慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて
Sub Title	
Author	戸田, 正博(Toda, Masahiro)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.167- 179
JaLC DOI	
Abstract	中枢神経系は、外敵から身を守り,組織修復に重要な免疫系から隔離された特殊な環境にある.なぜ,二つの重要なシステムが分離されたのかは未だに不明であるが,進化の過程で,高等生物の中枢神経系の秩序を守るために,必然的に生じた結果なのかもしれない.しかし,ひとたび何らかの異常が発生したときには,この特殊な環境がマイナスに働いているのではないかという仮説を立て,免疫系を利用した疾患治療の研究を進めてきた.現在,3つのテーマを重点的に進めることにより,新しい治療技術,治療薬の実用化を目指している. 第一は,中枢神経再生を目指した免疫治療アプローチである.免疫制御に最も重要である樹状細胞を損傷部に移植する治療法を考案し,成熟哺乳類の脊髄において,本治療法により神経細胞が新生しうることを証明した.現在、臨床応用を目指して,サルモデルでの実験を進めている.第二は,単純ヘルペスウイルス(HSV)を用いた癌ワクチン療法である.腫瘍内にHSVを投与すると,樹状細胞を活性化して,癌ワクチンとして働くことが明らかになった.脳腫瘍をはじめとする様々なマウス腫瘤モデルにおいて本治療法の有効性を証明し,現在,臨床応用へ向けたウイルス作製の準備を進めている.第三は,疾患特異的な抗原分子を用いた免疫治療アプローチである.これまでに,脳腫鰯特異的な抗原遺伝子を同定し,抗原ペプチドを用いた免疫療法の臨床応用を検討している. 我々は,臨床医学へ応用される研究を推進させるために,バイオベンチャー企業(株式会社GBS研究所)を設立して,研究成果の実用化という明確な方向性のもと,目標の達成を目指している.本稿では,現在進めている3つのテーマの基盤的な研究内容を紹介し,さらに大学発ベンチャーとの産学速携研究体制について概説する.
Notes	綜説
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051200-0067

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(4)：167～179，2005

綜　　説

難治性神経疾患に対する治療法の開発と実用化へ向けて

慶應義塾大学医学部　外科学教室
戸田正博（とだまさひろ）

中枢神経系は，外敵から身を守り，組織修復に重要な免疫系から隔離された特殊な環境にある．なぜ，二つの重要なシステムが分離されたのかは未だに不明であるが，進化の過程で，高等生物の中枢神経系の秩序を守るために，必然的に生じた結果なのかもしれない．しかし，ひとたび何らかの異常が発生したときには，この特殊な環境がマイナスに働いているのではないかという仮説を立て，免疫系を利用した疾患治療の研究を進めてきた．現在，3つのテーマを重点的に進めることにより，新しい治療技術，治療薬の実用化を目指している．

第一は，中枢神経再生を目指した免疫治療アプローチである．免疫制御に最も重要である樹状細胞を損傷部に移植する治療法を考案し，成熟哺乳類の脊髄において，本治療法により神経細胞が新生しうることを証明した．現在，臨床応用を目指して，サルモデルでの実験を進めている．第二は，単純ヘルペスウイルス（HSV）を用いた癌ワクチン療法である．腫瘍内にHSVを投与すると，樹状細胞を活性化して，癌ワクチンとして働くことが明らかになった．脳腫瘍をはじめとする様々なマウス腫瘍モデルにおいて本治療法の有効性を証明し，現在，臨床応用へ向けたウイルス作製の準備を進めている．第三は，疾患特異的な抗原分子を用いた免疫治療アプローチである．これまでに，脳腫瘍特異的な抗原遺伝子を同定し，抗原ペプチドを用いた免疫療法の臨床応用を検討している．

我々は，臨床医学へ応用される研究を推進させるために，バイオベンチャー企業（株式会社GBS研究所）を設立して，研究成果の実用化という明確な方向性のもと，目標の達成を目指している．本稿では，現在進めている3つのテーマの基盤的な研究内容を紹介し，さらに大学発ベンチャーとの産学連携研究体制について概説する．

Key Words：regeneration, DC, cancer vaccine, HSV, antigen

1．中枢神経損傷に対する免疫療法

成熟中枢神経系において，自己複製能及び多分化能を有する神経幹細胞の存在が明らかにされたことから，内在性の神経幹細胞を分化誘導させて中枢神経を再生させる治療法に期待が寄せられている[1]．実際に，胎児神経組織や神経幹細胞の移植実験の結果から，適切な環境下においては，中枢神経系も再生しうる可能性が示されている．我々は，損傷後の中枢神経再生が困難である原因の一つが，組織修復に重要な免疫系から隔絶された環境特異性にあるという仮説のもと，内在性神経幹細胞を分化誘導させるため，神経損傷時に免疫系を導入する新しい治療アプローチを進めている．

1）正常中枢神経系の免疫学的環境

中枢神経系は免疫学的に寛容な組織であり，その理由として，①BBB（Blood Brain Barrier；血液脳関門）が血中の免疫細胞の流入を妨げていること，②リンパ球がほとんど存在しないこと，③MHC（Major Histocompatibility Complex；主要組織適合遺伝子複合体）クラスI，クラスII分子の発現が乏しく，抗原提示細胞が充分働いていないこと，④免疫細胞を不活性化するサイトカインが産生されていること，などが挙げられている．すなわち，中枢神経系は正常な状態では，免疫細胞の流入及び内在性の免疫系細胞の活動が極端に制限されている．以下，BBBおよび中枢神経系の抗原提示細胞に関して概説する．

a）血液脳関門（BBB）

中枢神経系の毛細管は内皮細胞が非常に密に配列することにより tight junction を形成し，これらが BBB の基本構造として抗体や細胞の侵入を防いでいる．また，中枢神経系以外ではこのような特殊な構造を形成しないことから，アストロサイトが BBB の形成に重要であると考えられている．BBB の維持には様々な因子が関与しているが，中枢神経系で恒常的に産生されている transforming growth factor-β (TGF-β) が，内皮細胞の接着因子の発現を抑制することにより，リンパ球の脳内流入を抑制し，免疫寛容状態の維持に関与しているという報告がある[2]．

一方，正常神経系に活性化 T 細胞が存在していたという報告から[3]，T 細胞は中枢神経系に侵入しうることが明らかになった．しかし，ナイーブ T 細胞や休止期 T 細胞は BBB を通過できず，活性化して芽球化した T 細胞のみ中枢神経系に侵入しうると考えられている（第1図）．また，脳内では，T 細胞は Fas/FasL によりアポトーシスが誘起されるという報告[4]や，ガングリオシドが T 細胞を不活性化するという報告[5]があり，中枢神経系には T 細胞を不活化する機構が存在する．

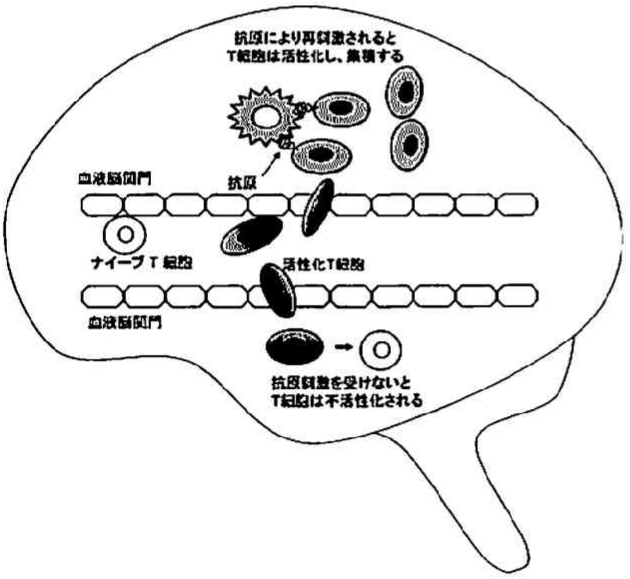

図1：中枢神経系における T 細胞による免疫反応
ナイーブ T 細胞は脳内へ入ることができないが，活性化 T 細胞は血液脳関門（BBB）を通過して脳内に侵入しうる．しかし，脳内において抗原刺激を受けない場合，T 細胞は不活性化される．一方，脳内で再度抗原刺激を受けることにより，局所で増殖，集積して免疫反応が惹起される．

b）抗原提示細胞

中枢神経系の抗原提示細胞として，アストロサイト，マイクログリア，および血管周囲マクロファージなどが候補として挙げられている[6]．アストロサイトやマイクログリアは MHC class II を発現し，食作用や *in vitro* での抗原提示能力を有することが報告されているが，*in vivo* における抗原提示細胞としての機能については明らかでない．血管周囲マクロファージは抗原提示細胞としての機能を有し，かつその解剖学的位置関係から，脳内の抗原提示細胞として最も有力な候補の一つである．また，脳内血管の内皮細胞が細胞内で蛋白を処理して，T 細胞に抗原提示することが示唆されている[7]．内皮細胞は *in vitro* および *in vivo* で MHC class II を発現しうる細胞であり，共刺激因子や接着分子の発現も認められる．血中の T 細胞と脳内の抗原提示細胞との間に介在する血管内皮細胞特有の解剖学的位置関係から，神経系と免疫系との接点としての重要な役割を担っているかもしれない．

2）損傷中枢神経系における免疫学的環境

中枢神経系には損傷された神経軸索の伸展を阻害する蛋白が存在し，神経前駆細胞の分化を阻害する抑制的環境が形成されている[8, 9]．したがって，中枢神経系の修復には，軸索伸展阻害因子を含めた損傷組織の速やかな排除が重要である．しかし，中枢神経系においては，損傷後早期のマイクログリアの貪食能は乏しく，また末梢神経損傷と比較して，貪食能を有するマクロファージの浸潤も限られている[10]．さらに，マクロファージの貪食能は末梢神経断端と共培養した場合に増強されるが，脊髄断端と共培養した場合は減弱するという報告[11]があり，中枢神経系に浸潤したマクロファージは，他の組織中に存在するマクロファージと性格が異なることが示唆されている．また，末梢神経損傷周囲には，中枢神経である視神経損傷と比較して，多くの T 細胞が集積していたという報告がある[12]．以上の様に，中枢神経系は，正常時のみならず損傷時においても組織修復につながる免疫反応が起きにくい組織である．

3）樹状細胞移植による中枢神経再生

樹状細胞（dendritic cells, DC）は，抗原提示細胞として近年注目されている細胞であり，マクロファージや B 細胞などの他の抗原提示細胞と比較して，MHC や共刺激分子（co-stimulatory molecules）を高く発現し，ナイーブ T 細胞を活性化しうる唯一の細胞である[13]．形態学的に樹枝状の突起を持つことが特徴であるが，中

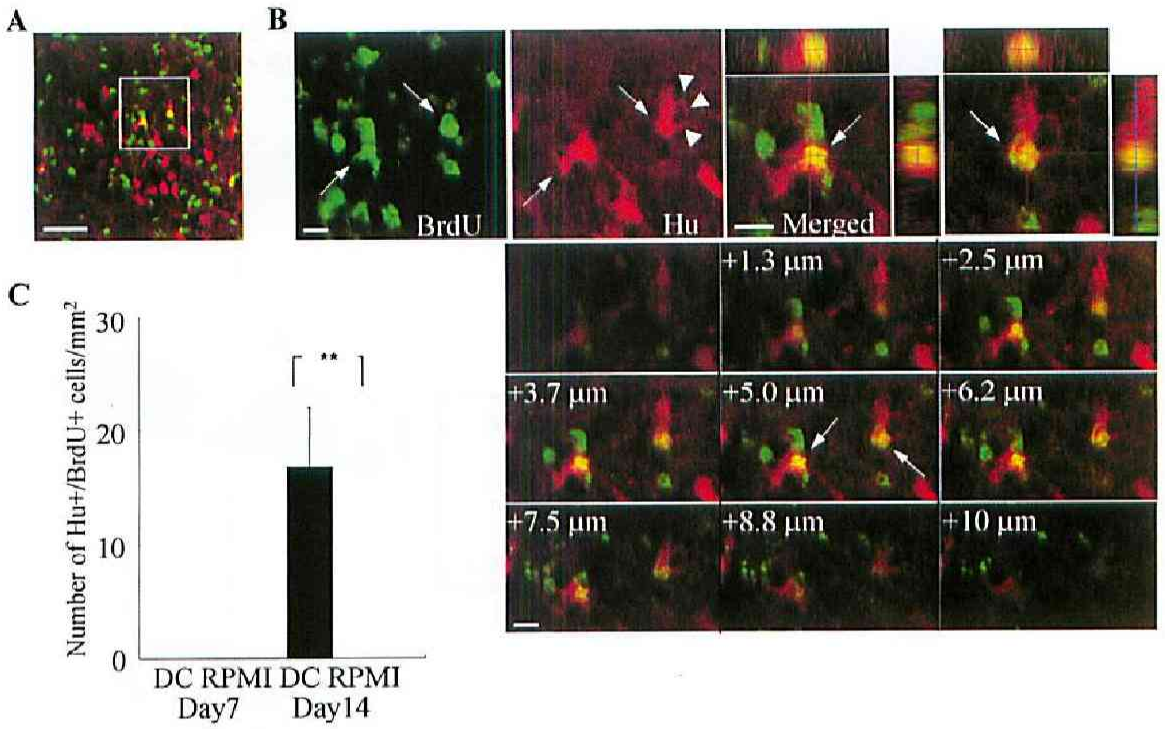

図2：樹状細胞移植による神経新生

A：樹状細胞移植後14日目の脊髄損傷部近傍のHu抗体（赤）およびBrdU抗体（緑）染色像．

B：図A中に示された範囲のConfocal画像．矢印はHu抗体，BrdU抗体二重陽性の新生ニューロンを示す．矢頭は神経突起を示す．

C：樹状細胞（DC）移植後7日，14日目の脊髄損傷部近傍のHu，BrdU二重陽性細胞数．DC移植後14日目に，Hu，BrdU二重陽性の新生ニューロンを認めたが，コントロール（RPMI）では，Hu，BrdU二重陽性細胞を認めない．（Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M：Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. J Neurosci Res 76：453-465, 2004の図を，許可を得て改編，転載）

枢神経系以外の生体内に広く分布し，それぞれの組織・器官に存在する樹状細胞は，表現型のみならず機能的にも多様な細胞集団である．我々は，中枢神経系に存在しない樹状細胞を損傷部位へ移植して，中枢神経系の特殊な環境を変えることによる損傷組織の修復を試みた．

マウス脊髄損傷モデルを作製し，同種の脾臓由来樹状細胞を損傷部位に移植したところ，損傷部位周辺の活性化マイクログリア・マクロファージの細胞数が増加して，損傷神経軸索の再生が観察された[14]．我々は，軸索再生のメカニズムの一つとして，樹状細胞自身が軸索再生効果の高い神経栄養因子であるNT-3（neurotrophin-3）を分泌することを明らかにした．また，活性化マイクログリアは様々な神経栄養因子を分泌する細胞であり，軸索伸展の阻害因子を貪食する活性も有する[15]．さらに，nestin enhancer制御下にEGFP（enhanced green fluorescent protein）を発現するトランスジェニックマウスを用いて内在性神経幹細胞の反応を解析したところ，興味深い結果を得ている．樹状細胞移植により，脊髄損傷部周辺の内在性神経幹細胞が活性化され，新しい神経細胞が分化誘導された（第2図）．したがって，これまで神経新生が起きないと考えられていた成熟哺乳類脊髄において，新たな神経細胞が分化誘導されうることが明らかになった．また，樹状細胞移植後の運動機能を様々な評価法[16]により解析したところ，2系統（Balb/cおよびC57BL/6）のマウスにおいて有意な運動機能の回復がみられた．樹状細胞は患者自身の末梢血から調整可能であり，その分離・培養法は確立され，すでに癌免疫療法へ臨床応用されている．今後，神経再生へ向けた

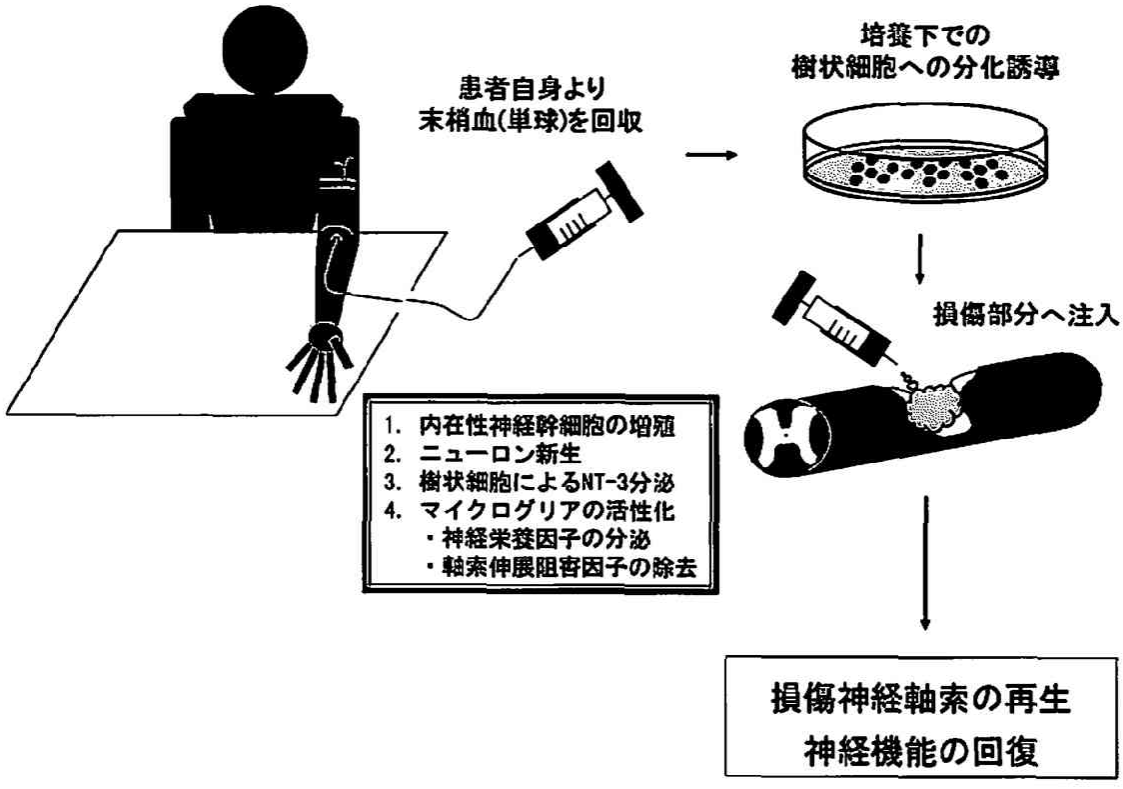

図3：自己樹状細胞移植による神経損傷治療
神経損傷患者の末梢血から単球を分離し，培養下で樹状細胞へ分化誘導する．得られた自己樹状細胞を損傷部位へ移植する神経損傷治療法を考案した．樹状細胞を移植することにより，内在性神経幹細胞を活性化して，ニューロン新生を誘導する．さらに，樹状細胞自身によるNT-3の分泌やマイクログリア活性化による神経栄養因子の分泌，軸索伸展阻害因子の除去が期待される．

免疫療法（第3図）が新しい治療法として確立されるために，樹状細胞の調整法や治療時期の検討が重要である．また，安全性の確認は最も重要な課題であり，現在，サル脊髄損傷モデルを用いて，樹状細胞治療の安全性および有効性の解析を行っている．

次に，胎仔脊髄より培養したニューロスフェアと様々な細胞との共培養を行ない，*in vitro* における神経幹細胞の増殖活性を調べた．その結果，*in vitro* において既知の神経幹細胞増殖因子や他の免疫系細胞と比較して，樹状細胞は神経幹細胞を著明に増殖させた．さらに，樹状細胞は胎仔脳の線状体由来のニューロスフェアに対しても，同様な活性を示したことから，多様な神経幹細胞に対して増殖活性を有することが明らかとなった（未発表データ）．現在，サブタイプの異なる樹状細胞による神経幹細胞増殖活性の違いを解析しており，移植治療への応用のみならず，*in vitro* で神経幹細胞を増殖させる支持細胞として，樹状細胞の有用性の検討を行っている．

4）サイトカインを用いた神経損傷治療

樹状細胞移植により神経再生効果が認められたことから，我々は，末梢血中の単球から樹状細胞への分化誘導に必須のサイトカイン，GM-CSF[17), 18)]を用いた神経再生治療について検討を行っている．マウス脊髄損傷モデルにおいて，GM-CSFを損傷部位へ投与したところ，損傷部位周囲に樹状細胞，活性化マイクログリア・マクロファージの集積が観察され，神経機能が改善された（論文準備中）．また，中大脳動脈閉塞によるラット脳梗塞モデルにおいて，頸動脈からGM-CSFを投与することにより，脳梗塞巣の縮小と神経機能の改善が認められた（論文投稿中）．脳梗塞周囲には，活性化マイクログリア・マクロファージの集積が観察され，同部位の細胞死が抑制された．今後，治療効果の詳細な機序の解明が必要であるが，GM-CSFは薬剤としてヒトへの投与が可能であり，新しい神経損傷治療薬として臨床応用を目指して準備を進めている．

2．ヘルペスウイルスを用いた癌ワクチン療法

脳腫瘍に対する遺伝子治療のひとつとして，組換え単純ヘルペスウイルスⅠ型（herpes simplex virus type 1；HSV-1）ベクターの臨床応用が進められている．組み換えHSVベクターは，HSVゲノム全長を有し，ウイルス遺伝子に変異が加えられたり，目的の挿入遺伝子によって置換されたウイルスベクターである．とくに腫瘍選択的な増殖性組換えHSVベクターは，安全性のみならず有効性の面から期待され，現在，脳腫瘍に対する臨床試験が行われている．一方，我々はHSVを用いて，癌特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法への応用を進めている．

1）単純ヘルペスウイルス

HSVは2本鎖DNAウイルスで，核内で増殖するDNAウイルスの中で最大長のゲノム（153 kb）を有し，少なくとも75種の遺伝子をコードする．ゲノムはL（long）領域とS（short）領域から構成され，各ユニーク配列の両側に倒置反復配列がはさむ形で存在する（第4図）．ウイルスゲノムの全塩基配列が決定され[19]，ほとんどのウイルス遺伝子の機能は解明されている．他の多くのウイルスと同様，HSV遺伝子も感染細胞における発現の順序にしたがって，3つのグループ（α，β，γ）に分類される．Immediate early遺伝子（IE，α）は，感染直後に発現し，2～4時間でピークに達し，early遺伝子（E，β），late遺伝子（L，γ）の発現およびα遺伝子群自身に対する転写制御因子として働く．β遺伝子群はα遺伝子群に引き続いて発現し，感染後5～7時間でピークに達するが，DNA複製蛋白群およびヌクレオチド，DNA代謝に関与する酵素群である．ウイルスDNA合成が始まるとγ遺伝子群が発現し，ほとんどのγ遺伝子はウイルス粒子構成蛋白質をコードする．

HSVの複製により，24時間以内に宿主細胞は死に至る．このウイルス複製（*in vivo* および *in vitro*）に必須な遺伝子を“essential遺伝子”と呼ぶ．非複製型組み換えHSVでは，このessential遺伝子が不活化されているが，主な遺伝子としてα群に属するICP4，ICP0，ICP27，ウイルス粒子蛋白であるVP16などがあげられる．一方，基本的に *in vivo* におけるウイルス複製に必須であるが，*in vitro*（培養下）での複製には必須でない遺伝子を“nonessential遺伝子”と呼ぶ．主な遺伝子として，神経毒性に関与する遺伝子であるγ34.5およびUL5，ウイルスDNA合成酵素であるribonucleotide reductase（RR），UTPase，thymidine kinase（TK）などがある．ベクターとしてHSVは，効率は様々ではあるが，ほとんどのヒト由来細胞に感染可能である．

2）組換えHSVベクター

組換えHSVベクターは目的挿入遺伝子をHSVゲノム中に組み込んだウイルスで，典型的には目的挿入遺伝子を組み込んだプラスミドベクター（相同組換えのためのHSV DNA配列を含む）とHSV DNAをVero細胞へ同時に遺伝子導入するか，あるいはプラスミドをVero細胞へ遺伝子導入した後，HSVを感染させて作製する．目的遺伝子をHSVに挿入可能な領域は多数存在し，現在まで，目的遺伝子が挿入されたnonessential遺伝子領域にはTK，ICP0，gC，RRなどが挙げられる[20]．一方，essential遺伝子領域にも目的遺伝子を挿入可能であり，essential遺伝子を導入した細胞株，D5細胞（ICP4），V27細胞（ICP27），D6細胞（gB）などの中でのみベクターは複製される．組換えHSVベクターは，主に細胞毒性を利用した癌の遺伝子治療に応用されているが[21, 22]，神経細胞などへの遺伝子導入ベクターとしても利用されている[23]．これまで，再発悪性グリオーマ患者を対象とした遺伝子治療のため，2つの組換えHSVベクター，G207および1716が臨床応用されている．

G207は，2種のnonessential遺伝子（ICP6，ICP34.5）内に計3ケ所の変異が施され（第4図），ICP6遺伝子の不活化とICP34.5遺伝子欠損により，ウイルスは分裂細胞中でのみ複製し，神経毒性が極めて減弱された安全性の高い組換えHSVである[22, 24, 25]．すなわち，癌の遺伝子治療に応用する場合，ウイルス増殖が腫瘍選択的にコントロールされた組換えHSVベクターである．米国で，再発悪性グリオーマ患者に対する第1相臨床試験として，1×10^6pfuから3×10^9pfuのウイルス力価で定位的に脳腫瘍内投与（21症例）が行われ，安全性の確認が行われた[26]．脳炎を含む重篤な有害事象は認められず，画像解析上8例に腫瘍の縮小を認め，2例で4年以上の生存が確認された．現在，開頭腫瘍摘出時に高力価のG207を投与する臨床試験が行われており，詳細な報告が待たれる．

1716はγ34.5遺伝子を欠失する組換えHSVであり（第4図），比較的強い殺細胞作用を有し，正常脳組織に対する病原性も残存している[27]．再発悪性グリオーマ患者9例を対象にした第1相臨床試験が英国で行われ，10^3pfuから10^5pfuの低いウイルス力価で定位的に脳腫瘍内投与が行われた．重篤な有害事象は認められず，4例で14ヶ月以上の生存が確認された[28]．さらに，悪性

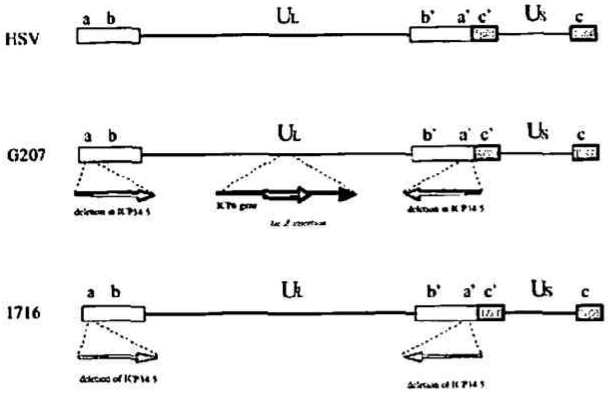

図4：HSV の DNA 構造と組換え HSV ベクター
HSV の DNA は L（long）領域と S（short）領域から構成され，それぞれのユニーク配列（unique long：UL および unique short：US）の両側に倒置反復配列（ab, b' a' および c, c'）が位置する．G207 は HSV-1 F 株に由来し，DNA 複製に関与する ICP6 遺伝子内に lacZ 遺伝子が挿入され，神経毒性に関与する ICP34.5 遺伝子内には 1.0kb の欠損をもつ．1716 は HSV-1 17 株に由来し，ICP34.5 遺伝子を欠失する．

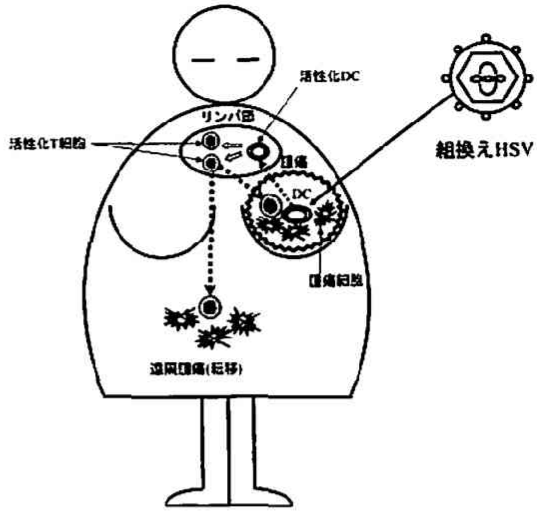

図5：組換え HSV を用いた *in situ* 癌ワクチン療法
腫瘍内に組換え HSV を投与することにより，腫瘍局所および周辺に存在する樹状細胞（DC）が活性化される．活性化 DC は腫瘍抗原をプロセスして，リンパ節へ移動して T 細胞に抗原を提示する．その結果，腫瘍特異的な活性化 T 細胞が誘導され，HSV 投与側腫瘍のみならず遠隔腫瘍を攻撃する．

グリオーマ患者 12 例（再発 11 例）を対象として，10^5 pfu のウイルス力価での脳腫瘍内投与が行われ，安全性と生体内におけるウイルス複製が組織学的に確認された[29]．

3）HSV ベクターを用いた癌ワクチン療法への応用

癌ワクチン療法は，腫瘍細胞自身あるいは同定された腫瘍抗原を用いて，癌患者体内で抗腫瘍免疫を誘導，あるいは増強する能動的な免疫療法である．体外で細胞障害性 T 細胞（cytotoxic T lymphocyte；CTL）や natural killer（NK）細胞などの抗腫瘍免疫に重要な細胞を調製し，これを癌患者へ投与する受動的な免疫療法とは異なる．近年，腫瘍抗原が同定されたことから，腫瘍抗原特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法に期待が寄せられている．

a）*in situ* 癌ワクチン療法

1970～80 年代には，細胞融解性ウイルスである Newcastle disease virus[30]，parainfluenza virus[31]，vaccinia virus[32]などを用いて，腫瘍細胞の抗原性を変えて，癌に対する免疫を誘導する試みが行われた．多くの場合は，ウイルス感染細胞 "oncolysates" をワクチンとして投与されていたが，結果は様々で，ウイルス毒性が観察された報告もあり，詳細な解析はなされていない．そこで，我々は，安全性の高い組換え HSV ベクター，G207 を用いて癌特異的な免疫を誘導する *"in situ* 癌ワクチン療法" を考案した[33]（第5図）．過去の細胞融解性ウイルスを用いた癌ワクチン療法と異なり，組換え HSV ベクターを用いるため，安全性が高められ，高力価のウイルスベクターを生体内へ直接投与可能である．マウスモデルでの具体例を以下に概説する．

大腸癌細胞株 CT26 を同種の Balb/c マウス両側腹部皮下に移植して約 1 週間後，両側腫瘍直径が約 5 mm 程度になった時点で，治療を開始した．コントロールとして，ウイルス調整に用いる Vero 細胞の抽出液（以下，mock）を用いた．G207 あるいは mock を右側腫瘍内にのみ投与し，実験によってさらにウイルス投与を追加し，以後両側腫瘍体積を経時的に計測した．その結果，ウイルス投与側腫瘍のみならず，対側腫瘍に対しても著明な抗腫瘍効果が認められた．ウイルス投与後の組織学的解析を行ったところ，投与側腫瘍のみウイルスが検出され，対側の腫瘍内にウイルスは認められず，一方，両側腫瘍内に著明な CD4 および CD8 陽性のリンパ球浸潤を認めた．また，G207 を腫瘍内ではなく皮内投与した場合は，対側腫瘍に対する明らかな抗腫瘍効果は認められなかった．以上より，遠隔腫瘍に対する抗腫瘍効果

は，腫瘍内にG207を投与することにより誘導されること，ウイルスによる直接細胞融解効果ではないことが明らかとなった．さらに，この抗腫瘍効果は，異なる組換えHSVベクターを用いても誘導され，また他の腫瘍，系統の異なるマウス，異なる腫瘍モデルにおいても，*in situ* 癌ワクチン療法による抗腫瘍効果が確認された[34-36]．

次にHSVを用いたin situ癌ワクチンにおけるT細胞の関与を調べるため，ヌードマウスを用いて同様の治療実験を行ったところ，ウイルス投与側においてのみ増殖抑制効果が認められ，対側腫瘍に対しては明らかな抗腫瘍効果を認めなかった．また，CD4, CD8抗体を用いたリンパ球サブセットのdepletion後に治療解析を行ったところ，遠隔腫瘍に対する抗腫瘍効果にはおもにCD8陽性T細胞が関与していることが明らかになった．さらに，G207投与後のマウス脾細胞のリンパ球反応を解析したところ，CT26細胞に対する腫瘍抗原ペプチドであるAH1に特異的なCTLの誘導が認められた[33, 37]．AH1は，マウス白血病ウイルスの膜タンパク，gp70由来のMHC class I拘束性のペプチドで，gp70が正常組織で発現せず，大腸癌CT26において高発現しているため，腫瘍特異抗原としてCTLに認識される．皮内にG207を投与した場合やmockを腫瘍内投与した場合では，腫瘍特異的なCTLは誘導されず，G207を腫瘍内投与することにより，腫瘍抗原特異的なCTLが誘導された．

果たしてどのようなメカニズムで，腫瘍特異的な免疫が誘導されるのであろうか．樹状細胞は外来抗原をMHC class Iに提示して，CTLを活性化しうる[38, 39]．ごく最近の結果から，HSVを腫瘍内へ投与することにより，腫瘍周囲の樹状細胞を活性化して，腫瘍特異的なCTLを誘導することが明らかになった（未発表データ）．また樹状細胞が，腫瘍特異的T細胞およびHSV特異的T細胞（CTLのみならずヘルパーT細胞）を同時に誘導することにより，それぞれが協調的に働き，高い抗腫瘍免疫を誘導するのではないかと考えている[40]．以上，組換えHSVは，細胞融解効果を利用した遺伝子治療のみならず，抗原特異的な免疫を誘導する癌ワクチン療法においても有効なウイルスベクターである．

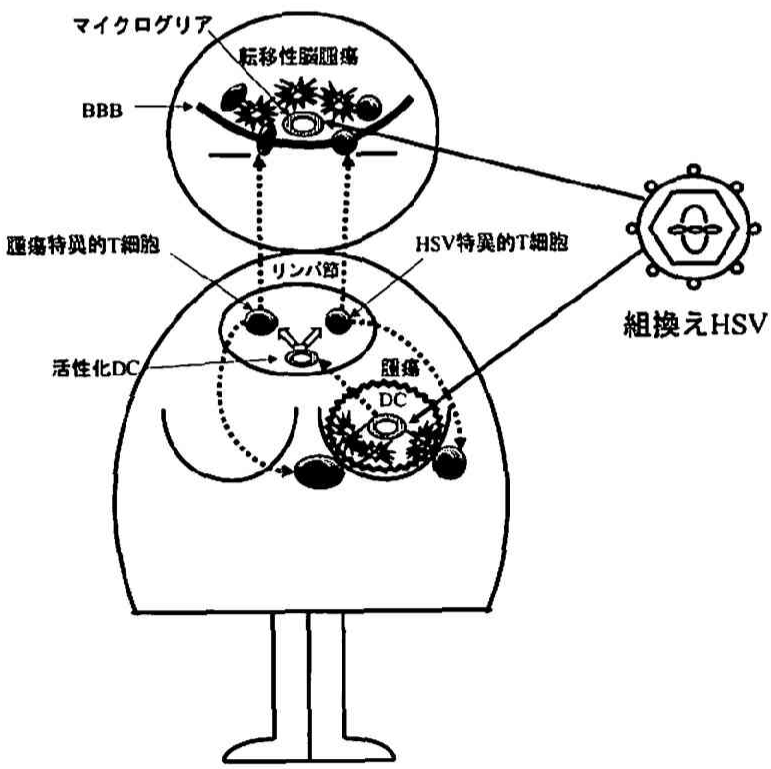

図6：脳腫瘍に対する組換えHSVを用いた免疫療法
転移性脳腫瘍に対する治療法として，原発腫瘍内のみならず転移性脳腫瘍内へ組換えHSVを投与すると，脳腫瘍は体内で誘導された腫瘍特異的T細胞に加えて，HSV特異的T細胞の標的となりうる．

b）脳腫瘍に対する癌ワクチン療法

脳は免疫学的寛容な組織であり，樹状細胞などの抗原提示細胞が充分に働けないため，脳腫瘍抗原を免疫系に提示することは容易でない．しかし，活性化T細胞がBBBを通過して脳内に侵入することが明らかになったことから，脳腫瘍抗原に対する全身の免疫を誘導して，脳腫瘍を治療する試みが行われている．米国で施行された神経膠腫（グリオーマ）に対する樹状細胞ワクチン療法の臨床治験では，延命効果が認められ，重篤な有害事象は報告されていない[41),42)]．本治療法の有効性は今後の臨床治験の結果を待たなければならないが，グリオーマに対する癌ワクチン療法の安全性が証明された．

一方，我々は組換えHSVベクター，G207を用いた癌ワクチン療法の脳腫瘍治療への応用を試みた[43)]．転移性脳腫瘍モデルを作製し，皮下腫瘍（原発腫瘍を想定）内へG207を投与したところ，HSV特異的なT細胞のみならず腫瘍特異的なT細胞が誘導され，生存期間の延長が認められた．しかし治癒例が認められなかったことから，原発腫瘍内に加えて転移性脳腫瘍内へもG207を投与したところ，高い治療効果が得られた．この複合治療においては，脳腫瘍内にG207を投与したことにより，脳腫瘍が，腫瘍特異的T細胞に加えて，HSV特異的T細胞の標的となり，高い治療効果が得られたと考えられている（第6図）[44)]．これらの研究結果から，脳腫瘍に対する癌ワクチン療法は，標的となる脳腫瘍の抗原性を高める工夫や局所環境を変える必要性があることが示唆された．

増殖性の組換えHSVベクターは，腫瘍細胞を選択的に破壊する局所治療のベクターとして研究が進み，実際に脳腫瘍の遺伝子治療へ臨床応用された．一方，HSVベクターは体内（脳組織以外）で腫瘍内投与すると，全身の抗腫瘍免疫を誘導することから，我々は癌ワクチンのベクターとして臨床応用を検討してきた．しかし，最近，アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターによる死亡例を含む重篤な有害事象が報告され，ウイルスベクターの安全性の検証が重要な課題として再認識されている．そこで，癌ワクチンしての有効性を保持しながら，安全性を高めるため，現在，感染性を失わせた不活性化HSVの臨床応用を検討している．幸い，COE（低侵襲・新治療開発による個別化癌医療確立）を中心とした研究計画の一つとしてベクタープロセッシングセンター（Keio University Vector Processing Center；KVPC）が設立された．今後は，早期の臨床応用へ向けて，環境管理されたベクタープロセッシングセンター内で不活性化HSVの作製を行う予定である．

3．脳腫瘍抗原の同定と抗原特異的な免疫療法

T細胞に認識されるヒト腫瘍抗原が同定されたことにより，癌に対する免疫応答を人為的に操作することが可能となった．またT細胞が腫瘍拒絶に重要であることが証明され，抗原特異的に増殖する能力とメモリー機構を有することから，T細胞は癌ワクチン療法における中心的な役割を担っている．これまでグリオーマに対する治療として，手術療法，放射線療法，化学療法による集学的治療が行われ，それぞれは飛躍的な進歩を遂げているにもかかわらず，治療成績は未だに向上しない．そこで，我々はグリオーマに対する新たな治療法の開発を目的として，特異的な免疫療法の標的となる腫瘍抗原の同定を積極的に進めている．

1）ヒト腫瘍抗原

腫瘍抗原のクローニング法が開発され，CTLに認識されるヒト腫瘍抗原としてMAGE-1遺伝子[45)]が同定されて以来，様々なヒト腫瘍抗原が同定されている[46)]．これらの腫瘍抗原は，以下のような代表的カテゴリーに分けられる．a）Cancer-testis（CT）抗原：各種癌組織と正常組織において精巣，卵巣，胎盤のみに発現する抗原群であり，MAGE遺伝子群に代表される．生殖系の細胞はMHC分子の発現が極めて低いため，CT抗原に対するCTLは生殖系細胞を攻撃せず，癌細胞のみを選択的に攻撃する．発現パターンから理想的なターゲットであり，実際にCT抗原を用いた多くの臨床試験が進められている．これまで，MAGE, NY-ESO-1などがCT抗原として同定されている[47)]．b）組織特異的抗原：腫瘍の発生母地である正常組織にも発現しているが，腫瘍での発現が増強し，CTLに認識される腫瘍抗原である．正常メラノサイトとメラノーマに共通して発現しているtyrosinase, MART-1, gp100などの抗原が同定されている．自己抗原であり，正常組織もCTLの標的となりうるが，メラノーマに対する癌ワクチン療法に応用され，これらの抗原の有用性が示されている[48)]．c）遺伝子異常に由来する抗原：腫瘍は多くの遺伝子変異に基づき発生するため，腫瘍特異的な遺伝子変異に由来する変異ペプチドが腫瘍抗原としてCTLに認識される．β-cateninおよびCDK4は1アミノ酸変異により，またMUM-1ではイントロン部分が翻訳され，それぞれ腫瘍抗原としてCTLに認識される[46)]．

2）SEREX法によるヒトグリオーマ抗原の同定

腫瘍抗原の同定法として，autologous typingに分

子生物学的手法を取り入れたSEREX法（serological identification of antigens by recombinant expression cloning）が開発された[49]．患者血清中のIgGを利用して抗原を同定する方法で，技術的に難易度の高いCTLの樹立を必要とせず，また実際にSEREX法により同定された腫瘍抗原の中で，CTLエピトープが同定され，癌ワクチンへ応用された抗原の報告もある[50]．そこで，我々は，患者血清を利用したSEREX法を用いてグリオーマ抗原の同定を試みた．

SEREX法は基本的に同一患者の腫瘍組織と血清を用いた解析法であるが，精巣組織由来のcDNA libraryを，複数のグリオーマ患者血清（アロ血清）を用いてSEREXスクリーニングを行なったところ，新規のグリオーマ抗原，SOX6が同定された[51]．SOX（*sry*-related HMG box）遺伝子群は，性決定因子のDNA結合部位であるHMG（high-mobility-group）ドメインを有する転写調節因子のファミリーであり，胚発生過程において組織特異的に発現され，細胞の運命決定に重要な役割を担っている[52]．マウスSOX6は，胎生期の中枢神経系や軟骨細胞にのみ発現し，SOX5やSOX9と共発現することにより軟骨形成に関与することが報告されているが[53]，中枢神経系における機能はいまだに不明である．ヒトSOX6の組織発現を解析したところ，胎児脳組織において発現を認めたが，成人正常組織では精巣を除いて発現を認めなかった．一方，グリオーマ組織において高いSOX6の発現が観察され，免疫組織学的解析において，グリオーマ組織（Glioblastoma 8例，Anaplastic astrocytoma 5例，Diffuse astrocytoma 1例，Oligoastrocytoma 4例）全例においてSOX6陽性細胞が観察され，正常成人脳組織では明らかなSOX6陽性細胞を認めなかった[54),55]．

つぎに，SOX6の免疫原性について解析を行った．36人のグリオーマ患者，14人の他の脳疾患患者（髄膜腫，悪性リンパ腫，転移性脳腫瘍，パーキンソン病，頭蓋咽頭腫，脳膿瘍，およびくも膜下出血），54人の脳腫瘍以外の癌患者，および37人の健常人血清中のSOX6抗体を解析したところ，36人中12人（33%）のグリオーマ患者がSOX6抗体陽性であったのに対し，グリオーマ以外の脳疾患患者では14人中0人（0%），他の癌患者では54人中2人（4%），健常人では37人中1人（3%）のみ抗体が検出された．さらにSEREX法により単離された完全長より短いSOX6抗原分子も，完全長の抗原と同様の免疫反応を示したことから，その共通部分に含まれるHMG domain（SOX6のDNA結合部位：SOX6-HMG）が抗体認識部位の一つではないかと推測し，SOX6-HMG組換え蛋白を作製して，抗原性の解析を行った．Western blot解析により，グリオーマ患者血清中の抗体がSOX6-HMG蛋白を認識することを確認後，ELISA法によりSOX6-HMG蛋白に対する血清中IgGの抗体価を解析したところ，グリオーマ患者血清は健常人の血清と比較して有意に高い抗体価を示した（第7図）．したがって，SOX6のHMG domainは，グリオーマ患者血清中の抗体認識部位の一つであることが示された．

現在まで，SEREX法により単離された数種のグリオーマ抗原の報告があるが，発現特異性や遺伝子変異は認められていない[56]．なぜこれらの抗原に対する抗体反応がグリオーマ患者にのみ検出されたのか，機序は不明であ

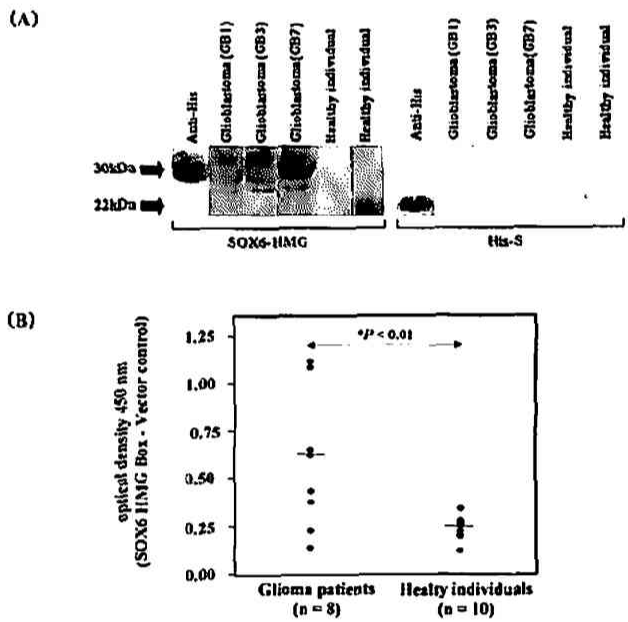

図7：グリオーマ患者におけるSOX6抗体反応
A：SOX6抗原のHMGドメインに対するグリオーマ患者血清反応
SOX6-HMG蛋白（SOX-HMG）に対して，グリオーマ患者血清（GB1, GB3, およびGB7）は反応するが，健常人血清は反応しない．His蛋白（His-S）に対して，グリオーマ患者血清およびコントロール血清はともに反応しない．His結合のSOX-HMGおよびHis-Sは，陽性コントロールであるHis抗体に反応する．
B：ELISA法によるSOX6-HMG抗体価の解析
グリオーマ患者血清中のSOX6-HMG抗体価は健常人血清中の同抗体価と比較して，有意に高い．（Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M：Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. Oncogene 23：1420-1427, 2004の図を，許可を得て改編，転載）

り，したがって，これらの抗原を用いた癌免疫療法への応用は困難である．一方，SOX6は精巣以外の成人正常組織では明らかな発現を認めず，グリオーマ組織における高い発現が観察された．さらに，グリオーマ患者選択的かつ3分の1という高頻度でSOX6に対する抗体反応が検出され，抗原特異的にヘルパーT細胞が活性化されていることが明らかになった．T細胞に認識される腫瘍抗原には，CTLに認識されるMHC class I結合性の抗原ペプチドと，ヘルパーT細胞に認識されるMHC class II結合性の抗原ペプチドが存在する．現在まで同定された腫瘍抗原は，技術的な理由などにより，ほとんどはCTLを活性化するMHC class I結合性の抗原ペプチドであるが，効率的にCTLを誘導するためには，ヘルパーT細胞の活性化が重要である．そこで，我々はSOX6抗原のCTLエピトープペプチドの解析と平行して，ヘルパーT細胞を活性化するSOX6抗原タンパクの合成および解析を行っている．ごく最近，SOX6抗原由来のHLA-A24およびHLA-A2に結合するCTLエピトープペプチドを同定することができた（論文準備中）．現在，これらの抗原ペプチドを用いたグリオーマに対する臨床研究の準備を進めている．

3）CTLに認識されるグリオーマ抗原

現在までCTLに認識されるグリオーマ抗原の報告は数少ない．上皮性腫瘍の抗原として同定されたSART1およびSART3がグリオーマにおいても発現し，SART1およびSART3抗原特異的なCTLがグリオーマ細胞を障害することが報告されている[57]．最近では，メラノーマ抗原であるgp100やMART-1がグリオーマ抗原としてCTLに認識され[58]，メチル化による遺伝子発現調節が重要である[59]ことから，脱メチル化剤を処理して，抗原性を高める工夫が行なわれている．一方，我々は，HSVを用いた免疫誘導法を利用して，T細胞に認識されるグリオーマ抗原の同定を試みた[60]．グリオーマ細胞をマウスに移植後，HSVを腫瘍内に投与して，腫瘍特異的な免疫が誘導されたマウスの脾細胞からCTL細胞株を樹立した．このCTLはMHC拘束性にかつ特異的にグリオーマを障害することから，抗原遺伝子のスクリーニングを行ったところ，新規遺伝子が同定された[61]．この分子の機能は不明であるが，グリオーマにおいて数カ所の遺伝子変異が存在し，この変異部分を含むペプチドが抗原としてCTLに認識されることが明らかになった．現在，この抗原ペプチドを用いて，マウスグリオーマモデルにおける抗原特異的な免疫療法の解析を行っている．また，腫瘍において高い発現を示す分子がCTLに認識される抗原エピトープを有していたことから[62]，今後は，グリオーマにおいて高発現を呈する分子[63]のCTLエピトープの検索を進めてゆく予定である．BBBが抗体の侵入を防御しているのに対して，活性化T細胞はBBBを通過して脳内を移動可能であり，選択

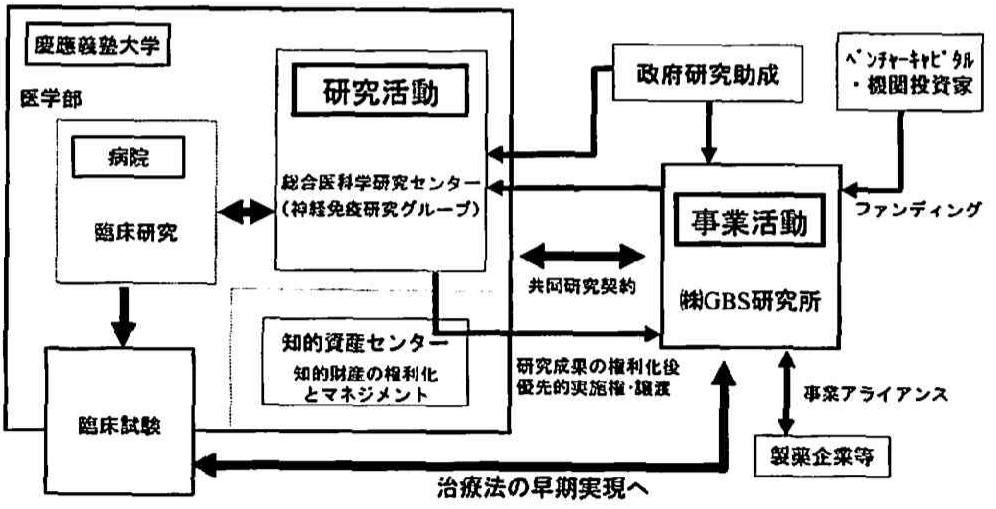

図8：大学発ベンチャーと慶應義塾

大学発ベンチャーの主な事業活動は，投資家や政府などから研究資金を調達し，得られた研究成果に基づく特許を慶應義塾から譲り受け，医薬品企業との提携や特許実施権の付与により対価を得ることである．

的に標的の脳腫瘍を攻撃しうる．細胞性免疫を誘導する抗原特異的な免疫療法は，浸潤性のグリオーマに対する新しい治療戦略として今後の展開が期待される．

4．おわりに

GBS研究所は，ベンチャーキャピタルからの出資により慶應義塾大学医学部を基盤として設立され，慶應義塾大学知的資産センターのもとで，知的財産の保護や権利化というスキームを描いていただいた（第8図）．大学内で行ってきた我々の研究を臨床研究へ移行するのがこれからの課題であり，この移行部分が非常に重要な点である．大学発ベンチャーの利点として，企業側の立場では，大学の研究基盤を利用して，密な情報ネットワークを使い，研究が推進される点が挙げられる．大学側から考えると，臨床応用を目指して続けられていた研究を大きく推進させるきっかけになる．一方，問題点は大学側と企業側の研究の方向性は，常に一致するわけではない点である．また，創薬のベンチャーモデルは，大学からバイオベンチャーがつないで，製薬会社へ移行するというスキームが出来ているが，再生医療に関しては，バイオベンチャーの先のスキームがなかなか描けない．しかし，我々の役割として，研究を推進させることが最も重要であり，産業化へ向けた企業としての問題点を克服しつつ，今後も医療へ貢献するための研究を前向きに進めてゆきたい．

謝　辞

研究の遂行にあたり，ご指導，ご協力頂きました植村慶一先生，河瀬斌先生，河上裕先生，岡野栄之先生，戸山芳昭先生，ならびに共同研究者の諸先生方に心より感謝申し上げます．

文　献

1) Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD：Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. Prog Neurobiol 75：321-341, 2005
2) Hickey WF：Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. Glia 36：118-124, 2001
3) Hickey WF：Leukocyte traffic in the central nervous system：the participants and their roles. Semin Immunol 11：125-137, 1999
4) Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD：Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. J Clin Invest 105：223-231, 2000
5) Irani DN：Brain-derived gangliosides induce cell cycle arrest in a murine T cell line. J Neuroimmunol 87：11-16, 1998
6) Hart MN, Fabry Z：CNS antigen presentation. Trends Neurosci 18：475-481, 1995
7) Santambrogio L, Pakaski M, Wong ML, Cipriani B, Brosnan CF, Lees MB, Dorf ME：Antigen presenting capacity of brain microvasculature in altered peptide ligand modulation of experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol 93：81-91, 1999
8) GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM：Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. Nature 403：439-444, 2000
9) Ishii K, Toda M, Nakai Y, Asou H, Watanabe M, Nakamura M, Yato Y, Fujimura Y, Kawakami Y, Toyama Y, Uyemura K：Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. J Neurosci Res 65：500-507, 2001
10) Perry VH, Brown MC, Gordon S：The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. J Exp Med 165：1218-1223, 1987
11) Zeev-Brann AB, Lazarov-Spiegler O, Brenner T, Schwartz M：Differential effects of central and peripheral nerves on macrophages and microglia. Glia 23：181-190, 1998
12) Moalem G, Monsonego A, Shani Y, Cohen IR, Schwartz M：Differential T cell response in central and peripheral nerve injury：connection with immune privilege. Faseb J 13：1207-1217, 1999
13) Banchereau J, Steinman RM：Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392：245-252, 1998
14) Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, Nakamura M, Shimazaki T, Okano HJ, Kawakami Y, Toyama Y, Toda M：Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery. J Neurosci Res 76：453-465, 2004
15) Marchetti B：Cross-talk signals in the CNS：role of neurotrophic and hormonal factors, adhesion molecules and intercellular signaling agents in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-astroglial interactive network. Front Biosci 2：d88-125, 1997
16) Mikami Y, Toda M, Watanabe M, Nakamura M, Toyama Y, Kawakami Y：A simple and reliable behavioral analysis of locomotor function after spinal cord injury in mice. Technical note. J Neurosurg Spine 97：142-147, 2002
17) Celluzzi CM, Welbon C：Dendritic cell culture：a simple closed culture system using ficoll, monocytes, and a table-top centrifuge. J Hematother Stem Cell

Res 12 : 575-585, 2003
18) Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J : Meth od for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. J Immunol Methods 288 : 123-134, 2004
19) McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P : The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. J. Gen. Virol. 69 : 1531-1574, 1988
20) Breakefield XO, DeLuca NA : Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. New Biol 3 : 203-218, 1991
21) Martuza RL : Conditionally replicating herpes vectors for cancer therapy. J Clin Invest 105 : 841-846, 2000
22) Toda M, Rabkin SD, Martuza RL : Treatment of human breast cancer in a brain metastatic model by G207, a replication-competent multimutated herpes simplex virus 1. Hum. Gene Ther. 9 : 2177-2185, 1998
23) Glorioso JC, Bender MA, Goins WF, Fink DJ, DeLuca N : HSV as a gene transfer vector for the nervous system. Mol Biotechnol 4 : 87-99, 1995
24) Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL : Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. Nature Medicine 1 : 938-943, 1995
25) Hunter WD, Martuza RL, Feigenbaum F, Todo T, Mineta T, Yazaki T, Toda M, Newsome JT, Platenberg RC, Manz HJ, Rabkin SD : Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207 : safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. J Virol 73 : 6319-6326, 1999
26) Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL : Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma : results of a phase I trial. Gene Ther 7 : 867-874, 2000
27) MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, Brown SM : Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. J Gen Virol 72 (Pt 3) : 631-639, 1991
28) Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M : Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. Gene Ther 7 : 859-866, 2000
29) Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M : The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5 (-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma : a proof of principle study. Gene Ther 9 : 398-406, 2002
30) Cassel WA, Murray DR, Phillips HS : A phase II study on the postsurgical management of Stage II malignant melanoma with a Newcastle disease virus oncolysate. Cancer 52 : 856-860, 1983
31) Freedman RS, Bowen JM, Herson JH, Wharton JT, Edwards CL, Rutledge FN : Immunotherapy for vulvar carcinoma with virus-modified homologous extracts. Obstet Gynecol 62 : 707-714, 1983
32) Boone CW, Paranjpe M, Orme T, Gillette R : Virus-augmented tumor transplantation antigens : evidence for a Helper antigen mechanism. Int J Cancer 13 : 543-551, 1974
33) Toda M, Rabkin SD, Kojima H, Martuza RL : Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. Hum Gene Ther 10 : 385-393, 1999
34) Endo T, Toda M, Watanabe M, Iizuka Y, Kubota T, Kitajima M, Kawakami Y : In situ cancer vaccination with a replication-conditional HSV for the treatment of liver metastasis of colon cancer. Cancer Gene Ther 9 : 142-148, 2002
35) Toda M, Martuza RL, Rabkin SD : Combination suicide/cytokine gene therapy as adjuvants to a defective herpes simplex virus-based cancer vaccine. Gene Ther 8 : 332-339, 2001
36) Toda M, Martuza RL, Rabkin SD : Tumor growth inhibition by intratumoral inoculation of defective herpes simplex virus vectors expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Mol Ther 2 : 324-329, 2000
37) Toda M, Martuza RL, Kojima H, Rabkin SD : In situ cancer vaccination : an IL-12 defective vector/replication- competent herpes simplex virus combination induces local and systemic antitumor activity. J. Immunol. 160 : 4457-4464, 1998
38) Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL : A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. Science 267 : 243-246, 1995
39) Reis e Sousa C, Germain RN : Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. J. Exp. Med. 182 : 841-851, 1995
40) Toda M, Kawakami Y : Cancer vaccination using herpes simplex virus vectors. Current Topics in Biochemical Research 1 : 135-143, 1999
41) Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM, Ying H, Finger DN,

Lee PK, Yong WH, Incardona F, Thompson RC, Riedinger MS, Zhang W, Prins RM, Black KL : Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. Cancer Res 61 : 842-847, 2001

42) Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ : Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. Cancer Res 64 : 4973-4979, 2004

43) Toda M, Iizuka Y, Kawase T, Uyemura K, Kawakami Y : Immuno-viral therapy of brain tumors by combination of viral therapy with cancer vaccination using a replication-conditional HSV. Cancer Gene Ther 9 : 356-364, 2002

44) Toda M : Immuno-viral therapy as a new approach for the treatment of brain tumors. Drug News Perspect 16 : 223-229, 2003

45) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254 : 1643-1647, 1991

46) Kawakami Y, Rosenberg SA : Human tumor antigens recognized by T-cells. Immunol Res 16 : 313-339, 1997

47) Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A : Tumor antigens recognized by T lymphocytes. Annu Rev Immunol 12 : 337-365, 1994

48) Rosenberg SA : A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity 10 : 281-287, 1999

49) Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ : A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. Proc Natl Acad Sci U S A 94 : 1914-1918, 1997

50) Preuss KD, Zwick C, Bormann C, Neumann F, Pfreundschuh M : Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. Immunol Rev 188 : 43-50, 2002

51) Ueda R, Iizuka Y, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of a human glioma antigen, SOX6, recognized by patients' sera. Oncogene 23 : 1420-1427, 2004

52) Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H : Pairing SOX off : with partners in the regulation of embryonic development. Trends Genet 16 : 182-187, 2000

53) Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B : A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. Embo J 17 : 5718-5733, 1998

54) Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, Toda M : Immunohistochemical analysis of SOX6 expression in human brain tumors. Brain Tumor Pathol 21 : 117-120, 2004

55) Ueda R, Yoshida K, Kawakami Y, Kawase T, Toda M : Expression of a transcriptional factor, SOX6, in human gliomas. Brain Tumor Pathol 21 : 35-38, 2004

56) Toda M : Cancer vaccine for brain tumors and brain tumor antigens. Cancer Therapy 2 : 21-26, 2004

57) Imaizumi T, Kuramoto T, Matsunaga K, Shichijo S, Yutani S, Shigemori M, Oizumi K, Itoh K : Expressi on of the tumor-rejection antigen SART1 in brain tumors. Int J Cancer 83 : 760-764, 1999

58) Liu G, Ying H, Zeng G, Wheeler CJ, Black KL, Yu JS : HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. Cancer Res 64 : 4980-4986, 2004

59) Ohashi Y, Ueda M, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of an epigenetically silenced gene, RFX1, in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning. Oncogene 23 : 7772-7779, 2004

60) Iizuka Y, Suzuki A, Kawakami Y, Toda M : Augme ntation of antitumor immune responses by multiple intratumoral inoculations of replication-conditional HSV and interleukin-12. J Immunother 27 : 92-98, 2004

61) Iizuka Y, Kojima H, Kobata T, Kawase T, Kawakami Y, Toda M : Identification of a glioma antigen, GARC-1, using cytotoxic T lymphocytes induced by HSV cancer vaccine. Int J Cancer, (in press)

62) Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H : Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 10 : 8577-8586, 2004

63) Toda M, Iizuka Y, Yu W, Imai T, Ikeda E, Yoshida K, Kawase T, Kawakami Y, Okano H, Uyemura K : Expression of the neural RNA-binding protein Musashi1 in human gliomas. Glia 34 : 1-7, 2001