

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

本研究の成果については、DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により、新規ヒト腫瘍抗原を単離し、*in vitro* T 細胞誘導法を用いて、日本人に頻度の高い HLA-A24、-A2、A3 スーパーファミリーに結合する T 細胞エピトープを同定した。同定抗原の癌細胞悪性形質への関与を示し、免疫療法への有用性だけでなく、分子標的治療への応用の可能性を、また、各種癌種における発現と免疫原性の解析により、新たな癌種への応用の可能性を示した。免疫療法改良のための基礎的検討として、腫瘍抗原ペプチドと免疫賦活剤の腫瘍局所投与を併用した免疫プロトコルの改良、養子免疫療法に用いる T 細胞培養法の改良、免疫モニター法の改良などを行った。癌細胞の免疫回避機構として、各種癌種における HLA クラス I 発現低下の検討、癌細胞からの免疫抑制分子産生機構の解明、癌細胞の CTL 抵抗性機構の解明を行った。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療法の臨床試験を段階的に実施し、サイトカイン追加による効果も検討した。臨床試験では、重篤な副作用は認められずに、一部の症例で免疫効果と抗腫瘍効果が認められた。

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	各種遺伝子解析法を用いたヒト腫瘍抗原の同定
珠玖 洋	三重大学大学院医学系研究科 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 教授	造血器腫瘍関連抗原の同定とペプチドワクチン療法の開発
平家 勇司	国立がんセンター研究所 主任研究官	ペプチドを用いた同種移植後の抗原特異的免疫回復とそれを用いた受動免疫療法の開発
山口 博志	九州がんセンター 医師	新規腫瘍抗原候補遺伝子の消化器癌・乳がんにおける発現解析

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、

造血器腫瘍、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新規腫瘍抗原と T 細胞エピトープの同定：網羅的遺伝子解析や患者 T 細胞・抗体を用いた DNA クロ

ーニング法により腫瘍抗原を同定し、*in vitro* T細胞誘導法やHLA遺伝子導入マウスを用いた方法で抗原ペプチドを同定する。②抗腫瘍免疫応答の解明：患者検体を用いて免疫応答を解析し、抗腫瘍免疫応答を解明する。また、免疫モニター法を改良する。③免疫制御法の改良：能動免疫プロトコルの改良や養子免疫療法に使用するT細胞培養法の改良などを行う。④癌細胞の免疫回避機構の解明とその克服法の開発：癌細胞のHLA発現の検討、癌細胞からの免疫抑制分子産生機構の解明、癌細胞のCTLによる細胞傷害抵抗性機構の解明などを行う。⑤臨床試験の実施と免疫モニターによる科学的評価：腫瘍抗原ペプチドを用いた免疫療法の実施、その他の免疫療法における腫瘍抗原ペプチド免疫モニターを施行する。臨床試験では、安全性、免疫効果、抗腫瘍効果を評価し、問題点を明らかにし改良する。

2 研究方法

本年度は、DNAチップ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細胞誘導法を用いて新規T細胞エピトープを同定した。特定の癌で同定された腫瘍抗原の他種癌での発現をRT-PCR法や免疫染色法により検討し、対応癌患者末梢血リンパ球から腫瘍抗原特異的T細胞の*in vitro*誘導により免疫原性を検討し、抗原適応癌種の拡大を図った。また、同定抗原の性質を遺伝子導入法やsiRNAを用いた発現抑制法を用いて解析し、癌の悪性形質に関与する抗原が分子標的治療の標的にもなり得ることを示した。抗腫瘍免疫応答の解析には、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T細胞応答をHLAテトラマー法やELISPOT法で解析し、また、血清IgG抗体の誘導をWestern blot法やELISA法で検討した。免疫制御法の改良として、抗原ペプチドや免疫賦活剤の腫瘍局所投与併用による能動免疫プロトコルの改良や、養子免疫療法に使用するT細胞培養法の改良を行い、免疫モニター法の改良として、副刺激分子遺伝子導入刺激細胞を用いたELISPOT感度増強を確立した。癌細胞の免疫回避機構の解明とその克服に向けては、新規作製抗HLAクラス1モノクローナル抗体を用いた各種癌種におけるHLA発現を免疫染色法で検討し、癌細胞由来の免疫抑制性可溶性分子の産生機構をsiRNA法を用いて解析し、また、癌細胞のCTLによる細胞傷害抵抗性に関わる分子の同定をDNAチップを用いて進めた。各種同定腫瘍抗原のT細胞エピトープを用いて、段階的に臨床試験を実施し、IFNやGM-CSFなどのサイトカイン併用の効果も検討した。

3 研究成果

1. 新規腫瘍抗原の同定と解析

1) 網羅的遺伝子解析により同定した腫瘍抗原の性質の

解析

網羅的遺伝子解析技術のうちDNA chip法を用いて、多種の新規腫瘍抗原候補を同定しているが、本年度は、ヒト悪性黒色腫細胞株で高発現する分子FABP7の詳細な解析を行った。RT-PCRでは、悪性黒色腫以外に、脳と脳腫瘍で発現が検出されたが、その他の正常組織や癌細胞では発現が見られず、免疫染色により、悪性黒色腫組織で高率に発現が認められた。siRNAオリゴヌクレオチドを用いた機能阻害実験では、細胞増殖の抑制およびMatrigel浸潤能の低下が認められ、悪性黒色腫の悪性形質に関与することが示された。また、組換え細菌蛋白と組換えファージ蛋白を認識する血清IgG抗体は悪性黒色腫患者では高率に検出されたが、健康人30例とグリオーマ11例では検出されなかった。従って、FABP7は、抗原消失が起こりにくい腫瘍抗原として免疫療法や分子標的治療の標的になり得ること、また、診断に応用できる可能性があることが示された。

2) 前立腺癌抗原の他の癌種への応用可能性の検討

前立腺関連抗原 PAP は、免疫組織染色により、大腸癌、胃癌、乳癌で蛋白発現が認められたが、腎癌では発現していなかった。HLA-A24 陽性大腸癌と胃癌患者の末梢血リンパ球より PAP ペプチド特異的 CTL を誘導することができ、癌細胞を特異的に傷害した。前立腺関連抗原 PTH-rP (parathyroid hormone - related protein) も、胃癌、乳癌、肺癌、大腸癌、子宮頸癌、腎癌、脳腫瘍細胞株における蛋白発現が認められ、HLA-A24 陽性の胃癌、大腸癌、子宮頸癌および腎癌患者の末梢血リンパ球を、2種の PTH-rP ペプチドで刺激することにより、PTH-rP ペプチド特異的かつ癌細胞反応性 CTL を誘導することができた。したがって、PAP と PTH-rP は、前立腺癌以外の腺癌に対する免疫療法の標的抗原に成り得ることが示された。

2. T細胞認識エピトープペプチドの同定

1) HLA-A3 スーパーファミリー (A11, A31, A33) 拘束性の前立腺抗原ペプチドの同定

本年度は、日本人の約4割が発現している HLA-A3 スーパーアレル (HLA-A11, HLA-A31, HLA-A33) に提示され、前立腺癌反応性 CTL を誘導できる前立腺関連抗原 (PSA, PAP, PSMA) 由来ペプチドのさらなる同定を試み、前立腺癌患者の血漿中 IgG 抗体に認識されやすい12種類について、前立腺癌患者の末梢血リンパ球からの *in vitro* ペプチド特異的 CTL 誘導能を検討した結果、新規ペプチドを同定した。これらの抗原ペプチドは、単一 HLA に限定されず、A3 スーパーファミリー共通に応用できることを示した。

2) 癌精巣抗原の各種癌における発現解析と T 細胞エピ

トープの同定

RT-PCR 法にて LAGE-1, NY-ESO-1, SCP-1, SSX-1, SSX-2, SSX-4 の計 6 種類の癌精巢抗原の発現を食道癌 46 例、胃癌 102 例、大腸癌 98 例、乳癌検討 129 例の組織を用いて検討した結果、腫瘍組織においてある程度の発現があり、免疫原性が高いと思われる標的抗原として、NY-ESO-1 を選び、新規 HLA-A24 拘束性 T 細胞エピトープの同定を試みた。インターネット上で使用できる HLA-A24 結合ペプチド予測プログラムを用いて、9 種類のペプチドを選定し合成した。次にペプチド結合能を FACS を用いた結合安定性試験にて検討し、HLA-A24 に比較的親和性が高いと考えられるペプチド 2 種類を同定した。そのうちのひとつで末梢血リンパ球を刺激することにより、ペプチド特異的かつ HLA-A24 陽性 NY-ESO-1 陽性の胃がん、大腸がん、メラノーマ細胞株を細胞傷害する T 細胞が誘導できた。このペプチドは新規 HLA-A24 結合性 NY-ESO-1 ペプチドであり、今後、各種癌に対する免疫療法に応用可能である。

3. 免疫療法・免疫モニター法の改良

すでに開発した PHA 刺激 CD4⁺T 細胞を刺激細胞として用いる免疫モニター法をさらに改良するために、電気穿孔法を用いて CD80 および CD86 の RNA を導入した PHA 刺激 CD4⁺T 細胞を作成し、刺激細胞にすることにより、免疫モニター感度の高い ELISPOT アッセイを開発した。

4. 癌細胞の免疫回避機構の解明と克服法の開発

1) 癌細胞 HLA 発現解析のための新規モノクローナル抗体の作製および各種癌組織 HLA 発現の検討

ホルマリン固定病理パラフィン切片で腫瘍組織の HLA クラス I を検出できる単クローン抗体 2 種を作製した。この抗体染色により、臨床効果がみられた肺癌と大腸癌では約 70-80% で HLA 発現が認められたが、臨床効果の低い乳癌や前立腺癌では約 80% で発現の低下消失が認められた。その他の腫瘍では、肉腫 40%、口腔癌 40%、胃癌 50%、膀胱癌 60% の陽性率であった。腫瘍再発率など予後を検討したところ、HLA クラス I の発現低下は予後不良因子であることが判明し、HLA 発現の消失が癌細胞の免疫回避機構として重要なことが示された。その機序として、乳癌では、 $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2M$) の発現低下の場合が多く、また、エピジェネティックな変化によることもあった。乳癌細胞株をヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害剤で処理すると、HLA クラス I 発現上昇を認め、HDAC 阻害剤による免疫回避機構の克服の可能性が示唆された。

2) 癌細胞活性化 MAPK シグナルによる免疫回避

悪性黒色腫においては、高頻度に共通 BRAF^{V600E} 変異あるいは、BRAF 高発現が認められ、MAPK シグナルの恒常的亢

進を起し、悪性黒色腫の増殖、浸潤亢進という悪性形質に関与している。悪性形質の一つとして、免疫抑制能があるが、悪性黒色腫培養上清中には、免疫抑制性因子 IL-10, VEGF, IL-6 が検出され、樹状細胞の成熟化を抑制する。MEK 阻害剤または BRAF^{V600E} RNAi による MAPK 経路阻害を行ったところ、これら免疫抑制性因子の産生が抑制され、樹状細胞成熟化抑制作用が減弱した。従って、各種癌種で亢進している MAPK 経路を、阻害剤や siRNA で抑制することにより、免疫回避機構の一部を克服できる可能性が示された。

3) CTL による細胞傷害抵抗性機序の解明

アロ抗原特異的 CTL と HLA-A24 拘束性 WT1 特異的 CTL クローンを、それぞれ B-LCL 株および HLA-A24 陽性白血病細胞株と繰り返し混合培養し、CTL による細胞傷害に抵抗性を示す細胞株の樹立を試み、親細胞株と比べて CTL 細胞傷害に抵抗性を示す細胞株が樹立された。これらの標的細胞は、拘束 HLA や WT1 抗原の発現量に低下は認められず、HLA や腫瘍抗原以外に、CTL 感受性を規定する因子の存在が示された。さらに、この因子を同定するために、マイクロアレイを用いて遺伝子発現量の差を網羅的に解析したところ、いくつかの遺伝子に発現量の差が認められ、細胞傷害抵抗性に関与する分子群が同定された。

5. 免疫制御法の改良

1) ペプチド能動免疫法の改良

ペプチドを用いた免疫療法の改良のために、マウス SART3 ペプチドと colon26 大腸癌 BALB/c モデルを用いて、腫瘍抗原ペプチドと免疫賦活剤 OK-432 の腫瘍局所投与の併用効果を検討した。SART3 ペプチドを全身免疫後に、SART3 ペプチドと OK-432 を腫瘍局所に投与した場合に最も強い抗腫瘍効果が認められた。その際、腫瘍への T 細胞浸潤が強く認められ、脾と局所リンパ節から SART3 ペプチド特異的 CTL が、また、血中に抗 SART3 ペプチド IgG 抗体が誘導された。したがって、腫瘍抗原ペプチドおよび OK432 の腫瘍局所投与併用による抗腫瘍効果の増強が確認された。

2) 養子免疫療法に用いる T 細胞の培養法の検討

抗 CD3/抗 CD28 抗体ビーズと CMV 溶解物を用いて、養子免疫療法に使用する CD4⁺T 細胞の培養方法を検討し、効率よく CMV 感染 PHA 芽球を傷害する CD4⁺T 細胞の培養法を確立した。

6. 臨床試験の実施と免疫モニターによる科学的評価

1) Survivin ペプチド免疫の臨床試験

大腸癌患者を中心に、①Survivin 2B ペプチド単体、②Survivin 2B ペプチド+IFA、③Survivin 2B ペプチド+IFA+IFN α 、④Survivin 2B ペプチド+IFA+GM-CSF という臨床試験を施行した。いずれのグループにも重篤な副作用は認めず、臨床効果 (SD あるいは PR および腫瘍マーカーの 30%以上の低下) は、①で 5/15 例、②で 1/5 例、③で 3/3 例、④で 1/2 例、認められた。CTL モニタリングでは、①の 2/15 例で、③では 3 例とも CTL 頻度の上昇を認めた。したがって、IFA、IFN α 、GM-CSF の併用により、免疫誘導効果と抗腫瘍効果が増強する可能性があるが、今後、症例を増やして検討する必要がある。

2) WT1 と hTERT ペプチド免疫の臨床試験

WT1 ペプチドを 9 名、hTERT ペプチドを 9 名に免疫したところ、grade2 以上の有害事象は認められず、一部の症例で臨床効果が認められた。WT1 ペプチド免疫を受けた輸血依存性 MDS 患者は、免疫開始後約 2 年間、輸血非依存性で経過している。また、化学療法抵抗性の難治性 AML 患者は、1 年以上白血病の再発を認めず経過している。他方、hTERT ペプチド免疫を受けた腎がん肺転移患者は、投与 2 年間、腫瘍径の増大を認めず経過していたが、その後大腿部に再発を認めた。再発転移組織の HLA 発現を免疫組織学的に検討したところ、HLA 発現低下～消失が認められ、HLA 消失による免疫回避が示唆された。これらの臨床試験で臨床効果を認めた症例では、末梢血中ペプチド特異的 CTL の増強が、ELISPOT と HLA テトラマー法によって確認された。CTL 頻度は、ペプチド免疫毎に増強し、中断によって減少した。

3) 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

CHP-HER2 単独免疫の 9 例、および GM-CSF あるいは OK-432 を併用した試験の 5 例で、HER2 に対する免疫誘導効果を、ELISA を用いた HER2 特異的抗体反応と、新たに開発した抗原 mRNA 導入リンパ球を刺激細胞とする ELISPOT 法と従来のペプチドを標的とする方法で検討した。CHP-HER2 単独免疫 9 例中 5 例において HER2-mRNA 導入細胞に対する反応が検出された。3 例では CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞ともに検出され、この蛋白ワクチンが MHC クラス I およびクラス II 経路を介してペプチドとして提示されることが示唆された。CD8⁺T 細胞検出 4 例中 2 例で、HLA-A24 拘束性 HER2p63 特異的 CD8⁺T 細胞が検出され、N 末端 146 アミノ酸蛋白内に、MHC クラス I とクラス II 結合ペプチドが複数存在することが示唆された。9 例全例に抗 HER2 抗体が検出され、CHP-HER2 投与 3 回から 6 回で抗体産生がみられ、4 回から 8 回でプラトーに達した。一方、GM-CSF あるいは OK-432 を併用した試験では、1 回投与後に抗体産生がみられ、4 回から 5 回でプラトーに達した。したがって、アジュバントやサイトカイン併用は免疫誘導効果を増強させることが示唆された。

4 倫理面への配慮

倫理面への配慮については、本研究に関しては、臨床試験を含めて、すでに各研究施設における倫理委員会の承認を得て実施した。本研究における臨床検体 (健常人と患者末梢血、癌細胞組織) の提供および臨床試験への参加に関しては、提供・実施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行われた。その際、本研究の目的、方法、試料提供者・臨床試験参加者の利益および不利益、個人情報保護、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文書で説明した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Matsuzaki, Y., Kawakami, Y., et al., Systematic identification of human melanoma antigens using serial analysis of gene expression (SAGE). *J. Immunother.* 28(1):10-19, 2005.
2. 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 Therapy.* 12(1): 95-100, 2005.
3. 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(2):283-290, 2005.
4. 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 Genet Cytogenet,* 157(1):1-11, 2005.
5. Satoh, T., Kawakami, Y., et al., Lack of circulating autoantibodies to bone morphogenetic protein receptor-II or activin receptor-like kinase 1 in mixed connective tissue disease patients with pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology.* 44(2):192-196, 2005.
6. Kawakami, Y., et al., Immunological detection of altered signaling molecules involved in melanoma development. *Cancer Metastasis and Rev,* 24(2):357-366, 2005.
7. Iwata, T., Kawakami, Y., et al., Frequent immune responses to a cancer/testis antigen, CAGE, in patients with microsatellite instability positive endometrial cancer. *Clinical Cancer Res.* 11(10):3949-3957, 2005.
8. 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*, 116(6):925-33,2005.
9. Ohnishi, M., Kawakami, Y. et al., Evaluation of Cytomegalovirus-specific T cell reconstitution in patients after various allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using interferon- γ -enzyme-linked immunospot and HLA tetramer assays with an immunodominant T cell epitope. *Br J Haematol*, 131(4):472-479,2005.
 10. Sumimoto, H., Kawakami, Y. et al., Effective inhibition of cell growth and invasion of melanoma by combined suppression of BRAF (V599E) and Skp2 with lentiviral RNAi. *Int J Cancer*, 118(2):472-476 2006.
 11. Yoshiura, K., Kawakami, Y. et al., Carbonic anhydrase- II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy. *Clin Cancer Res* 15;11(22):8201-7,2005.
 12. Sumimoto, H., Use of RNA interference technology for cancer specific gene silencing *Ann. Cancer Res. Therap.* 13, 1&2, 23-25,2005.
 13. Matsushita, M., Kawakami, Y. et al., Possible involvement of allogeneic antigens recognized by donor-derived CD4⁺ cytotoxic T cells in selective GVL effects after stem cell transplantation of patients with haematological malignancy. *Br J Haematol*, 132(1):56-65,2006.
 14. Iizuka, Y., Kawakami, Y. et al., Identification of a antigen, GARC-1, using cytotoxic T lymphocytes induced by HSV cancer vaccine. *Int J Cancer*, 15;118(4):942-9,2006.
 15. Okada, T., Kawakami, Y. et al., A novel cancer testis antigen frequently expressed in pancreatic, lung and endometrial cancers. *Clin Cancer Res*, 1;12(1):191-7,2006.
 16. Goto, Y., Kawakami, Y., et al., A new melanoma antigen FABP7 involved in proliferation and invasion is a potential target for immunotherapy and molecular target therapy, *Cancer Res*, in press
 17. Ohtani, S., Kawakami, Y. et al., Frequent immune response to a melanocyte-specific protein KU-MEL-1 in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease, *Br J Ophthalmol*, in press
 18. Miyahara, Y., Naota, H., et al., Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11:5581-5589, 2005.
 19. Nishikawa, H., Kato, T., et al. IFN- γ controls the generation/activation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 175:4433-4440, 2005.
 20. Hoshino, N., Katayama, N., et al., A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes. *J Leukoc Biol* 78:921-929, 2005.
 21. Nishikawa, H., Kato, T., et al., Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in wild-type hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9253-9257, 2005.
 22. Nakase, K., Tsuji, K., et al., Elevated levels of soluble interleukin-2 receptor in serum of patients with hematological or non-hematological malignancies. *Cancer Detect Prev*, 29:256-259, 2005.
 23. Asanuma, H., Sato, N. et al., Survivin expression is regulated by coexpression of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Epidermal Growth Factor Receptor via Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.*, 65: 11018-11025, 2005.
 24. Yamamoto, M., Sato, N. et al., A novel isoform of TUCAN is overexpressed in human cancer tissues and suppresses both caspase-8- and caspase-9-mediated apoptosis. *Cancer Res.*, 65: 8706-8714, 2005.
 25. Yagihashi, A., Sato, N. et al., Autoantibodies to survivin in patients with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma, *Autoimmunity*, 38: 445-448, 2005.
 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. Yagihashi, A., Sato, N. et al., Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer. *Clin. Chim. Acta.*, 362: 125-130, 2005.
 28. Kawaguchi, S., Sato, N. et al., A quest for therapeutic antigens in bone and soft tissue sarcoma. *J. Translational Medicine*, 3: 31-38, 2005.
 29. Hariu, H., Sato, N. et al., Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1000-1009, 2005.
 30. 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.
 31. 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.
32. Yagihashi, A., Sato, N., et al., Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer*, 48: 217-221, 2005.
33. Tsuruma, T., Sato, N., et al., Peptide-based vaccination for colorectal cancer. *Expert Opin Biol. Ther.*, 5: 799-807, 2005.
34. Tsukahara, T., Sato, N., et al., HLA-restricted specific tumor cytotoxicity by autologous T-lymphocytes infiltrating metastatic bone malignant fibrous histiocytoma of lymph node. *J. Orthop. Res.*, 24: 94-101, 2006.
35. Hatakeyama, N., Sato, N., et al., Induction of Autologous CD4- and CD8-mediated T-cell Responses against Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) Cell Line using Apoptotic Tumor Cell-loaded Dendritic Cells. *Exp. Hematol.* 34, 2006. in press
36. Kitamura, H., Sato, N., et al., Expression and antigenicity of survivin, an inhibitor of apoptosis family member, in bladder cancer: implications for specific immunotherapy. *J. Urol.*, in press
37. 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.
38. 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.
39. 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.*, 28: 368-375, 2005.
40. 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.*, 26: 1605-1612, 2005.
41. Shichijo, S., Harada, M., et al., ABCE1, a member of ATP-binding cassette transporter gene, encodes peptides capable inducing HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes in colon cancer patients. *Oncol. Reports*, 13: 907-914, 2005.
42. Shichijo, S., Harada, M., et al., A unique gene having homology with the kinesin family member 18A encodes a tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2⁺ colon cancer patients. *Eur. J. Cancer*, 41: 1323-1330, 2005.
43. Wang, Y., Harada, M., et al., Prostatic acid phosphatase as a target molecule in specific immunotherapy for patients with nonprostate adenocarcinoma. *J. Immunother.*, 28: 535-541, 2005.
44. Matsueda, S., Harada, M., et al., Identification of peptide vaccine candidates for prostate cancer patients with HLA-A3 supertype alleles. *Clinical Cancer Res.*, 11: 6933-6943, 2005.
45. Arima, Y., Harada, M., et al., Parathyroid hormone-related proteins as a common target molecule in specific immunotherapy for a wide variety of tumor types. *Int. J. Oncol.*, 27: 981-988, 2005.
46. Hara, M., Harada, M., et al., Identification of human papillomavirus 16 E6 protein-derived peptides with the potential to generate cytotoxic T-lymphocytes toward HLA-A24⁺ cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 27: 1371-1380, 2005.
47. Wang, Y., Harada, M., et al., Prostate-specific antigen-reactive cytotoxic T lymphocyte precursors in colon cancer patients. *Oncol. Reports*, 15: 317-321, 2006.
48. Ono, T., Harada, M., et al., Anti-tumor effect of systemic and local immunization with a cytotoxic T lymphocyte-directed peptide in combination with a local injection of OK-432. *Clinical Cancer Res.*, 12: 1325-1332, 2006.
49. 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* 106:47-476, 2005.
50. Guo, Y., Yasukawa, M., et al., Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4⁺ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner. *Blood* 106:1415-1418, 2005.
51. Ishikawa, F., Yasukawa, M., et al., Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chainnull mice. *Blood* 106:1565-1573, 2005.
52. Niiya, H., Yasukawa, M., et al., Differential regulation of perforin expression in CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Hematol.* 33:811-818, 2005.
53. Kawano, N., Yasukawa, M., et al., Efficient engraftment of

- primary adult T-cell leukemia cells in newborn NOD/SCID/ β 2-microglobulin^{null} mice. *Leukemia* 19:1384-1390,2005.
54. Niiya, H., Yasukawa, M., et al., Human herpesvirus 6 impairs differentiation of monocytes to dendritic cells. *Exp. Hematol.* in press.
55. Harada, Y., Heike, Y., et al., Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated Va24⁺ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. *Journal of Immunotherapy*, 28:314-321, 2005.
56. Hosokawa, M., Heike, Y., et al., Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by SART-1 Gene Transduction. *AntiCancer Res*, 25:1983-1990, 2005.
57. Ikarashi, Y., Heike, Y., et al., Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells in mice primed with alpha-galactosylceramide. *Immunology*, 116:30-37, 2005.
58. Ikarashi, Y., Heike, Y., et al., Cytokine production and migration of in vitro-expanded NK1.1(-) invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells using alpha-galactosylceramide and IL-2. *Immunol Lett.*, 101: 160-167, 2005.
59. Morita, Y., Heike, Y., et al., Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A(*):02 or HLA-A(*):24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 36:803-811, 2005.
60. Imataki, O., Heike, Y., et al., Efficient ex vivo expansion of V α 24⁺ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. *Journal of Immunotherapy*, in press, 2006.
61. Morita, Y., Heike, Y., et al., Monitoring of WT1-Specific Cytotoxic T Lymphocyte after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *International Journal of Cancer*, in press, 2006.