

15 - 17 抗腫瘍抗原ペプチドの臨床への導入に関する研究

主任研究者 慶應義塾大学医学部 河上 裕

研究成果の要旨

本年度は、昨年に引き続き、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により、多数の新規ヒト腫瘍抗原を単離し、新規 HLA 結合ペプチド予測プログラム、in vitro T 細胞誘導法、HLA 遺伝子導入マウス等を用いて、日本人に頻度の高い HLA-A24 や-A2 に結合する T 細胞エピトープを同定した。T 細胞エピトープペプチドを用いた各種癌に対する免疫の第 I 相臨床試験を開始し、重篤な副作用なく一部の症例で免疫効果と抗腫瘍効果が認められた。投与ペプチドに対する IgG 抗体が検出される症例があり、その意義解明による免疫療法の改良が考えられた。同種造血幹細胞移植により固形癌に対しても抗腫瘍効果(GVT 効果)が認められ、腫瘍抗原に対する T 細胞応答が増強する場合があることが明らかになった。また、ヒト T 細胞再構成マウス、免疫モニター用の Q-dot を用いた高感度 HLA マルチマー、Hsp90-ペプチド複合体による免疫誘導増強など、今後の免疫療法の改良に直接結びつく基礎研究成果をあげた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
河上 裕	慶應義塾大学医学部 教授	各種遺伝子解析を用いたヒト腫瘍抗原の同定
珠玖 洋	三重大学医学部 教授	ヒト腫瘍抗原ペプチドの同定とその臨床応用
佐藤昇志	札幌医科大学医学部 教授	腫瘍抗原ペプチドの同定と CTL 癌ワクチンの臨床試験
原田 守	久留米大学医学部 助教授	再燃前立腺癌に対するペプチドワクチン療法に関する研究
安川正貴	愛媛大学医学部 助教授	造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法の開発
若杉 尋	*1 国立がんセンター 部長	ペプチドを用いた同種移植後の抗原特異的免疫回復の解析
平家勇司	*2 国立がんセンター 主任研究官	とそれを用いた受動免疫療法の開発

*1：平成15年4月1日～平成16年3月31日

*2：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1. 研究目的

本研究の目的は、ヒト腫瘍抗原およびT細胞エピトープペプチドを同定し、それを用いた抗腫瘍免疫応答の解析と免疫療法の臨床試験の実施と評価、また、その改良により、各種癌（消化器癌、乳癌、泌尿器癌、婦人科癌、

造血管腫瘍、肉腫、悪性黒色腫など)に対する抗原ペプチドを標的とした免疫療法の可能性を追究することである。同時に腫瘍抗原を用いた癌の診断法開発も検討する。

具体的には、1. 新規腫瘍抗原の同定においては、網羅的遺伝子発現解析(DNA Chip, DNAマイクロアレイ、SAGEなど)や患者T細胞や抗体を用いたcDNA発現クローニング法などの各種方法を試み、改良を加えて新規腫瘍抗原を単離同定する。また既知の候補分子が抗原になるかを検討する。2. T細胞認識腫瘍抗原ペプチドの同定においては、健康人や患者末梢血リンパ球を用いたin vitro T細胞誘導法を用いて、CD8⁺T細胞やCD4⁺T細胞が認識する抗原ペプチドを決定する。その際、新規開発HLA-A24結合ペプチド予測プログラム、HLAトランスジェニックマウスへの腫瘍抗原免疫実験によるT細胞エピトープの推定も試みる。3. 抗腫瘍免疫応答の解明においては、腫瘍抗原に対する免疫応答を、患者、健康人検体(末梢血、腫瘍浸潤リンパ球など)を用いて、各種免疫アッセイにより検討する。また、T細胞による癌細胞認識傷害機構の解明を試み、将来の免疫療法改良へと結びつける。4. 免疫療法・免疫モニタリング法の改良においては、新しい手法を開発し将来の臨床試験に役立てる。5. 臨床試験の実施と免疫モニタリングによる科学的評価においては、安全性、免疫効果(Elispot、HLAテトラマー、抗体産生など)、抗腫瘍効果(画像診断、腫瘍マーカー、免疫組織化学など)を評価することにより、免疫療法の問題点を明らかにし、改良法を考え、新たな免疫療法の開発を行う。

2 研究成果

本年度は、昨年度に引き続き、DNA Chipを用いた網羅的遺伝子発現解析により、各種癌における新規ヒト腫瘍抗原を同定し、in vitro T細胞誘導法やHLA 遺伝子導入マウスを用いてT細胞エピトープを同定した。抗腫瘍免疫応答の解析においては、ペプチド免疫の臨床試験において、投与ペプチドに対する免疫応答をHLAテトラマー法などにより解析しただけでなく、投与ペプチドに対するIgG抗体誘導の意義を詳細に検討し、また、同種造血幹細胞移植における抗腫瘍免疫応答の解析を行った。免疫モニター法の改良として、Q-dotを用いた高感度HLAマルチマーを開発し、免疫法の改良として、Hsp90/腫瘍抗原ペプチド複合体を用いた免疫法を開発した。高度免疫不全マウスへのヒト造血幹細胞移植により、ヒト免疫再構成マウスを作製し、ワクチンのモデルに使用できる可能性を示した。また、昨年に引き続き、各種同定腫瘍抗原のT細胞エピトープを用いて、臨床試験を実施し、現在のところ重篤な副作用を認めずに、一部の患者においては免疫誘導効果と抗腫瘍効果が認められている。以下に、具体的な成果を述べる。

1. 新規腫瘍抗原の同定

本年度は、網羅的遺伝子解析技術のうちDNA chip法を用いて新規腫瘍抗原を多数同定した。正常組織42検体、癌組織45検体、正常培養細胞株16検体、癌細胞株97検体を用いたDNA chip法による遺伝子発現解析結果を比較することにより、胃癌で高発現するKU-CT3、腎癌で高発現するKU-RCC-1、種々の癌細胞に高発現するKU-CT6、KU-CR1を同定した。各種正常組織、癌組織、正常培養細胞株、癌細胞株を用いたRT-PCR、定量PCR法により、KU-CT3は胃癌だけでなく、肺癌、悪性黒色腫、子宮体癌、大腸癌などでも発現が認められ、KU-RCC1は腎癌組織や腎癌細胞株で高頻度に発現していた。多発性骨髄腫で発現が報告され、転座や遺伝子増幅が認められているKU-CT6は、多発性骨髄腫、子宮体癌、卵巣癌、食道癌、膀胱癌、大腸癌、肺癌など多くの癌で発現が認められた。FGFファミリーに属するKU-CR1は大腸癌組織および細胞株、肺癌、食道癌で発現していた。また各抗原の大腸菌組換えタンパクを作製し、癌患者血清中における特異IgG抗体の存在をWestern blot法により検討したところ、KU-CT3は悪性黒色腫患者27例中13例、KU-RCC1は腎癌患者28例中3例、KU-CT6やKU-CR1では、それぞれ子宮体癌および肺癌患者でIgG抗体が検出された。IgG抗体の存在は、癌患者において同じ腫瘍抗原に対するCD4⁺T細胞が活性化されていることを意味し、新規同定腫瘍抗原は、少なくともCD4⁺T細胞抗原として免疫療法に応用できると考えられる。

また、別のDNAチップセットを用いて、35種類の新規腫瘍抗原候補を抽出し、RT-PCR法により、正常組織に発現が極めて低く、癌組織に過剰発現する腫瘍抗原候補17種類を同定した。そのうち5種類は新規蛋白質であり、2種類はMMPファミリー、1種類は酸素センサー分子、1種類は蛋白リン酸化酵素であった。このうちの一つは前立腺癌と乳癌に特異的に発現し、腫瘍マーカーとしても有用であることが示唆された。

2. T細胞認識エピトープペプチドの同定

1) In vitro T細胞誘導法によるT細胞エピトープの同定

i) 前立腺癌抗原T細胞エピトープの同定

本年度は、PSA、PSMA、PAPにおいて、HLA-A3スーパーファミリー(A11, A31, A33)拘束性のペプチド候補を複数同定し、また、前立腺関連抗原は他の癌種でも発現することをみい出した。前立腺癌関連抗原以外で、ホルモン抵抗性前立腺癌や骨転移性前立腺癌に発現する分子の抗原性を検討したところ、骨転移癌病変に関わり高Ca血症の原因となるParathyroid hormone-related protein(PTHrP)において、HLA-A24および-A2結合T細胞エピトープを同定した。さらに、gene silencingに関わるpolycombグループ蛋白enhancer of zeste homologue 2 (EZH2)で、HLA-A24結合性T細胞エピトープを同定した。

ii) 子宮頸癌患者における HLA-A24 拘束性 HPV type 16 ペプチドの同定

子宮頸癌発症に関わる human papilloma virus (HPV) type 16 の E6 と E7 において、HLA-A24 陽性子宮頸癌患者末梢血から癌細胞反応性 CTL を誘導できる T 細胞エピートープを同定した。

iii) CD4+T細胞に認識されるWT1ヘルパーT細胞エピートープの同定

WT1 全長に対して 10 アミノ酸が重複する 20 アミノ酸ペプチドを 43 種類合成し、*in vitro* T 細胞誘導法により、Th1 タイプの HLA-DP5 拘束性 WT1 特異的 CD4+T 細胞を誘導した。この CD4+T 細胞は、WT1 発現白血病細胞を HLA-DP5 拘束性に直接傷害でき、細胞傷害性は concanamycin A によって抑制されたことから、パーフォリン依存性経路によるものであることが明らかとなった。

2) HLA 遺伝子導入マウスを用いたT細胞エピートープ同定

i) 遺伝子銃を用いる方法

前年度確立したHLA-A24遺伝子導入マウスに、遺伝子銃によりMAGE-A4cDNAを免疫し、T細胞エピートープを同定した。また、HLA-A24 陽性健常人末梢血リンパ球をMAGE-A4mRNAを導入したCD4⁺ PHA blastで刺激することにより、MAGE-A4特異的T細胞が誘導され、ヒト癌細胞株にも反応した。

ii) 新規 HLA-A24 結合ペプチド予測プログラムで同定した候補ペプチドを用いる方法

本年度は、新しく開発された HLA-A24 結合ペプチド予測アルゴリズムを用いて決定した候補ペプチドで HLA-A24 遺伝子導入マウスを免疫することによる T 細胞エピートープの同定を試みた。本プログラムは、既存のプログラムと異なり、少数のペプチドと HLA 分子との結合実験結果からスタートし、予測と実験を繰り返す能動学習によって作製され、個々の部位に適するアミノ酸という概念を越えて、隣接するアミノ酸の影響も考慮したペプチド結合条件が予測できる。本アルゴリズムを用いて、以前に DNA chip 解析により同定したメラノーマ、悪性リンパ腫抗原 FCRL、SAGE 法により同定したメラノーマ抗原 PAX3、SEREX 法により同定した癌精巣抗原 CAGE の T 細胞エピートープ候補を同定した。この新規アルゴリズムにより既存の BIMAS や SYFPEITHI プログラムでは見落とすペプチドをエピートープとして同定できることが判明した。

3. 抗腫瘍免疫応答の解明

1) T 細胞エピートープペプチド免疫により誘導されるペプ

チド特異的 IgG 抗体の意義の解明

ペプチド免疫をした患者において、投与ペプチドに対する IgG 抗体が顕著に増強される症例では、臨床効果が認められやすいことを見いだしたが、その機序の解明を試みたところ、投与ペプチド特異的 IgG 抗体が誘導された症例では、ペプチド反応性 CD4 陽性 T 細胞が誘導され、さらに、PSA 蛋白に対する IgG 抗体および PSA 蛋白反応性 CD4 陽性 T 細胞も誘導されることが判明した。その免疫複合体が血漿中に同定できる症例も確認された。これらは、B 細胞を介したエピートープスプレディングが起こった可能性を示唆しており、免疫療法後の免疫動態を解明する上で、また、効果的な免疫プロトコールを作成する上で重要な知見である。

2) 免疫不全マウスを用いたヒトワクチン開発用モデルマウスの確立

新たに開発された重症免疫不全マウス NOD/scid/common γ null および nude/NOD/scid マウスにヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞を移植したところ、種々の血液細胞に加えて成熟 T 細胞と B 細胞の出現が認められた。このマウスの OVA 免疫により、OVA 特異的 IgM および IgG 抗体の産生が確認され、さらにアロ抗原特異的 CTL の誘導も観察されたので、このマウスはワクチン開発に有用である可能性が示唆された。

4. 免疫療法・免疫モニター法の改良

1) Q-dotを用いた高感度HLAマルチマーの作製

Q-dot を用いることにより通常の HLA テトラマーより感度の高い MHC マルチマーの作製に成功した。ウイルス特異的 CTL の系で検討したところ、HLA テトラマーに比して 5~10 倍の感度増強が認められ、今後、腫瘍抗原ペプチドワクチン臨床試験における免疫モニターに使用する予定である。

2) 抗原ペプチド hsp90 複合体による免疫効果の増強

腫瘍抗原ペプチド hsp90 複合体による免疫は CTL を効率よく誘導することを明らかにし、免疫療法に有用と考えられた。この複合体は樹状細胞に取り込まれた後、非 TAP 経路で CTL にクロスプレゼントされることが示唆された。

5. 臨床試験の実施と免疫モニターによる科学的評価

1) 大腸癌、乳癌、肺癌、口腔癌に対する survivin ペプチド免疫の臨床試験

前年度に引き続き、大腸癌、乳癌、肺癌、口腔癌、リンパ腫に対して、HLA-A24 結合性 survivin ペプチド免疫

の臨床試験を実施中である。いずれの癌種でも明らかな副作用は認めず、腫瘍マーカー低下が大腸癌 7/15、乳癌 4/14、肺癌 3/6、口腔癌 0/4 に認められた。しかし CT 上で MR は大腸癌 1 例のみであり、他の癌種では画像上、腫瘍増大停止がみられた例はあったが、MR にはならなかった。免疫誘導効果に関しては、大腸癌ではサバイビン 2B ペプチド HLA テトラマーで CTL 前駆細胞の上昇を検出したが、臨床効果との明らかな相関は認められなかった。

2) 滑膜肉腫に対するSYT-SSXペプチド免疫の臨床試験

前年度に引き続き、HLA-A24結合性SYT-SSX ペプチドを用いた免疫の臨床試験を実施中である。臨床的有効性に関しては肺転移巣の腫瘍増殖が停止した症例が認められたが、明らかなMRにはならなかった。免疫誘導効果に関しては、HLAテトラマーを用いた解析により、実施6例中、肺転移のある患者2例でCTL前駆細胞の上昇を認め、このペプチドの免疫原性が確認された。

3) WT1とhTERTペプチド免疫の臨床試験

WT1 および hTERT ペプチドを用いた免疫療法の第 相臨床試験 (WT1 6 名、hTERT 9 名) を実施中である。対象疾患は、WT1 は急性骨髄性・リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病急性転化、骨髄異形成症候群、肺癌であり、hTERT は腎癌、前立腺癌、悪性リンパ腫である。ペプチド + IFA を 2 週間毎に 0.5 -1.0-2.0mg を 3 名ずつ量を増やし投与した。hTERT ペプチド免疫においては、Grade3 以上の有害事象は認めず、全身転移腎がん患者 2 名で進行が停止し、微小肺転移巣の消失が認められた症例があった。これらの患者末梢血からは hTERT 特異的 CTL が誘導され、免疫するごとに、その頻度が増した。WT1 ペプチド免疫では、骨髄異形成症候群患者 1 名において、赤血球輸血の必要がなくなる程度の貧血改善と血小板数の上昇が認められ、WT1 特異的 CTL の誘導が確認された。臨床効果が得られなかった患者の多くでは CTL 誘導が確認されなかった。

4) 再燃前立腺癌に対するペプチド免疫の臨床試験

広い癌腫に発現する腫瘍抗原ペプチドに加え、本研究により同定した前立腺関連抗原ペプチドを候補に加えたペプチドの免疫療法を HLA-A24 陽性ホルモン抵抗性前立腺癌患者に実施した。ペプチド単独で臨床効果が認められない場合、エストラムチン半量投与を併用し、6 例で 50%以上の血中 PSA レベルの低下が認められた。副作用のほとんどはペプチド投与部の局所症状であったが、エストラムチン併用が原因と思われる脳梗塞が 1 例に認められた。免疫誘導効果に関しては、ペプチド単独では、14 例中 10 例でペプチド特異的 CTL が誘導され、14 例中 7 例でペプチド特異的 IgG 抗体が誘導された。エストラムチン半量投与併用例では、8 例中 6 例にペプチド特異的 CTL が誘導され、12 例中 10 例でペプチド特異的 IgG 抗体

が誘導された。

5) 疎水化多糖類 (CHP)-Her2 抗原蛋白複合体による免疫の臨床試験

CD4⁺ヘルパーT 細胞エピートームも含む多価ワクチンとして HER2 短縮型蛋白と疎水化多糖類との複合体 (CHP-HER2) を GMP 基準で作製し、第 1 相臨床試験を行った。CHP-HER2 の安全性と免疫誘導能をエンドポイントとし、HER2 蛋白 300 μg に相当する CHP-HER2 を 2 週間隔で 3 回皮下投与し、希望によりワクチン投与を継続した。予定した 9 症例の転移・再発腫瘍例 (乳癌 4 例、非小細胞肺癌 2 例、膀胱癌 1 例、鼻腔腺癌 1 例、腎盂癌 1 例) のエントリーを完了した。安全性に関しては全例グレード 1 の一過性のワクチン接種部位の発赤を認めた。またグレード 1 の全身倦怠、下痢、皮膚掻痒感が 1 例で観察されたが、その他の有害事象は観察されなかった。多価性ワクチンの免疫誘導効果の評価のため、146HER2 mRNA を導入した自家 CD4+PHA blast で *in vitro* 刺激し、HER2 mRNA 導入標的細胞を用いて IFNγ-ELISPOT を行った。4 症例において 4~8 回のワクチン以後に 146HER2 に応答性を示す CD8 陽性および CD4 陽性 T 細胞を検出し、免疫回数に伴い検出頻度が増加した。抗体産生解析ではワクチンを受けた 8 症例で、投与した組み換え HER2 蛋白に対する IgG の出現が 3 - 6 回免疫後に ELISA 法にて検出され、8-10 回免疫後、高い抗体価を保った。検討した全ての症例で IgG1 抗体が優位であった。また western blot にてワクチン投与後の患者血清中抗体は、癌細胞由来 HER2 蛋白に結合することも確認された。したがって、CHP-HER2 多価性癌ワクチンは安全であり、抗原蛋白に対して液性免疫応答および MHC class I、class II 両方の細胞性免疫応答を誘導できた。

6) 同種造血幹細胞移植後の腫瘍抗原特異的T細胞の誘導

前年度に引き続き、HLA-A2陽性同種造血幹細胞移植後患者におけるPR1、PRAME、WT1に対する抗原特異的T細胞解析をHLAテトラマー法を用いて行ったところ、WT1特異的T細胞は、急性骨髄性白血病症例を含む複数の造血器腫瘍と腎がん症例 2 例において陽性となった。腎がん症例では経時的な解析により、WT1特異的T細胞は移植後早期に出現すること、GVHDの出現に伴い出現すること、GVHDの軽快と共に消失するか自然に消失する例がみられた。WT1特異的T細胞の出現・消失と治療効果には関連性が疑われるが、治療効果に寄与するかは不明であり、今後ミニ移植にペプチドや樹状細胞免疫、抗原特異的リンパ球投与などを組み合わせた治療で検証する必要があると考えられた。

3 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、本研究に用いる臨床検体

(健康人と患者末梢血、癌細胞組織)は、提供施設の倫理委員会の規定に基づき、本研究の趣旨を十分に説明し、文書での同意を得た上で提供されるものとする。その際、必要に応じて、本研究の目的、方法、試料提供者にもたらされる利益および不利益、個人情報の保護、結果の開示、研究結果の公表、研究結果から生じる知的財産権の帰属、解析研究終了後の試料の取り扱いの方針、研究協力の任意性と撤回の自由、および費用負担に関する事項などにつき明確にする。本研究に関しては、臨床試験も含めて、すでに各研究施設における倫理委員会の承認を得て進行している。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Ito, K., Kawakami, Y., et al., Identification of novel bladder cancer antigen, human lipoic acid synthetase, recognized by antibodies in serum of a patient with metastatic bladder cancer. *Int J Cancer*, 108:712-724, 2004.
2. Iizuka, Y., Kawakami, Y., et al., Augmentation of Antitumor Immune Responses by Multiple Intratumoral Inoculations of Replication-Conditional HSV and Interleukin-12. *J Immunother*, 27:92-98, 2004.
3. Ueda, R., Kawakami, Y., et al., Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. *Oncogene*, 23:1420-1427, 2004.
4. Kawakami, Y., et al., Development of Immunotherapy for Pancreatic Cancer. *Pancreas*, 28:320-325, 2004.
5. Miyagishi, M., Kawakami, Y., et al., Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med*, 6:715-723, 2004.
6. Ueda, R., Kawakami, Y., et al., Expression of a transcriptional factor, SOX6, in human gliomas. *Brain Tumor Pathology*, 21:35-38, 2004.
7. Sumimoto, H., Kawakami, Y., et al., Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference. *Oncogene*, 23: 6031-6039, 2004.
8. Kawakami, Y., et al., Identification of human tumor antigens and its implication for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci*, 95:784-791, 2004.
9. Tanami, H., Kawakami, Y., et al., Involvement of overexpressed wild-type BRAF in the growth of malignant melanoma cell lines. *Oncogene*, 23:8796-8804, 2004.
10. Matsuzaki, Y., Kawakami, Y., et al., Systematic identification of human melanoma antigens using serial analysis of gene expression (SAGE). *J Immunother*, 28:10-19, 2005.
11. Sumimoto, H., Kawakami, Y., et al., Gene therapy for human small cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene Ther*, 12:95-100, 2005.
12. Inozume, T., Kawakami, Y., et al., Novel melanoma antigen, FCRL/FREB, identified by cDNA profile comparison using DNA chip are immunogenic in multiple melanoma patients. *Int J Cancer*, 114:283-290, 2005.

13. Namiki, T., Kawakami, Y., et al., Genomic alterations in primary cutaneous melanomas detected by metaphase comparative genomic hybridization with laser capture or manual microdissection: 6p gains may predict poor outcome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 157:1-11, 2005.
14. Kawakami, Y., et al., Immunological detection of altered signaling molecules involved in melanoma development. *Cancer Metastasis and Reviews*, in press.
15. Iwata, T., Kawakami, Y., et al., Frequent immune responses to a cancer/testis antigen CAGE in patients with microsatellite instability positive endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, in press.
16. Okada, T., Kawakami, Y., et al., Immune responses to DNA mismatch repair enzymes hMSH2 and hPMS1 in patients with pancreatic cancer, dermatomyositis and polymyositis. *Int J Cancer*, in press
17. Nishikawa, H., Shiku, H., et al., Definition of target antigens for naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 201: 681-686, 2005.
18. Greiner, J., Shiku, H., et al., mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer*, 108:704-711, 2004.
19. Hara, I., Sato, N., et al., Introduction of 65kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy. *Microbiol Immunol*, 48: 289-295, 2004.
20. Ueda, G., Sato, N., et al., Tumor-derived heat shock protein70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci*, 95: 248-253, 2004.
21. Morimoto, Y., Sato, N., et al., Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon- γ in haematopoietic tumor cells. *Br J Cancer*, 90:844-852, 2004.
22. Takamura, Y., Sato, N., et al., Regulation of MHC class II expression in glioma cells by class II transactivator (CIITA). *Glia*, 45:392-405, 2004.
23. Ida, K., Sato, N., et al., Crisscross CTL induction by SYT-SSX junction peptide and its HLA-A*2402 anchor substitute. *J Immunol*, 173:1436-1443, 2004.
24. Tsukahara, T., Sato, N., et al., Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma

- gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res.*, 64: 5442-5448, 2004.
25. Tsuruma, T., Sato, N., et al., Phase II clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med*, 2:19-29, 2004.
26. Kawaguchi, S., Sato, N., et al., Phase I vaccination trial of SYT-SSX junction peptide in patients with disseminated synovial sarcoma. *J Transl Med*, 3: 1, 2005.
27. Kondo, N., Sato, N., et al., A calcium binding protein, S100A4, mediates T cell dependent cytotoxicity as a transformation-associated antigen. *Microbiol Immunol*, 49: 49-56, 2005.
28. Hariu, H., Sato, N., et al., Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of IAP family, Livin/ML-IAP in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 1000-1009, 2005.
29. Idenoue, S., Sato, N., et al., A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res*, 11:1474-82, 2005.
30. Tsuda, N., Harada, M., et al., Vaccination with predesignated or evidence-based peptides for patients with recurrent gynecologic cancers. *J Immunother*, 27: 60-72, 2004.
31. Harada, M., et al., In vivo evidence that peptide vaccination can induce HLA-DR-restricted CD4⁺ T cells reactive to a class I tumor peptide. *J Immunol*, 172:2659-2667, 2004.
32. Matsueda, S., Harada, M., et al., Identification of new prostate stem cell antigen-derived peptides immunogenic in HLA-A2⁺ patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 53: 479-489, 2004.
34. Matsueda, S., Harada, M., et al., A prostate stem cell antigen-derived peptide immunogenic HLA-A24⁺ prostate cancer patients. *Prostate*, 60: 205-213, 2004.
35. Ishihara, Y., Harada, M., et al., HER2/neu-derived peptides recognized by both cellular and humoral immune systems in HLA-A2⁺ cancer patients. *Int J Oncol*, 24: 967-975, 2004.
36. Sato, Y., Harada, M., et al., A phase I trial of cytotoxic T-lymphocyte precursor-oriented peptide vaccines for colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer*, 90: 1334-1342, 2004.
37. Ogata, R., Harada, M., et al., Identification of polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)-derived peptides immunogenic in HLA-A24⁺ prostate cancer patients. *Prostate*, 60: 273-281, 2004.
38. Mochizuki, K., Harada, M., et al., Immunological evaluation of vaccination with pre-designated peptides frequently selected as vaccine candidates in an individualized peptide vaccination regimen. *Int J Oncol*, 25:121-132, 2004.
39. Takedatsu, H., Harada, M., et al., Expression of epithelial cancer-related antigens in hematological malignancies applicable for peptide-based immunotherapy. *J Immunother*, 27: 289-297, 2004.
40. Yao, A., Harada, M., et al., Identification of parathyroid hormone-related protein-derived peptides immunogenic in human histocompatibility leukocyte antigen-A24⁺ prostate cancer patients. *Br J Cancer*, 91: 287-296, 2004.
41. Harada, M., et al., Prostate-related antigen-derived new peptides having the capacity of inducing prostate cancer-reactive CTLs in HLA-A2⁺ prostate cancer patients. *Oncol. Reports*, 12: 601-608, 2004.
42. Yao, A., Harada, M., et al., New epitope peptides derived from parathyroid hormone-related protein having the capacity of inducing prostate cancer-reactive CTLs in HLA-A2⁺ prostate cancer patients. *Prostate*, 62: 233-242, 2004.
43. Noguchi, M., Harada, M., et al., Immunological evaluation of individualized peptide vaccination with a low dose of estramustine for HLA-A24⁺ HRPC patients. *Prostate*, 63: 1-12, 2005.
44. Eto, M., Harada, M., et al., Anti-tumor activity of heat-shock protein 60-recognizing CD4⁺ T cells against syngeneic murine renal cell carcinoma. *BJU Int*, 95: 421-424, 2005.
45. Harada, M., et al., Vaccination of cytotoxic T lymphocyte-derived peptides elicited and spread humoral and Th1-type immune responses to prostate-specific antigen protein in a prostate cancer patient. *J Immunother*, in press.
46. Takedatsu, H., Harada, M., et al., Immunological evaluation of vaccination of peptides derived from epithelial cancer-related antigens in two patients with hematological malignancy. *Int J Oncol*, in press.
47. Tsuboi, A., Yasukawa, M., et al., WT1 peptide-based immunotherapy for patients with lung cancer: report of two cases. *Microbiol Immunol*, 48:175-184, 2004.
48. Azuma, T., Yasukawa, M., et al., Myeloma cells are highly sensitive to granule exocytosis pathway mediated by WT1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Clin Cancer Res*,

10:7402-7412, 2004.

49.Yamamoto, K., Yasukawa, M., et al., MUNC13-4 mutations and cytotoxic function of MUNC13-4-deficient T lymphocytes in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. J Med Genet, 41:763-767, 2004.

50.Tsuji, T., Yasukawa, M., et al., Generation of human tumor-specific, HLA class I-restricted Th1 and Tc1 cells by cell engineering with tumor peptide-specific T cell receptor genes. Blood, in press.

51.Niyya, H., Yakushijin, Y., et al., Differential regulation of perforin expression in CD4+ and CD8+ cytotoxic T lymphocytes. Exp Hematol, in press.

52.Guo, Y., Yakushijin, Y., et al., Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. Blood, in press.

53.Hamaki, T., Heike, Y., et al., Reduced-intensity stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor in patients with myeloid malignancies. Bone Marrow Transplant, 2004.

54.Kami, M., Heike, Y., et al., Reduced-intensity Hematopoietic Stem Cell Transplantation (RIST) for Solid Malignancies. Jpn J Clin Oncol, 34: 707-716, 2004.

55.Kojima, R., Heike, Y., et al., Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation as an immunotherapy for metastatic colorectal cancer. Transplantation, 78: 1740-1746, 2004.