

新しいがん免疫療法の研究

所属機関 慶応義塾大学医学部 先端医科学研究所 細胞情報研究部門
研究者名 河上 裕

《研究の概要》

免疫療法の開発においては、1) 癌抗原の同定、3) 腫瘍エスケープ機構の解明 4) 免疫制御法の開発が重要であるが、本研究では、第一に各種分子生物学的・生化学的手法を用いて、ヒト癌抗原を同定して、癌に対する免疫応答の解析と免疫療法への応用を追究した。第二に、遺伝子導入ベクターの改良と免疫誘導や癌細胞傷害に関わる種々の分子を用いた新しい免疫制御法や遺伝子治療法の開発を行った。

まず、悪性黒色腫、膀胱癌、肺癌、骨肉腫、咽頭扁平上皮癌、口腔癌において、癌反応性 T 細胞を樹立し、癌抗原の単離を行った。悪性黒色腫では、cDNA 発現クローニング法により、新規癌抗原と T 細胞エピトープを単離・同定した。そのうちの一つは、癌細胞の突然変異に由来する変異ペプチドであったが、滑膜肉腫でも染色体転座由来の SYT-SSX 融合ペプチドが、大腸癌で CDX2 のフレームシフト変異抗原が同定され、様々な癌で癌細胞の遺伝子異常に対する免疫応答の存在が証明された。日本人に高発現する HLA-A24 に統合する癌抗原ペプチドの同定にも重点をおいたが、TRP2、recoverin、survivin などで同定された。survivin や胃癌抗原 F4.2 では、多数の患者から細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導が可能であることが示され、免疫療法の標的抗原として有望である。免疫誘導においては、ヘルパー T 細胞が認識する抗原も重要であるが、CD4+ T 細胞に認識される口腔扁平上皮癌抗原として、 α -enolase ペプチドが同定された。悪性黒色腫抗原 PRAME では、腫瘍マーカーとして造血器腫瘍の微小残存病変の早期診断にも有用であることが示された。ヒト癌抗原同定法として、癌患者血清を用いる SEREX 法や、SAGE 法を用いた cDNA プロファイル比較法も試みたが、多数の新規癌抗原や癌抗原候補が同定された。癌抗原ペプチドで HLA テトラマーを作製し、癌患者における癌特異的 T 細胞の頻度解析や選択的培養増に成功し、今後の免疫応答解析や免疫療法開発に有用であることを示した。また、癌抗原を用いて抗原プロセス過程の解析を行ったが、抗原ペプチドの hsp70 親和性が重要であること、癌細胞のポリアミン量が影響して、抗原プロセスの低下が腫瘍エスケープ機序になり得ることが示された。

本研究では、様々な免疫制御法や遺伝子治療法の可能性もしたが、自殺誘導遺伝子と GM-CSF 遺伝子併用による免疫遺伝子治療、抗原ペプチドと lymphotactin 遺伝子導入樹状細胞の併用療法、caspase-8 などのアポトーシス関連遺伝子導入による癌細胞アポトーシス誘導療法、変異 HSV を用いた免疫療法などを開発した。その際に用いる癌細胞などへの選択的、高効率遺伝子導入が可能な各種 capsid 修飾アデノウイルスを作製した。以上のように、本研究では、免疫療法に使用できる多数のヒト癌抗原の同定に成功した。また、各種ベクターの開発と遺伝子導入技術を用いた新しい癌の免疫療法・遺伝子治療を開発した。本研究の成果は、今後、臨床試験に向けての応用研究の基盤になると考えられる。

佐藤昇志	札幌医科大学 教授	病理学第一講座	癌抗原単離・同定
濱田洋文	札幌医科大学 教授	分子医学研究部門	免疫誘導増強法の検討

研究報告

I 研究目的

癌に対する免疫療法は、一部の癌を除いては、標準的治療になっていない。問題点の一つは、ヒトの癌細胞に対する免疫応答の解析が、十分に科学的に行われていなかったことにある。免疫療法の科学的な開発においては、1) 免疫応答の証明、2) ヒト癌抗原の同定、3) 腫瘍エスケープ機構の解明 4) 免疫制御法の開発、などの課題を解決する必要がある。特に、多くの動物モデルやヒトメラノーマにおいて生体内腫瘍拒絶に関わることが示されている T 細胞が認識する癌抗原の同定が重要である。癌抗原の同定により、1) 癌に対する免疫応答の詳細な解析、2) 免疫療法における免疫効果の定量的、定性的評価、3) 免疫療法の新規標的、4) 抗原の投与形態、投与量、投与場所、投与タイミングなどの制御、5) 本来低免疫原性である癌抗原の免疫原性の改良、などが可能になり、免疫療法の科学的な開発が進められる。近年、分子生物学・免疫学の進歩により、今まで不明瞭であったヒト癌に対する免疫応答を分子レベルで解析することが可能になってきた。本研究では、第一に、各種分子生物学的・生化学的手法を用いて、ヒト癌抗原を単離・同定して、ヒト癌に対する免疫応答機構の解明と科学的な免疫療法開発の基盤を築く。第二に、近年、同定されてきた免疫誘導機構および癌細胞傷害機構に関わる種々の分子を用いて、癌に対する免疫応答の制御や増殖制御が可能になりつつあるが、本研究では、抗原分子や免疫誘導・癌細胞アポトーシスに関わる種々な分子を用いた新しい癌に対する免疫制御法や遺伝子治療の開発を行う。そのために、癌細胞や樹状細胞に効率よく選択的に遺伝子導入を行うウイルスベクターの開発を行う。以上のように、本研究では、癌に対する新しい免疫療法や遺伝子を開発するための科学的基盤を確立することを目的とする。

II 研究計画

1. 新しいヒト癌抗原の単離・同定

- 1) 腫瘍浸潤リンパ球や末梢血リンパ球からの癌細胞反応性 T 細胞の樹立と免疫学的解析
- 2) 癌細胞反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法による癌抗原遺伝子の単離と T 細胞エピトープの決定および単離癌抗原の免疫学的・生物学的解析
- 3) HPLC と質量分析器を用いた癌細胞 HLA 結合ペプチドからの T 細胞エピトープの同定
- 4) 癌患者血清を用いた cDNA 発現クローニング法による癌抗原遺伝子の単離同定 (SEREX 法) と単離癌抗原の免疫学的・生物学的解析
- 5) SAGE 法を用いた cDNA プロファイル比較による癌抗原候補遺伝子の体系的同定
- 6) 合成ペプチドと in vitro CTL 誘導法を用いた、既知の癌抗原あるいは癌抗原候補分子からの日本人に高頻度で発現する HLA-A24 に結合する T 細胞エピトープの同定
- 7) in vitro CTL 誘導法を用いた単離癌抗原の免疫原性の検討と免疫療法への応用の検討

- 8) 単離癌抗原の腫瘍マーカーとしての診断への応用の検討
- 9) 癌抗原ペプチド HLA テトラマーの作製と、それを用いた癌抗原特異的 T 細胞の生体内動態解析と選択的培養増殖の検討
- 10) hsp70 と癌抗原ペプチドの親和性の検討による、癌抗原ペプチドの細胞内プロセス機構の解明と腫瘍エスケープ機序への関与の検討

2. 新しい免疫制御法、遺伝子治療の開発

- 1) 自殺誘導遺伝子 (cytosine deaminase) と GM-CSF 遺伝子組換えアデノウイルス併用による免疫遺伝子治療の抗腫瘍効果の検討
- 2) lymphotactin 遺伝子導入樹状細胞による抗腫瘍免疫誘導増強効果の検討
- 3) 種々のアポトーシス関連分子 (caspase-8、caspase-3、Bax、Bcl-2、Bcl-XL) 遺伝子組換えアデノウイルスを用いた癌細胞のアポトーシス誘導能検討
- 4) capsid 修飾による癌細胞選択的、高効率遺伝子導入変異アデノウイルスベクターの作製
- 5) replication-conditional 変異型 HSV ベクターを用いた免疫遺伝子治療の開発

III 研究成果

1. ヒト癌抗原の単離・同定

- 1) HLA-A1、-A2、-A3 拘束性の悪性黒色腫反応性 T 細胞、HLA-A26 拘束性膀胱癌反応性 CTL クローン、HLA-A24 拘束性肺癌反応性 CTL クローン、HLA-B55 拘束性骨肉腫反応性 CTL クローン、HLA-A24 拘束性咽頭扁平上皮癌反応性 CTL クローン、HLA-DRB1*08032 拘束性口腔癌反応性 T 細胞を樹立した。また、造血器腫瘍の同種造血幹細胞移植において、GVL (graft-versus-leukemia) 効果を担うと考えられる血液細胞上の同種抗原に反応する T 細胞を樹立し、その標的抗原が、マイナー組織適合抗原とミスマッチ MHC クラス II 分子であることを明らかにした。
- 2) 癌細胞反応性 T 細胞を用いた cDNA 発現クローニング法による癌抗原遺伝子の単離と T 細胞エピトープの同定を試みた。HLA-A1、-A2、-A3 に提示される悪性黒色腫抗原 tyrosinase と gp100 の新規 T 細胞エピトープを同定した、HLA-A2 結合 gp100 ペプチドでは、システインを、酸化されない側鎖をもつ α ブチル酸に替えることにより T 細胞認識が増強を示し、システインを含む合成ペプチドを用いる場合には、その酸化状態を考慮する必要性を示した。また、HLA-A1 拘束性悪性黒色腫反応性 T 細胞を用いて、新規悪性黒色腫抗原を単離したが、癌細胞の突然変異に由来する変異ペプチドに対する T 細胞応答の存在が証明された。この突然変異は抗原の phosphate binding loop (P-loop) 内に存在し、変異蛋白は P-loop モチーフの消失とともに GTP 結合能を消失していた。肺扁平上皮癌などの他の癌にも同分子 P-loop に変異が存在する可能性が示され、単離した変異分子が癌細胞形成に関与する可能性が示唆されたが、NIH3T3 細胞への遺伝子導入による形質転換活性は認められなかった。
- 3) 口腔癌反応性 CD4+T 細胞が認識する HLA 結合ペプチドを含む HPLC 分画を同定し、その分画に含まれるペプチドを質量分析器で解析し、T 細胞エピトープの候補ペプチドを合成して、T 細胞による認識を検討したところ、 α -enolase ペプチドが抗原として同定され

た。同様な方法で以前単離した胃癌抗原ペプチド F4.2 をコードする遺伝子の単離を試み C98 を単離した。C98 遺伝子は多くの癌細胞でその mRNA の発現をみたが、正常組織での発現は明らかに弱かった。C98 遺伝子は C 末端に F4.2 と異なるアミノ酸をもつが、T 細胞に認識された。

4) 悪性黒色腫、膵癌、大腸癌、膀胱癌患者血清を用いて、それぞれラムダファージ癌細胞株 cDNA ライブラリーをスクリーニング (SEREX 法) した結果、多数の陽性クローンを得た。各抗原に対する IgG 抗体の癌患者や健常人血清中の存在および各抗原の癌細胞や常組織の発現を検討することにより、免疫療法に応用可能な癌抗原を選択した結果、黒色腫抗原 KU-MEL-1、膵癌抗原 KU-PAN-1、膀胱癌抗原 KU-BL-1、KU-BL-50、大腸癌抗原 caudal type homeobox transcription factor2 (CDX2) を同定した。CDX2 は、マイクロサテライト不安定性 (MSI) 陽性大腸癌患者の血清を用いて単離されており、組織の CDX2 遺伝子を解析したところ、翻訳領域の (G) 7 が (G) 8 となるフレームシフト変異が確認された。そこで、CDX2 の C 末端側の正常型および変異型の組み換えタンパクを作製して、抗体の反応特異性を検討したところ、大腸癌細胞に CDX2 変異を認めた患者の血清中にだけ、CDX2 の腫瘍特異的ペプチドと共通ペプチドに対する抗体が認められた。すなわち、MSI により産生された腫瘍特異的ペプチドに対する免疫応答が証明された。

5) SAGE 法により高色素性悪性黒色腫細胞株 SKmel23 の mRNA プロファイルを得た。これと色素細胞、正常精巣、正常大腸、正常脳組織、大腸癌、脳腫瘍の EST データベースや SAGE データベースからの mRNA プロファイルと比較して、悪性黒色腫と色素細胞における遺伝子発現を解析した。その結果 mRNA プロファイルの各種組織間比較により、既知の抗原を含めて悪性黒色腫抗原が体系的に同定可能なことが示された。

6) 既知の癌抗原・癌抗原候補分子からの、HLA-A24 結合性合成ペプチドと *in vitro* CTL 誘導法を用いて、日本人に高頻度に発現する HLA-A24 に結合する T 細胞エペトープの同定を試みた。悪性黒色腫抗原 (MART-1、gp100、tyrosinase、TRP1、TRP2) 由来合成ペプチド 74 個から、TRP2 ペプチドを同定した。滑膜肉腫にみられる染色体転座 t(x;18) (p11.2;q11.2) より生じた SYT-SSX 遺伝子産物由来の 2 つの抗原ペプチドを同定した。CAR (cancer associated retinopathy) の自己抗原でもある recoverin 由来の 3 つの抗原ペプチドを同定した。癌細胞に特異的に発現する survivin 由来のペプチドを同定した。

7) いくつかの癌抗原では、診断や治療への臨床応用の可能性の検討を行った。胃癌抗原 F4.2 ペプチドでは、HLA-A31+胃癌患者の約 1/3 から、また、survivin ペプチドでは、5 例中全例で、*in vitro* で CTL 誘導がみられ、癌患者の免疫療法に有用である可能性が示唆された。また、メラノーマ抗原 PRAME は、各種造血器腫瘍にも高発現することが示され、異なる病期や各種治療前後の PRAME 発現量を real time PCR 法でモニタリングしたところ、腫瘍マーカーとして、造血器腫瘍の残存微小病変や再発の早期診断へ応用できることが示唆された。PRAME 特異的 T 細胞により、新鮮白血球細胞が認識され、造血器腫瘍においても免疫療法の標的になり得ることが示された。

8) SYT-SSX 融合ペプチドの HLA-A24 テトラマーを作製し、患者末梢血中の癌抗原特異的 T 細胞の頻度を解析したところ、患者に有意に増加していることが判明した。また、メラノーマ抗原 gp100 (209-217) ペプチド HLA-A*0201 テトラマーを作製し、FACS を用いて悪性黒色腫反応性 T 細胞の選択的増殖培養ができることを示し、HLA テトラマーが癌に対する

免疫応答の解析に有用であることを示した。

9) 癌抗原ペプチドと hsp70 の親和性を検討したところ、hsp70 と高親和性なペプチドは TAP を介して小胞体内にペプチドを輸送されることが判明し、抗原ペプチドの hsp70 親和性が細胞表面抗原ペプチドの量を規定することが示唆された。また、細胞内のポリアミンが hsp70 と TAP の会合を阻害する作用をもち、抗原ペプチドの小胞体への輸送に影響することが示された。

2. 新しい免疫制御法、遺伝子治療の開発

1) 自殺誘導遺伝子 (cytosine deaminase) と GM-CSF 遺伝子組換えアデノウイルスの併用により、GM-CSF 単独使用よりも強い抗腫瘍効果が認められた。

2) lymphotacin 遺伝子導入樹状細胞と抗原ペプチドの併用により強い抗腫瘍免疫誘導が認められた。

3) 種々のアポトーシス関連分子 (caspase-8、caspase-3、Bax、Bcl-2、Be1-XL) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製し、癌細胞のアポトーシス誘導能を検討したところ、caspase-8 組換えアデノウイルスの導入により癌細胞に強いアポトーシスが誘導できた。

4) capsid 修飾による癌細胞選択的、高効率遺伝子導入変異アデノウイルスベクターを各種作製し、その特徴を解析した。E1B55K 欠損変異型アデノウイルスはグリオーマ特異的に増殖し、高い殺細胞効果を認めた。インテグリンを標的とした RGD モチーフを含む F/RGD 変異型ウイルスを作製して用いたところ、Adv 受容体 CAR の発現が低く、従来型ベクターでは遺伝子導入効率が非常に低い悪性黒色腫、口腔扁平上皮癌などに対しても、数十倍高い遺伝子導入効率が得られた。メラノサイト刺激ホルモン (MSH) 融合 F/MSH 変異ウイルスを作製したところ、メラノーマに対して数十倍高い遺伝子導入効率が得られた。正常細胞上の CAR への結合を起こさないようにするために、Ad5 のファイバーを 40 型の短ファイバーに置き換えた Adv-F40S を作製したところ、ヒト正常細胞に対して遺伝子導入がほとんど認められなかった。さらに、Adv-F/40S をベースにして、リジン 7 個の連続配列をもつ adv-F40S/K7 を作製したが、ヘパラン硫酸を高発現する悪性脳腫瘍などに対して高い遺伝子導入効率が得られた。また、NG2 糖タンパクを標的とする TAA ペプチドモチーフを含んだ Adv-F40S/TAA を作製したが、NG2 を高発現するメラノーマやグリオーマに高い選択性を示し、腫瘍標的化に有効であった。したがって、特定の癌細胞において高発現するレセプターに対するペプチドモチーフを F40S ファイバーに付加することによって、選択性の高い「がん標的化ウイルスベクター」の作製が可能であることが示された。

5) マウス腫瘍モデルにおいて、replication-conditional 変異型 HSV G207 の腫瘍内投与により、腫瘍特異的 T 細胞が誘導され、対側の腫瘍も拒絶され、変異 HSV の免疫療法への応用が示された。転移性脳腫瘍や大腸癌肝転移の動物モデルにおいても効果が認められ、IL-12 併用により相乗的な効果も認められた。

IV 考察

1. ヒト癌抗原の同定による癌に対する免疫応答の解析と、診断・治療への臨床応用

本研究では、悪性黒色腫、膵癌、肺癌、骨肉腫、咽頭扁平上皮癌、口腔癌において、多数の癌細胞反応性 T 細胞を樹立し、その一部を用いて、癌抗原と T 細胞エピトープの同定

を行った。悪性黒色腫では、新規癌抗原とエピトープを単離・同定したが、すでに行われている免疫療法のように、臨床応用が可能と考えられる。システインを含むエピトープでは、酸化されないアミノ酸に置換した修飾ペプチドの有用性が示された。また、突然変異をもつエピトープが同定され、癌細胞に生じる遺伝子異常に対する T 細胞応答が証明された。この変異分子は GTP 結合能を消失しており、悪性黒色腫形成にも関与している可能性が示唆された。変異ペプチド抗原は、腫瘍特異的であり、比較的免疫原性が高く、抗原消失による癌細胞のエスケープが起こりにくいので、癌の診断や免疫療法に応用できる可能性がある。今後、より多くの癌で本抗原の変異頻度を検討していく必要がある。

悪性黒色腫以外の癌抗原は、世界的にもまだ少数しか同定されておらず、抗原同定が期待されているが、本研究では、滑膜肉腫で染色体転座の結果生じる SYT-SSX 融合ペプチド、胃癌に発現する F4, 2、様々な癌に高発現を示す recoverin や IAP family に属する survivin 由来のペプチドが T 細胞抗原として同定された。これらは、腫瘍組織に選択的に発現され、日本人の約 60% に高発現する HLA-A24 に提示され、癌患者から高率に CTL が誘導されるので、様々な癌の免疫療法の標的として有用と考えられる。免疫誘導においては、CDS+CTL だけでなく、CD4+ヘルパー T 細胞も重要であるが、口腔扁平上皮癌において、 α enolase が抗原として同定された。しかし、これは原発性胆汁性肝硬変で自己抗原となり得るとの報告もあり、今後の詳しい解析が必要である。造血器腫瘍では、同種造血幹細胞移植において、同種免疫反応が免疫療法に利用できることが指摘されているが、GVHD を起こさずに GVL (graft-versus-leukemia) 効果を起こせる血液細胞に特異的に発現するマイナー組織適合抗原やミスマッチ MHC クラス II 分子が T 細胞の標的抗原となり、同種免疫療法へ応用できる可能性が示された。

また、本研究では、T 細胞を用いた癌抗原同定法以外の方法も試みられた。患者血清を用いた SEREX 法では、悪性黒色腫、膵癌、大腸癌、膀胱癌において、癌細胞選択的な発現と癌患者に免疫誘導を起こす新規癌抗原が単離された。これらに対する CD4+T 細胞の存在は予測されるが、CD8+T 細胞に関しては、今後、in vitro CTL 誘導法を用いて、証明していく必要がある。また、SAGE 法を用いて、各種組織の mRNA プロファイル比較することにより、癌抗原を体系的に同定できることを示した。

癌抗原を用いて、ヒト癌に対する免疫応答の詳細な解析や免疫操作が可能になるが、本研究では、同定癌抗原ペプチドを用いて HLA テトラマーを作製し、癌抗原特異的 T 細胞の生体内動態解析と選択的培養増殖を試みた。SYT-SSX ペプチド HLA-A24 テトラマーを用いて、癌患者の体内の癌抗原特異的 T 細胞頻度が高いことを示し、gp100 ペプチド HLA-A2 テトラマーを用いて、癌抗原特異的 T 細胞の FACS ソーティングによる選択的増殖に成功した。この技術は、今後の免疫療法開発において、癌抗原特異的 T 細胞の解析と免疫操作に有用だと思われる。また、癌抗原ペプチドを用いて抗原プロセス機構の解析を行ったが、hsp70 が抗原ペプチドの小胞体への輸送を TAP との会合を通して制御していること、hsp70 と TAP の会合がポリアミンにより影響されることを明らかにした。ポリアミンは癌細胞に高発現している場合があり、腫瘍エスケープ機構の一つになり得ると考えられた。

癌抗原は免疫療法の標的としてだけでなく、腫瘍マーカーとして癌の診断にも利用できることが示された。メラノーマ抗原 PRAME は、造血器腫瘍において、real time PCR 法を用いて残存微小病変の早期診断に使えることが示された。これは T 細胞の標的にもなるの

で、再発した微小病変に対する免疫療法の可能性も期待される。今後は、本研究で同定された癌抗原を用いた免疫療法の臨床試験を進める必要があり、一部ではすでに臨床教室との共同研究が進められている。また、本研究で樹立された癌反応性 T 細胞の中には、まだ、抗原が同定されていないものもあり、今後の研究の継続が重要である。

2. 新しい免疫制御法、遺伝子治療の開発

癌の免疫療法・遺伝子治療においては、近年明らかになりつつある免疫機構や癌細胞形成に関わる重要な分子を用いることにより、癌の制御を行うことも可能である。本研究では、免疫誘導・癌細胞アポトーシスに関わる種々な分子を用いた癌の制御の可能性を検討した。自殺誘導遺伝子 (cytosine deaminase) 併用により、GM-CSF 単独使用よりも強い抗腫瘍効果があることをみいだした。また、抗原ペプチド免疫において、リンフォタクチン遺伝子を導入した樹状細胞を用いることにより、より強い免疫誘導ができることをみいだした。癌細胞にアポトーシスを誘導するために、近年明らかにされた種々のアポトーシス関連分子 (caspase-8、caspase-3、Bax、Bcl-2、Be1-XL) 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを作製し、癌細胞のアポトーシス誘導能を検討したところ、caspase-8 組換えアデノウイルスの導入により、特に強いアポトーシスが誘導できることをみいだした。癌にアポトーシスを起こすことにより、癌細胞の直接的破壊だけでなく、樹状細胞を介した癌抗原に対する効果的な免疫誘導も期待できる。変異 HSV ベクター G207 は、癌細胞特異的傷害を起こす変異ウイルスとして、臨床応用へ向けて開発されたウイルスであるが、本研究により、腫瘍局所に投与することにより、T 細胞を介した癌細胞に対する免疫誘導効果と IL12 併用による抗腫瘍効果増強が明らかになった。今後は、その免疫誘導機序の細胞・分子レベルでの詳細な解析が必要である。しかし、米国ジョージタウン大学では、すでに、再発脳腫瘍に対する phase I 臨床試験が行なわれ、安全性が確立されつつあるので、近いうちに、免疫療法として臨床試験ができる可能性がある。今回、開発した様々な免疫法や遺伝子治療法は、今後、臨床試験へ向けて、応用研究を進めていく必要がある。

以上のような免疫遺伝子操作においては、遺伝子導入技術が重要であるが、本研究では、癌細胞などに、選択的に効率よく遺伝子導入可能な新しいアデノウイルスベクターの開発を行った。アデノウイルスの感染は、ウイルスファイバーが受容体分子 (CAR) に吸着することで始まる。従来のアデノウイルスは、CAR を発現する正常細胞にも感染し、安全面で問題となっていた。今回、CAR を認識しない 40 型の短ファイバーに置換した Adv-F/40S を作製することで、正常細胞に感染しないアデノウイルスの開発に成功した。この Adv-F/40S に NG2 糖タンパクを標的とする TAA などの特定の組織型の腫瘍に特異的なリガンドを組み合わせることによって、腫瘍選択的感染が可能な、より安全な治療用ベクターが開発された。癌細胞の標的化法として、インテグリンを標的とした RGD モチーフをファイバーに含む F/RGD 変異型ウイルス、メラノサイト刺激ホルモン受容体を標的とした MSH 融合 F/MSH 変異ウイルス、リジン 7 個の連続配列を持つ F40S ファイバーをもつ F40S/K7 変異ウイルスを作製したが、それぞれ、標的を高発現する癌細胞への高効率遺伝子導入を可能にした。今後は、これら改良型ベクターを用いて生体内での腫瘍標的化が可能であるかどうかの検討が必要である。これらのベクターは癌の治療だけでなく、様々な遺伝子治療にも応用できると考えられる。

V 研究成果の発表

河上裕

1. Kawakami Y, Robbins PF., Wang X., Tupesis JP., MR. Parkhurst, Kang X., Kazuyasu K, Appella E. and Rosenberg SA. Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles. *J. Immunol*, 161: 6985-6992, 1998.
2. Kawakami Y, Robbins PF., Wang RF., M. Parkhurst, Kang X., and Rosenberg S. A The use of melanosomal proteins in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother.* 21: 237-246, 1998.
3. Parkhurst, M. Fitzgerald E., Southwood S., Sette A., Rosenberg SA.. and Kawakami Y. Identification of a shared HLA-A *0201 restricted T cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase related protein 2 (TRP2). *Cancer Res*, 58: 4895-4901, 1998.
4. Rosenberg, SA., Yang J., Schwartzentruber, D, HwuP., Marincola, F, Topalian, S. Restifo, N. Dudley, M. S. Schwarz, Spiess, P. Wunderlich, J. Parkhurst, M. Kawakami Y. Seipp, C. Einhorn, J. and D. White. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* 4: 321-327, 1998.
5. Kawakami Y. Immunotherapy using T cell defined tumor antigens for melanoma. *Microbiol. Immunol.* 42: 803-813, 1998.
6. Toda M, Kawakami Y. Cancer vaccination using herpes simplex virus vectors—a review. *Current Topics in Biochemical Res.* 1: 135-143, 1999.
7. Kawakami Y. Identification of human melanoma antigens recognized by tumor infiltrating T lymphocytes and their use for immunotherapy. In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy" *Gann Monogr. on Cancer Res.* No.48, Edts. K. Kikuchi, B. van den Eynde and N. Sato, p179-189, Japan Acientific Society press, Karger, Tokyo, 1999.
8. Kawakami Y, Development of new immunotherapy using cancer antigens recognized by T lymphocytes. In " New Strategy for Cancer Treatment", Proceedings of the 3rd Shizuoka Forum on Health and Longevity , 62 -68, 2000
9. Kawakami Y, Dang N., Wang X.,. Tupesis J, Robbins PF., Wang RF., Wunderlich JR., Yannelli JR., and Rosenberg SA. Recognition of shared melanoma antigens in association with major HLA-A alleles by tumor infiltrating T lymphocytes from 123 patients with melanoma. *J.I mmunother.* 27: 17-27, 2000.
10. Kawakami Y, Ikeda, Y, Hata, J, Koyasu, S, Kawakami, Y, Hattori, Y, eds. Immunotherapy of melanoma using T cell defined antigens. in "Cell Therapy" *Keio University Symosia for Life Sciences and Medicine*, vol 5, p77-92, Springer, Tokyo, 2000.
11. Kawakami Y. Suzuki, Y. Shofuda T., Kiniwa Y., Inozume, T. Dan.K, Sakurai T.,

- and Fujita T.: T cell responses to melanoma and melanocytes. *Pigment Cell Research*, 13:163-169, 2000.
12. Kawakami, Y. New cancer therapy by immunomanipulation: Development of immunotherapy for human melanoma as a model system. *Cornea*, 19: 2-6, 2000.
 13. Kageshita T, Kawakami Y, and Ono T. Clinical significance of MART-1 and HLA-A2 expression and CD8+ T cell infiltration in melanocytic lesions in HLA-A2 phenotype patients. *J Dermatol Science* 25: 36-42, 2001.
 14. Ogawa Y, Yamazaki K, Kuwana M, Mashima Y, Nakamura Y, Ishida S, Toda I, Oguchi Y, Tsubota K, Okamoto S, and Kawakami Y. Ultrastructural and immunohistochemical studies of lacrimal gland in patients with chronic graft-versus-host disease: a significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42: 111-9, 2001.
 15. Kawakami Y, Wang, X, Shofuda, T, Sumimoto, H, Tupesis, J.P, Fitzgerald, E. and Rosenberg S.. A Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor infiltrating T lymphocytes. *J Immunol*. 166: 2871-2877, 2001.
 16. Matsushita M., Ikeda H., Kizaki M., Okamoto S., Ogasawara M., Ikeda Y., and Kawakami Y. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematology*. 112: 916-926, 2001.
 17. Toda M., Iizuka Y, W. Yu,, Imai, T., Ikeda, E., Yoshida, K., Kawase, T., Kawakami Y., Okano, H., and Uyemura, K. Expression of the Neural RNA-Binding Protein Musashi 1 in Human Gliomas. *Glia*, 34: 1-7, 2001.
 18. Kiniwa, Y, Fujita T, Akada M, Ito K, Shofuda T, Suzuki Y, Yamamoto A, Saida T, and Kawakami Y, Tumor antigens isolated from a patient with vitiligo and T-cell-infiltrated melanoma. *Cancer Res*. submitted
 19. Suzuki Y, Hashimoto S, Fujita T, Shofuda T, Suzuki T, Sakurai T, Matsushima K, Kawakami Y. Systematic isolation of genes encoding candidate proteins for human melanoma antigens using serial analysis of gene expression (SAGE). *Cancer Res* submitted
 20. Toda M, Iizuka Y, Kawase T, Uyemura K, and Kawakami Y. Immuno-Viral Therapy of Brain Tumors by Combination of Viral Therapy with Cancer Vaccination Using a Replication-Conditional HSV. *Hum Gene Ther*. Submitted
 21. Endo T., Toda M, Watanabe M, Iizuka Y, Kubota T, Kitajima M, and Kawakami Y. In Situ Cancer Vaccination with a Replication-Conditional HSV for the Treatment of Liver Metastasis of Colon Cancer. *Gene Ther*. submitted
 22. Akada M, Fujita T., Kiniwa Y, Ito K, Suzuki Y, Ishikawa T, Sunamura M, Matsuno S and Kawakami Y. Analysis of new pancreatic cancer antigen identified by SEREX. in preparation
 23. Ito K, Fujita T., Akada M, Shofuda T, Kiniwa Y, Suzuki Y, Matsushita M, Nakamura J, Tachibana M, Ikeda H, Murai M, and Kawakami Y. Identification of

novel bladder cancer antigen, human lipoic acid synthetase, recognized by antibodies in serum of a patient with metastatic bladder cancer. in preparation

24. Ito K, Fujita T., Akada M, Shofuda T, Kiniwa Y, Suzuki Y, Matsushita M, Nakamura J, Tachibana M, Ikeda H, Murai M, and Kawakami Y. Identification of a bladder cancer antigen that is categorized in the galectin family. in preparation
25. Nagayama H, Sato K, Morishita M, Uchiyama K, Inazawa T, Yamazaki T, Enomoto M, Nakaoka T, Nakamura T, Maekawa T, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Tani K, Asano S, Takahashi TA, and Yamashita N. Aberrant development of monocyte-derived dendritic cells obtained from advanced melanoma patients: Results of phase I clinical trial of immunotherapy with tumor lysate-pulsed monocyte-derived dendritic cells plus IL2 for stage IV malignant melanoma patients. in preparation
26. Matsushita M, Ikeda H, Okamoto S, Ikeda Y, and Kawakami Y. HLA-DPB 1*0501 restricted novel minor histocompatibility antigen recognized by donor T cells: Implication for the role of CD4 T cells in stem cell transplantation. in preparation
27. Iizuka Y, Toda M, Suzuki A, Kawakami Y. Multiple in situ cancer vaccinations with herpes simplex virus and IL-12 synergize to facilitate tumor regression. in preparation

佐藤昇志

1. Suzuki, K., Sahara, H., Okada, Y., Yasoshima, T., Hirohashi, Y., Nabeta, Y., Hirai, I., Torigoe, T., Takahashi, S., Matsuura, A., Takahashi, N., Sasaki, A., Suzuki, M., Hamuro, J., Ikeda, H., Wada, Y., Hirata, K., Kikuchi, K. and Sato N. Identification of natural antigenic peptides of a human gastric signet ring cell carcinoma recognized by HLA-A31-restricted cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.*, 163: 2783-2791, 1999.
2. Maeda, T., Hirai, I., Ohguro, H., Maeda, A., Ogawa, K., Nakagawa, T., and Sato N. Identification of the antigenic site within hsc70 by serum autoantibody in patients with cancer-associated retinopathy. *Tumor Res.*, 34: 49-56, 1999.
3. Sato N., Okada, Y., Suzuki, K., Sahara, H., Yasoshima, T., Hirohashi, Y., Nabeta, Y., Hirai, I., Torigoe, T., Takahashi, S., Takahashi, N., Sasaki, A., Suzuki, M., Hamuro, J., Ikeda, H., Wada, Y., Hirata, K. and Kikuchi, K. Natural antigenic peptides of gastric signet ring cell carcinomas. In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy" *Gann Monogr. Jap. J. Cancer Res.*, Edts. K. Kikuchi, B. van den Eynde and N. Sato, 48: 31-41, 1999.
4. Kikuchi, K., and Sato N. Cell-mediated Immunity to autologous cancer. Rationale of immunotherapy of human cancer with CTL. *Gann Monogr. Japa. J.*

- Cancer Res., In "Recent Advances of Human Tumor Immunology and Immunotherapy" Gann Monogr. Jap. J. Cancer Res., Edts. K. Kikuchi, B. van den Eynde and N. Sato, 48:3-14, 1999.
5. Nabeta, Y., Kawaguchi, S., Sato, Y., Wada, T., Yamashita, T. and Sato N. Identification Strategy and Cataloguing of antigenic cancer epitope. *Modern Aspects of Immunobiology*, 1:17-19, 2000.
 6. Ichimiya, S., Nakagawara, A., Sakuma, Y., Kimura, S., Ikeda, T., Satoh, M., Takahashi, N., Sato N. and Mori, M. p73: Structure and function. *Pathol. Int.*, 50:589-593, 2000.
 7. Maeda, A., Ohguro, H., Maeda, T., Wada, I., Sato N., Kuroki, Y., and Nakagawa, T. Aberrant expression of photoreceptor specific calcium binding protein (recoverin) in cancer cell lines. *Cancer Res.*, 60: 1914-1920, 2000.
 8. Nabeta, Y., Sahara, H., Suzuki, K., Kondo, H., Nagata, M., Hirohashi, Y., Sato, Wada, Y., Sato, T., Wada, T., Kikuchi, K. and Sato N. Induction of CTL from peripheral blood of HLA-A31 (+) gastric cancer patients by in vitro stimulation with antigenic peptide of signet ring cell carcinoma. *Jap. J. Cancer*, 91 :616-621, 2000.
 9. Sato N., Nabeta, Y., Kondo, H., Sahara, H., Hirohashi, Y., Hirai, I., Kamiguchi, K., Tamura, Y., Matsuura, A., Takahashi, S., and Torigoe, T. Human CD8 and CD4 T cell epitope of epithelial cancer antigens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: 86-90, 2000.
 10. Maeda, A., Ohguro, H., Nabeta, Y., Hirohashi, Y., Sahara, H., Maeda, T., Wada, Y., Sato, T., Chuns, Y., Nishimura, Y., Kuroki, Y. and Sato N. Identification of human antitumor cytotoxic T lymphocytes epitopes of recoverin, cancer associated retinopathy antigen, to achieve a clinical better prognosis in a paraneoplastic syndrome. *Eur. J. Immunol.* 31 :563-572, 2001.
 11. Maeda, T., Maeda, A., Ogawa, K., Sahara, H., Sato N., Kuroki, Y., and Ohguro, H. Effects of anti-recoverin antibody to photoreceptor cell death and antibody generation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42: 705-712, 2001.
 12. Tamura, Y., and Sato N. Regulation of peptide antigenicity by molecular chaperones. *Current Trends in Immunology*, in press.
 13. Kamiguchi, K., Torigoe, T., Fujiwara, O., Hirohashi, Y., Sahara, H., Hirai, I., Sato N. 73 kD heat shock cognate protein is associated with transporters associated with antigen processing (TAP) and involved in feeding of MHC class I-presentable antigenic peptides to TAP. *J. Immunol.*, in press
 14. Kondo, H., Sahara, H., Miyazaki, A., Nabeta, Y., Hirohashi, Y., Yamaguchi, A., Yamada, N., Hirayama, K., Suzuki, M., Hamuro, J., Torigoe, T., Takahashi, N., Kohama, G., Ikeda, H. and Sato N. Natural Antigenic Peptides of Squamous Cell Carcinoma Recognized by Autologous HLA-DR8- restricted CD4+ T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, in press.

15. Sahara, H., Nabeta, Y., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Sasaki, A., Hirai, I., Ichimiya, S., Wada, Y., Takahashi, N., Jimbow, K., Yajima, T., Watanabe, N., Hirata, K., Kikuchi, K. and Sato N. Identification of Antigen of a Human Gastric Signet Ring Cell Carcinoma recognized by HLA-A31-restricted Cytotoxic T Lymphocytes. *Cancer Res.*, submitted.
16. Sato, Y., Nabeta, Y., Tsukahara, T., Ikeda, H., Torigoe, T., Kawaguchi, S., Wada, T., Ishii, S. and Sato N. HLA-A24 restricted antigenic peptides of SYT-SSX proteins in synorcel sarcoma. *Cancer Res.*, submitted.
17. Hirohashi, Y., Ikeda, H., Torigoe, T., Nabeta, Y., Yamanaka, N. and Sato N. HLA-A24-restricted antigenic peptides of surviving 2B protein recognized by CD (8) cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.*, submitted.

濱田洋文

1. Cao, X., Ju, D.W., Tao, Q., Wang, J., Wan, T., Wang, B.M., Zhang, W., and Hamada H. Adenovirus-mediated GM-CSP gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5 fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Therapy* 5: 1130-1136, 1998.
2. Cao, X., Zhang, W., He, L., Xie, Z., Ma, S., Tao, Q., Yu, Y., Hamada H. and Wang, J. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce antitumor immunity. *J. Immunol.* 161 (11): 6238-6244, 1998.
3. Yoshida, Y., Sadata, A., Zhang, W., Shinoura, N. and Hamada H. Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma. *Human Gene Therapy* 9 (17): 2503-2515, 1998.
4. Shinoura, N., Ohashi, M., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., Saito, I., and Hamada H. Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses for pro-apoptotic genes. *Human Gene Therapy* 9 (18): 2683-2689, 1998.
5. Zhang Weiping, He Long, Yuan Zhenglong, Xie Zhifang, Wang Jianli, Hamada H, and Cao Xuetao, Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphotactin. *Human Gene Therapy.* 10 (7): 1151-1161, 1999.
6. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Relative level of expression of Bax and Bel-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene*, 18 (41): 5703-5713, 1999.
7. Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant ELB-defective adenovirus for gene therapy of glioma. *Cancer Res.* 59(14):3411-3416, 1999.
8. Shinoura, N., Yoshida, Y., Nishimura, M., Muramatsu, Y., Asai, A., Kirino,

- T., and Hamada H. Expression level of Bcl-2 determines anti-or pro-apoptotic function. *Cancer Res.* 59 (16): 4119-4128, 1999.
9. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, H., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of p33ING with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res.* 59(21):5521-5528, 1999.
 10. Shinoura N, Yamamoto N, Yoshida Y, Fujita T, Saito N, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated gene transduction of IkappaB or IkappaB plus Bax gene drastically enhances tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jpn J Cancer Res.* 91 (1):41-51, 2000.
 11. Koyama, F., Sawada, H., Fujii, H., Hirao, T., Ueno, M., Hamada H., and Nakano, H. The enzyme/prodrug gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of Escherichia coli cytosine deaminase gene driven by the CAG promoter associated with 5- fluorocytosine administration. *J. Exp. Clio. Cancer Res. (JECCR)* 19 (1): 75-80, 2000.
 12. Shinoura, Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of p53 and Fas ligand drastically enhances apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* 7 (5): 732-738, 2000.
 13. Shinoura, Saito, K., Yoshida, Y., Hashimoto, M., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of Bax with caspase-8 controlled by myelin basic protein promoter induces enhanced apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther.* 7 (5): 739-748, 2000.
 14. Motoi, F., Sunamura, M., Ding, L., Duda, DG., Yoshida, Y., Zhang, W-P., Matsuno, S., and Hamada H. Effective gene therapy for pancreatic cancer by cytokines mediated by restricted replication-competent adenovirus. *Human Gene Ther.* 11 (2): 223-235, 2000.
 15. Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirusmediated transfer of Bel-xi protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* 254 (2): 221-231, 2000.
 16. Shinoura, N., Muramatsu, Y., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirusmediated transfer of caspase-3 with Fas ligand Induces drastic apoptosis In U373MG glioma cells. *Exp. Cell Res.* 256 (2):423-433., 2000.
 17. Shinoura, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: Implication for gene therapy. *Hum. Gene Ther* 11
 18. Shinoura, S., Yamamoto, N., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino. T., and Hamada H. Adenovirusmediated transfer of caspase-8 in combination with super-repressor of NF-kB drastically induced apoptosis in gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 (2): 544-552, 2000.
 19. Cao X, Huang X, Ju DW, Zhang W, Hamada H, Wang J. Enhanced antitumoral effect

- of adenovirus-mediated cytosine deaminase gene therapy by induction of antigen-presenting cells through stem cell factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Gene Ther.* 7(2):177-86, 2000.
20. Shinoura, N., Sakurai, S., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Transduction of Apaf-1 or caspase-9 induces apoptosis in A1 72 cells, which are resistant to p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (3): 667-673, 2000.
 21. Shinoura N, Yamamoto N, Asai A, Kirino T, and Hamada H. Adenovirus-mediated Transfer of Fas Ligand Gene Augments Radiation-induced Apoptosis in U-373MG Glioma Cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 91 (10):1044-1050, 2000.
 22. Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, and Hamada H. Transduction of a Fiber-mutant Adenovirus for the HSVtk Gene Highly Augments the Cytopathic Effect towards Gliomas. *Jpn J Cancer Res.* 91 (10):1028-1034, 2000.
 23. Nagayama Y, Nishihara E, Namba H, Yokoi H, Hasegawa M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Hamada H, Yamashita S, Niwa M. Targeting the replication of adenovirus to p53-defective thyroid carcinoma with a p53-regulated Cre/loxP system. *Cancer Gene Ther.* 8 (1):36-44, 2001.
 24. Shinoura, N., Sakurai, S., Asai, A., Kirino, T., and Hamada H. Co-transduction of apaf-1 and caspase-9 augments etoposide-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Apr;92(4):467-474.