

義勝, 井田博幸. Pompe 病の酵素補充療法における酵素製剤に対する免疫寛容導入. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会, 東京, 11 月.

- 15) Ohashi T, Iizuka S, Eto Y, Ida H. Immune tolerance induction in enzyme replacement therapy for Pompe disease by anti-CD3 antibody and oral enzyme administration. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, Honolulu, Oct.
- 16) Ohashi T. Impact of antibody formation on enzyme replacement therapy for Lysosomal storage diseases and immune tolerance induction for infused enzyme. The 12th Annual Asia LSD Symposium, Taiwan, Oct.
- 17) Ohashi T. Immune response against therapeutic enzyme. The 3rd International Symposium of Lysosomal Storage Diseases, Nagoya, Sept.
- 18) 大橋十也. iPS 細胞の可能性について. 第 13 回日本ムコ多糖症研究会. 大阪, 8 月.
- 19) 大橋十也. ライソゾーム病の遺伝子治療と再生医療. 第 112 回日本小児科学会学術集会. 奈良, 4 月.
- 20) Ohashi T. Immunological aspect of enzyme replacement therapy for Lysosomal storage diseases. The 9th International Symposium on Lysosomal Storage Diseases, Frankfurt, Apr.

#### IV. 著 書

- 1) 佐々木敬. 第 1 部: 分子細胞生物学 5. ゲノム科学. 花岡炳雄, 永倉俊和編. 臨床分子細胞生物学. 東京: メディカルレビュー社, 2009. p.75-87.
- 2) 佐々木敬. III. 症例に見るメトホルミンの効果的な使い方 他の糖尿病薬と併用した方がよい場合 チアゾリジン誘導体. 河盛隆造編. 見直されたビグアナイド: メトホルミン. 改訂版. 大阪: フジメディカル出版, 2009. p.160-4.
- 3) 大橋十也. N. ライソゾーム病 2 症例 40: 原因不明の発熱, 足趾の疼痛, 低汗症を主訴に来院した 12 歳男児. 日本先天代謝異常症学会編. 遠藤文夫, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸編集委員. 症例から学ぶ先天代謝異常症: 日常診療からのアプローチ. 東京: 診断と治療社, 2009. p.175-7.
- 4) 大橋十也. 第 1 章: 小児科研修医へのアドバイス E. 小児科医と社会 (地域) との結びつき 2. 小児の先進医療. 永井良三シリーズ総監修, 五十嵐隆責任編集, 金子一成, 田原卓浩, 渡辺 博編. 小児科研修ノート. 東京: 診断と治療社, 2009. p.78-82.
- 5) 大橋十也. 体細胞遺伝検査 その他の遺伝病的検査 ファブリ病. 高久史磨監修. 黒川 清, 春日雅人, 北村聖編. 臨床検査データブック 2009-2010. 東京: 医学書院, 2009. p.633.

### 悪性腫瘍治療研究部

- 教授: 銭谷 幹男 (兼任) 肝臓病学・肝疾患の細胞生物学
- 准教授: 本間 定 腫瘍免疫学・消化器肝臓病学
- 准教授: 山田 順子 血液学・分子腫瘍学
- 講師: 小井戸薫雄 (兼任) 消化器病学

#### 教育・研究概要

##### I. 抗腫瘍免疫療法についての基礎および臨床研究

##### 1. 進行膀胱癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンの併用効果のメカニズム

WT1 (Wilms' tumor gene) は膀胱癌を含む広範な悪性腫瘍に発現し, WT1 ペプチドワクチン (WT1 PV) は白血病, 悪性脳腫瘍などに有効例が認められている。我々は進行膀胱癌を対象として WT1 PV と塩酸ゲムシタピン (GEM) の併用療法の臨床試験を行い, GEM 単独療法に比し良好な治療成績と複数の著効例を得た。この WT1 PV と GEM 治療でみられる相乗効果のメカニズムについて検討した。ヒト膀胱癌細胞 MIAPaCa-2 を GEM (30-100ng/ml) で処理すると NF- $\kappa$ B のシグナル伝達を介して WT1 mRNA・蛋白の発現が有意に増加した。MIA PaCa-2 移植 SCID マウスに臨床使用量の GEM を投与しても腫瘍組織の WT1 mRNA 発現が増加した。WT1 蛋白は転写因子として核内に局在するが, GEM 処理により細胞質へ移行しプロテアソームによる抗原ペプチド産生が促進されることが示唆された。実際, GEM 処理膀胱癌細胞の MHC class I 結合ペプチドを酸抽出により回収し質量解析を行うと HLA-A\*2402 拘束性の WT1 抗原ペプチドの提示量が増加していた。WT1 特異的 T 細胞受容体遺伝子導入リンパ球は GEM 処理 MIAPaCa-2 細胞をより強く傷害した。以上より, GEM はヒト膀胱癌細胞の WT1 発現を増強させ, この GEM 処理膀胱癌細胞を WT1 特異的 CTL が効率的に認識し傷害することが相乗効果を生む機序と考えられた。

##### 2. 悪性神経腫瘍に対する免疫療法臨床研究

悪性神経腫瘍症例に対して腫瘍細胞/樹状細胞の融合細胞を用いた免疫療法の臨床研究を継続した。融合細胞は GMP 対応細胞治療用細胞生産室において GMP 作業に準拠して生産している。化学療法剤テモゾロミドとの併用で長期生存を得ており臨床研究の完遂に向け継続している。

## II. 機能的ペプチド配列から構成される蛋白質を用いた腫瘍免疫療法の開発

従来のがん治療に加えて、新たなペプチドワクチンを用いた腫瘍免疫療法が注目されている。しかし、これらはいずれも腫瘍抗原エピトープに相当する短鎖ペプチドを用いており、十分な免疫活性化に至らないのが現状である。そこで我々は腫瘍抗原エピトープを多数含有し蛋白質それ自身が免疫誘導能を有する人工蛋白質を作成することに取り組んでいる。本年度は、腫瘍抗原 WT1 エピトープ配列、 $\alpha$ ヘリックス蛋白質安定化配列を無作為に多数繰りかえした人工蛋白質を作製した。このような人工蛋白質はその配列に依存してナノ～サブミクロンオーダーの大きさを持つ分子を形成するので、抗原提示細胞に効率よく認識、処理され、強い免疫原性を発揮する事が期待される。今後、人工蛋白質ライブラリーの中から強い免疫誘導能を持つ人工蛋白質を探索し、その物理化学的性質と免疫誘導能の関連性を調べ、より高い細胞性免疫を誘導する人工蛋白質のデザイン指針を導き出し、新しい腫瘍免疫療法の開発を目指していく。

## III. 接着により誘導される巨核球系分化の分子メカニズム

巨核球は巨核球/赤芽球共通前駆細胞から分岐するが、そのメカニズムには不明な点が多い。我々はAML (M7) 患者より樹立した白血病細胞を利用して、接着と巨核球分化機構の解明を試みた。転写因子 FLI-1 を RNAi 法でノックダウンすると PF4・FLI-1 の転写、細胞表面 CD61 分子、接着性が低下し FLI-1 が巨核球系分化を担っていることが確認された。接着刺激からの分化には FLI-1 遺伝子上流 -835～-36 塩基部位の転写活性が関与し、特に GATA と ets 結合部位が必須であることが分かった。また、FLI-1 タンパク自身が FLI-1 遺伝子プロモーターに結合し転写を活性化していることを示した。このように接着刺激は転写因子 FLI-1 のポジティブフィードバックを介して巨核球への分化を促進する。

## IV. プロテオミクス解析に基づく新規泌尿器科癌マーカーの探索

癌プロテオミクス解析の結果から得られた複数のマーカー候補タンパク質について前立腺癌組織や尿路上皮癌組織での免疫組織学的発現解析を行い、マーカーとしての臨床的有用性の評価を行っている。今年度はより効率的な方法として、前立腺癌パラ

フィン包埋組織から前立腺癌部と非癌部の一部をそれぞれ採取し、新たに配列し直した Tissue Microarray (TMA) を作製し検討した。この結果、前立腺癌組織で MCM5 (Minichromosome Maintenance 5) および、GANAB (Glucosidase, alpha; neutral AB) の発現が増加していることが確認できた。現在、これらタンパク質の機能解析を行っている。(本研究は、本学泌尿器科、病理学講座との共同研究である。)

### 「点検・評価」

#### 1. 研究について

基礎研究としては癌治療を最終目的とする各自の研究課題をそれぞれ進展させることができた。腫瘍免疫は研究所改組以来の課題であり、2つの臨床研究に結びついている。このうち、悪性神経膠腫に対する免疫療法は長期間に及ぶ臨床研究であり予定通りの完遂に向け継続できている。膀胱がんに対する WT-1 ペプチドワクチンは塩酸ゲムシタピンとの併用で予想以上の治療効果をあげ、全国的に腫瘍免疫が見直される契機となった。平行して、治療効果の裏づけとなる基礎研究も進めている。これまでの研究で化学療法と腫瘍免疫療法の併用が相乗効果を発揮できることを明らかにしており、臨床を意識した研究となっている。

#### 2. 管理運営について

研究所としてハイテクリサーチやバイオベンチャーといった大型研究費で設置された研究機器を学内研究者に解放している。当部門でもフローサイトメトリーを始めとする機器の管理を担当している。今年度は循環腫瘍細胞測定装置セルサーチも設置され、これらの稼働管理を通じて大学全体の研究活動に貢献している。

昨年度課題とした学術的コミュニケーションの推進について今年度は個々の実情に対応するとともに研究所セミナーを担当した。研究所としての夏季・冬季研究発表も定着しており、今後もこのような機会を活用し臨床との連携を意識していく。

#### 3. 教育について

学部教育としては各教員がそれぞれ授業・研究所配属・医学英語・チューターなどを担当した。大学院教育として研究の計画・実施・論文報告を指導し医学研究者の育成に努めた。

## 研究業績

### I. 原著論文

1) Yamada H, Penney KL, Takahashi H, Katoh T, Ya-

mano Y, Yamakado M, Kimura T, Kuruma H, Kamata Y, Egawa S, Freedman ML. Replication of prostate cancer risk loci in a Japanese case-control association study. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(19): 1330-6.

2) Funamizu N, Okamoto A, Kamata Y, Misawa T, Uwagawa T, Gocho T, Yanaga K, Manome Y. Is the resistance of gemcitabine for pancreatic cancer settled only by overexpression of deoxycytidine kinase? *Oncol Rep* 2010; 23(2): 471-5.

### III. 学会発表

1) 高原映崇, 永崎栄次郎, 小井戸薫雄, 佐川由紀子, 伊藤正紀, 越智俊元, 藤原 弘, 安川正貴, 田尻久雄, 本間 定. 膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピン併用療法の相乗効果のメカニズム. 第 22 回日本バイオセラピー学会学術集会総会. 大阪, 11 月.

2) Saeki C, Nakano M, Oikawa T, Takahashi H, Homma S, Zeniya M. Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. Boston, Oct.

3) 小井戸薫雄, 本間 定, 込田英夫, 高原映崇, 小田原俊一, 内山 幹, 佐藤憲一, 大草敏史, 田尻久雄. 進行肝細胞癌における樹状細胞ワクチンの免疫回避機構の解明. 第 51 回日本消化器病学会大会. 京都, 10 月.

4) 込田英夫, Zhao X, 小井戸薫雄, 本間 定, 大草敏史, Katakam AK, Kumar P, Kawabe M. On/off システムによる IL-12 遺伝子治療により安全で効率的な抗腫瘍効果の誘導. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

5) 小井戸薫雄, 本間 定, 原 栄一, 込田英夫, 佐川由紀子, 高原映崇, 永崎栄二郎, 伊藤正紀, 大草敏史, 田尻久雄. 肝細胞癌産生物質はヒト樹状細胞と癌細胞との融合細胞を未成熟化し抑制性 T 細胞を誘導する. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

6) 永崎栄次郎, 小井戸薫雄, 田尻久雄, 相羽恵介, 本間 定. 樹状細胞と 5-FU の併用療法は TNF- $\alpha$  を介した抗腫瘍効果. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

7) 高原映崇, 永崎栄二郎, 小井戸薫雄, 佐川由紀子, 伊藤正紀, 田尻久雄, 本間 定. 膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピン併用療法の相乗効果のメカニズム. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

8) 込田英夫, 小井戸薫雄, 本間 定, Zhao X, Katakam AK, Kumar P, Kawabe M, Okada H, 大草敏史, 田尻久雄, Braugher MJ, Storkus WJ. Condi-

tional IL-12 gene therapy promotes safe and effective anti-tumor immunity. 第 51 回日本消化器病学会大会. 京都, 10 月.

9) 西田純幸, 武田 裕, 岡 芳弘, 小井戸薫雄, 込田英夫, 伊藤壽記, 本間 定, 大草敏史, 土岐祐一郎, 森 正樹, 川瀬一郎, 田尻久雄, 杉山治夫. 進行膵臓癌に対するゲムシタピン併用 WT1 ペプチドワクチン療法. 第 68 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

10) 西田純幸, 武田 裕, 岡 芳弘, 小井戸薫雄, 本間 定, 込田英夫, 伊藤壽記, 北川 透, 坪井昭博, 尾路祐介, 保仙直毅, 白方俊章, 中野晶子, 川瀬一郎, 大草敏史, 田尻久雄, 杉山治夫. WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタピンを併用した進行膵臓癌に対する新たな治療戦略. 第 13 回日本がん免疫学会総会. 北九州, 6 月.

11) 込田英夫, 本間 定, 小井戸薫雄, 大草敏史, Alber SM, Amoscato AA, 田尻久雄, Storkus JW. 肝血管肉腫に対する抗腫瘍免疫の誘導. 第 45 回日本肝臓学会総会. 神戸, 6 月.

12) 佐伯千里, 中野真範, 及川恒一, 高橋宏樹, 本間 定, 銭谷幹夫, 田尻久雄. 自己免疫性肝炎マウスモデルにおける制御性 T 細胞の動態と病態との関連の解析. 第 45 回日本肝臓学会総会. 神戸, 6 月.

13) 本間 定, 込田英夫, 小井戸薫雄, 大草敏史, 田尻久雄, 小幡 徹. 肝癌細胞に発現するチトクローム P450 分子の抗腫瘍免疫誘導における意義. 第 45 回肝臓学会総会. 神戸, 6 月.

14) 込田英夫, 小井戸薫雄, 本間 定, Alber SM, 大草敏史, Amoscato AA, Storkus JW, 田尻久雄. 肝血管肉腫に対する抗腫瘍免疫の誘導. 第 95 回日本消化器病学会総会. 札幌, 5 月.

15) Koido S, Homma S, Hara E, Komita H, Mitsunaga M, Namiki Y, Takahara A, Nagasaki E, Odahara S, Uchiyama K, Ito M, Sagawa Y, Gong J, Ohkusa T, Tajiri H. Fusions of human dendritic cells and hepatocellular carcinoma cells induce cytotoxic and regulatory T cells in vitro. Keystone Symposia, Dendritic Cells (22) 2009. Banff, Mar.

16) Koido S, Hara E, Homma S, Komita H, Takahara A, Odahara S, Mitsunaga M, Uchiyama K, Ohkusa T, Tajiri H. Fusions of human dendritic cells and pancreatic carcinoma cells induce antigen-specific antitumor immune responses. Digestive Disease Week 2009. Chicago, May.

17) 小井戸薫雄, 込田英夫, 本間 定, 光永真人, 高原映崇, 小田原俊一, 内山 幹, 河原秀治郎, 遠山洋一, 柳沢 暁, 小林 進, 矢永勝彦, 大草敏史, 田尻久雄. トール様受容体を刺激した樹状細胞と熱処理した大腸癌細胞の融合細胞は効果的な細胞傷害性 T 細胞を誘

- 導する。第95回日本消化器病学会総会。札幌。5月。
- 18) 高原映崇, 本間 定, 田尻久雄. 膀胱癌に対する塩酸ゲムシタピンと WT1 ペプチドワクチン併用療法の有効性に関する基礎的検討. 第95回日本消化器病学会総会。札幌。5月。
- 19) 山田順子, 河野 毅, 山田 尚. 転写因子 FLI-1 は接着による巨核球系分化に重要である. 第71回日本血液学会学術総会。京都。10月。[臨血 2009; 50(9): 1119]
- 20) Horiguchi-Yamada J, Yamada H. Mutual-activation of FLI-1 and integrins functions as a key event during megakaryocytic differentiation of megakaryoerythroid JAS-R cells. The 51st ASH (American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition. New Orleans, Dec.
- 21) Horiguchi-Yamada J, Kawano T, Yamada H. Transcription activation of FLI-1 plays an important role in adherence-induced megakaryocytic differentiation. 第68回日本癌学会学術総会。横浜。10月。
- 22) Horiguchi-Yamada J, Kawano T, Yamada H. Transcription factor FLI-1 plays an important role in adherence-induced megakaryocytic differentiation. AACR (American Association for Cancer Research) 100th Annual Meeting 2009. Denver, Apr. [AACR Meet Abst Online 2009; 2009: 4259]

## 分子遺伝学研究部

教授：山田 尚 分子腫瘍学  
講師：河野 毅 分子腫瘍学

### 教育・研究概要

#### I. 分子腫瘍学的研究

##### 1. 白血病細胞の可塑性

腫瘍細胞は多様な機構を使って治療抵抗性を獲得する。従来、抗腫瘍薬に対する薬剤耐性は腫瘍細胞からの薬剤排出や薬剤代謝の側面から研究されてきた。しかし、腫瘍細胞に内在する可塑性に基づく脱分化等が治療耐性に関与する可能性も考えられる。我々が樹立した巨核芽球性白血病由来の細胞株 JAS-R はこのような可塑性を容易に示す細胞である。これまでの研究で JAS-R は培養条件の変化によって巨核球と赤芽球との間の形質転換を示すことが明らかとなった。さらに、白血病幹細胞形質の獲得も可能なようである。すなわち、低酸素やマトリックスなどの培養条件を骨髄環境下と近似させることによって、JAS-R 細胞を白血病幹細胞、さらに、幹細胞の増殖生存を維持する支持細胞としての間葉系幹細胞へと変化させることができないかを検討している。低酸素下では、JAS-R 細胞はカドヘリンの発現が誘導され、更に、造血の維持に重要な様々な因子の誘導が可能である。この結果、腫瘍細胞は細胞周期の停止などを通して薬剤抵抗性を獲得できるものと考えられる。このような腫瘍生物学的な変化を可能にしている分子生物学的機構についても解析を行っている。

#### II. 分子薬理学的研究

##### 1. テロメラーゼ阻害薬

染色体末端のテロメアはグアニンに富んだ DNA である。陽イオン性ポルフィリン TMPyP4 はテロメア領域のこのグアニンに結合して安定した DNA 四重鎖構造を作る。我々は白血病細胞を用いて TMPyP4 の抗腫瘍活性を検討し、TMPyP4 による増殖抑制効果はテロメアの短縮に依存した現象ではないこと。TMPyP4 処理で c-Myc が顕著に抑制され、遺伝子発現修飾が抗腫瘍活性に関連することを示してきた。今回、TMPyP4 の網膜芽細胞腫における抗腫瘍効果を検討した。TMPyP4 は直接的にアポトーシスを誘導し、ヒストン H2AX および p53 がリン酸化を受けていることが判明した。また、TMPyP4 は膜芽細胞腫の放射線感受性を増強し、