

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月24日現在

機関番号：85402
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成22年度～平成24年度
 課題番号：22591520
 研究課題名（和文） 癌幹細胞を標的とした糖鎖改変膵癌ワクチン療法の開発と次世代型抗体医薬の創薬
 研究課題名（英文） Pancreatic cancer immunotherapy using tumor lysate vaccine, engineered to express α -gal epitopes, can target pancreatic cancer stem cells
 研究代表者
 種村匡弘（TANMURA MASAHIRO）
 国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター・外科医長
 研究者番号 30379250

研究成果の概要（和文）：

膵癌の癌抗原である MUC1 糖鎖の末端にブタ型糖鎖抗原 α -gal epitopes を発現させ癌抗原の糖鎖構造をリモデリングすることで癌抗原自身の抗原性を向上させ、ヒトに生来備わっている自然抗原 Anti-Gal との抗原抗体反応を利用して効率的に抗腫瘍免疫を惹起できるか解析した。 α -gal group の抗膵癌抗体は control group に比し 16 倍強く誘導され、MUC1 抗原に特異的 CD8⁺CTL も α -gal group で有意に強く誘導できた。in vivo 抗腫瘍効果でも腫瘍増大速度、生存期間ともに α -gal group で有意に延長できた。

研究成果の概要（英文）：

The results of our in vitro and in vivo experiments emphasize the efficiency of tumor lysate vaccines expressing α -gal epitopes in targeting all pancreatic cancer cells, including differentiated cancer cells and pancreatic CSCs. Vaccination with α -gal tumor lysate induced strong long-lasting anti-tumor immunity. The α -gal tumor lysate vaccine may form the basis for testing this novel therapeutic approach in human clinical trials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

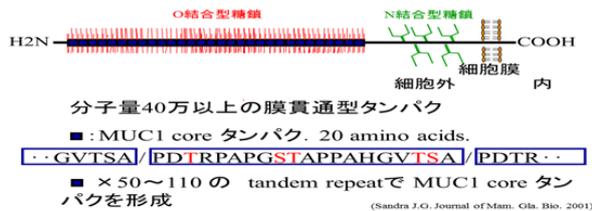
科研費の分科・細目：外科系臨床医学、外科学一般、7301

キーワード：(1)膵癌 (2)免疫療法 (3)癌幹細胞 (4)糖鎖 (5)創薬

1. 研究開始当初の背景

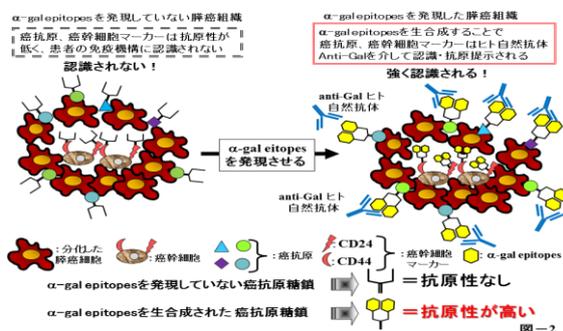
膵癌は本邦において癌死第5位の原因疾患である。膵癌の予後は、近年の手術技術向上により改善されつつあるが、たとえ治癒切除し得たとしても5年生存率は13%と不良であり、膵癌は最も悪性度の高い消化器癌の1つである。この現状を改善すべく補助療法として、Mucin1(MUC1)、CEA、K-rasなどを標的抗原とした癌免疫療法が行われている。標的癌抗原の中でも細胞膜貫通I型糖タンパクで

ある Mucin1(MUC1)(図-1)は、(i)90%以上の膵癌細胞の表面に発現し、(ii)MHC非拘束性で広く膵癌患者に応用でき、(iii)MUC1特異的 CTL の誘導も可能な癌抗原であり有効性が期待されている。しかし、担癌患者の荒廃した免疫能や MUC1 タンパク自身の抗原性が低いこと十分の有効な抗腫瘍免疫を引き出せず有意な臨床の有効性はいまだ報告されていない。



さて、ブタの臓器をヒトに移植する異種移植において、**hyperacute rejection** は移植されたブタグラフトを分単位で拒絶できる激しい免疫反応である。このメカニズムはブタ細胞に多量発現しているブタ異種糖鎖抗原 **α -gal epitopes** ($\text{Gal}\alpha 1,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc-R}$) とヒト自然抗体 **Anti-Gal** との激しい抗原抗体反応により補体が活性化、さらに ADCC により急速に拒絶される反応である。 **α -gal epitopes** はタンパク糖鎖、脂質糖鎖の糖鎖末端構造で、 $\alpha 1,3$ ガラクトース糖転移酵素（以下、 **$\alpha 1,3\text{GT}$** ）によって生合成される。 **α -gal epitopes** は多くの哺乳類に発現されるが、ヒトの **$\alpha 1,3\text{GT}$ 遺伝子** では point mutation のため偽遺伝子となり失活し **α -gal epitopes** を生合成できない。その代わりにエピトープを認識する **Anti-Gal** を自然抗体として多量に産生する。ヒトの Anti-Gal 産生 B 細胞は腸管リンパ節にも存在しブタ肉、牛肉など食物曝露により常に刺激されるため、ヒト循環 IgG の内、1% が **Anti-Gal 自然抗体** としてヒト血清中に常に循環しており、この抗体価は癌末期の患者でも維持されている。

申請者は、この強力な免疫反応を**膵癌免疫療法**に応用することに着目した。即ち、糖転移酵素 $\alpha 1,3\text{GT}$ を用いてヒト膵癌細胞の糖鎖末端に **α -gal epitopes** を発現させ糖鎖構造リモデリングを行い、ヒトに癌ワクチンとして投与することで生来備わっている大量の Anti-Gal 自然抗体との免疫反応を介して、効率的に癌抗原の抗原提示を行い**抗膵癌抗体**、**膵癌特異的 CTL** を誘導させ、予後の改善に寄与できると考えた(図-2)。



2. 研究の目的

本研究では、MUC1 を始めとして複数の癌抗原を含んだ手術切除標本を tumor lysate とし、lysate に含まれている癌抗原の糖鎖末端に $\alpha 1,3\text{GT}$ を用いて α -gal epitopes を酵素学的に

生合成し、癌患者に対し高い抗原性を獲得した癌ワクチンを作製、これを癌患者に投与しヒト自然抗体 anti-Gal との抗原・抗体反応を介して抗原提示能、抗体誘導能を飛躍的に向上させる**新しいコンセプトの癌免疫療法**の開発および臨床応用に向けた研究を行うことを目的とした。

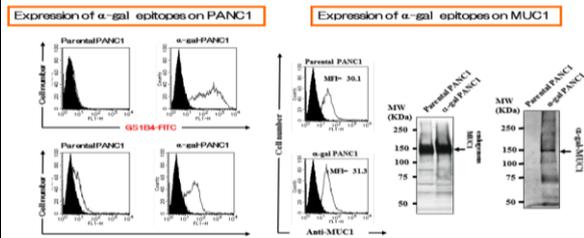


図-3

3. 研究の方法

1. α -gal MUC1 の作成

MUC1 発現ヒト膵癌細胞株 PANC1 にマウス $\alpha 1,3$ ガラクトース糖転移酵素遺伝子 ($\alpha 1,3\text{GT}$) を lipofection 法を用いて導入し、G418 による薬物選択により stable tranfectant を樹立した。 α -gal epitopes の発現は GS1B-4 レクチンおよび M86mAb (α -gal epitopes を特異的に認識するマウス IgM 抗体) を用いた FACS、ELISA にて確認し、MUC1、 α -gal MUC1 の発現は Western blot および免疫沈降にて確認した (図-3)。

2. 実験デザイン

$\alpha 1,3$ GT ノックアウトマウス (KO mice) を 100 mg のブタ腎臓片にて 1 週おきに 4 回、腹腔内免疫しヒトと同じ anti-Gal 抗体価 (High anti-Gal KO mice) とした。この High anti-Gal KO mice に 1×10^6 個の放射線照射 parental PANC1 (control group) または α -gal PANC1 (α -gal group) を 1 週おきに 3 回、腹腔内投与し vaccination し、抗腫瘍免疫の誘導の有無を *in vitro* で解析し、さらには *in vivo* での腫瘍抑制効果を以下の手順で解析した。

3. 免疫誘導の解析

Vaccination したマウスの尾静脈より採血を行い、anti-MUC1 抗体の産生は MUC1 peptide を固相化した ELISA にて解析した。anti-MUC1 抗体産生 B cell の増幅は ELISPOT にて解析し、MUC1 特異的 CTL も IFN- γ 産生リンパ球として ELISPOT にて解析した。

4. *In vivo* 抗腫瘍効果

上記の様に α -gal PANC1 または parental PANC1 にてワクチン化した KO mice の皮下に 0.5×10^6 個の MUC1 遺伝子導入 B16F10メラノーマ細胞株を皮下注射し生存期間、腫瘍増大速度を比較した。

5. レクチンマイクロアレイ

α -gal PANC1 または parental PANC1 にてワクチン化した KO mice より脾臓を摘出し ficol を用いて splenocytes を分離した。MUC1

peptide をビオチン化しアビジン coating したマグネットビーズと混合し MUC1 ビーズを作成した。この MUC1 ビーズとマウス splenocytes を 4°C 下で 4 時間混合し、MUC1 ビーズ結合 splenocytes と MUC1 ビーズ非結合 splenocytes に分離した。この分離した splenocytes を lysate 液に suspend し、リンパ球の糖鎖を分離しレクチンマイクロアレイにて糖鎖構造を網羅的に解析した (Kuno A et al. *Nature Methods*, 2005)。

4. 研究成果

(結果)

1, 免疫誘導

anti-MUC1 抗体は、control group に比し α -gal group では 16 倍強く産生された (図-4)。anti-MUC1 抗体産生 B cell (number of dots/1 X 10⁶ lymphocytes) の増幅は、control group の 319.5 ± 18.9 に比し α -gal group では 553.6 ± 66.7 と有意に ($P < 0.0001$) 強く増幅され ELISA と ELISPOT の結果に相関性を認めた (図-5)。MUC1 特異的 CTL (number of IFN- γ spots/1 X 10⁶ lymphocytes) の増幅も、control group の 211 ± 33.4 に比し α -gal group では 1237.5 ± 283.1 と有意に ($p < 0.001$) 強く増幅できた (図-5)。

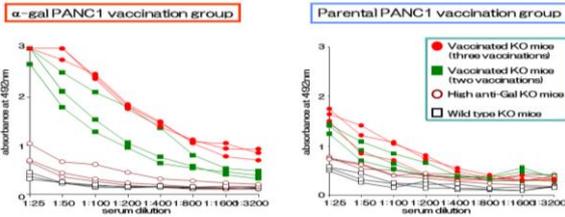


図-4

2, 抗腫瘍効果

本研究で行った動物モデルを図-6 に示した。

In vivo モデルを行うべく樹立・使用した MUC1-B16F10 の FACS 解析では、parental B16F10 および MUC1-B16F10 には α -gal epitopes は発現しておらず (data not shown)、parental B16F10 では endogenous な MUC1 発現は認めなかったが、MUC1-B16F10 では parental

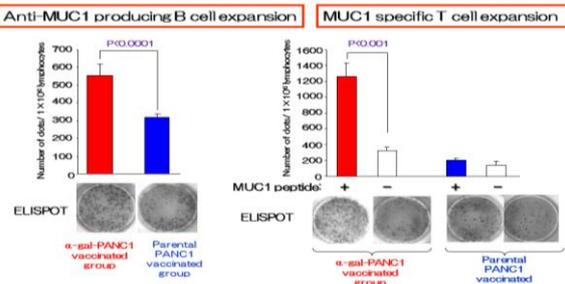
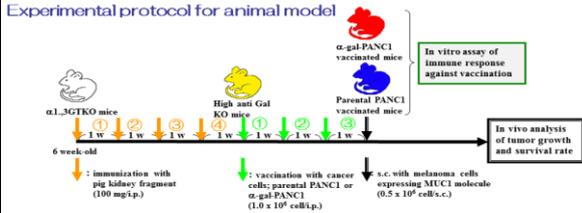


図-5

PANC1 と同程度の MUC1 の発現を確認

Experimental protocol for animal model



MUC1 expression on B16F10 mouse melanoma cells

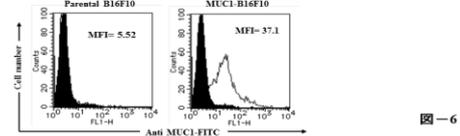


図-6

できた (図-6)。腫瘍増大速度では、control group においては 3~7 日ごとに皮下腫瘍のサイズは 2 倍化し、22~25 日までは最大 980 mm² にまで腫瘍は増大しマウスは死亡した。一方、 α -gal group では 200

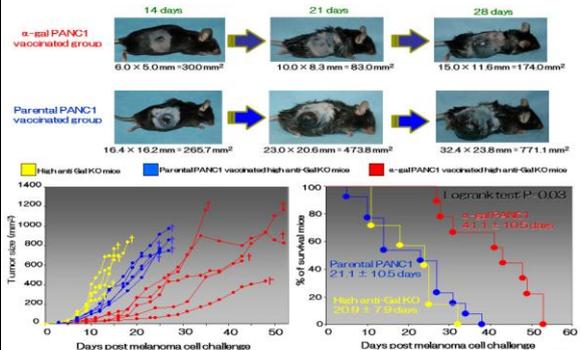


図-7

mm² の大きさに達するまでに 20~36 日 (平均 25.4 ± 7.6 日) を必要とし、control group の 12~14 日 (12.8 ± 1.1 日) に比し有意に腫瘍増大速度は遅かった (図-7)。マウス生存期間では、 α -gal group では 41.4 ± 10.4 日の平均生存期間が得られたが、control group では 21.1 ± 10.5 日の平均生存期間しか得られず ($p < 0.003$)、ワクチン投与を行っていないマウスの生存期間 20.9 ± 10.5 日と差がないことが明らかとなった (図-7)。

2, レクチンマイクロアレイによる糖鎖網羅解析

α -gal PANC1 ワクチンにより stimulate された anti-MUC1 producing B cells (MUC1 ビーズ結合リンパ球) の細胞表面糖鎖構造において、Parental PANC1 ワクチン投与群に比し以下の糖鎖構造発現に有意差を認めた (図-8)。



図-8

① α 1,6-Fucose (Core fucose) の発現が有意に

減少していた（ポテリジエント抗体誘導の可能性あり）。

- ② $\alpha 2, 3$ および $\alpha 2, 6$ シアル酸の糖鎖末端構造が有意に減少していた。
- ③ High mannose 構造が有意に増加していた。
- ④ シアリル T 抗原の発現が増加していた。Core fucose 構造の発現を確認するために Core fucose を特異的に認識するレクチン AAL レクチンにて FACS 解析を行った。レクチンマイクロアレイと同様にマグネットビーズにて MUC1 結合リンパ球と非結合リンパ球に分け、分離されたリンパ球それぞれを AAL レクチンにて処理しその結合度を解析すると、MUC1 非結合リンパ球では、 α -gal group と control group で AAL レクチンへの結合に差はなかったが、MUC1 結合リンパ球では、control group では mean fluorescence intensity(MFI)は 1359.6 と AAL レクチンと強く結合したが、 α -gal group では MFI:689.8 と AAL レクチンとの結合性は減弱しており、Core fucose 構造が減少していることが証明された（図-9）。

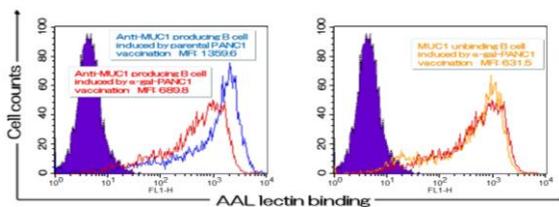


図-9

【考察】

膵癌治療の成績向上を実現するためには、従来行われている外科的切除、抗癌剤および放射線療法だけでは限界がある。今回、われわれが注目した癌ワクチン療法は治療成績向上のための有力な戦略と考えられるが、既知の癌抗原を用いて担癌患者を単に免疫するだけでは腫瘍の再発、増勢を抑制できる有効な抗腫瘍免疫を惹起できない。

本研究では、ブタからヒトへの異種移植においてブタ移植片生着の障壁となる超急性拒絶反応の発生メカニズムを免疫療法に応用できないかと仮説を立てた。すなわち、癌抗原は多くの場合、糖タンパクでありその糖鎖末端にブタ型糖鎖を人工的に生合成し癌抗原の糖鎖構造をリモデリングすることにより、ヒト癌抗原はブタ分子と同様にヒトに対し高い抗原性を持つことになり、ヒト自然抗体 Anti-Gal との抗原抗体反応を介して抗原提示細胞により効率的に認識され抗腫瘍免疫を惹起できるストラテジーである。

本研究では、ヒト膵癌細胞株 PANC1 に $\alpha 1,3GT$ 遺伝子を導入することで細胞表面に発現する MUC1 を含めた糖タンパクに α -gal epitopes を生合成し、この α -gal PANC でワクチン投与することで、従来型の parental

PANC1 でワクチン化するより有意に強く抗腫瘍免疫を誘導することができた。さらに *in vivo* の皮下腫瘍モデルにおいても α -gal PANC でワクチン化したマウスでは parental PANC1 でワクチン化したマウスに比し、腫瘍増大速度は有意に延長され、マウスの生存期間でも α -gal group のマウスでは control group のマウスに比し有意な生存期間の延長を認め、*in vitro* および *in vivo* の両者において α -gal PANC ワクチンの有効性が明らかとなった。また、レクチンマイクロアレイを用いたリンパ球糖鎖構造の網羅解析では（図-8）、 α -gal group のリンパ球において Core fucose 構造が有意に減少していることを見出し、 α -gal group で誘導された anti-MUC1 抗体を含む抗腫瘍抗体はポテリジエント抗体（図-10）である可能性が示唆された。すなわち α -gal epitopes を発現したワクチン投与により、より多くの抗腫瘍抗体、腫瘍特異的 CD8⁺CTL が誘導された免疫学的な理由だけでなく、抗体結合のアフィニティーが有意に高く、ADCC 誘導効果が通常の抗体より 100 倍強いとされているポテリジエント抗体の誘導が *in vivo* 抗腫瘍効果発現の一因となっている可能性があると考えられる。さらに、このポテリジエント抗体を産生するリンパ球を同定しハイブリドーマ化することにより腫瘍を標的としたポテリジエント抗体を自由に産生することが可能で、より効率的に抗腫瘍効果を発揮する抗体医薬を、より多くの種類創薬することができると期待している。

【結語】

α -gal MUC1 ワクチンは強い免疫誘導と生存期間延長を引き出し、さらにコアフコースが抑制されたポテリジエント抗体誘導も惹起でき新しい抗体医薬創薬に発展する可能性が示唆された。今後、本研究を積極的に進展させ癌治療の新しいブレイクスルーとなるよう努力したい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 37 件）

・ Deguchi T, Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Machida T, Ohmura Y, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Ito T, Mori M, Doki Y and Sawa Y. Increased immunogenicity of tumor-associated antigen, MUC1, engineered to express α -gal epitopes: A novel approach to immunotherapy in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 70 (13):5259-69, 2010

・ Tomimaru Y, Nagano H, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Wada H, Tanemura M, Umeshita K, Hiratsuma N, Takehara T, Doki Y, Mori M, Effects of preceding interferon therapy on outcome after surgery for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J of Surg Oncol*, 15;102(4),308-14, 2010

・ Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M., MicroRNA-21 induces resistance to the anti-tumour

effect of interferon- α /5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer*. 9;103(10), 2010, 1617-26.

• Ohmura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y and Mori M. Combined Transplantation of Pancreatic Islets and Adipose Tissue-Derived Stem Cells Enhances the Survival and Insulin Function of Islet Grafts in Diabetic Mice. *Transplantation*. 27;90(12), 2010, 1366-73

• Kobayashi S, Nagano H, Hoshino H, Wada H, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Kim T, Shimosegawa E, Hatazawa J, Doki Y, Mori M. Diagnostic value of FDG-PET for lymph node metastasis and outcome of surgery for biliary cancer. *J Surg Oncol*. 103(3):223-9, 2011

• Noda T, Nagano H, Tomimaru Y, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Kim T, Wakasa K, Doki Y, Mori M. Prognosis of hepatocellular carcinoma with biliary tumor thrombi following liver surgery. *Surgery*. 49(3):371-7, 2011

• Murakami M, Kobayashi S, Marubashi S, Tomimaru Y, Noda T, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Hiroaki Nagano H. Tyrosine kinase inhibitor PTK/ZK enhances the anti-tumor effects of interferon- α /5-fluorouracil therapy for hepatocellular carcinoma cells. *Ann Surg Oncol*. 18(2):589-96, 2011

• Eguchi H, Nagano H, Tanemura M, Takeda Y, Marubashi S, Kobayashi S, Wada H, Umeshita K, Mori M, Doki Y. A thick pancreas is a risk factor for pancreatic fistula after a distal pancreatectomy: Selection of the closure technique according to the thickness. *Dig Surg*. 28(1):50-6, 2011

• Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinical Significance of Alpha-Fetoprotein mRNA in Peripheral Blood in Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 18 (8): 2200-9, 2011

• Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Umeshita K, Kim T, Wakasa K, Doki Y, Mori M, Nagano H. IGFBP7 downregulation is associated with tumor progression and clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 15;130(2):319-27, 2011

• Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Donor Hepatectomy for Living Donor Liver Transplantation: Learning Steps and Surgical Outcome. *Dig Dis Sci*. 56 (8): 2482-90, 2011

• Tomimaru Y, Eguchi H, Wada H, Tomokuni A, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Mori M, Doki Y, Nagano H. Synergistic antitumor effect of interferon- β with gemcitabine in interferon- α -non-responsive pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 38(5):1237-43, 2011

• Akita H, Takeda Y, Hoshino H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Mori M, Doki Y, Nagano H. Mural nodule in branch duct-type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas is a marker of malignant transformation and indication for surgery. *Am J Surg*. 202 (2): 214-9, 2011

• Moriwaki K, Okudo K, Haraguchi N, Takeishi S, Sawaki H, Narimatsu H, Tanemura M, Ishii H, Mori M, Miyoshi E. Combination use of anti-CD133

antibody and SSA lectin can effectively enrich cells with high tumorigenicity. *Cancer Sci*. 102 (6): 1164-70, 2011

• Akita H, Nagano H, Takeda Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Takahashi H, Ohigashi H, Tomita Y, Ishikawa O, Mori M, Doki Y. Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene*. 4; 30 (31): 3468-76, 2011

• Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Daimon E, Kimura T, Kuroda A, Tanemura M, Doki Y, Ito T. Successful pregnancy after simultaneous pancreas-kidney transplantation from a brain-dead donor: the first case report in Japan. *J Obstetrics Gynaecol Res*. 37 (11): 1711-6, 2011

• Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Osuga K, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Long-term outcome of combined subcutaneous interferon- α and intra-arterial 5-fluorouracil treatment for advanced hepatocellular carcinoma with major portal vein thrombosis. *Oncology*. 80 (1-2): 63-9, 2011

• Tomimaru Y, Eguchi H, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Tomokuni A, Takemasa I, Umeshita K, Kanto T, Doki Y, Mori M. Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 56 (1): 167-75, 2011

• Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res*. 2011, Mar 25. [Epub ahead of print]

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Treatment of borderline cases for curative resection of biliary tract cancer. *J Surg Oncol*. 104 (5): 499-503, 2011

• Miyoshi N, Ishii H, Tanemura M, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*. 3; 8 (6): 633-8, 2011

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Experience with the use of fibrin sealant plus polyglycolic acid felt at the cut surface of the liver in laparoscopic hepatectomy. *Surg Endosc*. 25 (11): 3590-6, 2011

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. *Hepatogastroenterology*. 58(106):503-7, 2011

• Yamada D, Kobayashi S, Yamamoto H, Tomimaru Y, Noda T, Uemura M, Wada H, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Nagano H. Role of the Hypoxia-Related Gene, JMJD1A, in Hepatocellular Carcinoma: Clinical Impact on Recurrence after Hepatic Resection. *Ann Surg Oncol*. 2011 May 24. [Epub ahead of print]

• Asaoka T, Marubashi S, Kobayashi S, Hama N, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Wada H, Takemasa I, Takahashi H, Ruiz P, Doki Y, Mori M, Nagano H. Intra-graft Transcriptome Level of CXCL9 as Biomarker of Acute Cellular Rejection after Liver Transplantation. *J Surg Res*. 2012 Jul 26. [Epub ahead of print]

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Kawamoto K, Wada H, Eguchi H, **Tanemura M**, Umeshita K, **Doki Y**, Mori M. Hepatectomy based on the tumor hemodynamics for hepatocellular carcinoma: a comparison among the hybrid and pure laparoscopic procedures and open surgery. *Surg Endosc.* 27 (2): 610-7, 2013.

• Eguchi H, **Tanemura M**, Marubashi S, Kobayashi S, Wada H, Okita K, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I, Osuga K, Umeshita K, Wakasa K, Mori M, **Doki Y**, Nagano H. Arterial Stimulation and Venous Sampling for Glucagonomas of the Pancreas. *Hepatogastroenterology.* 59(113):276-9, 2012

• Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, **Tanemura M**, Okumura N, Takao T, **Doki Y**, Mori M, Nagano H. Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res.* 2012, 175(1):138-48.

• **Tanemura M**, Nagano H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, **Doki Y**. Role of Rapamycin induced autophagy in pancreatic islets. *Am J Transplant.* 2012Apr;12(4):1067.

• Machida T, **Tanemura M**, Ohmura Y, Tanida T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, H Eguchi , Ito T, Nagano H, Mori M, **Doki Y**, Sawa Y. Significant Improvement in Islet Yield and Survival with Modified ET-Kyoto Solution (ET-Kyoto/Neutrophil Elastase Inhibitor). *Cell Transplant.* 22 (1): 159-73, 2013..

• Tomimaru Y, Eguchi H, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, **Tanemura M**, Umeshita K, **Doki Y**, Mori M, Nagano H. Equivalent outcomes after anatomical and non-anatomical resection of small solitary hepatocellular carcinoma in patients with preserved liver function. *Digest Dis Sci.* 57(7):1942-8, 2012

• Noda T, Yamamoto H, Takemasa I, Yamada D, Uemura M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, **Tanemura M**, Umeshita K, **Doki Y**, Mori M, Nagano H. PLOD2 induced under hypoxia is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma after curative resection. *Liver Int.* 32 (1): 110-8, 2012

• Kubota M, Murakami T, Nagano H, Eguchi H, Marubashi S, Kobayashi S, Wada H, **Tanemura M**, Dono K, Nakamori S, Sakon M, Monden M, Mori M, **Doki Y**. Xenon-Inhalation Computed Tomography for Noninvasive Quantitative Measurement of Tissue Blood Flow in Pancreatic Tumor. *Dig Dis Sci.* 57(3):801-5, 2012

• **Tanemura M**, Ohmura Y, Deguchi T, Machida T, Tsukamoto R, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Ito T, Nagano H, Mori M, **Doki Y**. Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both *in vitro* and *in vivo*. *Am J Transplant.* 12(1):102-14, 2012

• **Tanemura M**, Miyoshi, Nagano H, Eguchi H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, **Doki Y**. Role of α -gal epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer. *Cancer Science* 104 (3): 282-90, 2013.

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Kawamoto K, Wada H, Eguchi H, **Tanemura M**, Umeshita K, **Doki Y**, Mori M. Clinicopathological features of long-term survivors for advanced biliary tract cancer and impact of the number of lymph nodes involved. *Int J Surg.* 11 (2): 145-51, 2013.

• Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, **Tanemura M**, And YD. Fibrin Sealant with PGA felt for Prevention of Bile Leakage

after Liver Resection. *Hepatogastroenterology.* 59 (120): 2564-8, 2012.

[学会発表] (計 6 件)

• **Tanemura M**, Deguchi T, **Miyoshi E**, Nagano H, Ohmura Y, Machida T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Ito T, Mori M and **Doki Y**. MUC1, remodeled to express α -gal epitopes immune-based therapy can elicit both significant prolonged survival and effective antibody production against multiple tumor-associated antigens. AACR 101st Annual Meeting, 2010 年 4 月、ワシントン

• **Masahiro Tanemura**, Vaccination with pancreatic cancer cells expressing α -gal epitopes effectively induced immuneresponses against not only differentiated cancer cells but also cancer stem cells. AACR 総会、2011 年 4 月、フロリダ

• **Masahiro Tanemura**, Preliminary experiment of α -gal epitopes immune-based therapy against pancreatic cancer, by tumor cell lysates. AACR 総会、2011 年 4 月、フロリダ

• **Masahiro Tanemura**, A new immunotherapy for pancreatic cancer stem cells by tumor lysate vaccine, expressing α -gal epitopes. AACR 総会、2012 年 4 月、シカゴ

• **Masahiro Tanemura**, Immune-based therapy with tumor lysate, remodeled to express α -gal epitopes induce significant B and T cell responses against pancreatic cancer. AACR 総会、2012 年 4 月、シカゴ

• **Masahiro Tanemura**, A novel immunotherapy for pancreatic cancer stem cells by tumor lysate vaccine, expressing α -gal epitopes. Pancreas Cancer 2012 in Kyoto, 2012 年 10 月、京都

[図書] (計 1 件)

種村匡弘、医学書院、
「レジデントのための消化器外科診療マニュアル」
2012 年発行、総ページ 459 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：膵島の分離方法および膵島組織を保護するための保護液

発明者：種村匡弘

権利者：大塚製薬工場

番号：特願 2010-159053

出願年月日：2010 年 7 月 13 日

国内外の別：国際特許申請中

PCT/JP2011/65997

名称：膵島と脂肪組織由来幹細胞を利用した膵島移植

発明者：種村匡弘

権利者：大阪大学

番号：特願 2010-177993

出願年月日：2010 年 8 月 6 日

国内外の別：国際特許申請中

PCT/JP2011/067992

6. 研究組織

(1) 研究代表者

種村 匡弘 (TANEMURA MASAHIRO)

国立病院機構 呉医療センター・中国がんセンター・外科・外科医長

研究者番号：30379250

(2) 研究分担者

土岐祐一郎 (YUICHIROU DOKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20291445

(2) 研究分担者

三善英知 (EIJI MIYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20322183