

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名 : (日本語) 難治性神経芽腫に対する分化誘導療法併用下でのエピジェネティック治療開発  
(英語) Development of epigenetic therapy against refractory neuroblastoma with a differentiating agent
- 研究開発担当者  
所属 役職 氏名 : (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 エピゲノム解析分野  
分野長 牛島 俊和  
(英語) Toshikazu Ushijima, Chief  
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute
- 実施期間 : 平成 26 年 7 月 11 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究  
開発課題名 : (日本語) エピジェネティック治療奏効の分子機構の解明と治療効果マーカーの開発  
(英語) Molecular mechanism of the response to epigenetic therapy and development of the marker for therapeutic efficacy
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名 : (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 エピゲノム解析分野  
分野長 牛島 俊和  
(英語) Toshikazu Ushijima, Chief  
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名 : (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 エピゲノム解析分野  
研究員 服部 奈緒子  
(英語) Naoko Hattori, Staff Scientist  
Division of Epigenomics, National Cancer Center Research Institute

- 分担研究  
開発課題名： (日本語) DAC+TBT 療法の臨床開発  
(英語) Investigator-initiated trial of a combination of DAC and TBT
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 東病院 小児腫瘍科  
医長 河本 博  
(英語) Hiroshi Kawamoto, Assistant Chief  
Department of Pediatric Oncology, National Cancer Center Hospital  
East
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 東病院 臨床研究支援部門  
部門長 佐藤 暁洋  
(英語) Akihiro Sato, Chief  
Clinical Research Support Office, National Cancer Center Hospital  
East
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 東病院 臨床研究支援部門  
研究実施管理部 治験事務室 室長 尾崎 雅彦  
(英語) Masahiko Ozaki, Section Head  
Clinical Trial Administration Section, Clinical Research  
Coordinating Division, Clinical Research Support Office, National  
Cancer Center Hospital East
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 臨床薬理部門  
部門長 濱田 哲暢  
(英語) Akinobu Hamada, Chief  
Department of Clinical Pharmacology, National Cancer Center  
Research Institute
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 地方独立行政法人大阪市民病院機構 大阪市立総合医療センター  
副院長 原 純一  
(英語) Junichi Hara, Deputy Director  
Pediatric Hematology and Oncology, Osaka City General Hospital
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 地方独立行政法人大阪市民病院機構 大阪市立総合医療センター  
医長 仁谷 千賀  
(英語) Chika Nitani, Chief Physician  
Pediatric Hematology and Oncology, Osaka City General Hospital
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人九州大学 医学研究院 小児外科学分野  
教授 田口 智章  
(英語) Tomoaki Taguchi, Professor  
Department of Pediatric Surgery Reproductive and Developmental  
Medicine Graduate School of Medical Sciences Kyushu University
- 研究開発分担者  
所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人金沢大学 先端医療開発センター  
特任教授 吉村 健一

(英 語) Kenichi Yoshimura, Professor  
Innovative Clinical Research Center, National University  
Corporation Kanazawa University

研究開発分担者 (日本語) 学校法人東京女子医科大学 東京女子医科大学病院 薬剤部  
所属 役職 氏名 : 部長 木村 利美

(英 語) Toshimi Kimura, Director  
Department of Pharmacy, Tokyo Women's Medical University  
Hospital

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究支援センター  
所属 役職 氏名 : 生物統計部 研究員 野村 尚吾

(英 語) Shogo Nomura, Researcher  
Biostatistics Division, Center for Research Administration and  
Support, National Cancer Center

分 担 研 究 (日本語) MDSC 分化誘導効果の探索

開 発 課 題 名 : (英 語) Analysis of the effect of TBT on MDSC differentiation

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 中央病院 先端医療科  
所属 役職 氏名 : 医員 北野 滋久

(英 語) Shigehisa Kitano, Assistant Chief  
Division of Cancer Immunotherapy, Department of Experimental  
Therapeutics, National Cancer Center Hospital

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

#### 1) 医師主導治験

##### I. 平成 26 年度の成果

###### 【研究体制の構築と IRB 承認】

研究採択確定後の平成 26 年 8 月から 10 月にかけて、TBT の小児用製剤の準備、最初の治験の試験資料を作成した。10 月から平成 27 年 3 月までに、支援組織の準備・TBT 小児用製剤準備・薬物動態測定準備・各種契約を終了した。また、IRB 承認（国立がん研究センター・大阪市立総合医療センター・九州大学）を得て、平成 27 年 3 月 10 日付けで治験開始届けを終了した。

##### II. 平成 27 年度の成果

###### 【TBT 単剤第 I 相試験の実施】

平成 27 年 4 月より症例登録を開始し、TBT 単剤第 I 相試験を、2 週内服・2 週休薬のレジメンで実施した。レベル 1 (6 mg/m<sup>2</sup>)で 3 例、レベル 2 (8 mg/m<sup>2</sup>)で 3 例、レベル 3 (10 mg/m<sup>2</sup>)で 7 例に関して行った。その結果、H28 年度初期までに、2 週内服・2 週休薬レジメンでは、最大投与量レベル 3 (10 mg/m<sup>2</sup>)まで達成した。

###### 【追加コホートの設定と実施】

先述した 2 週内服・2 週休薬のレジメンでは、開始後 2 コホート中、多くの症例で、TBT 投与中の炎症反応の軽減が観察されたものの、休薬に伴う症状・炎症反応の再燃がみられた。投与期間の延長による休薬期間の短縮、もしくは増量による曝露量・時間の増量探索が必要と考えられた。

前臨床・基礎グループと連携をとり、非臨床試験を実施した。その結果に基づいて、平成 27 年 6 月 12 日に PMDA と事前面談を行い、3 週内服・1 週休薬のレジメン追加コホートを設定することとなった。平成 28 年 3 月から、TBT 単剤第 I 相試験の追加コホートをレベル 3' (10 mg/m<sup>2</sup>)で 3 例に関して行った。

##### III. 平成 28 年度の成果

###### 【追加コホートの実施】

引き続き、TBT 単剤第 I 相試験の追加コホートを行い、3 週内服・1 週休薬レジメンで、レベル 3' (10 mg/m<sup>2</sup>)で 3 例、レベル 4' (12 mg/m<sup>2</sup>)で 6 例を実施した。最終登録は、平成 29 年 9 月であった。その結果、3 週内服・1 週休薬レジメンでも、最大投与量レベルレベル 4' (12 mg/m<sup>2</sup>)まで達し、推奨用量と決定した。

###### 【血漿中 TBT 濃度測定】

TBT 単剤第 I 相試験の血漿中 TBT 濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。検量線、QC 試料およびキャリーオーバーは許容基準を満足したことから、実試料は問題なく測定された。また、ISR の結果も許容基準を満足し、別日に実試料を測定したときの再現性が認められた。更に、TBT および DAC の長期安定性の試験も許容基準を満足し、いずれの化合物も凍結保存下の血漿中で 20 ヶ月間は安定であることが明らかとなった。

## 【骨髄由来細胞の分化誘導作用の解析】

TBT は骨髄由来細胞の分化誘導作用を示すことが知られており、その作用機序の1つとして、免疫抑制細胞など免疫担当細胞への作用が考えられている。そこで、TBT 単剤第 I 相試験の血液検体を用いて、免疫担当細胞ポピュレーションの変化を追跡し、治療効果との関連性を検証した。凍結した PBMC の 2 例について、各種免疫担当細胞ポピュレーションをマルチカラーフローサイトメーターにて解析した。その結果、T 細胞などの各種 Lineage 細胞の割合に関しては、投与による大きな変化は観察されなかったが、骨髄由来抑制細胞の割合が投与後に減少している傾向が観察された。

## 2) 奏効の分子機構と治療効果マーカー

### I. 平成 26 年度の成果

#### 【低用量 TBT の *in vivo* での検討】

*in vitro* の実験においては、TBT は 13-*cis*-RA の 1/10 倍以下の濃度で、分化誘導効果が発揮される。そこで、平成 26 年度後半から平成 27 年にかけて、マウス移植腫瘍を用いて、低用量 TBT (2 mg/kg) の腫瘍増殖抑制効果の解析および分化誘導能の確認を行った。その結果、劇的な腫瘍減少効果と分化マーカーの発現上昇が観察された。

#### 【前臨床データの拡充】

平成 26 年度後半から平成 27 年にかけて、すでに取得していた前臨床データの拡充を目的として、神経芽腫 7 細胞株についての TBT および DAC による増殖抑制効果、分化誘導効果を確認した。また、TBT+DAC の併用効果についても検証を行った。

### II. 平成 27 年度の成果

#### 【奏効性分子機構の解明】

DNA 脱メチル化剤は DNA 脱メチル化の程度が軽度であっても奏効するが、その機構は分かっていない。そこで、その理由は、個々の細胞ごとに様々な遺伝子群が完全に脱メチル化・正常化され、その結果として各種パスウェイが正常化されているためであると仮説をたてた。その証明のため、大腸がん細胞株を DAC 処理後クローン化、個々の細胞の状態を観察可能とした。その後クローンごとのゲノム網羅的なメチル化解析を行い、クローンごとに異なる遺伝子群に完全な脱メチル化が誘発されていることを明らかにした。このことから、DNA 脱メチル化治療には個々の細胞ごとに異なるものの各種パスウェイが正常化されていることが重要であるということが示唆され、エピジェネティック治療全般につながるコンセプトが得られた。

神経芽細胞腫については、4 個の細胞株の DAC 処理を行い、脱メチル化されている遺伝子群のオントロジー解析から、神経機能・神経分化・アポトーシスパスウェイが濃縮されていることを明らかにした。このことは、神経芽腫において、脱メチル化剤の奏効には、これらパスウェイの正常化が必要であることを示唆している。

#### 【追加コホート設定のための非臨床研究】

医師主導治験で、投与期間の延長を検討する必要が生じたことから、*in vitro* において、3 パターンの TBT 処理期間について分化誘導効果および細胞数減少効果を検討した。十分な濃度の TBT で処理した場合は、休薬期間を設けても連続投与と変わらず分化誘導及び細胞数の減少は維持されていることを見いだした。

#### 【奏効性マーカーの開発】

DAC 奏効性のマーカーを分離するため、CIMP 標的遺伝子 200 個から、治療標的ともなり得る TNF パスウェイに関わる *SECTM1*, アポトーシスに関わる *BCL2L10*, 神経分化に関わる *S100A6* を抽出した。TBT+DAC 併用奏効性のマーカーを分離するため、TBT+DAC 処理細胞の DNA メチル化解析および遺伝子発現解析の統合解析を行った。結果的に、すでに同定していた CIMP 標的遺伝子が抽出され、効果マーカーとしての有用性が立証された。

### III. 平成 28 年度の成果

#### 【奏効性マーカーの開発】

平成 27 年度で同定したマーカーに関して、マウス移植腫瘍モデルの採取腫瘍を用いて、これらマーカーの発現上昇と脱メチル化を確認した。

#### 【血中遊離 DNA を用いた DNA メチル化解析】

DAC 治療に反応した細胞由来の末梢血遊離 DNA のメチル化解析を目的として、がん細胞を *in vitro* で DAC 処理後、DNA 脱メチル化効果を i)生存細胞、ii)治療に反応した浮遊細胞、iii)メディアウム中の遊離 DNA (治療に反応して死滅した細胞由来) で測定する系を確立した。末梢血遊離 DNA ではより高度の脱メチル化が誘発されており、NB-1 細胞株に関しては、奏効性マーカーの候補となりうる、死滅した細胞で脱メチル化されている 2,910 遺伝子を同定した。

また、マウス移植腫瘍モデルを用いて、治療群マウス血漿中のヒト細胞由来 DNA の検出と低メチル化の確認を行った。

さらに、血中遊離 DNA を用いた新規 DNA 脱メチル化解析法を開発するために、膵がん患者の血漿サンプルを用いて、遊離 DNA を抽出することに成功した。また、その長さはヌクレオソームと一致する 130-150 bp であることを確認した。

### 英文

#### 1) Investigator-initiated trial

##### I. Achievement in 2014

#### 【Establishment of research system and approval by IRB】

From August to October, 2014, we started the drug formulation of TBT for children, and the preparation of documents for clinical trials. From October, 2014 to March, 2015, the establishment of research support system, the drug formulation of TBT for children, the preparation of pharmacokinetic analysis were completed. Also, we obtained IRB approval in National Cancer Center, Osaka City General Hospital, and Kyusyu University, and submitted the notification of clinical trial on March 10, 2015.

##### II. Achievement in 2015

#### 【Investigator-initiated phase I trial of TBT】

From April, 2015, the registration of an investigator-initiated phase I trial of TBT had been started. We treated three cases as level 1 (6 mg/m<sup>2</sup>), three cases as level 2 (8 mg/m<sup>2</sup>), and seven

cases as level 3 (10 mg/m<sup>2</sup>) under the regimen of 2-week oral administration and 2-week washout. Finally, the maximum dose was reached to level 3 (10 mg/m<sup>2</sup>) under this regimen.

#### **【Planning and conduct of the additional cohort】**

Although many patients who received the regimen of 2-week oral administration and 2-week washout showed the reduction of inflammation response during administration period, the symptom flare up was observed during washout period. We had decided that the increase of TBT intake should be required by prolongation of administration period, shortening of washout period, or increase of administration dose or period. Based on the data of preclinical study as mentioned below, we had the pre-interview with PMDA on June 12, 2015, and had decided to conduct the additional cohort with the regimen of 3-week oral administration and 1-week washout. In 2017, three cases were registered for level 3' (10 mg/m<sup>2</sup>) in this regimen.

### III. Achievement in 2016

#### **【Conduct of the additional cohort】**

For the additional cohort, three cases and six cases were registered as level 3' (10 mg/m<sup>2</sup>) and level 4' (12 mg/m<sup>2</sup>), respectively. We had completed additional cohort and had determined the recommended dose at 12 mg/m<sup>2</sup> in the regimen of 3-week oral administration and 1-week washout.

#### **【TBT pharmacokinetic analysis】**

We analyzed pharmacokinetics of TBT using the plasma from the patients of TBT-phase I trial using LC-MS/MS. Since the calibration curve, the QC samples, and the ISR data passed acceptance criteria, it was concluded that the analysis system could be used for clinical specimen with high reproducibility. We also conducted the stability check of TBT and DAC, and found that these compounds were stable for 20 months in frozen plasma.

#### **【Analysis of the effect of TBT on differentiation of bone marrow-derived cells】**

It is known that TBT induces differentiation of bone marrow-derived cells, and one of the mechanisms is the role of immunocompetent cells such as suppressor cells. In 2014, we measured myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and lymphocyte subsets using the plasma from the patients of TBT-phase I trial. Although there were no changes in the population of lineage cells, including T-cell, by TBT administration, it seemed that MDSC was decreased by TBT treatment.

### 2) Analysis of molecular mechanisms and development of biomarker for drug response

#### I. Achievement in 2014

#### **【Effect of low-dose TBT *in vivo*】**

We have already revealed that neuroblastoma differentiation could be induced by low-dose TBT that is one-tenth of 13-*cis*-retinoic acid *in vitro*. In 2014, we analyzed tumor suppressive effect of low-dose TBT (2 mg/kg) *in vivo* using xenograft model of NB-1 cells. It is revealed that low-dose TBT could suppress tumor growth significantly without any severe side-effects, and that

the differentiation markers (*NTRK2* and *NGFR*) were up-regulated in the tumor treated with low-dose TBT.

#### **【Establishment of preclinical data】**

Seven additional cell lines were used to analyze tumor suppressive effect and differentiation effect by the combination of TBT and DAC. We discovered that prolonged washout period enhanced the effect of DAC, and had established an optimal schedule of TBT and DAC administration.

## **II. Achievement in 2015**

#### **【Analysis of the molecular mechanism of DAC response】**

It is still unclear that the molecular mechanism why DNA demethylating agent shows response even the demethylation induction is mild. We hypothesized that although, in bulk cells, demethylation does not seem to be completely induced, in individual cell, demethylation are completely induced, leading to the normalization of cancer-related pathways. To prove this hypothesis, the clones of colorectal cancer cell lines after DAC treatment were established. We analyzed genome-wide DNA methylation of each clones, and found that complete demethylation was induced in different gene sets, which were specific to each clones. These data indicate that normalization of cancer-related pathways in individual cell might be important for the response of epigenetic therapy.

To reveal which genes are demethylated by DAC in neuroblastoma cell lines, genome-wide DNA methylation analyses was performed using four cell lines. We compared untreated cells and treated cells, and performed GO and KEGG pathway analyses focusing on the 168 genes with CGI located at TSS200 and enhancer. The first term of hypomethylated genes was neurological system process, and the genes involved in neuroactive ligand-receptor interaction pathways were also enriched. These data indicate that in neuroblastoma, the genes involved in neuronal function might be aberrantly methylated and preferentially demethylated by DAC, and that DNA demethylation therapy might be effective to induce neuron differentiation.

#### **【Pre-clinical study for the additional cohort of TBT-phase I】**

Based on the response of first cohort of TBT-phase I, the change of TBT regimen was required. To reveal the effect of differentiation by different schedules, we treated NB-1 cell line, and found that, compared with the sequential administration, the levels of differentiation and cell growth suppression were maintained at the same level by the pulse administration.

#### **【Development of biomarkers for drug response】**

To isolate the markers reflecting DAC response, we conducted genome-wide DNA methylation analysis, and found that 262 genes were heavily methylated in multiple neuroblastoma cell lines and demethylated by DAC. Also, to identify the marker reflecting TBT+DAC response, the comparative analysis using methylation data and expression data was performed, and 18 genes were selected as the genes up-regulated by a combined therapy. Among the 18 genes, the expressions of 6 genes were highly induced by a combination compared with TBT single treatment. *SECTM1* (TNF pathway gene), *BCL2L10* (apoptosis-related gene), and *S100A6*



(neuron differentiation-associated genes) were included in the 6 genes, meaning that these were the target of epigenetic-based differentiation therapy, and might become promising markers to monitor therapeutic effect.

### III. Achievement in 2016

#### 【Development of biomarker for drug response】

To test the ability of marker candidates, we analyzed DNA methylation level of *SECTM1* in the tumors of xenograft model. In mock-treated tumors, the promoter methylation level of *SECTM1* was almost 100%, while in DAC-treated and TBT+DAC-treated tumors, that was around 40 and 60%, respectively, showing that *SECTM1* can be used to monitor demethylation level in clinical samples.

#### 【DNA methylation analysis using cell-free DNA】

To analyze DNA methylation using cell-free DNA that is mainly originated from responder cells to therapy, we treated NB-1 cells with DAC, and analyze genome-wide DNA methylation in i) surviving cells, ii) floating-cells, and iii) cell-free DNA in the media. The number of demethylated genes in cell-free DNA was higher than that in surviving cells, and 2,910 genes were isolated as demethylated genes in cell-free DNA, meaning that these genes are the candidates of a biomarker for DAC response. Also, we discovered the presence of human DNA in the plasma from mice which were bearing xenograft tumors and treated with DAC, and found that repetitive sequence (LINE1) of human DNA was demethylated in cell-free DNA. Moreover, to develop a novel method for demethylation analysis, we succeeded to extract cell-free DNA from the plasma of pancreatic patients, and confirmed that DNA length is around 130 - 150 bp, that is similarly to the DNA wrapping with a nucleosome.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3 件、国際誌 12 件）

1. Matsuura T, Yoshimaru K, Yanagi Y, Esumi G, Hayashida M, Taguchi T. Massive pulmonary hemorrhage before living donor liver transplantation in infants. *Pediatr Transplant*. 2016, 20, 89-95.
2. Matsuura T, Takahashi Y, Yanagi Y, Yoshimaru K, Yamamura K, Morihana E, Nagata H, Uike K, Takada H, Taguchi T. Surgical strategy according to the anatomical types of congenital portosystemic shunts in children. *J Pediatr Surg*. 2016, 51, 2099-2104.
3. Matsuura T, Yoshimaru K, Yanagi Y, Esumi G, Hayashida M, Taguchi T. Insufficient portal vein inflow in children without major shunt vessels during living donor liver transplantation. *Ann Transplant*. 2016, 21, 373-379.
4. Satoh S, Takatori A, Ogura A, Kohashi K, Souzaki R, Kinoshita Y, Taguchi T, Hossain MS, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. Neuronal leucine-rich repeat 1 negatively regulates anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *Sci Rep*. 2016, 6, 32682.

5. Yoshimaru K, Matsuura T, Hayashida M, Kinoshita Y, Takahashi Y, Yanagi Y, Esumi G, Taguchi T. Transient hyperphosphatasemia after pediatric liver transplantation. *Pediatr Int*. 2016, 58, 726-731.
6. Kuda M, Kohashi K, Yamada Y, Maekawa A, Kinoshita Y, Nakatsura T, Iwamoto Y, Taguchi T, Oda Y. FOXM1 expression in rhabdomyosarcoma: a novel prognostic factor and therapeutic target. *Tumour Biol*. 2016, 37, 5213-5223.
7. Kohashi K, Tanaka Y, Kishimoto H, Yamamoto H, Yamada Y, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. Reclassification of rhabdoid tumor and pediatric undifferentiated/unclassified sarcoma with complete loss of SMARCB1/INI1 protein expression: three subtypes of rhabdoid tumor according to their histological features. *Mod Pathol*. 2016, 29, 1232-1242.
8. 田口智章. 小児外科領域の臨床研究：難治性疾患から TR まで（第 15 回臨床研究セミナー 第 3 部外科臨床研究の実践）. 日外会誌. 2016, 117, 236-238.
9. 田口智章, 宗崎良太, 木下義晶, 田尻達郎. "外科治療の役割と考え方特集 小児固形がんの最新のトピックス". 小児外科. 2016, 48, 1160-1168.
10. 木下義晶. 横紋筋肉腫 小児がん診療ガイドライン. 日本小児血液・がん学会. 2016, 251-300.
11. Tada K, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Katayama N, Boku N, Heike Y, Hamaguchi T. Pretreatment immune status correlates with progression-free survival in chemotherapy-treated metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Res*. 2016, 4, 592-599.
12. Hatogai K, Kitano S, Fujii S, Kojima T, Daiko H, Nomura S, Yoshino T, Ohtsu A, Takiguchi Y, Doi T, Ochiai A. Comprehensive immunohistochemical analysis of tumor microenvironment immune status in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016, 7, 47252-47264.
13. Kim Y, Kobayashi E, Kubota D, Suehara Y, Mukaihara K, Akaike K, Ito A, Kaneko K, Chuman H, Kawai A, Kitano S. Reduced argininosuccinate synthetase expression in refractory sarcomas: Impacts on therapeutic potential and drug resistance. *Oncotarget*. 2016, 7, 70832-70844.
14. Nakamura Y, Kitano S, Takahashi A, Tsutsumida A, Namikawa K, Tanese K, Abe T, Funakoshi T, Yamamoto N, Amagai M, Yamazaki N. Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy. *Oncotarget*. 2016, 7, 77404-77415.
15. Yamashita M, Kitano S, Aikawa H, Kuchiba A, Hayashi M, Yamamoto N, Tamura K, Hamada A. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flowcytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 2016, 6, 19772.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Preclinical study of epigenetic drug-based differentiation therapy for neuroblastoma, ポスター, Hattori N, Mori A, Kimura K, Kubo E, Asada K, Kawamoto H, Ushijima T, Annual Meeting of AACR, 2016/4/19, 国外.
2. 肺がんにおける腫瘍細胞率予測 DNA メチル化マーカー開発, ポスター, 久保絵美, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2016/5/19, 国内.
3. Establishment of the combination strategy of a DNA demethylating agent and a cytotoxic drug for gastric cancer, 口頭, Hattori N, Nakamura Y, Mori A, Yashiro M, Ushijima T, 26th Seoul International Cancer Symposium, 2016/6/17, 国外.

4. Identification of a DNA methylation marker to estimate cancer cell content in lung cancer, 口頭, Kubo E, Takeshima H, Ushijima T, 26th Seoul International Cancer Symposium, 2016/6/17, 国外.
5. 肺がんにおける腫瘍細胞率予測 DNA メチル化マーカー開発, ポスター, 久保絵美, 竹島秀幸, 生島俊和, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内.
6. DNA methylation and epigenetic changes in gastric cancer: From bench to bedside, 口頭, Ushijima T, The 41st European Society for Medical Oncology Congress (ESMO 2016), 2016/10/8, 国外.
7. 神経芽腫に対する DNA 脱メチル化治療の前臨床研究, 口頭, 服部奈緒子, 第 23 回神経芽腫研究会, 2016/10/29, 国内.
8. 肺がんにおける腫瘍細胞率予測 DNA メチル化マーカー開発, 久保絵美, 第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ, 2016/11/29, 国内.
9. Clinical outcome of laparoscopic surgery for neuroblastoma in children: A single-institution experience, 口頭, Souzaki R, Obata S, Jimbo T, Kinoshita Y, Hashizume M, Taguchi T, IPEG2016, 2016/5/26-28, 国内.
10. Creating Three-Dimensional full size models based on preoperative CT images for laparoscopic adrenalectomy and liver biopsy in a case demonstrating adrenal neuroblastoma with liver metastasis, ポスター, Souzaki R, Kinoshita Y, Kawakubo N, Jimbo T, Obata S, Koga Y, Hashizume M, Taguchi T, ANR2016, 2016/6/19-23, 国外.
11. Natural antibody against neuroblastoma of the TH-MYCN transgenic mice has CDC activity, ポスター, Kawakubo N, Harada Y, Ishii M, Souzaki R, Kinoshita Y, Yonemitsu Y, Taguchi T, ANR2016, 2016/6/19-23, 国外.
12. Development of combination therapy with ZNKTM and anti-GD2 antibody for advanced neuroblastoma, ポスター, Ishii M, Kawakubo N, Sozaki R, Kinoshita Y, Harada Y, Yonemitsu Y, Taguchi T, ANR2016, 2016/6/19-23, 国外.
13. Laparoscopic Surgery for Neuroblastoma, ポスター, Taguchi T, Souzaki R, Kinoshita Y, 31st Congress of The Egyptian Paediatric Surgical Association · International Paediatric Endosurgery Group Middle East Chapter, 2016/11/30-2016/12/2, 国外.
14. New technology in Pediatric Surgical Oncology, 口頭, Taguchi T, Souzaki R, Kinoshita Y, 31st Congress of The Egyptian Paediatric Surgical Association · International Paediatric Endosurgery Group Middle East Chapter, 2016/11/30-2016/12/2, 国外.
15. New Technology in Pediatric Surgical oncology, 口頭, Taguchi T, Pediatric Surgery Update Symposium, 2017/3/ 31- 2017/4/1, 国外.
16. 免疫チェックポイント阻害剤の開発と TR 研究, 口頭, 北野滋久, 第 105 回日本病理学会総会, 2016/5/12, 国内.
17. がん免疫療法の進歩～免疫チェックポイント阻害剤を中心に～, 口頭, 北野滋久, 第 22 回呼吸器外科セミナー, 2016/5/14, 国内.
18. 免疫抑制細胞のバイオマーカーとしての意義, 口頭, 北野滋久, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016/5/31, 国内.
19. 治療薬開発への基礎的アプローチ, 口頭, 北野滋久, 第 49 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2016/7/15, 国内.
20. 免疫チェックポイント阻害剤～過去、現在、今後の展望～, 口頭, 北野滋久, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 教育講演, 2016/7/28, 国内.

21. 免疫チェックポイント分子, 口頭, 北野滋久, 第 20 回日本がん免疫学会, 2016/7/28, 国内.
22. 免疫, 口頭, 北野滋久, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/29, 国内.
23. 免疫抑制因子の解除と複合免疫療法, 口頭, 北野滋久, 第 20 回日本がん免疫学会, 2016/7/29, 国内.
24. 複合的がん免疫療法—複合/併用療法の科学的基盤と開発戦略—, 口頭, 北野滋久, 第 20 回日本がん免疫学会, 2016/7/28, 国内.
25. 免疫チェックポイント阻害剤の副作用管理 腫瘍内科医の立場から, 口頭, 北野滋久, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
26. 進化するがん治療とがん医療」正しく学ぶ最新のがん免疫療法, 口頭, 北野滋久, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 市民公開講座, 2016/7/30, 国内.
27. 分子標的薬のアニユアルレビュー 「癌における複合的免疫療法の動向」, 口頭, 北野滋久, 第 44 回日本臨床免疫学会総会, 2016/9/10, 国内.
28. “Recent Advances in Cancer Immunotherapy” 「Immunomonitoring in Cancer Immunotherapy」, 口頭, 北野滋久, 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016/10/20, 国内.
29. バイオマーカーによる最適化免疫療法, 口頭, 北野滋久, 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 2016/10/22, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し