.

G. 知的財産等の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

WT1ペプチド癌ワクチンの開発に関する研究

研究分担者 杉山 治夫 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

ウィルムス腫瘍遺伝子WT1は、白血病やほとんどすべての種類の固形癌に発現する汎腫瘍抗原である。HLA-A*2402拘束性WT1ペプチドを開発し、このWT1ペプチドを用いたがんの免疫療法の臨床研究を世界に先駆けて行い、その有用性を明らかにした。特に白血病、骨髄異形成症候群、脳腫瘍や膵癌で有効性が高かった。切除不能進行性膵癌においては、WT1ワクチン+ジェムザール投与で、ジェムザール単独のヒストリカルコントロールに対し、OSの延長を認めた(J Immunother, in press)。そこで、WT1ワクチン+ジェムザール対ジェムザール単独の非盲検ランダム化第II相臨床研究(150人を1:1にランダム化)を計画し、現在進行中である。今後、WT1ワクチンの臨床効果を増強させるため、①白血病では寛解期、固形癌では手術直後の腫瘍量の少ない時期にWT1ワクチンを開始する。②WT1ヘルパーペプチドワクチンを併用するなどを計画し、すでに一部はスタートしている。

A. 研究目的

ウィルムス腫瘍遺伝子WT1は、白血病やほとんどすべての種類の固形癌に発現する汎腫瘍抗原であることを見出し、HLA-A*2402拘束性WT1ペプチドを開発し、これを用いたがんの免疫療法の第I相臨床研究を世界に先がけて実施し、その安全性と有用性を確立した。本研究目的は癌腫毎の有用性を明確にし、本免疫療法を医療として確立することである（下記の1-3の臨床研究）。

B. 研究方法

WT1ペプチドワクチンとしては、HLA-A*2402拘束性変型WT1ペプチド3.0 mg/body+モンタナイド・アジュバントのエマルジョンを用いる。

1. 第I相臨床研究の継続
2001年に開始した臨床研究において、3人のAML患者が長期生存（10年8ヶ月～10年9ヶ月）しており、これらの患者に対して継続投与あるいは、経過観察をする（このような例は、世界に例を見ない）。
2. 再発グリオブラストーマに対するII相臨床研究
WT1ペプチドワクチン毎週1回、計12回皮内投与する。
3. 進行性膵癌に対するジェムザール併用した第I相臨床研究
ジェムザールの標準的療法（ジェムザール1000 mg/m²、3投4休）に0,2,4,6週目にWT1ペプチドワクチンを投与する。
4. 切除不能進行性膵癌に対するWT1+ジェムザール対ジェムザール単独のランダム化第II相

試験。

HLA-A*24:02あるいはHLA-A*02:01陽性の切除不能進行性膵癌患者150名をジェムザール

標準療法にWT1ペプチドワクチンを2週間毎に投与する群と、ジェムザール標準療法群とに、1:1で非盲検ランダム化する。primary endpointとして1年後生存率、secondary endpointとして全生存率を見る。

5. 骨髄異形成症候群（MDS）に対する少量WT1ペプチドワクチン療法の第I相臨床研究
MDSでは、WT1ペプチド300μgの投与で急速に顆粒球（大部分が白血病細胞由来）が減少（著効を呈すると言える）し、敗血症の危険性がある。そこで、WT1ペプチドの投与量を減じた第I相臨床試験を開始した。WT1ペプチド5μg/body、3人 → 15μg/body、3人とdose-upする。2週間毎に計3回投与する

（倫理面への配慮）

C. 研究結果

1. 2001年に開始した第I相臨床研究で、分子再発時点でWT1ペプチドワクチンを投与し、有効であったAML3人に対して、8年、9年7ヶ月、7年10ヶ月投与し、それぞれ、10年8ヶ月、10年7ヶ月、10年7ヶ月完全寛解が持続している。これらの3人では分子レベルでの微小残存病変も検出できず、治癒の可能性が高い。投与部位

- の発赤・腫脹以外、重篤な副作用は見られていない。
- 再発グリオブラストーマ65例（全例が放射線照射済み）に対してWT1ペプチドワクチンを毎週1回、計12回投与。65例のうち、CR 1例、PR 2例、SD 28例、PD 34例であり、overall survival rateは4.6%、disease control rateは47.7%であった。SD 28人のうち7人はlong SDであり、このうち4人のPFSは416週、410週、184週、130週で、生存中である。全例において、WT1ペプチドワクチン投与部位の発赤以外、重篤な副作用はみられない。
 - 進行性膵癌患者32例（IVa 6例、IVb 22例、再燃3例、評価不能1例）に対して、ジェムザール併用WT1ペプチドワクチン療法を施行したところ、PR 7例（21.9%）、SD 17例（53.1%）、PD 7例（21.9%）、評価不能1例であった。Response rate 21.9%、disease control rate 75.0%であった。PRの2例は手術可能となり、そのうち1例は手術時摘出標本で残存腫瘍細胞が検出されず、組織学的完全寛解であった。このPR 2例は、70.8ヶ月、63.9ヶ月生存中である。ジェムザールによると思われる副作用以外特別なものはなかった。WT1ペプチドに対する遅延型アレルギー反応（DTH）が出現した群では長期生存者が存在するが、DTHが出現しなかった群では、長期生存者は皆無であり、DTH反応と予後の相関が見られた。現在、ジェムザール単独とジェムザール+WT1ワクチンの2群の臨床効果を比較するためのランダム化第II相臨床研究を行っている。
 - 切除不能進行性膵癌に対する WT1+ジェムザール対ジェムザール単独の非盲検ランダム化第II相臨床研究は、現在進行中で、26年度中に中間解析を予定している。副作用としては、ジェムザールと考えられる副作用以外の副作用は見られていない
 - MDS に対する少量 WT1 ペプチド投与の臨床研究では、5 μ g 投与群では 2 例に臨床効果が出現し、このうち 1 例は、現在まで 6 年 7 ヶ月にわたり継続投与している。残り 1 例は No change であった。15 μ g 投与群では 1 例が白血病細胞が減少し、有効であった。他の 2 例は No change であった。15 μ g 投与の 4 人では、1 人が有効、1 人が PD で、残り 2 人は No change であった。50 μ g 投与の 4 人では、1 人が有効、1 人が PD で、残り 2 人は不変であった。MDS が heterogenous であるため、効果に個人差があり、推奨用量を決定することができなかった。5 μ g/body を 7 年 8 ヶ月にわたり

継続投与している 1 例においては、WT1 ワクチン投与から 8 年 8 ヶ月、寛解が持続しており、WT1 ペプチドワクチンの投与部位の発赤、腫脹以外、重篤な副作用は見られていない。予想どおり、WT1 ペプチドワクチンの投与により顆粒球の減少が生じたが、G-CSF の投与により回復させることが明らかになり、本療法の安全性が明らかになった。以上のデータをふまえて、初期量を 50 μ g/body に設定した新第 I 相臨床研究を開始したが、現時点では、まだ症例数が少なくデータをまとめられる状況でない。

D. 考察

WT1ペプチド免疫療法は、きわめて予後不良な再発グリオブラストーマや進行性膵癌に対しても臨床効果を出しうるということが明らかになった。これらの進行癌に臨床効果が出現した背景として考えられることは、再発グリオブラストーマでは、前治療としてほとんど抗がん剤が投与されており、進行性膵癌においても大部分の症例が初発例であり、抗がん剤の前治療は行なわれていない。このように両疾患では、抗がん剤前治療がないか、あっても軽微であるので、患者の免疫能が温存されており、そのため臨床効果が出現しやすいと現時点では考えている。さらに、進行性膵癌の治療で併用しているジェムザールが、免疫抑制性細胞を抑制することで免疫能を上げるとともに、ジェムザールが、膵癌細胞のWT1タンパクの発現を上げ、癌細胞の免疫原性を高めることも明らかになってきた。MDSでは、stem cell leukemiaであるので、WT-CTLがWT1⁺ leukemic stem cellをkillすること及び、MDSでは治療前にWT1-CTLがすでにクローナルな増殖をしていることにより臨床効果が出やすいと考えられる。

今後は、白血病、グリオブラストーマ、肺癌や卵巣がんに対して抗がん剤や手術後の寛解時にWT1ワクチン投与を開始する臨床研究や医師主導治験を進める予定である。

E. 結論

- WT1ペプチドワクチン療法は、重篤な副作用のない安全性の高い治療法である。
- WT1ペプチドワクチン療法は、白血病、再発グリオブラストーマや進行性膵癌に対して臨床効果が期待しうる治療法である。切除不能進行性膵癌に対しては、ランダムイズド臨床研究が進行中である。
- stem cell leukemia であるMDSでは、G-CSFを併用した少量WT1ペプチドワクチン療法が有

効であり、WT1ペプチド50 µg/bodyは安全量であることが判明した。

4. WT1ペプチドワクチン療法は、抗がん剤が多量に使われるまでの免疫能が残存している時期に使用すべきであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida S, Koido S, Takeda Y, Honma S, Kimita H, Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, Hara K, Tsuboi A, Oka Y, Yanagisawa S, Toyama Y, Ikegami M, Kitagawa T, Eguchi H, Wada H, Nagano H, Nakata J, Nakae Y, Hosen N, Oji Y, Tanaka T, Kawase I, Kumanogoh A, Sakamoto J, Doki Y, Mori M, Ohkusa T, Tajiri H, Sugiyama H. Wilms Tumor Gene 1 (WT1) Peptide-based Cancer Vaccine Combined With Gemcitabine for Patients With Advanced Pancreatic Cancer. *J Immunother.*, in press.
- 2) Maeda T, Hosen N, Fukushima K, Tsuboi A, Morimoto S, Matsui T, Sata H, Fujita J, Hasegawa K, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tatsumi N, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kanakura Y, Kumanogoh A and Sugiyama H. Maintenance of complete remission after allogeneic stem cell transplantation in leukemia patients treated with Wilms tumor 1 peptide vaccine. *Blood Cancer Journal.*, 2013, 3: e130.
- 3) Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F. Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.*, 2013, 54(7): 1450-1458
- 4) Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin Y, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Functional human Th17 clones with WT1-specific helper activity. *Cancer Immunol Immunother.*, 2013, 62(4): 801-10.
- 5) Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tatsumi N, Morimoto S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. HLA-DPB1*05:01-restricted WT1332-specific TCR-transduced CD4(+) T lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells. *J Immunother.*, 2013, 36(3):159-170.
- 6) Miyatake T, Ueda Y, Morimoto A, Enomoto T, Oka Y, Nishida S, Tsuboi A, Shirakata T, Oji Y, Hosen N, Aozasa K, Morita S, Sakamoto J, Sugiyama H, Kimura T. WT1 Peptide Immunotherapy for Gynecologic Malignancies Resistant to Conventional Therapies: a Phase II trial. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2013, 139(3): 457-463.
- 7) Anguille S, Fujiki F, Smits EL, Oji Y, Lion E, Oka Y, Berneman ZN, Sugiyama H. Identification of a Wilms' tumor 1-derived immunogenic CD4(+) T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes. *Leukemia.*, 2013, 27(3):748-750.
- 8) Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin Y, Tachino S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T cell receptor. *Anticancer Res.*, 2012, 32(12): 5201-5209.
- 9) Ohno S, Okuyama R, Aruga A, Sugiyama H, Yamamoto M. Phase I trial of Wilms' Tumor 1 (WT1) peptide vaccine with GM-CSF or CpG in patients with solid malignancy. *Anticancer Res.*, 2012, 32(6): 2263-9.
- 10) Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Elisseeva OA, Kawakami M, Nishida S, Morimoto S, Murao A, Nakajima H, Hosen N, Oji Y, Sugiyama H. Long-term WT1 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Leukemia.*, 2012, 26(6): 1410-13.
- 11) Nishioka M, Tanemura A, Nishida S, Nakano A, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Azuma I, Sugiyama H, Katayama I. Vaccination with WT-1 (Wilms' Tumor gene-1) peptide and BCG-CWS in melanoma. *Eur J Dermatol.*, 2012, 22(2): 258-9.
- 12) Chiba Y, Kinoshita M, Okita Y, Tsuboi A, Isohashi K, Kagawa N, Fujimoto Y, Oji Y, Oka Y, Shimosegawa E, Morita S, Hatazawa J, Sugiyama H, Hashimoto N, Yoshimine T. Use of (11)C-methionine PET parametric response map for

- monitoring WT1 immunotherapy response in recurrent malignant glioma. *J Neurosurg.*, 2012, 116(4): 835-42. 2012 Apr.
- 13) Shirakata T, Oka Y, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Murao A, Tanaka H, Nakatsuka S, Inohara H, Sugiyama H. WT1 Peptide Therapy for a Patient with Chemotherapy-resistant Salivary Gland Cancer. *Anticancer Res.*, 2012, 32(3): 1081-5.
 - 14) Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Maruno M, Myoui A, Enomoto T, Izumoto S, Sekimoto M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8(+) T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Sci.*, 2012, 103(3): 408-414.
 - 15) Hashii Y, Sato-Miyashita E, Matsumura R, Kusuki S, Yoshida H, Ohta H, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric leukemic patients with high risk for relapse: successful maintenance of durable remission. *Leukemia.*, 2012, 26(3): 530-532.
 - 16) Hayashi S, Oji Y, Kanai Y, Teramoto T, Kitaichi M, Kawaguchi T, Okada M, Sugiyama H, Matsumura A. Low Wilms' tumor gene expression in tumor tissues predicts poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest.*, 2012, 30(2): 165-71.
 - 17) Nakajima H, Oka Y, Tsuboi A, Tatsumi N, Yamamoto Y, Fujiki F, Lie Z, Murao A, Morimoto S, Hosen N, Shirakata T, Nishida S, Kawase I, Isaka Y, Oji Y, Sugiyama H. Enhanced tumor immunity of WT1 peptide vaccination by interferon- β administration. *Vaccine.*, 2012, 30(4): 722-9.
 - 18) Hosen N, Ichihara H, Mugitani A, Aoyama Y, Fukuda Y, Kishida S, Matsuoka Y, Nakajima H, Kawakami M, Yamagami T, Fuji S, Tamaki H, Nakao T, Nishida S, Tsuboi A, Iida S, Hino M, Oka Y, Oji Y, Sugiyama H. CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology.*, 2012, 156(2): 213-224.
 - 19) Takahara A, Koido S, Ito M, Nagasaki E, Sagawa Y, Iwamoto T, Komita H, Ochi T, Fujiwara H, Yasukawa M, Mineno J, Shiku H, Nishida S, Sugiyama H, Tajiri H, Homma S. Gemcitabine enhances Wilms' tumor gene WT1 expression and sensitizes human pancreatic cancer cells with WT1-specific T-cell-mediated antitumor immune response. *Cancer Immunol Immunother.*, 2011, 60(9): 1289-97.
 - 20) Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Takakura M, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 peptide vaccine stabilized intractable ovarian cancer patient for one year: a case report. *Anticancer Res.*, 2011, 31(7): 2441-5.
 - 21) Ohno S, Takano F, Ohta Y, Kyo S, Myojo S, Dohi S, Sugiyama H, Ohta T, Inoue M. Frequency of myeloid dendritic cells can predict the efficacy of wilms' tumor 1 Peptide vaccination. *Anticancer Res.*, 2011, 31(7): 2447-52.
 - 22) Oji Y, Oka Y, Nishida S, Tsuboi A, Kawakami M, Shirakata T, Takahashi K, Murao A, Nakajima H, Narita M, Takahashi M
 - 23) , Morita S, Sakamoto J, Tanaka T, Kawase I, Hosen N, Sugiyama H. WT1 peptide vaccine induces reduction in minimal residual disease in an Imatinib-treated CML patient. *Eur J Hematol.*, 2010, 85(4): 358-60.
 - 24) Sitaram RT, Degerman S, Ljungberg B, Andersson E, Oji Y, Sugiyama H, Roos G, Li A. Wilms' tumour 1 can suppress hTERT gene expression and telomerase activity in clear cell renal cell carcinoma via multiple pathways. *Br J Cancer.*, 2010, 103(8): 1255-62.
 - 25) Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, Gostick E, Vermeulen K, Pieters K, Nijs G, Stein B, Smits EL, Schroyens WA, Gadisseur AP, Vrelust I, Jorens PG, Goossens H, de Vries IJ, Price DA, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Berneman ZN. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2010, 107(31): 13824-9.
 - 26) Dohi S, Ohno S, Ohno Y, Kyo S, Soma G, Sugiyama H, Inoue M. WT1 expression correlates with angiogenesis in endometrial cancer tissue. *Anticancer Res.*, 2010, 30(8): 3187-92.
 - 27) Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediat Blood Cancer.*, 2010, 55(2): 352-5.

- 28) Tanaka Y, Nakasone H, Yamazaki R, Sato K, Sato M, Terasako K, Kimura S, Okuda S, Kako S, Oshima K, Tanihara A, Nishida J, Yoshikawa T, Nakatsura T, Sugiyama H, Kanda Y. Single-cell analysis of T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in allogeneic transplant recipients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res.*, 2010, 70(15): 6181-92.
- 29) Fujiki F, Oka Y, Kawakatsu M, Tsuboi A, Tanaka-Harada Y, Hosen N, Nishida S, Shirakata T, Nakajima H, Tatsumi N, Hashimoto N, Taguchi T, Ueda S, Nonomura N, Takeda Y, Ito T, Myoui A, Izumoto S, Maruno M, Yoshimine T, Noguchi S, Okuyama A, Kawase I, Oji Y, Sugiyama H. A clear correlation between WT1-specific Th response and clinical response in WT1 CTL epitope vaccination. *Anticancer Res.*, 2010, 30(6): 2247-54.
- 30) Ichinohasama R, Oji Y, Yokoyama H, Takeuchi K, Fujiwara T, Ishizawa K, Taniguchi O, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H. Sensitive immunohistochemical detection of WT1 protein in tumors with anti-WT1 antibody against WT1 235 peptide. *Cancer Sci.*, 2010, 101(5): 1089-1092.
- 31) Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Oka Y, Murao A, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Hosen N, Nishida S, Sugiyama H, Yoshimine T. Effects of Concomitant Temozolomide and Radiation Therapies on WT1-specific T-cells in Malignant Glioma. *Jpn J Clin Oncol.* *Jpn J Clin Oncol.*, 2010, 40(5): 395-403.
- 32) Chiba Y, Hashimoto N, Tsuboi A, Rabo C, Oka Y, Kinoshita M, Kagawa N, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T. Prognostic value of WT1 protein expression level and MIB-1 staining index as predictor of response to WT1 immunotherapy in glioblastoma patients. *Brain Tumor Pathol.*, 2010, 27(1): 29-34.
- 33) Narita M, Masuko M, Kurasaki T, Kitajima T, Takenouchi S, Saitoh A, Watanabe N, Furukawa T, Toba K, Fuse I, Aizawa Y, Kawakami M, Oka Y, Sugiyama H, Takahashi M. WT1 peptide vaccination in combination with imatinib therapy for a patient with CML in the chronic phase. *Int J Med Sci.*, 2010, 7(2): 72-81.
- 34) Murao A, Oka Y, Tsuboi A, Elisseeva OA, Harada Y, Fujiki F, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Hashimoto N, Myoui A, Ueda T, Takeda Y, Osaki T, Enomoto T, Yoshikawa H, Kimura T, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. High frequencies of less differentiated and more proliferative WT1-specific CD8+ T cells in bone marrow (BM) in tumor-bearing patients: an important role of BM as a secondary lymphoid organ. *Cancer Science.*, 2010, 101(4): 848-854.
2. 学会発表
- 1) Hashii Y, Watanabe A, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Miyamura T, Oka Y, Ozono K, Sugiyama H: Clinical study of WT1 peptide vaccination for pediatric leukemia after stem cell transplantation, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 13, 2013.
- 2) Kobayashi S, Ueda Y, Kurokawa M, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kihara R, Emi N, Motoji T, Sasaki K, Usuki K, Ogawa H, Sakura T, Ohyashiki K, Ogawa K, Imai K, Miyazaki Y, Morita Y, Matsuda A, Toyama K, Kakumoto K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H: WT-1 expression level in BM is the great prognostic marker with Revised IPSS, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 11, 2013.
- 3) Kondo A, Tamura H, Inokuchi K, Ogata K, Kakumoto K, Matsuda A, Tohyama K, Ueda Y, Kurokawa M, Takeuchi J, Shibayama H, Emi N, Motoji T, Miyazaki Y, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F: Prognostic impact of the IPSS-R and CD7 expression on myeloblasts in Japanese patients with MDS, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Hokkaido, Oct. 11, 2013.
- 4) Hashii Y, Hosen N, Miyamura T, Nishida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Ozono K, Sugiyama H: WT1 based immunotherapy after stem cell transplantation for pediatric hematological malignancy: Phase II clinical study, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013
- 5) Oji Y, Tatsumi N, Fukuda M, Nakatsuka S, Fujiki F, Nakajima H, Hasegawa K, Nezu R, Morii E, Nishida S, Hosen N, Tsuboi A, Oka Y, Sugiyama H: Oncogenic function of eEF2 in cancers and in vivo humoral and in vitro CTL responses against eEF2 protein, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 6) 藤本文博、林兪宏、勝原晶子、岡芳弘、坪井昭博、青山奈央、谷井里江、中島博子、森本

- 創世子、保仙直毅、西田純幸、尾路祐介、熊ノ郷淳、杉山 治夫：HLA class II 拘束性 WT1由来ヘルパーペプチド特異的TCRを導入されたCD4⁺T細胞はヘルパー活性と細胞傷害活性を有する, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
- 7) Hosen N, Maeda T, Fukushima K, Morimoto S, Nakata J, Nakae Y, Nishida S, Tsuboi A, Kondo T, Kadowaki N, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Kanakura Y, Sugiyama H: Clinical trial of WT1 peptide vaccination post allo HSCT in patients with high risk for relapse, the 5th Society of Immunotherapy for Hematological Malignancies, Nagoya, Aug. 24, 2013.
 - 8) Nakae Y, Hosen N, Nakata J, Maeda T, Fukushima K, Morimoto S, Takashima S, Nakajima H, Fujiki F, Tastmi N, Nishida S, Tsuboi A, Kondo T, Hino M, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Kanakura Y, Sugiyama H: Wilms Tumor 1 (WT1) Peptide Vaccine as an Enhancer of Graft Versus Leukemia Effects, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)
 - 9) Fujiki F, Lin Y, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tastumi N, Morimoto S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: HLA class II-restricted WT1-specific TCR-transduced CD4⁺ T cell Display a Helper Activity for WT1-specific CTL Induction and a Cytotoxicity Against Leukemia Cells, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)
 - 10) Nakata J, Hosen N, Nakano K, Nshida S, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H: NK cells Have Potential to Eradicate Leukemia cells in vivo in the Absence of Adaptive Immunity in the MLL-ENL Model, The 4th JSH International Symposium 2013, Ehime, 2013年5月24日 (国際学会)
 - 11) Kobayashi S, Takeuchi J, Ueda Y, Kurokawa M, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Emi N, Motoji T, Matsuda A, Tohyama K, Kakumoto K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Tokaku F: Prognostic significance of WT1 mRNA expression level in patients with myelodysplastic syndrome (MDS), The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 12) Lin Y, Fujiki F, Katsuhara A, Oka Y, Tsuboi A, Aoyama N, Tanii S, Nakajima H, Tastumi N, Morimoto S, Tamanaka T, Tachino S, Hosen N, Nishida S, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: HLA class II-restricted WT1 332-specific TCR-transduced CD4⁺ T Lymphocytes display a helper activity for WT1-specific CTL induction and a cytotoxicity against leukemia cells, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 13) Anguille S, Fujiki F, Lion E, Smits L E, Oji Y, Oka Y, Berneman N Z, Sugiyama H: Identification of a Wilm's tumor 1 (WT1)-derived immunogenic CD4⁺ T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 14) Tachino S, Fujiki F, Oka Y, Tsuboi A, Morimoto S, Lin Y, Tamanaka T, Kondo K, Nakajima H, Nishida S, Hosen N, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Establishment and characterization of WT-specific Th17 clones, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 15) Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of cancer antigen WT1-specific CTLs in patients with solid tumors and healthy donors, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 16) Hosen N, Maeda T, Fukushima K, Morimoto S, Nakata J, Nakae Y, Takashima S, Nakajima H, Fijiki F, Tastumi N, Nishida S, Tsuboi A, Kondo T, Hino S, Oji Y, Oka Y, Kumanogoh A, Kanakura Y, Sugiyama H: Wilm's tumor 1 (WT1) peptide vaccine as an enhancer of graft versus leukemia effects, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 17) Sawada A, Inoue M, Kondo O, Koyama-Sato M, Kawae Y, Hishikawa M, Yoneda A, Oji Y, Yasui M, Sugiyama H, Kawa K: WT-peptide vaccination in the context of the treatment of pediatric malignancies, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
 - 18) Hahii Y, Miyamura T, Matsuura R, Yoshida H, Miyashita E, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Oka Y,

- Ozono K, Sugiyama H: WT peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric patients, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012
- 19) Hashimoto N, Tsuboi A, Chiba Y, Kijima N, Oka Y, Hosen N, Oji Y, Kinoshita M, Kagawa N, Yoshimine T, Sugiyama H: WT1 peptide vaccination for newly diagnosed glioblastomas; phase I clinical trial of combination with tomazolomide, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
- 20) Egawa S, Okada T, Hayashi H, Sakata N, Nishida S, Oka Y, Sugiyama H, Unno M: Long-term follow up of Wilm's Tumor 1 (WT1) peptide vaccinated patients with chemorefractory advanced pancreatic cancer, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
- 21) Chiba Y, Hashimoto N, Kagawa N, Kinoshita M, Kijima N, Hirayama R, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Sugiyama H, Yoshimine T: Tumor-infiltrating lymphocytes and immune escape in patients with malignant glioma receiving WT1 peptide vaccination, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 23, 2012.
- 22) Kijima N, Hosen N, Kagawa N, Hashimoto N, Chiba Y, Kinoshita M, Oji Y, Sugiyama H, Yoshimine T: The effect of WT1 on tumorigenicity and apoptosis in glioblastoma, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 22, 2012.
- 23) Oji Y, Berneman N Z, Keilholz U, O'reilly R, Saglio G, Wargner N, Heike Y, Lundin E, Morii E, Pauwels P, Papotti M, Aanguille S, Cilloni D, Lestch A, Ohashi H, Ohno Y, Waelput W, Duregon E, Hiraoka N, Udaka K, Izumoto S, Ohno S, Iwafuchi M, Fukuda M, Tatsumi N, Kaji M, Utada M, Oka Y, Sugiyama H: International Harmonization on Immunohistochemical Evaluation of WT1 Positivity in Solid Cancers, The 6th International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Kyoto, Nov. 22, 2012.
- 24) Kobayashi S, Takeuchi J, Ueda Y, Kurokawa M, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kihara R, Emi N, Motoji T, Sasaki k, Usuki K, Ogawa H, Sakura T, Ohyashiki K, Ozawa K, Imai K, Miyazaki Y, Morita Y, Matsuda A, Tohyama K, Kakumoto K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F: The usefulness of WT1 mRNA expression levels as a monitoring marker of MDS progression, The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, Oct. 21, 2012.
- 25) Oji Y, Oka Y, Tsuboi A, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Nakajima H, Sugiyama H: Imatinib-combined WT1 peptide vaccine immunotherapy for chronic phase CML, The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, Oct. 20, 2012.
- 26) Hashii Y, Mayumura T, Matsumura R, Yoshida H, Miyashita E, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K: WT1 peptide vaccination following allogeneic stem cell transplantation in pediatric patients, The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Kyoto, Oct. 20, 2012.
- 27) 保仙直毅、前田哲生、福島健太郎、森本創世子、中田潤、中江吉希、西田純幸、坪井昭博、近藤忠一、門脇則光、日野雅之、尾路祐介、岡芳弘、熊ノ郷淳、金倉謙、杉山 治夫、：再発ハイリスク同種造血幹細胞移植後患者に対するWT1ペプチドワクチン第1相臨床試験，第74回日本血液学会学術集会，京都，2012年10月19日
- 28) 尾路祐介、福田茉莉、森井英一、辰巳直也、北條望、村上由依、斎藤千紗恵、鈴木望友、川田紗世、澄川美穂子、坪井昭博、岡芳弘、杉山 治夫：固形癌におけるWT1発現の免疫組織化学法による評価，第71回日本癌学会学術総会，北海道，2012年9月21日
- 29) 分田貴子、西田純幸、坪井昭博、保仙直毅、尾路祐介、梅田智恵、種村篤、片山一郎、岡芳弘、杉山 治夫、平家勇司：がんワクチン療法と患者QOL接種痕に対するカバーメイクの導入，第71回日本癌学会学術総会，北海道，2012年9月21日
- 30) 坪井昭博、橋本直哉、岡芳弘、香川尚己、木下学、木嶋教行、千葉泰良、尾路祐介、保仙直毅、西田純幸、吉峰俊樹、杉山 治夫：初発悪性神経鞘腫を対象としたテミンゾロミド併用WT1ペプチドワクチン第I相臨床試験，第71回日本癌学会学術総会，北海道，2012年9月19日
- 31) 森本晶子、上田豊、宮武崇、榎本隆之、岡芳弘、西田純幸、坪井昭博、白方俊章、尾路祐介、森田智視、坂本純一、杉山 治夫、木村正：治療抵抗性婦人科悪性腫瘍におけるWT1ペプチドワクチン第II相臨床試験，第71回日

- 本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19日
- 32) 矢津田旬二、入江厚、道端弥生、原田久美子、富田雄介、湯野晃、竹田直樹、澁谷功、十河真司、藤木文博、杉山 治夫、江藤正俊、西村泰治: CD4+T細胞が認識するがん抗原ペプチドを迅速に同定できるHLA-DR4トランスジェニックマウスの樹立, 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19日
 - 33) 木嶋教行、保仙直毅、香川尚己、木下学、橋本直哉、杉山 治夫、吉峰俊樹: グリオブラストーマにおけるWT1(Wilm's tumor 1)の機能的役割, 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19日
 - 34) 尾路祐介、岡芳弘、坪井昭博、保仙直毅、西田純幸、中田潤、中江吉希、中島博子、藤木文博、辰巳直也、杉山 治夫: 慢性期CMLに対するイマチニブ併用WT1ペプチドワクチン免疫療法, 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 石川, 2012年8月18日
 - 35) 保仙直毅、前田哲生、福島健太郎、近藤忠一、日野雅之、岡芳弘、熊ノ郷敦、金倉讓、杉山 治夫: 再発ハイリスク同種造血幹細胞移植後患者に対するWT1ペプチドワクチン第1相臨床試験, 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 石川, 2012年8月18日
 - 36) 橋井佳子、宮村能子、松村梨紗、吉田寿雄、宮下恵美子、平松英文、谷沢昭彦、坪井昭博、尾路祐介、保仙直毅、岡芳弘、杉山 治夫、大園恵一: WT1ペプチドワクチンを用いた小児血液腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後免疫療法, 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 石川, 2012年8月18日
 - 37) 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、藤木文博、辰巳直也、尾路祐介、杉山 治夫: WT1ヘルパーペプチド投与による抗腫瘍免疫反応の増強—マウスモデルを用いた検討—, 第4回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 石川, 2012年8月18日
 - 38) 坪井昭博、橋本直哉、香川尚己、千葉泰良、岡芳弘、尾路祐介、保仙直毅、西田純幸、吉峰俊樹、杉山 治夫: 初発悪性神経膠腫を対象としたテモゾロミド併用WT1ペプチドワクチン第I相臨床試験, 第16回日本がん免疫学会総会, 北海道, 2012年7月28日
 - 39) 橋井佳子、坪井昭博、西田純幸、尾路祐介、岡芳弘、杉山 治夫: WT1ペプチドワクチンを用いた小児固形がんに対する免疫療法, 第16回日本がん免疫学会総会, 北海道, 2012年7月28日
 - 40) 保仙直毅、前田哲夫、福島健太郎、近藤忠一、日野雅之、岡芳弘、熊ノ郷淳、金倉讓、杉山 治夫: 再発ハイリスク同種造血幹細胞移植後患者に対するWT1ペプチドワクチン第1相臨床試験, 第16回日本がん免疫学会総会, 北海道, 2012年7月28日
 - 41) 杉山 治夫: WT1ペプチドがん免疫療法, 第10回日本臨床腫瘍学会学術総会, 大阪, 2012年7月26日
 - 42) 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、杉山 治夫: WT1ペプチドワクチン効果増強を求めて—マウスモデルを基にした検討—, 第16回日本がん免疫学会総会, 北海道, 2012年7月26日
 - 43) Sugiyama H: WT1 peptide immunotherapy for hematopoietic malignancies, XIX. Wilsede Meeting, Wilsede, Germany, June 17, 2012.(招聘講演)
 - 44) Sugiyama H: WT1 Peptide Vaccine for Leukemia, The 16th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation, Muju, Korea, February 17, 2012. (招待講演)
 - 45) 西田純幸、杉山 治夫: WT1ペプチドを用いたがんの免疫療法 多施設共同研究, 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会、和歌山、2011年12月1日
 - 46) 杉山 治夫: WT1ペプチドワクチン, 第49回日本癌治療学会学術集会, 名古屋, 2011年10月28日
 - 47) 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、森本創世子、保仙直毅、白方俊章、西田純幸、尾路祐介、杉山 治夫: WT1ペプチドワクチンとIFN- β の併用投与によるWT1発現白血病細胞に対する拒絶効果の増強, 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日
 - 48) Tsuboi A, Oka Y, Kyo T, Katayama Y, Kawakami M, Hosen N, Nishida S, Morimoto S, Oji Y, Sugiyama H: Long-term WT1 peptide vaccination for the patients with acute myeloid leukemia with MRD, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, Oct. 14, 2011.
 - 49) 前田哲生、保仙直毅、佐多弘、中田潤、西田純幸、坪井昭博、尾路祐介、福島健太郎、岡芳弘、水木満佐央、織谷健司、杉山 治夫、金倉讓: 血液悪性疾患に対する同種造血幹細胞移植後のadjuvant therapyとしてのWT1 peptide vaccinationの検討, 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14日
 - 50) 橋井佳子、坪井昭博、尾路祐介、保仙直毅、岡芳弘、杉山 治夫: WT1ペプチドワクチン

- を用いた小児血液腫瘍に対する同種造血幹細胞移植後免疫療法、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月5日
- 51) 橋本直哉、坪井昭博、千葉泰良、木嶋教行、岡芳弘、木下学、香川尚己、吉峰俊樹、杉山 治夫：悪性グリオーマに対するWT1免疫療法：Recursive partitioning analysisと予後予測因子、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日
- 52) 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、森本創世子、保仙直毅、白方俊章、西田純幸、尾路祐介、杉山 治夫：IFN-β併用投与によるWT1ペプチドワクチンの腫瘍拒絶効果の増強、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日
- 53) 土肥聡、大野智、高倉正博、京哲、石崎純子、宮本謙一、杣源一郎、杉山 治夫、井上正樹：WT1ペプチドワクチン療法により長期間症状安定が得られた抗癌剤治療抵抗性卵巣癌の1症例、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月4日
- 54) 坪井昭博、保仙直毅、川上学、岡芳弘、尾路祐介、西田純幸、中田潤、森本創世子、杉山 治夫：骨髓異型成症候群に対する低容量WT1ペプチドワクチン療法、第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011年8月20日
- 55) 岡芳弘、坪井昭博、許泰一、片山雄太、川上学、Elisseeva Olga、村尾綾子、森本創世子、中島博子、保仙直毅、西田純幸、中田潤、中江吉希、尾路祐介、熊ノ郷淳、杉山 治夫：再発ハイリスク寛解期AMLに対するWT1ペプチドワクチン治療による長期生存・治癒の可能性、第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011年8月20日
- 56) 中島博子、岡芳弘、坪井昭博、辰巳直也、藤木文博、保仙直毅、西田純幸、尾路祐介、杉山 治夫：IFN-β併用投与によるWT1ペプチドワクチンの造血器腫瘍に対する拒絶効果の増強、第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、別府、2011年8月20日
- 57) 杉山 治夫：WT1ペプチドがん免疫療法、第15回日本がん免疫学会総会、豊中、2011年6月30日
- 58) Nakata J, Hosen N, Okumura A, Shimizu Y, Guo M, Fujioka Y, Kinoshita Y, Oka Y, Kumanogoh A, Sugiyama H: Immuno-editing of leukemic stem cells in MLL/ENL mouse leukemia model, The 15th annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology, Toyonaka, June 30, 2011.
- 59) Hara K, Nishida S, Morimoto S, Tsuboi A, Koido S, Homma S, Komita H, Fujiki F, Takeda Y, Nagano H, Oka Y, Ohkusa T, Sugiyama H: CD45RA-CCR7+/- memory WT1-CTLs predicts the favorable clinical outcome; the WT1 cancer vaccine combined with gemcitabine in the pancreatic cancer patients, The 15th annual Meeting of Japanese Association of Cancer Immunology, Toyonaka, June 30, 2011.
- 60) 橋井佳子、松村梨紗、吉田寿雄、宮下恵実子、坪井昭博、尾路祐介、保仙直毅、岡芳弘、杉山 治夫、大藪恵一：同種造血幹細胞移植後の難知性小児血液腫瘍患者に対するWT1ペプチドワクチンを用いた免疫療法、第15回日本がん免疫学会総会、豊中、2011年6月30日
- 61) 西岡めぐみ、種村篤、西田純幸、坪井昭博、井上匡美、岡芳弘、杉山 治夫、片山一郎：BCG-CWS併用WT1ペプチドワクチン療法によって肺転移巣の増殖抑制を認めた悪性黒色腫の一例、第15回日本がん免疫学会総会、豊中、2011年6月30日
- 62) 保仙直毅、前田哲生、山根孝久、日野雅之、森本創世子、原一真、中田潤、西田純幸、坪井昭博、尾路祐介、岡芳弘、金倉譲、森田智視、坂本純一、杉山 治夫：造血幹細胞移植後患者に対するWT1ワクチン免疫療法、第15回日本がん免疫学会総会、豊中、2011年6月30日
- 63) 杉山 治夫：WT1ペプチドを用いたがんの免疫療法、第11回日本蛋白質科学会年会、吹田、2011年6月8日
- 64) Wakeda T, Heike Y, Nishida S, Tsuboi A, Hosen N, Oji Y, Nakajima H, Umeda T, Tanemura A, Katayama I, Oka Y, Sugiyama H: Effect of Cancer Vaccine Therapy on Patients' QOL Camouflage makeup for unsightly skin reactions. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
- 65) Nishida S, Takeda Y, Eguchi H, Ito T, Kitagawa T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Koido S, Homma S, Komita H, Takahara A, Ohkusa T, Tajiri H, Morita S, Sakamoto J, Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Hosen N, Morimoto S, Sugiyama H: WT1 peptide-based Cancer Vaccine in combination with Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer –Phase 1 Clinical Trial-. Fifth International Conference on WT1 in Human Neoplasia, Torino, April 16, 2011.
- 66) Hosen N, Maeda T, Yamane T, Hino M, Morimoto S, Hara K, Nakata J, Nishida S, Tsuboi