

【総説】

肝細胞癌の免疫療法

Immunotherapy for hepatocellular carcinoma

金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学
(第一内科学)

水 腰 英 四 郎

常識を覆した癌免疫療法の成績

今、癌治療において革命が起きようとしている。現代医療では手術、放射線、化学療法が癌の3大治療として行われてきた。癌免疫療法はこうした治療に続く第4の治療として期待が寄せられてきたが、これまでに実際に患者と向き合う臨床医はもちろんのこと、癌の研究者を納得させるに足る治療成績は示されてこなかった。しかしながら、この数年、癌治療に携わる人々の常識を覆すような治療成績が、種々の癌において報告されている。こうした研究成果に基づいて、サイエンス誌によって選ばれた2013年の10の発見・進歩のうち、最も“breakthrough”した研究分野として同誌が取り上げたのは「癌の免疫療法」であった。癌免疫療法はこれまでの癌治療が癌そのものを治療標的としていたのとは異なり、宿主の免疫系をターゲットにしているという意味で革新的な治療方法であり、これまでに開発されてきた癌免疫療法のツールと併せて、パラダイムシフトによる新たな癌治療戦略が形成されようとしている。

本稿では当教室がこれまでに行ってきた肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) の免疫療法の開発を中心に、世界における癌免疫療法の進歩と今後の展開について紹介したい。

HCC の特徴と免疫療法

HCCは肝細胞由来の上皮性悪性腫瘍であり、大部分がB型肝炎ウイルス (HBV) ないしC型肝炎ウイルス (HCV) 感染に伴って生じる慢性肝炎や肝硬変に合併して発症する。一方、近年では、糖尿病や肥満、脂肪肝といった代謝異常がHCCの発症リスクであることが指摘されており、同疾患は今後より重大な健康問題となることが予想されている。

世界的なHCCの多発地域はHBVやHCV感染率の高い地域と一致し、日本、韓国、中国、台湾、東南アジア諸国、イタリアやスペインなどヨーロッパの一部、サハラ砂漠以南のアフリカが好発地帯であり、世界では年間60万人を超える人がHCCによって死亡している。日本国内におけるHCCによる死亡者数は年間約3万5千人であり、悪性新生物の臓器別死亡原因として第4位である。

HCCに対する治療は、他の固形癌と異なり、背景とする肝臓の病態を考慮して治療法を選択するという特殊性を有している。現在行われている治療法は、外科的肝切除、肝移植、ラジオ波焼灼術 (radiofrequency ablation, RFA)、肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、ソラフェニブ療法、肝動注化学療法 (hepatic arterial infusion chemotherapy, HAIC) と多岐にわたり、さらにこれらを組み合わせた治療が行われている。癌が早期に診断され、腫瘍径が小さく肝臓

内に限局している場合、肝臓の機能が十分に保たれていれば外科的切除やRFAは根治的な治療となる可能性がある。しかしながら、HCCを発症する患者では、診断時すでに癌が進行していたり、肝臓の機能が低下していることがあり、こうした根治的な治療を受けることが困難な場合が存在する。また、HCCは障害を受けた肝細胞から発生するために、根治的な治療により現存の腫瘍を除去したとしても、背景にある肝疾患を根治しない限り、高率に再発を繰り返す。以上のことから、現在、HCC患者の予後を改善するために求められている新しい治療方法には、1) 肝臓の機能を温存したまま癌のみに治療効果を示す、2) 進行癌に対してはこれまでの治療とは機序が異なった抗腫瘍効果を発揮する、3) 根治的治療後の再発予防効果を兼ね備えている、といった要素が求められている。免疫療法は理論上、こうした作用機序を有していると考えられることから、HCCに対する新しい治療方法として大きな期待が寄せられている。このような臨床的ニーズに加え、HCCは治療後再発を繰り返し死に至る疾患であり、免疫療法による癌の再発予防効果と長期予後を解析するうえで、最も研究に適した癌腫であるといえる。

腫瘍関連抗原の同定

1991年にBoonらによってメラノーマ抗原であるMAGE遺伝子が同定された。この研究成果は「ヒトの免疫系が自己の体内に発生した癌を異物として認識し、排除する」という現象に対して科学的根拠を示した画期的なものであった。現在では癌に関連する蛋白に由来するペプチドがHLA-class I分子と複合体を形成して細胞表面に発現し、これを細胞傷害性T細胞 (Cytotoxic T cell, CTL) がT細胞レセプター (T cell receptor, TCR) を用いて認識し、癌細胞を除去するというメカニズムが明らかにされている。これまでに、様々な癌拒絶抗原や腫瘍関連抗原ならびにそのT細胞エピトープが同定され、こうした抗原由来の蛋白や核酸、またはそれらのアミノ酸配列を基に合成されたペプチドを用いた治療に応用されている。

こうした治療をHCCに対して確立していくための第一歩は、HCCに発現している抗原を同定することである。HCCは背景にダメージを受けた肝臓を合併していることが多いことから、正常な肝細胞を傷つけずに、腫瘍細胞だけを殺すことができる免疫を誘導できるかどうか、HCCに対する安全で有効な免疫療法の確立につながるかと考えられる。このために、よりHCCに特異的で、免疫原性の高い抗原を発見することが重要である。一般的にHCCは免疫原性の高い腫瘍とは考えられていないが、これまでの研究において、腫瘍内に多くのリンパ球が浸潤しているHCC患者では、治療後の再発のリ

スクが低いことや予後がよいことが報告されている。このことは、HCC患者においても抗腫瘍免疫が存在し、免疫学的機序による腫瘍の進展抑制が行われていることを示唆している。実際に、この10-15年の間に、HCCに発現している腫瘍関連抗原とそのT細胞エピトープが同定され、HCCに対するT細胞の免疫応答が起きていることが証明されている。

このうち、アルファフェトプロテイン(α -fetoprotein, AFP)は、そのCTLエピトープが早くから同定され、免疫反応の解析が進んでいる。AFPは癌胎児性抗原であり、胎生期には体内で産生され、出生後間もなく産生されなくなる蛋白であるが、HCCでは再び産生が認められるようになる。当教室では、HLA-A24拘束性のAFP由来CTLエピトープを同定し、HCC患者においては健康人と比較し、高率に末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)において同エピトープに特異的なT細胞が検出できること、癌が進展するにしたがって、その検出頻度が高くなること、RFAやTACEといった治療を行うと、治療後において、これらのエピトープに特異的なCTLの末梢血でのfrequencyが増加することを報告してきた¹⁾。こうした研究結果は、自己抗原に対しても特異的なCTLがT細胞レパトリーの中に存在し、中枢性もしくは末梢性に排除されていないことを示しており、HCCの免疫療法の有効な標的抗原となりうることを示唆している。

当教室ではAFP以外にもHCCに発現している腫瘍関連抗原をいくつか報告している^{2)~4)}。当教室で同定されたものを含め、現在ではAFP以外にtelomerase reverse transcriptase (TERT), melanoma antigen gene-A (MAGE-A), Glypican-3 (GPC3), NY-ESO-1, Cyclophyrin-B (Cyp-B), SART, p53, MRP3, AKR1C3, WT-1, β -Catenin, Hsp70などが報告されている。これらの中には、CTLエピトープが同定され、HCC患者の末梢血において特異的なCTLの反応が検出できるものも含まれている。さらにAFP, hTERT, GPC3においては、そのCTLエピトープを有するペプチドをワクチンとしてHCC患者に投与する臨床試験が既に行われており、このことについては後に詳細に記載する。

HCC患者における抗腫瘍免疫応答

こうしたCTLエピトープの同定は癌に対する免疫療法に応用できるだけでなく、HCC患者の体内で起こっている免疫現象を解析するのに大いに役立つと考えられる。これまでに当教室では、独自に同定したHCCに特異的なCTLエピトープを用いて、HCC患者の生体内で起き

ている免疫反応を明らかにしてきた(図1)。各種腫瘍関連抗原由来のエピトープに対するHCC患者のCTLの反応の強度をenzyme-linked immuno spot (ELISPOT)アッセイ法で比較解析した研究では、HCC患者のPBMC中の腫瘍関連抗原由来エピトープに特異的なCTLのfrequencyは10-60.5 cells/300,000 PBMCsであり、各エピトープに特異的なCTLをもつ患者の割合も3-19%と高くはなかった⁵⁾。これらの値は、ウイルス由来の外来抗原に対する宿主の免疫応答の強さと比較して弱く、腫瘍の排除には不十分である可能性がある。

各種腫瘍関連抗原由来CTLエピトープに対する免疫応答とHCC患者の臨床背景を比較すると、いくつかの新しい知見を得ることができた。その1つは宿主の免疫応答が腫瘍関連抗原ごとに異なることである。例えば、AFPに対するCTLは進行したHCC症例において、より高率に認められるのに対して、hTERT, SART, MRP3といった抗原に対するCTLは病初期から末梢血において高頻度に検出が可能であった^{2)~4)}。また、CTLの反応をELISPOTアッセイとテトラマーによって同時に解析すると、抗原エピトープに結合はするものの、サイトカインの産生を認めない、いわゆる非機能性のCTLの存在も明らかになった。さらに、HCCの治療であるRFAやTACEを行うと、治療後において腫瘍抗原特異的CTLの末梢血中のfrequencyが増加する一方、手術ではこうした現象が認められないことも明らかになった(図1①)⁶⁾⁷⁾。このことは、腫瘍に対して壊死もしくはアポトーシスを誘導する治療は、生体内での抗腫瘍免疫を増強する可能性を示している。

さらに最近では、RFAによる治療後に腫瘍抗原特異的CTLの末梢血中のfrequencyが高い症例では、低い症例と比較して、有意に治療後の再発率が低いことを明らかにし、HCCの標準治療に免疫療法を加えることによって治療後の再発を抑制できる可能性を示した⁷⁾。これらの研究結果は、HCC患者において免疫療法が有用であることを示唆しており、正しい方法でより強力な抗腫瘍免疫を誘導することができれば、HCCに対する新しい治療方法の確立につながると考えられた。

免疫抑制機構

癌に対する宿主の抗腫瘍免疫が十分に発揮されていない理由にはいくつかの機序が提唱されている。最近では、制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)や骨髄由来抑制性細胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)に代表されるような、癌に対する免疫応答を負の方向へ制御する細胞の存在やその機序が明らかになってきている⁸⁾。こうした細胞群がHCC患者においても同様に存在し、抗腫瘍免疫に対して負の制御を行っていることを当教室において明らかにしてきた(図1②)⁹⁾¹⁰⁾。Tregは最もよく機能解析された免疫抑制細胞であり、多くの研究において、抗腫瘍免疫を抑制することが示されている。HCC患者では、PBMCや腫瘍内浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)の中に、このTregが増加しており、腫瘍の進展に関与している。

もう一方のMDSCはアルギナーゼ活性によってCD4陽性T細胞におけるFoxp3とIL-10を誘導し、こうしたTregの誘導を介してT細胞の機能を抑制することが報告されている。ヒトのMDSCはheterogeneousな集団で、主にgranulocytic CD14陰性とmonocytic CD14陽性サブタイプに分けられるが、当教室からの研究結果を含め、最近の

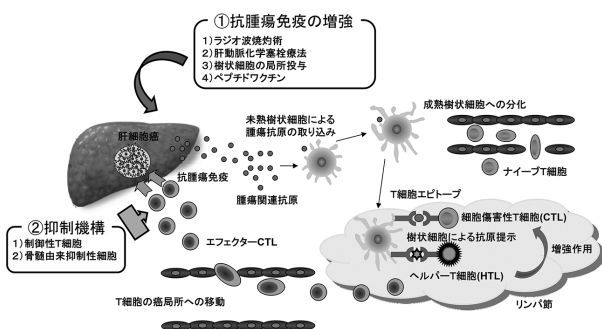


図1. 肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫反応

報告ではCD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSCがHCC患者の末梢血において増加していることが示されている¹⁰⁾。当教室で行った123例のHCC患者の解析では、CD14⁺HLA-DR^{-/low} MDSCの末梢血中frequencyは肝組織の線維化や炎症の程度とは関連を認めなかったが、血中のIL-10濃度やHCCの進展度と相関していた。また、HCCに対するRFA療法によって同細胞のfrequencyは変化し、治療後にfrequencyが低い患者では、治療後再発率が低いことが明らかになった。治療後にMDSCのfrequencyが減少する詳細な機序については未だ明らかにはなっていないが、おそらく腫瘍細胞の絶対数が減少することによって生じる様々な生理的メカニズムに随伴する現象と考えられる。HCC患者におけるMDSCの抑制が、患者予後に貢献するかは今後の重要な検討課題であると考えられる。

残念ながら、現在、このMDSCの機能を直接的に抑制する薬剤や抗体は存在しないが、少数の製剤は早期臨床試験の段階に入っている。今後MDSCのT細胞への抑制機構がより詳細に解明できれば、こうした抑制を解除することによる抗腫瘍免疫の増強効果が得られるようになるかもしれない。

HCC に対する免疫療法

1) 活性化リンパ球療法

癌に対する免疫療法としては、古くから、クレスチンやOK432等を用いた免疫賦活療法、インターフェロンやインターロイキンを用いたサイトカイン療法、活性化リンパ球やサイトカイン誘導キラーT細胞等を用いた免疫細胞療法など、多くの癌腫において様々な手法が試みられてきた。その中でもHCCにおいては2000年に高山らが活性化リンパ球を用いて、外科的切除後の補助療法として投与を行い、その成績を報告している。彼らの報告では、治療切除後の5年無再発生存率を非投与群の22%に対して、活性化リンパ球投与群では38%($p=0.008$)まで有意に改善できるとしている。同様な成績はサイトカイン誘導キラーT細胞を用いたHCC患者の治療においても得られており、これらの結果は、免疫療法がHCCの特徴である根治的治療後の高い再発率を抑制することができる可能性を示唆している。

2) 樹状細胞療法

HCCに対する免疫療法では活性化リンパ球を用いた方法の他に、樹状細胞を用いた試みがなされている。樹状細胞は生体内に存在する最も強力な抗原提示細胞であり、現在は培養技術の進歩により、末梢血中の単球から顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)とインターロイキン-4(IL-4)を用いて樹状細胞を大量に誘導することが可能となっている。米国ではすでに転移性前立腺癌に対するsipuleucel-Tと呼ばれる樹状細胞製剤が食品医薬品局によって認可されている。これはprostatic acid phosphatase(PAP)の融合蛋白を癌抗原として樹状細胞と培養して作製された細胞製剤であり、第3相試験において、同製剤の投与群では非投与群と比較して約4か月の延命効果を示すことが報告されている¹¹⁾。樹状細胞はアポトーシス細胞を認識すると活性化し、成熟化して抗腫瘍免疫を増強することが報告されており、当教室ではこれまでにHCC患者における抗腫瘍免疫を発揮するのに最適な樹状細胞の誘導方法や、生体内への投与方法を基礎研究や安全性臨床試験を行い確立してきた^{12)~14)}。現在、免疫賦活物質であるOK-432を用いて刺激した樹状細胞を肝動脈塞栓療法後に癌局所に投与することに

よって、術後の再発率を抑制できることを明らかにしている¹⁵⁾。こうした樹状細胞による治療方法は他のHCC治療においても応用が可能であり、RFA施行後の癌局所へ樹状細胞を投与する方法の効果を臨床試験において確認中である。

3) ペプチドワクチン

先述したBoonらによるメラノーマ抗原であるMAGE遺伝子の発見以来、世界中で多くの癌腫において、腫瘍抗原由来ペプチドを用いた癌免疫療法の臨床試験が行われるようになった。こうした臨床試験では、一部の症例において癌の消失や進行癌の進展阻止が得られることが報告されているが、一方で完全奏効(CR)や部分奏効(PR)が得られる確率は極めて少ないとする報告もある¹⁶⁾。これまでの世界における臨床試験の報告を俯瞰すると、ペプチドワクチン単独での進行癌に対する有効性は限局的かもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長の可能性や治療後の再発予防効果については十分に期待できる治療方法であり、現在も多くの臨床試験が様々な癌腫において進行中である。

HCCにおいても、これまでにいくつかのペプチドワクチンを用いた臨床試験の結果が報告されている。その1つとして、HLA-A2拘束性AFP由来ペプチドでパルスした樹状細胞を用いたHCCの免疫療法が行われており、10例中6例のHCC患者においてAFPに特異的なCTLが治療後増加したが、腫瘍の縮小効果は認められなかったと報告されている。一方、当教室が独自に開発した日本人向けのHLA-A24拘束性AFP由来ペプチドを用いた20例の進行HCC患者の臨床試験では、CR1例、安定(SD)8例という結果であった。特に、CR例と2年以上にわたってSDを示した症例は、いずれもこれまでに外科的切除、RFA、TACE、HAIC、ソラフェニブ療法といったすべての治療を行ったが無効であった症例であり、こうした症例に上記効果を示したことはHCCに対する同ペプチドワクチンの有効性を十分に感じさせる結果であった¹⁷⁾。同臨床試験におけるペプチドワクチンに起因する有害事象としては、皮下硬結、発熱、消化器症状を認めたが、いずれも軽微なものであり、これらに対しては治療を必要としなかった。他のペプチドワクチンに関するこれまでの有害事象の報告も同様のものであり、今後多数例での詳細な検証が必要ではあるものの、HCCに対するペプチドワクチン療法は比較的安全な治療方法と考えられる。一方、AFP由来のエピトープに関しては、AFPの全長をカバーするオーバーラッピングペプチドによるT細胞の免疫応答の検討が行われており、先に同定されたCTLエピトープ以外にも免疫療法の標的となりうるエピトープが存在することが示唆されている。今後さらに多くのエピトープを同定するとともに、臨床試験によって抗腫瘍効果を発揮する免疫原性の高いエピトープを確認することが必要であると考えている。

AFP以外の腫瘍抗原に関しても、HCCに対してペプチドワクチンによる治療の試みが報告されている。hTERT由来ペプチドワクチンの投与は、cyclophosphamideとの併用で、40例の進行HCC患者に対して行われた。本研究では、ペプチドに対する免疫反応の増強は観察されず、抗腫瘍効果に関しては、CRもしくはPRを示した症例は認められなかったと報告されている。hTERTを標的としたHCCの免疫療法に関しては、今後より免疫原性の強いペプチドの探索が必要と考えられる。

一方、GPC3由来のペプチドに関する研究では、33例の進行HCC患者に対し投与を行い、1例にPR、19例に2か月以上にわたってSDという効果を認めたと報告されている。さらにSDであった19例のうち、4例では腫瘍の壊死や縮小が観察されており、本研究結果は腫瘍関連抗原を標的としたHCCの免疫療法の可能性を支持するものであった。

4) 免疫チェックポイント阻害療法

宿主の免疫応答の過程にはいくつかの免疫チェックポイントが存在し、自己に対する危険な免疫応答を制御している。一方、癌細胞やその微小環境には、宿主の抗腫瘍免疫応答を妨げる機構が存在し、特にT細胞に対する抑制機構は様々な抑制性レセプターを介して行われることが知られている。代表的な分子として、CTLA-4やPD-1が挙げられるが、これらの分子は抗原提示細胞もしくは癌細胞の細胞表面に存在する特異的リガンドとの結合によって、抑制シグナルをT細胞に伝え、T細胞の増殖、サイトカイン分泌、細胞傷害といった機能を抑制する。こうしたT細胞の抑制システムを抗体により抑制することで、より強力な抗腫瘍免疫が得られることが多くの研究結果によって支持されている¹⁸⁾。現在CTLA-4抗体にはipilimumabとtremelimumabがあるが、このうちipilimumabは米国において切除不能または転移性メラノーマに対する治療薬として認可されている。PD-1抗体に関しては、2014年9月に日本においても根治切除不能なメラノーマに対して認可され、実臨床の場において使用が可能となった。現在、HCC患者におけるこうした抗体のまとまった治療成績は報告されていないが、今後臨床試験のデータがでてくるものと考えられる。また、こうした免疫チェックポイント分子に対する抗体薬は、それ自体で驚異的な治療効果が報告されているが、免疫学の理論から考えれば、これまでに癌免疫療法の研究領域において開発が行われてきたペプチドワクチンや樹状細胞療法などとの組み合わせにより、より相乗的な効果が期待できると思われる。

5) T細胞レセプターを用いた治療

メラノーマなどでは、RosenbergらがTILを用いた腫瘍特異的T細胞輸注療法を試み、その有効性を報告している。とりわけT細胞輸注前に、患者に対し免疫抑制剤の投与および放射線全身照射を行うことにより、同療法の効果が著しく増加するとされており、こうした処置を行った患者では50%近い有効性が認められたと報告している。しかしながら、腫瘍特異的TCRをもち、抗腫瘍効果を発揮するT細胞の数は生体内では限られており、そういった細胞を人工的に分離し、大量に培養することには困難がある。このことが、腫瘍特異的T細胞輸注療法が、一部の例外を除いてメラノーマの症例に適用が限定されている理由の1つである。

こうした問題点を克服するために、近年、腫瘍特異的T細胞からTCR遺伝子を取得し、患者末梢血から得られたリンパ球に遺伝子導入することによって、人工的に腫瘍特異的T細胞を作製、大量培養し輸注するといった治療法が行われるようになった。先述したRosenbergらのグループは、癌抗原MART-1特異的TCRを導入したT細胞を用いた臨床試験において、腫瘍縮小効果を報告している¹⁹⁾。

現在、各種の癌において腫瘍抗原特異的TCRが取得されている。HCCでは未だ腫瘍抗原特異的TCRを用いた臨

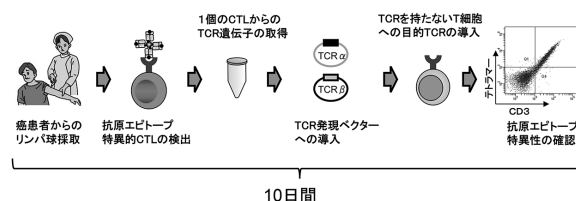


図2. T細胞レセプターの迅速クローニングシステム（文献17より一部改変）

床試験成績の報告はないが、当教室では富山大学免疫学教室との共同研究において、TCRの迅速クローニングシステムを開発し、すでにAFPとhTERT特異的TCRの取得に成功している（図2）¹⁷⁾。この迅速クローニングシステムは、抗原エピトープに特異的なCTLを単一細胞レベルで分離し、そこからTCR遺伝子をクローニングした後、その抗原エピトープに対する特異性を確認するまでの一連の作業を10日間で行える技術である。従来の方法では約2ヶ月を要したのに比べ、短時間でTCRのクローニングができること、単一細胞レベルでのクローニングが可能であることから、従来では取得できなかったマイナーなTCRも取得できるところが優れている。本手法にて取得したAFP特異的TCRは、先述したAFP由来ペプチドワクチンを投与し、癌の完全消失が得られた症例と多発肺転移と腹膜播種を認めながらも、2年以上にわたって腫瘍の進行が抑制された症例のAFP特異的T細胞からクローニングしたTCR遺伝子である。同遺伝子を導入した健康人のリンパ球は、同TCRが認識するエピトープを発現する標的細胞に対し、高い細胞傷害活性を示すことが確認されており、今後同TCRを用いたHCCの免疫療法への応用が期待される。

一方、T細胞に抗原特異的な抗腫瘍活性を付与する方法として、抗体の抗原反応性ドメインとT細胞がもつ細胞表面分子であるCD3ζ分子の細胞内シグナル伝達ドメインとのキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor, CAR)遺伝子を患者リンパ球に遺伝子導入する手法も行われている。開発初期には有効性が認められなかった本治療法も、現在はCD28や4-1BBなどのT細胞共刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加することによって、治療成績の向上が報告されている。特にB細胞リンパ腫の治療においては、抗CD19 CARを用いた治療の有効性が報告されており、今後HCCを含めた固形癌の治療にも大きな期待が寄せられている²⁰⁾。

癌免疫療法の開花期

これまで述べてきたように、近年の抗腫瘍免疫に関する研究は格段の進歩を遂げており、その成果の臨床応用という点ではまさに開花期を迎えている。HCCの免疫療法の領域においても今後さらなる発展が予想され、特にCTLエピトープ由来のペプチド、CARを含めたTCR、免疫チェックポイントに関する抗体を用いた治療方法の開発には、HCCの再発予防や進行HCCの新しい治療として大きな期待が寄せられている。より免疫原性の強い腫瘍関連抗原由来T細胞エピトープの同定や、腫瘍による抗腫瘍免疫抑制機構の更なる解明が新しい免疫療法の開発に重要であり、こうした研究成果に基づいた複合的な免疫療法の開発が将来の癌治療に貢献すると考えられる。

謝 辞

本総説の執筆にあたり研究のご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学（第一内科）の金子周一教授ならびに教室員、関係の先生方に深甚なる謝意を表します。また、執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長 井関尚一教授ならびに関係の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tsuji H, Yamashita T, Kaneko S: Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma, *Int J Cancer*, 118:1194-1204, 2006
- 2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S: Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 43:1284-1294, 2006
- 3) Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma, *J Hepatol*, 49:946-954, 2008
- 4) Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma, *Liver Int*, 32:1516-1526, 2012
- 5) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 53:1206-1216, 2011
- 6) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma, *Int J Cancer*, 126:2164-2174, 2010
- 7) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Arihara F, Kagaya T, Fushimi K, Kaneko S: Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 57:1448-1457, 2013
- 8) Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ: Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion, *Science*, 331:1565-1570, 2011
- 9) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett*, 307:165-173, 2011
- 10) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis, *Cancer Immunol Immunother*, 62:1421-1430, 2013
- 11) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, Xu Y, Frohlich MW, Schellhammer PF: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer, *The New England journal of medicine*, 363:411-422, 2010
- 12) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety, *Clin Exp Immunol*, 147:296-305, 2007
- 13) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation, *Cancer Immunol Immunother*, 63:347-356, 2014
- 14) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma, *Int Immunopharmacol*, 21:346-353, 2014
- 15) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization, *Clin Exp Immunol*, 163:165-177, 2011
- 16) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines, *Nat Med*, 10:909-915, 2004
- 17) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A: A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of patients with cancer within 10 days, *Nat Med*, 19:1542-1546, 2013
- 18) Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q, Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Szol M: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma, *The New England journal of medicine*, 369:122-133, 2013
- 19) Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes, *Science*, 314:126-129, 2006
- 20) Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan DA, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA: Chemotherapy-Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Indolent B-Cell Malignancies Can Be Effectively Treated With Autologous T Cells Expressing an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor, *J Clin Oncol*, in press, 2014,