

200500728A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

新規癌胎児性抗原を利用した
肝細胞癌の診断と治療に関する研究

平成17年度 研究報告書

主任研究者 西村 泰治

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 構成員名簿	-----	1
II. 平成17年度総括研究報告		
新規癌胎児性抗原を利用した肝細胞癌の診断と治療	-----	3
主任研究者 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野		西村 泰治
III. 分担研究報告		
1. Glypican-3を標的とした癌の診断および治療方法の開発	-----	9
熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野		西村 泰治、千住 覚
2. 肝細胞癌の免疫療法への応用をめざしたHLA-A2あるいは-A24結合性 Glypican-3 (GPC3) 由来がん拒絶抗原ペプチドの同定	-----	13
国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部		中面 哲也
熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野 (平成17年9月30日まで)		
3. 酸化ストレスと肝細胞障害に関する研究	-----	17
熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学分野		佐々木 裕
4. GPC3の肝細胞癌の外科療法の効果と再発の判定、 および免疫療法への応用	-----	19
国立がんセンター東病院上腹部外科		木下 平
5. 肝細胞がんに対する局所壊死療法後の再発および予後に関する研究	-----	21
国立がんセンター東病院肝胆膵内科		古瀬 純司
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
V. 平成17年度班会議プログラム	-----	27
VI. 研究成果の刊行物・別刷	-----	29

I. 平成17年度構成員名簿

新規癌胎児性抗原を利用した肝細胞癌の
診断と治療に関する研究班

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	西村 泰治	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野	教授
分担研究者	中面 哲也	国立がんセンター東病院臨床開発センター がん治療開発部機能再生室 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学 分野（平成17年9月30日まで）	室長 助手
	佐々木 裕	熊本大学大学院医学薬学研究部 消化器内科学分野	教授
	木下 平	国立がんセンター東病院上腹部外科	外来部長
	古瀬 純司	国立がんセンター東病院肝胆膵内科	病棟医長
研究協力者	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野	助教授

II. 平成17年度総括研究報告

新規癌胎児性抗原を利用した肝細胞癌の診断と治療

西村 泰治（熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 教授）

研究要旨

本研究は、肝細胞癌に特異的に高発現する新規癌胎児性抗原として同定したGlypican-3(GPC3)を、癌の診断と治療に利用することを目的とする。本年度の研究により、新たにGPC3とSPARCが早期メラノーマの優れた血清腫瘍マーカーとなることを示すとともに、血清GPC3測定による肝細胞癌の診断における意義を検証すべく検体を収集した。また、GPC3由来のマウスキラーT細胞エピトープペプチドを同定して、免疫療法に関するマウスin vivoモデルを構築し、GPC3を標的とした養子免疫療法および樹状細胞ワクチンの有効性と安全性を証明した。さらに肝細胞癌の免疫療法に臨床応用可能な、肝細胞癌を破壊するヒトキラーT細胞を誘導できるGPC3ペプチドを2種類同定し、これらのGPC3ペプチドを用いた、肝細胞がん根治治療後補助療法の臨床第I/II相試験のプロトコールを作成した。また、モデル腫瘍抗原を発現させたマウスES細胞より分化誘導した樹状細胞(ES-DC)を用いて、有効な腫瘍免疫を誘導することに成功した。以上の研究成果により、肝細胞癌の免疫療法に適した腫瘍拒絶抗原としてのGPC3の有用性、およびES-DCの抗腫瘍免疫療法への応用の可能性が明確に示された。

分担研究者

中面哲也 国立がんセンター東病院
臨床開発センター・がん治療開発部
機能再生室 室長
熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫
識別学分野 助手（平成17年9月30日まで）
佐々木 裕 熊本大学大学院医学薬学研究部
消化器内科学分野 教授
木下 平 国立がんセンター東病院上腹部外科
外来部長
古瀬純司 国立がんセンター東病院肝胆膵内科
病棟医長

研究協力者

千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部
免疫識別学分野 助教授

A.研究目的

肝細胞癌は日本人の癌死亡率において、男性では第3位、女性では第5位であり、今後、肝細胞癌を発症する可能性があるC型肝炎患者は、我が国に200万人以上存在すると推定されている。また、手術療法や経皮的局所壊死療法の進歩にも関わらず、5年生存率は20%以下であり、依然として難治性の癌である。肝細胞癌の原発巣および再発巣の早期発見、予防ならびにより有効な治療法の開発は急務である。

我々は、東京大学医科学研究所の中村祐輔博士との共同研究により、cDNAマイクロアレイによる肝細胞

癌組織および正常組織における、2万種類を超える遺伝子の発現を解析した結果に基づいて、肝細胞癌に特異的に高発現する新規癌胎児性抗原であるGlypican-3(GPC3)を同定した。GPC3は、胎生期の肝、腎、肺に発現するが、成人では胎盤で高発現する以外は、他の多くの正常臓器においてほとんど発現しない新規癌胎児性抗原である。GPC3が、肝細胞癌あるいはメラノーマに特異的に高発現することを発見し、腫瘍マーカーとして有用であることを既に報告した (BBRC 306: 16, 2003, Clin. Cancer Res. 10: 6612, 2004)。GPC3は、肝細胞癌の腫瘍マーカーとして先行している α フェト蛋白およびPIVKA-IIとは全く相関関係が認められていない。さらに、血清GPC3は比較的に早期で癌が小さい症例においても検出されており、症例数を増やして、肝細胞癌の腫瘍マーカーとしてのGPC3の有用性を確立することが重要である。

肝細胞癌の特徴として、根治手術後にも高頻度に再発が見られること、および、肝硬変や慢性肝炎を合併し侵襲性の高い治療を行なえない症例が多いことが挙げられる。主任研究者らは、これまでに、有効かつ侵襲性の低い治療法の開発を目指して、種々の癌に特異的に高発現する癌抗原を同定し、これを標的とする特異的免疫療法の開発に関する基礎研究を行ってきた。GPC3を標的とする特異的免疫療法は、肝細胞癌の新たな予防法あるいは治療法として非常に有望であると考えられる。

平成17年度より3年間の研究計画として発足した本研究は、以下の事項を解明することを目的とす

る。

- 1) 血清 GPC3 の定量により肝細胞癌の診断確率を向上させる。これにより、肝細胞癌の高リスク群である、B 型・C 型肝炎患者からの早期の肝細胞癌の検出や、肝細胞癌治療後の再発の早期検出を実現すると共に、治療効果の判定に利用する。
- 2) 肝細胞癌の新たな予防・治療法として、GPC3 を標的とする免疫療法を開発する。このために動物実験およびヒトを対象とした研究を実施し、根治治療を受けた患者における、癌の再発防止による予後の向上を目指した、臨床試験を実現する。

B.研究方法、C.研究結果

西村泰治 主任研究者

千住 覚 研究協力者：本年度の研究により、新たにGPC3とSPARCが早期メラノーマの優れた腫瘍マーカーとなることを示した。さらに、GPC3由来のマウスキラーT細胞エピトープペプチドを同定して、免疫療法に関するマウスin vivoモデルを構築し、GPC3を標的とした養子免疫療法および樹状細胞ワクチンの有効性と安全性を証明した。また、モデル腫瘍抗原を発現させたマウスES細胞より分化誘導した樹状細胞(ES-DC)を用いて、有効な腫瘍免疫を誘導することに成功した。以上の研究成果により、GPC3の腫瘍拒絶抗原としての有用性、およびES-DCの抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を明確に示した。

中面哲也 分担研究者：癌特異抗原GPC3由来の腫瘍拒絶抗原ペプチドを同定し、肝細胞癌の免疫療法における臨床試験に応用することを目指して研究を行った。結合ペプチドの構造モチーフがHLA-A24のそれと同一であるマウスのH-2K^d、あるいはHLA-A2により提示されるGPC3由来のマウスキラーT細胞エピトープペプチドを、それぞれ1種類ずつ同定した。これらのペプチドを用いた免疫療法がマウスに自己免疫現象を誘導することなく、抗腫瘍効果を発現することを証明し、さらにHLA-A24あるいはHLA-A2を所有する肝細胞がん患者の約50%の末梢血リンパ球より、これらのGPC3ペプチドに特異的、かつGPC3陽性肝細胞癌細胞株を傷害するキラーT細胞を誘導できた。以上の研究成果をもとにして、HLA-A24あるいは-A2結合性GPC3ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治治療後補助療法の臨床第I/II相試験のプロトコールを作成し、がんセンターの倫理委員会に

提出した。

佐々木 裕 分担研究者：肝細胞癌の腫瘍マーカーとしての有用性を検証するために、患者検体を収集した。酸化ストレスは細胞障害、DNA障害などのさまざまな細胞応答を惹起する。とりわけミトコンドリア(Mt)が障害されると、チトクロームC(Cyt.C)が細胞質に遊出しアポトーシスが誘起される。一方、種々のストレスによりアポトーシス抑制系が働く事が報告されている。今回、酸化ストレスがアポトーシス促進系と抑制系のバランスに影響し、どのように肝細胞死に関与するかを検討した。まず肝がん細胞株培養での検討では、酸化ストレスである過酸化水素や抗Fas抗体刺激により、caspase 3 活性上昇と培養液中でのLDHとCyt.Cの濃度上昇が認められ、細胞はアポトーシスに陥った。一方、ヒト血清Cyt.C濃度はAST値、ALT値との間に正の相関関係を有し、線維化進行例では有意に上昇していた。さらにヒト血清Cyt.C濃度については、NOストレスマーカー発現群での有意な低下、脂質過酸化マーカー発現群での有意な上昇を認め、酸化的DNA障害マーカーの発現が強い症例ほど高値であった。加えて血清Cyt.C濃度はC型慢性肝炎ではより高値の傾向があった。以上の結果から、肝細胞では酸化ストレスはMtからのCyt.Cの放出を促すが、同時に誘導される細胞死抑制系とのバランスで細胞死が決定されることを示した。加えて血清Cyt.C濃度は、酸化ストレスによるMt障害や種々の細胞内応答の指標となりうる可能性を示した。

木下 平 分担研究者：現在GPC3ペプチドワクチンによる肝細胞癌切除、RFA治療後の再発予防の臨床試験を計画中であるが、その基礎となる肝癌治療成績を検討した。1992年7月から2001年8月までに当院で治療をおこなった968例を対象とした。初回治療は単発の40%が切除、28%がablation、20%がTAEまたはTAI、その他が12%であった。多発では27%、9%、50%、14%であった。予後規定因子を比例ハザードモデルにより検討すると、Vp、腫瘍径、腫瘍数、治療法、臨床病期、部位が有意な予後因子となった。治療成績の検討結果より、がんセンター東病院の治療方針が妥当であることを示した。

古瀬純司 分担研究者：木下分担研究者と共に、GPC3ペプチドワクチンによる肝細胞癌切除、RFA治療後の再発予防の臨床試験を計画中であるが、その基礎となる肝癌治療成績を検討した。エタノール注入

(PEI)あるいはラジオ波焼灼(RFA)による経皮的局所壊死療法は肝細胞癌における標準治療として広く普及している。しかし、治療後高率に再発を認めることから、再発予防が重要な課題となっている。局所壊死療法施行例における局所制御および再発率を検討し、治療後補助療法の前向き臨床試験の妥当性の検証とhistorical controlを作成した。対象は1992年7月から2004年12月までにPEIまたはRFAを施行した初回治療例134例である。局所コントロール不能例はPEI6例(6.8%)、RFA3例(6.6%)、全体で9例(6.7%)であった。累積再発率は1年31%、3年75%、5年89%。PEIとRFAの治療法別では累積再発率に差は認めなかった。肝切除でもほぼ同様の再発率を認めており、局所壊死療法と切除を含めた包括的な補助療法の臨床試験が妥当であることを示した。

D. 考察、

本年度の研究成果を項目別に以下にまとめ、その意義と今後の研究の方向性について考察した。

1) 従来の治療成績の評価、および血清 GPC3 の腫瘍マーカーとしての診断的価値に関する検証

肝細胞癌の治療成績を検討することにより、外科的治療としての肝切除と、内科的治療としての局所壊死療法の有効性が確認され、さらに切除を含めた包括的な補助療法に関する臨床試験実施の必要性が示された。また、血清GPC3の検出により、肝細胞癌を早期発見できるか否かを検討すべく、慢性肝炎患者や画像診断により発見された微小肝細胞癌の患者血清を収集した。さらに肝細胞癌の治療効果および再発を検出するために、該当する患者の血清サンプルを治療後経時的に採取して保存しつつある。また血清チトクロームC濃度が、肝臓の酸化ストレスによるミトコンドリア障害や、種々の細胞内応答の指標となりうることを示した

(木下、古瀬、佐々木)。

従来の肝細胞癌の治療成績の解析に基づき、次年度以降に、肝細胞癌の補助療法としてのGPC3免疫療法の臨床試験を実施する妥当性が確認された。さらに、収集した検体を利用してGPC3の腫瘍マーカーとしての、肝細胞癌の早期診断、治療効果の判定、および再発の検出における有用性について検討する準備が整いつつある。

2) 腫瘍拒絶抗原としての GPC3 の有用性に関するマウス動物実験

HLA-A2トランスジェニックマウス、および結合

するペプチドの構造が、HLA-A24のそれと同様なマウスK^d分子を発現するBALB/Cマウスを用いて、HLA-A2あるいはマウスK^d分子に結合してマウスキラーT細胞に認識されるGPC3ペプチドを、それぞれ1種類ずつ同定した。さらにBALB/CマウスにおいてGPC3ペプチドを負荷した骨髄樹状細胞ワクチンの投与により、GPC3陽性癌の増殖抑制とマウスの生存期間延長を誘導できた。また上記の方法で誘導したGPC3ペプチドに特異的なマウスキラーT細胞を、腫瘍内に移入することにより腫瘍の増殖抑制を誘導できた。(中面、西村)。

以上の成果をもとにして、GPC3免疫療法の臨床試験を実施するために必要な、以下のようなヒトを対象とした研究を進展させることができ、所期の目標を十分に達成することが出来た。さらに次年度以降には、マウス動物実験によりGPC3を標的とした癌免疫療法の改善について検討する予定である。

3) 肝細胞癌の治療に応用可能な癌細胞反応性ヒトキラーT細胞を誘導する GPC3 ペプチドの同定

上記のペプチドを用いて肝細胞癌患者の末梢血リンパ球を刺激することにより、HLA-A2あるいはHLA-A24陽性患者の約50%において、肝細胞癌細胞株を傷害するヒトキラーT細胞株を誘導できた(中面、西村)。以上の研究成果をもとに、HLA-A24あるいは-A2結合性GPC3ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治治療後補助療法の臨床第I/II相試験のプロトコールを作成して、がんセンターの倫理審査委員会に提出し審議中である(木下、古瀬、中面)。

計画中の肝細胞癌に対するGPC3免疫療法の臨床試験においては、根治治療後の肝細胞癌患者に対して、GPC3ペプチドを不完全フロイントアジュバント(IFA)と共に免疫することにより、有害事象を伴うことなく肝細胞癌の再発予防効果が得られるか否かを検討したいと考えている。有害事象の種類と出現率を観察するとともに、1年再発率を従来の補助療法なしの対照群と比較し、免疫学的評価も合わせて解析する予定である。

E. 結論

本年度の研究成果により、GPC3を標的とした肝細胞癌の免疫療法に関する臨床試験を、平成18年度に実施するための準備が整った。また、腫瘍マーカーとしてのGPC3の有用性の検証についても、次年度以降に成果が期待できる。したがって、平成17年度の研究により、所期の目標を十分に満たす成果が得られたと考える。

F.健康危険情報

該当するものはない。

G.研究発表

1. 論文発表

<西村泰治, 中面哲也, 千住 寛>

- 1) Ikuta Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H., and Nishimura, Y.: Highly sensitive diagnosis of melanoma at an early stage by detecting the serum SPARC and glypican-3 levels. *Clin. Cancer Res.* 11: 807-8088, 2005.
- 2) Nakatsura, T., and Nishimura, Y. [Review] Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.
- 3) Mtsuyoshi, H., Hirata, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Fukuma, D., Kurisaki, A., Nakatsura, T., Nishimura, Y., and Senju, S.: Therapeutic effect of a-galactosylceramide loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* 96: 889-896, 2005.
- 4) Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Kurisaki, A., Motomura, Y., Yoshitake, Y., Sinohara, M., Nishimura, Y., and Senju, S.: Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 335: 5-13, 2005.

<佐々木 裕>

- 5) Kawamura, K., Iyonaga, K., Ichiyasu, H., Naganoto, J., Suga, M., and Sasaki, Y. Differentiation, maturation, and Survival of dendritic cells by osteopontin regulation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12:206-12,2005
- 6) Nakanishi, F., Ohkawa, K., Ishida, H., Housui, A., Sato, A., Hiramatsu, N., Ueda, K., Takehara, T., Kasahara, A., Sasaki, Y., et al. Alteration in gene expression profile by full length hepatitis B virus genome. *Intervirology* 48:77-83, 2005

<木下 平>

- 7) Kobayashi, A., Takahashi, S., Hasebe, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Gotohda, N. and Kinoshita, T. Solitary bile duct hamartoma of the liver, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40: 1378-1381, 2005

- 8) Kawashima, M., Furuse, J., Nishio, T., Konishi, M., Ishii, H., Kinoshita, T., Nagase, M., Nihei, K., Ogino, T. Phase II Study of Radiotherapy Employing Proton Beam for Hepatocellular Carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, 23: 1839-1846, 2005

- 9) 光永修一、小西大、長谷部孝裕、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、木下平 術前診断に苦慮した肝血管筋脂肪腫の2切除例, 医学書院, 7, 693-699, 2005

<古瀬純司>

- 10) Furuse J., Ishii H., Nagase M., et al. Adverse hepatic events caused by radiotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1512-8, 2005
- 11) Kawashima M, Furuse J., Nishio T, et al. A phase II study of radiotherapy employing proton beam for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 23:1839-46, 2005
- 12) 古瀬純司、石井浩、仲地耕平、他. 臨床腫瘍学の現状と展望. がん薬物療法の実践. 肝胆膵癌. *Progress in medicine* 25: 2087-2093, 2005

2. 学会発表

<西村泰治, 中面哲也, 千住 寛>

- 1) Glypican-3, Identified by cDNA Microarray Analysis, is an Ideal Tumor Marker and Tumor Rejection Antigen of Human HCC and Melanoma.: Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. 2005 AACR Annual Meeting, April 15-21, 2005, (Anaheim CA, U.S.A.)
- 2) Therapeutic control of immune responses by genetically modified ES cell-derived dendritic cells.: Senju, S., Hirata, S., Nishimura, Y. 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, April 8-10, 2005, (Kyoto)
- 3) Successful Vaccination by Genetically Modified ES Cell-Derived Dendritic Cells.: Kurisaki, A., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Shimomura, M., Nishimura, Y. and Senju, S., International Symposium on The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Kumamoto University. September 15-16, 2005 (Aso)

- 4) ES細胞由来の樹状細胞を用いた免疫応答制御技術の開発、千住 覚、第16回日本樹状細胞研究会、平成17年7月14～15日（福岡）
- 5) 癌胎児性抗原Glypican-3を標的とした免疫療法による肝細胞癌の治療・予防モデルの確立：中面哲也、小森宏之、吉武義泰、西村泰治 第8回基盤的癌免疫研究会総会、平成17年7月15、16日（札幌）
- 6) 新規腫瘍マーカーSPARCとGPC3の併用による早期メラノーマの血清診断、中面哲也、生田義明、小森宏之、福島 聡、影下登志郎、西村泰治 第25回日本分子腫瘍マーカー研究会、平成17年9月14～16日（札幌）
- 7) 癌胎児性抗原Glypican-3のHLA-A2拘束性CTLエピトープペプチドの同定 小森宏之、中面哲也、松井政則、西村泰治 第64回日本癌学会学術総会 平成17年9月14～16日（札幌）
- 8) 新規腫瘍マーカーSPARCとGPC3を利用した早期メラノーマの血清学的診断、生田義明、中面哲也、影下登志郎、西村泰治 第64回日本癌学会学術総会、平成17年9月14～16日（札幌）
- 9) メラノーマ新規腫瘍抗原の診断・治療への応用 影下登志郎、中面哲也、千住 覚、西村泰治 第64回日本癌学会学術総会、平成17年9月14～16日（札幌）
- 10) Semi-allogenicなES細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の有効性の検討、福岡大喜、松吉秀武、平田真哉、栗崎朱里、吉武義泰、篠原正徳、西村泰治、千住 覚、第64回日本癌学会学術総会、平成17年9月14～16日（札幌）
- 11) HLA トランスジェニックマウスを用いた癌抗原特異的CTL誘導ペプチドの有効性と安全性の証明：小森宏之、中面哲也、松井政徳、西村泰治 第14回日本組織適合性学会大会、平成 17年10月2～3日（熊本）
- 12) MHCを一部共有するアロES細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の開発 福岡大喜、松吉秀武、平田真哉、栗崎朱里、吉武義泰、篠原正徳、西村泰治、千住 覚 第14回日本組織適合性学会大会、平成17年10月2～3日（熊本）
- 13) α -GalCerを負荷した抗原とケモカインを同時発現するES-DCによる抗腫瘍免疫の誘導 千住 覚、松吉秀武、平田真哉、吉武義泰、本村裕、福岡大喜、栗崎朱里、中面哲也、西村泰治 第35回日本免疫学会総会・学術集会（横浜）、平成17年12月13～15日
- 14) MHCを共有するアロES細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の開発 福岡大喜、松吉秀武、平田真哉、栗崎朱里、吉武義泰、本村 裕、篠原正徳、西村泰治、千住 覚、第35回日本免疫学会総会・学術集会（横浜）、平成17年12月13～15日

<佐々木 裕>

- 15) 葦原 浩、永濱裕康、佐々木 裕：酸化ストレスはどのように肝細胞死を修飾するか？第41回日本肝臓学会総会 ワークショップ「アポトーシス」2005年6月16日、大阪
- 16) 永濱裕康、片瀬香子、高岡 了、古澤千枝、田中基彦、藤山重俊、佐々木 裕：Breakthrough hepatitis に対するAdefovir dipivoxilの有効性に関する検討。第41回日本肝臓学会総会 一般演題、2005年6月16日、大阪

H.知的財産権の出願・登録状況

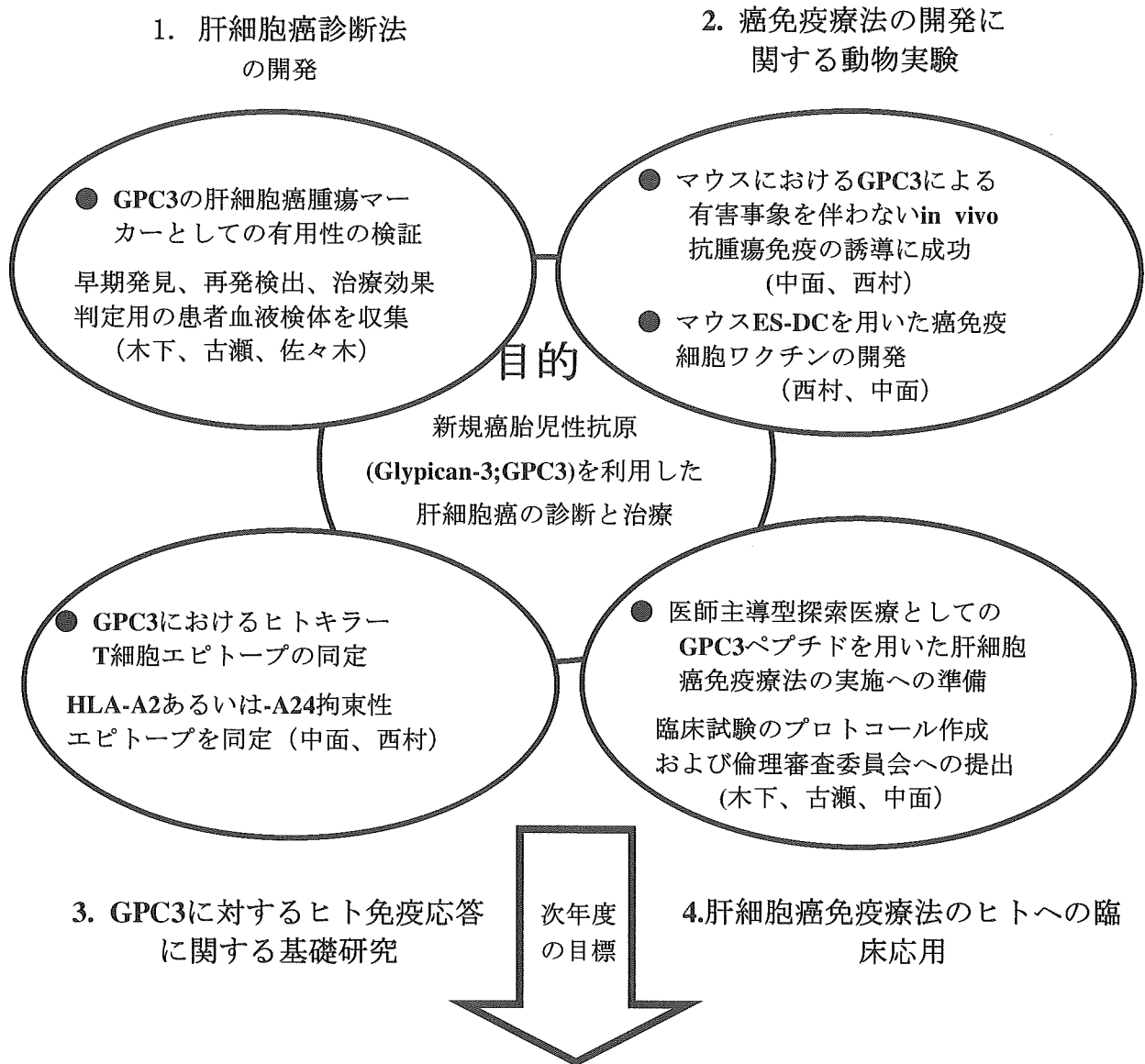
1. 特許取得

特願2005-230702 出願日 平成17年8月9日
HLA-A2陽性者用glypican-3(GPC3)由来癌拒絶抗原ペプチド及びこれを含む医薬
出願人 国立大学法人熊本大学
発明者 西村泰治、中面哲也、小森宏之

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

平成17年度の研究成果の概要図



- 収集した患者検体を利用して血清 GPC3 を測定し、肝細胞癌の早期診断、治療効果の判定、ならびに再発の早期検出における有用性を検証する。
- 倫理審査を経た後に、医師主導型探索医療としての GPC3 ペプチドを用いた肝細胞癌免疫療法の臨床応用試験を開始する。
- マウスを用いた動物実験により、より有効なアジュバントおよび免疫方法を開発するための基礎研究を続行する。
- GPC3 遺伝子を発現させたヒト ES 細胞由来の樹状細胞を用いた、肝細胞癌免疫療法の開発に関する基礎研究を開始する。

III. 分担研究報告

Glypican-3 を標的とした癌の診断および治療方法の開発

主任研究者 西村 泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野（教授）
研究協力者 千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野（助教授）

研究要旨

本研究は、肝細胞癌(HCC)に特異的に高発現する新規癌胎児性抗原として同定したGlypican-3(GPC3)を、癌の診断と治療に利用することを目的とする。本年度の研究により、新たにGPC3とSPARCが早期メラノーマの優れた腫瘍マーカーとなることを示した。さらに、GPC3由来のマウスキラーT細胞エピトープペプチドを同定して、免疫療法に関するマウスin vivoモデルを構築し、GPC3を標的とした養子免疫療法および樹状細胞ワクチンの有用性を証明した。また、モデル腫瘍抗原を発現させたマウスES細胞より分化誘導した樹状細胞(ES-DC)を用いて、有効な腫瘍免疫を誘導することに成功した。以上の研究成果により、GPC3の腫瘍マーカーおよび腫瘍拒絶抗原としての有用性、およびES-DCの抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を明確に示した。

A.研究目的

肝細胞癌（HCC）は日本人の癌死亡率において、男性では第3位、女性では第5位と上位に位置し、外科的治療や化学療法の対象外となる患者の症例数も多い。このため、HCCの早期発見のための診断マーカーの同定およびHCCに対する新規療法の開発は、社会的要請が大きい重要課題である。我々は、東京大学医科学研究所の中村祐輔博士との共同研究により、HCC組織および正常組織における、cDNAマイクロアレイによる2万種類を超える遺伝子の発現解析結果に基づいて、HCCに特異的に高発現する新規癌胎児性抗原であるGlypican-3(GPC3)を同定した。GPC3は、胎生期の肝、腎、肺に発現するが、成人では胎盤で高発現する以外は、他の多くの正常臓器においてほとんど発現しない新規癌胎児性抗原である。GPC3が、HCCあるいはメラノーマに特異的に高発現することを発見し、腫瘍マーカーとして有用であることを既に報告した (BBRC 306: 16, 2003, Clin. Cancer Res. 10: 6612, 2004)。平成17年度は、GPC3の腫瘍マーカーとしてのさらなる評価と、マウスin vivo腫瘍モデルにおける、癌免疫療法の標的抗原としてのGPC3の可能性を検討することを目的として研究を実施した。

B.研究方法

- 1) 腫瘍マーカーGPC3とSPARCの併用による早期メラノーマの検出
GPC3はHCCと同様に約40%のメラノーマ患者の血清中に検出されるが、今回メラノーマの新規腫瘍マーカーとしてSPARCを同定し、117例のメラノーマ患者において、GPC3、SPARCおよび従来の腫瘍マーカーである5-S-cystenyldopa(5-S-CD)について、その検出率と特徴を比較検討した。
- 2) GPC3を標的とする癌免疫療法のマウスモデルの確立
BALB/cマウスが発現するMHCクラスI分子であるK^d分子と、日本人の約60%が所有するHLA-A24分子に結合するペプチドの構造は、ほぼ同一である。そこでヒトとマウスのGPC3においてアミノ酸配列が共通な部分に相当し、K^d（ならびにHLA-A24）分子に結合すると予想される合成ペプチドをBALB/cマウスに免疫することにより、GPC3を高発現する癌細胞を傷害する細胞傷害性(キラー)T細胞を誘導することを試みた。また、BALB/cマウスにGPC3ペプチドを負荷した骨髄細胞由来樹状細胞 (BM-DC) ワクチンを投与した後に、マウスGPC3を発現させたマウス大腸癌細胞株Colon-26を移植し、抗腫瘍効果を検討した。さらにGPC3発現Colon-26をマウスに移植して腫瘍を形成した後に、腫瘍にGPC3ペプチドで刺激することにより樹立したGPC3特異的キラーT細胞を局所

注入し、その抗腫瘍効果を検討した。

3) 抗腫瘍免疫誘導性ES-DC細胞ワクチンの開発

我々はマウスES細胞からin vitroで樹状細胞(ES-DC)を分化誘導する方法を開発した(Blood 101: 3501, 2003)。さらに、ES細胞にモデル抗原OVA遺伝子を発現させた後に分化誘導したES-DC (ES-DC-OVA)を用いて、T細胞応答を抗原特異的に調節することに成功した。さらにES-DC-OVAにT細胞走化性ケモカインの遺伝子を共発現させることにより、OVA特異的なT細胞応答を増強することにも成功している(J. Immunol. 172: 776, 2004)。そこで本年度は、ES-DC-OVAにNKT細胞の活性化リガンドである α -Galactosylceramide (α Galcer)を負荷することにより、自然免疫応答をも増強させ、より有効な抗腫瘍免疫応答を誘導出来るか否かを検討した。また一般に、ES細胞から分化させた細胞や臓器を用いて治療に応用するためには、患者と同一の遺伝的背景を有する(少なくともHLAが一致した)ES細胞が必要であると考えられる。アロ(同種異系)ES-DCであっても、これが発現するHLAの一部を共有するレシピエントにおいて、抗原ペプチドに対する免疫応答を惹起することが可能であると考えられる。このような可能性を検証するために、MHCを部分的に共有するセミアロジェニックなマウスES-DCの免疫により、抗原特異的なT細胞応答を誘導できるかどうか、マウスモデルを用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体を採取する場合には、研究課題と被験者への倫理面での配慮を記載した書類を熊本大学倫理委員会に提出し、その承認を得た。その後、被験者個人のプライバシーの保護、検体提供の任意性、検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて、被験者ないしはその保護者に十分に説明した上で、同意を得て行った。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

- 1) 腫瘍マーカーGPC3とSPARCの併用による早期メラノーマの検出
メラノーマ患者の陽性率はSPARC、GPC3および5-

S-CDでそれぞれ33%、42%および22%であり、ステージ別に見ると、SPARCおよびGPC3はStage 0のin situメラノーマであっても、それぞれ56%、44%が陽性であった。Stage 0, I, IIではいずれも、5-S-CDと比較して有意に高い陽性率を示し、SPARCとGPC3を併用するとstage 0~IIのメラノーマの64%が陽性であり、早期メラノーマの検出に有用であることが示された。(論文1, 2)

2) GPC3を標的とする癌免疫療法のマウスモデルの確立

まず、BALB/cマウスを用い、K^d結合モチーフをもつGPC3由来ペプチド12種類の中からキラーT細胞エピトープペプチドを同定した。GPC3エピトープペプチドを負荷したマウスBM-DCの予防的腹腔内投与により、自己免疫現象を伴うことなく、GPC3を発現するColon-26に対する拒絶効果を誘導できた。さらに、マウス皮下に形成されたGPC3発現Colon-26腫瘍にGPC3特異的キラーT細胞を局所注入することにより、腫瘍が著明に縮小した。また、脾注入モデルでは、同ワクチンの投与により、C26/GPC3の脾臓への生着を拒絶できただけでなく、肝転移も予防できた。

3) 抗腫瘍免疫誘導性ES-DC細胞ワクチンの開発

モデル腫瘍抗原OVAを発現するES-DC (ES-DC-OVA)に α Galcerを負荷することにより、OVA特異的キラーT細胞のみならず、自然免疫系のNKT細胞をも活性化して、OVA発現腫瘍に対する抗腫瘍免疫応答を増強させることに成功した。この抗腫瘍効果は、CD8, NK1.1, あるいはasialoGM1に対する抗体で、陽性細胞を除去することにより消滅した(論文3)。また、ES-DC-OVAが発現する2種類のMHCクラスIハプロタイプのうち、一方のみを共有するアロ・レシピエントマウスにES-DC-OVAを免疫することにより、共有されたMHCクラスIに拘束性されたOVA特異的キラーT細胞を十分に誘導でき、OVA発現腫瘍細胞の排除を誘導できることを示した(論文4)。

D. 考察

SPARCとGPC3は、ほとんどのメラノーマ組織に発現しているが、それぞれ33%、40%の患者血清中にしか検出出来なかった。しかも、その多くは早期患者であり、腫瘍の大きさと分泌量との相関も認められなかった。したがって、この二つのマーカーはす

すべてのメラノーマ細胞ではなく、最近その存在が目目されている腫瘍幹細胞だけが、分泌するような仕組みがあるのではないかと予想されたが、今後の検討を要する。

GPC3ペプチドによるキラーT細胞の誘導が、マウスに自己免疫現象を誘導することなく安全に、かつGPC3発現腫瘍を有効に排除することが、マウスin vivo実験により確認された。この観察は、ヒトHCCに対するGPC3免疫療法の応用の可能性を支持するものである。

ES-DC-OVAに α Galcerを負荷することにより、ES-DC表面のCD1dに α Galcerが提示され、自然免疫を担うNKT細胞がこれを認識して活性化されIFN- γ などを産生する。これがNK細胞およびキラーT細胞の活性化を増強することにより、強力な抗腫瘍効果が誘導されたものと推測される。さらに、MHCを一部共有するアロES-DCを投与することにより、共有されたMHCクラスI分子に拘束された腫瘍抗原に特異的なキラーT細胞が活性化され、抗腫瘍免疫応答が誘導されることが確認された。これまでに、世界各国において樹立されたヒトES細胞株は、各民族集団中で遺伝子頻度が高いHLA対立遺伝子を発現していると期待される。日本人集団では、約60%がHLA-A24を、また約40%がHLA-A2を発現する。将来、このように各民族集団中で遺伝子頻度が高いHLA対立遺伝子を発現するヒトES-DCを、これらのHLAが陽性の癌患者に投与することにより、抗腫瘍免疫療法への応用が期待される。

今後、GPC3抗腫瘍免疫療法のヒト臨床応用により、HCC発癌リスクが高い多くの慢性肝炎および肝硬変患者、およびHCCの患者を対象とした有効なHCCの予防・治療法が開発されることが期待される。

E. 結論

SPARCとGPC3を併用することにより、早期メラノーマを高感度で検出することが可能となった。また、マウスモデルにおいて、自己免疫現象などの有害事象を伴うことなく、GPC3を用いた免疫療法により腫瘍の増殖を抑制することが出来た。 α Galcerを負荷したES-DC-OVA、あるいはMHCハプロタイプ共有したアロES-DC-OVAをマウスに免疫することにより、OVA特異的なキラーT細胞応答を誘導することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

3. 論文発表

- 1) Ikuta Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H., and Nishimura, Y.: Highly sensitive diagnosis of melanoma at an early stage by detecting the serum SPARC and glypican-3 levels. *Clin. Cancer Res.* 11: 8079-8088, 2005.
- 2) Nakatsura, T., and Nishimura, Y. [Review] Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.
- 3) Mtsuyoshi, H., Hirata, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Fukuma, D., Kurisaki, A., Nakatsura, T., Nishimura, Y., and Senju, S.: Therapeutic effect of agalactosylceramide loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* 96: 889-896, 2005.
- 4) Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Kurisaki, A., Motomura, Y., Yoshitake, Y., Sinohara, M., Nishimura, Y., and Senju, S.: Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 335: 5-13, 2005.

4. 学会発表

- 1) Glypican-3, Identified by cDNA Microarray Analysis, is an Ideal Tumor Marker and Tumor Rejection Antigen of Human HCC and Melanoma.: Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. 2005 AACR Annual Meeting, April 15-21, 2005, (Anaheim CA, U.S.A.)
- 2) Therapeutic control of immune responses by genetically modified ES cell-derived dendritic cells.: Senju, S., Hirata, S., Nishimura, Y. 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference, April 8-10, 2005, (Kyoto)

- 3) Successful Vaccination by Genetically Modified ES Cell-Derived Dendritic Cells.: Kurisaki, A., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Shimomura, M., Nishimura, Y. and Senju, S., International Symposium on The Cooperative Research Project on Clinical and Epidemiological Studies of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in Kumamoto University, September 15-16, 2005 (Aso)
- 4) ES 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫応答制御技術の開発, 千住 覚, 第 16 回日本樹状細胞研究会, 平成 17 年 7 月 14~15 日 (福岡)
- 5) 癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした免疫療法による肝細胞癌の治療・予防モデルの確立: 中面哲也、小森宏之、吉武義泰、西村泰治 第 8 回基盤的癌免疫研究会総会、平成 17 年 7 月 15、16 日 (札幌)
- 6) 新規腫瘍マーカー SPARC と GPC3 の併用による早期メラノーマの血清診断、中面哲也、生田義明、小森宏之、福島 聡、影下登志郎、西村泰治 第 25 回日本分子腫瘍マーカー研究会、平成 17 年 9 月 14~16 日 (札幌)
- 7) メラノーマ新規腫瘍抗原の診断・治療への応用 影下登志郎、中面哲也、千住 覚、西村泰治 第 64 回日本癌学会学術総会、平成 17 年 9 月 14~16 日 (札幌)
- 8) Semi-allogenic な ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の有効性の検討, 福間大喜, 松吉秀武, 平田真哉, 栗崎朱里, 吉武義泰, 篠原正徳, 西村泰治, 千住 覚, 第 64 回日本癌学会学術総会、平成 17 年 9 月 14~16 日 (札幌)
- 9) HLA トランスジェニックマウスを用いた癌抗原特異的 CTL 誘導ペプチドの有効性と安全性の証明: 小森宏之、中面哲也、松井政徳、西村泰治 第 14 回日本組織適合性学会大会、平成 17 年 10 月 2~3 日 (熊本)
- 10) MHC を一部共有するアロ ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の開発 福間大喜, 松吉秀武, 平田真哉, 栗崎朱里, 吉武義泰, 篠原正徳, 西村泰治, 千住 覚 第 14 回日本組織適合性学会大会、平成 17 年 10 月 2~3 日 (熊本)
- 11) α -GalCer を負荷した抗原とケモカインを同時発現する ES-DC による抗腫瘍免疫の誘導 千住 覚, 松吉秀武, 平田真哉, 吉武義泰, 本村裕, 福間大喜, 栗崎朱里, 中面哲也, 西村泰治 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 平成 17 年 12 月 13~15 日
- 12) MHC を共有するアロ ES 細胞由来の樹状細胞を用いた抗原特異的抗腫瘍免疫療法の開発 福間大喜, 松吉秀武, 平田真哉, 栗崎朱里, 吉武義泰, 本村 裕, 篠原正徳, 西村泰治, 千住 覚, 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (横浜), 平成 17 年 12 月 13~15 日

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2005-230702 出願日 平成 17 年 8 月 9 日
HLA-A2陽性者用glypican-3(GPC3)由来癌拒絶抗原ペプチド及びこれを含む医薬
出願人 国立大学法人熊本大学
発明者 西村泰治、中面哲也、小森宏之

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

[謝辞]

本研究の遂行に際しては、熊本大学医学薬学研究部・免疫識別学分野の中面哲也助手、平田真哉特定事業研究員、ならびに大学院学生である松吉秀武、小森宏之、本村 裕、生田義明、福間大喜、福島 聡君らの協力を得た。また臨床検体の提供に際しては、熊本大学医学薬学研究部・皮膚機能病態学分野の影下登志郎助教授、ならびに小野友道教授の御協力を得たものであり、ここに深謝いたします。

肝細胞癌の免疫療法への応用をめざしたHLA-A2あるいはA24結合性 Glypican-3 (GPC3) 由来がん拒絶抗原ペプチドの同定

分担研究者 中面 哲也 国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部機能再生室（室長）
熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野（助手：平成17年9月30日まで）

研究要旨

本研究は、がん特異抗原Glypican-3(GPC3)由来のがん拒絶抗原ペプチドを同定し、肝細胞癌の免疫療法における臨床試験に応用することを目的とする。結合ペプチドの構造モチーフがHLA-A24のそれと同一であるH-2K^d、あるいはHLA-A2により提示されるGPC3由来のキラーT細胞エピトープペプチドを、それぞれ1種類ずつ同定した。これらのペプチドを用いた免疫療法がマウスに自己免疫現象を誘導することなく、抗腫瘍効果を発現することを証明し、さらにHLA-A24あるいはHLA-A2を所有する肝細胞がん患者の約50の末梢血リンパ球より、これらのGPC3ペプチドに特異的、かつGPC3陽性肝細胞癌細胞株を傷害するキラーT細胞を誘導できた。

A.研究目的

肝細胞がんは根治治療がなされても1年で約30%、3年で約70%と高率に再発を認める。しかし、現時点で、再発を防ぐための有効な標準的補助療法は確立されていない。Glypican-3(GPC3)は正常臓器においては、免疫学的に隔離された胎盤と胎生期の肝臓にしか発現していないため、GPC3を標的とした抗腫瘍効果のある免疫療法を開発できれば、自己免疫などの有害事象を誘導しない、理想的な肝細胞がんの予防と治療が可能になると期待される。癌抗原ペプチドを用いた癌免疫療法に際しては、キラーT細胞に抗原ペプチドを提示するHLAクラスI分子には著明な多型（個人差）が存在し、HLA型が異なると結合するペプチドの構造も変化することを考慮しなければならない。そこで我々は、日本人の60%が所有するHLA-A24と、40%が所有するHLA-A2に着目した。日本人の85%が、これらのHLAのいずれかを有しており、また欧米白人でもHLA-A2は最も頻度の高いHLAクラスI対立遺伝子である。本研究は、これらのHLAに結合してGPC3陽性癌細胞を破壊するキラーT細胞を誘導できる、GPC3由来のがん拒絶抗原ペプチドを同定し、肝細胞癌の免疫療法における臨床試験に応用することを目的とする。

B.研究方法

まず我々は、結合ペプチドの構造モチーフが、ヒトHLA-A24のそれと同一であるマウスH-2K^d分子を発現するBALB/cマウス、ならびにHLA-A2を発現するトランスジェニックマウス（HLA-A2Tgm）を用いて、H-2K^d(≒HLA-A24)あるいはHLA-A2分子に結合してGPC3陽性癌細胞を破壊するマウスキラーT細胞を誘導できる、GPC3由来のがん拒絶抗原ペプチドを同定した。このために、当該MHCクラスI分子に結合する構造モチーフを有し、マウスとヒトで共通のアミノ酸配列を示すGPC3ペプチドを合成し、これらを樹状細胞に負荷してマウスの腹腔内に2回免疫した。その後、マウスの脾細胞を回収し、各ペプチドに特異的なキラーT細胞の誘導の有無をELISPOT法により検討した。また、免疫したマウスの重要臓器へのリンパ球浸潤を組織学的に検討することにより、自己免疫現象発生の有無を検討した。さらに同定したH-2K^d(≒HLA-A24)あるいはHLA-A2拘束性の癌拒絶GPC3抗原ペプチドを用いて、HLA-A24あるいはHLA-A2陽性の肝細胞癌患者から採取した末梢血CD8⁺T細胞を、GPC3ペプチドを負荷した自己の樹状細胞で刺激して、GPC3特異的かつGPC3陽性癌細胞株に細胞傷害性を示すキラーT細胞の誘導の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体を採取する場合には、研究課題と被験者への倫理面での配慮を記載した書類を熊本大学倫理委員会に提出し、その承認を得た。その後、被験者個人のプライバシーの保護、検体提供の任意性、検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度などについて、被験者ないしはその保護者に十分に説明した上で、同意を得て行なった。マウスを用いた実験に際しては、熊本大学動物実験委員会の承認を得たうえで、動物愛護に十分配慮しつつ実験を行なった。

C. 研究結果

GPC3由来の H-2K^d(≡HLA-A24) 結合性ならびに HLA-A2 結合性キラーT細胞エピソードペプチドを、それぞれ1種類ずつ同定した。これらを用いた免疫療法がマウスに自己免疫現象を誘導することなく、抗腫瘍効果を発揮することを証明した。これらのペプチドを用いて、HLA-A24陽性あるいはHLA-A2陽性の肝細胞がん患者の約50%の末梢血リンパ球より、GPC3特異的かつGPC3陽性肝細胞癌細胞株を傷害するキラーT細胞を誘導することができた。

D. 考察

以上の研究成果をもとに、HLA-A24あるいはA2結合性GPC3ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治治療後補助療法の臨床第III相試験のプロトコールを作成した。本臨床試験においては、根治治療後の肝細胞癌患者に対して、GPC3ペプチドを不完全フロイントアジュバント(IFA) と共に免疫することにより、有害事象を伴うことなく肝細胞癌の再発予防効果が観察されるか否かを検討する。有害事象の種類と出現率を観察するとともに、1年再発率を従来の補助療法なしの対照群と比較する。免疫学的評価も合わせて解析する。国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た後に、平成18年4月から本臨床試験を行う予定である。

E. 結論

HLA-A24あるいはHLA-A2により提示されたGPC3ペプチドを特異的に認識して、GPC3陽性肝細胞癌細胞株を傷害するヒトキラーT細胞を誘導できるGPC3ペプチドを、それぞれ1種類ずつ同定した。これらのペプチドは、肝細胞がんの予防と治療を目指した

免疫療法のターゲットとして、その有効性と安全性が期待できる。

F.健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mtsuyoshi, H., Hirata, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Fukuma, D., Kurisaki, A., Nakatsura, T., Nishimura, Y., and Senju, S.: Therapeutic effect of α -galactosylceramide loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells. *Cancer Science* 96: 889-896, 2005.
- 2) Ikuta Y., Nakatsura, T., Kageshita, T., Fukushima, S., Ito, S., Wakamatsu, K., Baba, H., and Nishimura, Y.: Highly sensitive diagnosis of melanoma at an early stage by detecting the serum SPARC and glypican-3 levels. *Clin. Cancer Res.* 11: 8079-8088, 2005.
- 3) Nakatsura, T., and Nishimura, Y. [Review] Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.

2. 学会発表

- 1) Glypican-3, Identified by cDNA Microarray Analysis, is an Ideal Tumor Marker and Tumor Rejection Antigen of Human HCC and Melanoma.: Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. 2005 AACR Annual Meeting, April 15-21, 2005, (Anaheim CA, U.S.A.)
- 2) 新規腫瘍マーカーSPARC と GPC3 の併用による早期メラノーマの血清診断 中面哲也、生田義明、小森宏之、福島 聡、影下登志郎、西村泰治 第25回日本分子腫瘍マーカー研究会 平成17年9月13日(札幌)
- 3) 癌胎児性抗原 Glypican-3 の HLA-A2 拘束性 CTL エピソードペプチドの同定 小森宏之、中面哲也、松井政則、西村泰治 第64回日本癌学会学術総

会 平成17年9月14～16日（札幌）

- 4) HLA トランスジェニックマウスを用いた癌抗原特異的 CTL 誘導ペプチドの有効性と安全性の証明
：小森宏之、中面哲也、松井政徳、西村泰治 第14回日本組織適合性学会大会、平成17年10月2～3日（熊本）
- 5) 新規腫瘍マーカーSPARC と GPC3 を利用した早期メラノーマの血清学的診断、生田義明、中面哲也、影下登志郎、西村泰治 第64回日本癌学会学術総会、平成17年9月14～16日（札幌）
- 6) メラノーマ新規腫瘍抗原の診断・治療への応用
影下登志郎、中面哲也、千住覚、西村泰治 第64回日本癌学会学術総会、平成17年9月14～16日（札幌）

らびに別府 透講師に御協力を頂いた。さらにHLA-A2 トランスジェニックマウスは、埼玉医科大学微生物学教室の松井政則助教授より提供を受けたものであり、ここに深謝いたします。

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願2005-230702 出願日 平成17年8月9日
HLA-A2陽性者用glypican-3(GPC3)由来癌拒絶抗原ペプチド及びこれを含む医薬
出願人 国立大学法人熊本大学
発明者 西村泰治、中面哲也、小森宏之

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

[謝辞]

本研究の遂行に際しては、熊本大学医学薬学研究部・免疫識別学分野の西村泰治教授、千住 覚助教授、ならびに大学院学生である吉武義泰、小森宏之、本村 裕、生田義明、横峰和典、福島 聡 君らの協力を得、また臨床検体の提供に際しては、熊本大学医学薬学研究部・消化器外科学分野の馬場秀雄教授、な

酸化ストレスと肝細胞障害に関する研究

分担研究者 佐々木 裕 熊本大学大学院医学薬学研究部 消化器内科学分野（教授）

研究要旨

酸化ストレスは細胞障害、DNA障害などのさまざまな細胞応答を惹起する。とりわけミトコンドリア(Mt)が障害されると、チトクロームC(Cyt.C)が細胞質に遊出しアポトーシスが誘起される。一方、種々のストレスによりアポトーシス抑制系が働く事が報告されている。今回、酸化ストレスがアポトーシス促進系と抑制系のバランスに影響し、どのように肝細胞死に関与するかを検討した。まず肝がん細胞株培養での検討では、酸化ストレスである過酸化水素や抗Fas抗体刺激により、caspase 3 活性上昇と培養液中でのLDHとCyt.Cの濃度上昇が認められ、細胞はアポトーシスに陥った。一方、ヒト血清Cyt.C濃度はAST値、ALT値との間に正の相関関係を有し、線維化進行例では有意に上昇していた。さらにヒト血清Cyt.C濃度については、NOストレスマーカー発現群での有意な低下、脂質過酸化マーカー発現群での有意な上昇を認め、酸化的DNA障害マーカーの発現が強い症例ほど高値であった。加えて血清Cyt.C濃度はC型慢性肝炎ではより高値の傾向があった。以上の結果から、肝細胞では酸化ストレスはMtからのCyt.Cの放出を促すが、同時に誘導される細胞死抑制系とのバランスで細胞死が決定されることが示された。加えて血清Cyt.C濃度は酸化ストレスによるMt障害や種々の細胞内応答の指標となりうることが考えられた。

A.研究目的

生体は酸素 O_2 を H_2O に変換する過程で多量のATPを産生するが、その過程には内因性の活性酸素種(ROS)の発生が伴っている。一方、外因性刺激である感染、薬品、飲酒なども細胞内にROSを産生させる。生体内にはもともと消去系が存在するが、産生系がこれを凌駕するとROSは酸化ストレスとなり、細胞障害、発癌などのさまざまな細胞応答を惹起する。とりわけ酸化ストレスがミトコンドリア(Mt)を障害すると、チトクロームC(Cyt.C)が細胞質に遊出しアポトーシスが誘起される。一方、種々のストレスにより誘導されるチオレドキシシン(TRX)、HO-1 (hemeoxygenase-1)やNO産物である8-NG (8-Nitroguanosine)はアポトーシス抑制的に働く事が示されている。今回、酸化ストレスがアポトーシス促進系と抑制系のバランスに影響し、どのように肝細胞死に関与するかを培養細胞系ならびにヒト慢性肝疾患患者にて検討した。

B.研究方法

肝癌細胞株(HepG2, Huh7)、ならびにコントロールであるリンパ球系細胞株H-9を対象に、酸化ストレスとしての過酸化水素、あるいは抗Fas抗体にて刺激し、培養液中の逸脱酵素LDHやCyt.Cの濃度を測定すると共に、細胞内caspase活性も解析した。加えてFACSを

用いPIとAnnexinVの二重染色にてアポトーシスを評価した。さらにアポトーシスを担うシグナル伝達、HO-1の発現も検討した。一方、ヒト慢性肝疾患の組織標本にて活動性や線維化の評価に加え、8-NG(NOストレスマーカー)、4-HNE(脂質過酸化マーカー)、8-OHdG(酸化的DNA障害マーカー)の発現を免疫組織学的に解析した。また一部の症例では鉄沈着を評価した。これらの組織学的データを血清Cyt.C濃度や生化学的検査データと比較検討した。

(倫理面への配慮) ヒト血清チトクロームC測定に関しては、熊本大学大学院医学薬学研究部倫理委員会による承諾を得ており、患者様からは文書による同意を得ている。さらに個人情報はずべて匿名かしており、その情報もインターネットには接続されていないコンピューターにて管理されている。

C.研究結果

肝癌細胞では過酸化水素や抗Fas抗体刺激により細胞数は減少するとともに、caspase 3 活性上昇とそれに続き培養液中でのLDHとCyt.Cの濃度上昇が認められた。FACSの結果より、惹起された細胞死はアポトーシスであった。また過酸化水素刺激ではストレス応答性MAPKが活性化されたが、過酸化水素や抗Fas抗体のいずれの刺激でもTRXやHO-1の発現増強