

表1 HCC に高発現する癌抗原に関する過去の報告のまとめ*
(Butterfield, L.H.: *Gastroenterology*, 2004. を基に情報を追加)

Study (Year)	GPC-3	MAGE-1	MAGE-2	MAGE-3	MAGE-4	MAGE-10	MAGE-12	SSX-1	NY-ESO1
Yamashita (1996)	80								
Kariyama (1999)	78			42					
Tahara (1999)	68		30	68			30	30	
Chen (2001)								80	
Mou (2002)	70			53					
Luo (2002)	19			24	4			38	0
Chen (2003)		66		70	20	36			40
Nakatsura (2003)	80								
Koranyi (2004)									24

*: HCC 組織における各腫瘍抗原 mRNA の発現頻度 (%)

表2 HCC に対するワクチン療法の臨床試験に関する過去の報告のまとめ (文献⁴⁾より)

Strategy	Author (Year)	Patients	Setting	Responses
Dendritic cells (DC vaccine)	Ladhams, <i>et al</i> (2002)	2 metastatic	GM/IL-4 DC + tumor	1 patient slowed tumor growth
	Iwashita, <i>et al</i> (2003)	10 unresectable	GM/IL-4 DC + tumor lysate + TNF + KLH	1/10 MR
	Stift, <i>et al</i> (2003)	2 HCC of 20 total	GM/IL-4 DC + tumor lysate + TNF + IL-2	No PR or CR
AFP peptide	Butterfield, <i>et al</i> (2003)	6 stage IVa and IVb	AFP peptide in Montanide adjuvant	No PR or CR

ワクチンを基盤とした免疫療法に関する臨床試験のみを抜粋した。

GM: GM-CSF, KLH: keyhole limpet hemocyanin, AFP: α -fetoprotein, MR: minor response, PR: partial response, CR: complete response

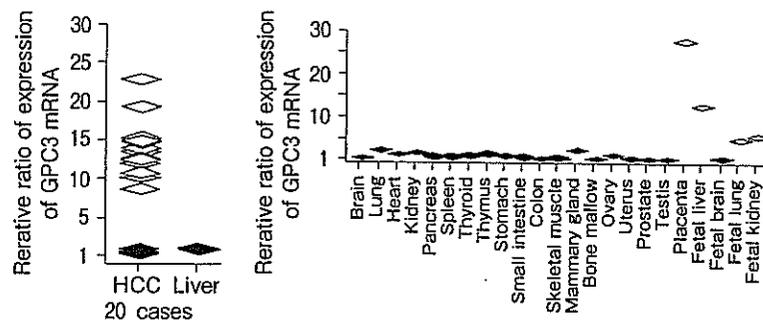


図1 HCC 20 例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター: 中村祐輔博士らの研究成果, Okabe, H., *et al.*: *Cancer Res.* 61: 2129, 2001.)

HCC 患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、発現の比が 5 以上の遺伝子を 16 種類選んだ。さらに胎生期の 4 臓器を含む 23 臓器の正常組織において、各遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子 GPC3 を探しだした。GPC3 は、HCC 患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上 (平均 396.2) で、胎盤や胎生肝、胎生腎に発現する以外はほとんどの成人正常臓器に発現を認めない癌胎児性抗原をコードする遺伝子であった。

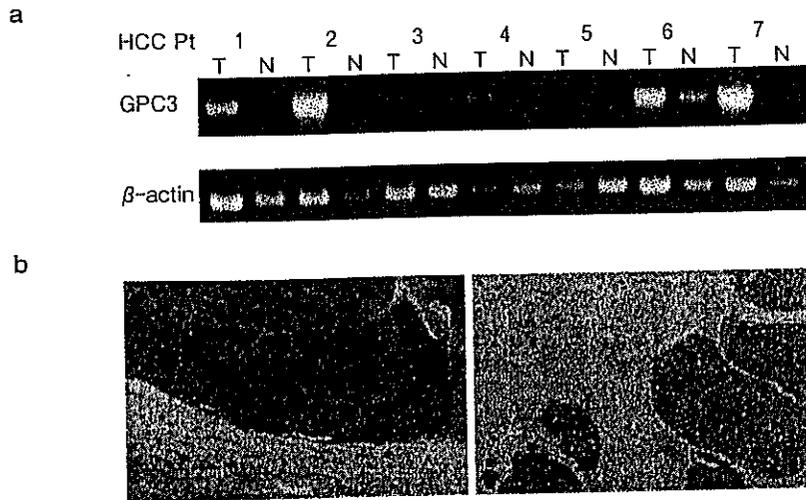


図2 HCC組織におけるGPC3の発現

- a : HCC組織の癌部 (T), 非癌部 (N)におけるGPC3mRNAの発現の有無をRT-PCR法にて検討し, 癌部においてのみGPC3の発現を認めた。
- b : HCC組織切片におけるGPC3蛋白質の発現を, 抗GPC3抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。

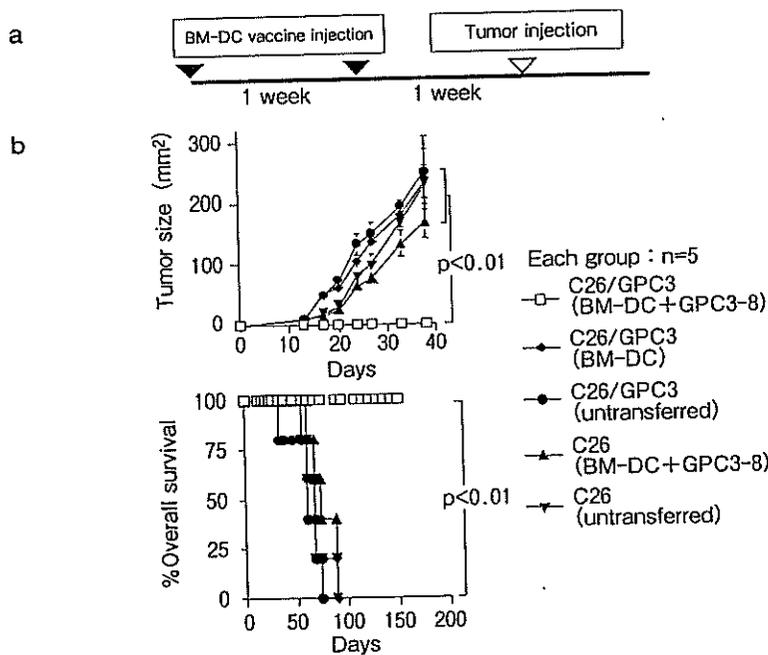


図3 マウスにおけるGPC3ペプチドを負荷したBM-DCワクチンによる腫瘍抑制効果

- a : 実験のプロトコール。BM-DCは1週間ごとに2回, BALB/cマウスの腹腔内に 5×10^5 個を投与した。その1週間後に腫瘍を 3×10^4 個背部の皮下に移植した。
- b : 抗腫瘍効果の検討。GPC3-8ペプチドを負荷したBM-DCワクチンを投与した後に, 同系マウス由来の大腸癌細胞株C26に, マウスGPC3遺伝子を強制発現させた細胞株 (C26/GPC3) を皮下移植した群では腫瘍の拒絶が認められた (上段)。さらに同群マウスにおいて, 生存期間の著明な延長が観察された (下段)。

表3 HLA-A2あるいはHLA-A24陽性HCC患者(それぞれPt-A2, Pt-A24)の約50%において, GPC3特異的なCTLが誘導された

Patients	Age	Gender	State of tumor†	GPC3 expression#	HKA expression★	CTL induction*
Pt-A2-1	80	F	IIIa	+	+	+
Pt-A2-2	72	M	II	+	+	+
Pt-A2-3	67	F	II	ND	ND	+
Pt-A2-4	54	M	I	+	+	+
Pt-A2-5	57	M	I	ND	ND	-
Pt-A2-6	66	M	I	-	-	-
Pt-A2-7	54	M	IIIa	+	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	ND	+
Pt-A2-9	68	F	IIIa	+	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	-
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+	+

†: TNM分類を用いた, #: 免疫染色を用いて腫瘍周囲組織と比較した, ★: 免疫染色にて膜が染色された場合を陽性とした, *: GPC3発現HCC細胞株HepG2に対する細胞傷害活性が, E/T比20で20%以上観察された場合にCTLを誘導できたと判断した。

3. 腫瘍マーカーとしてのGPC3の有用性

われわれは, ELISA法を用いてHCC患者の約40%の血清中のGPC3蛋白について検討したところ, HCC患者の血清中にのみ検出されるが, 健康人, その他の良性肝疾患患者や他の癌種の患者ではまったく検出されなかった。さらにHCC切除手術後に血清GPC3は著明に減少したことから, GPC3がHCCの腫瘍マーカーとして有用であることを報告した⁸⁾。HCCの腫瘍マーカーとしてのGPC3の有用性に関しては, 他施設からも同時期に報告されているが^{9,10)}, 早期診断や治療効果の判定などの臨床応用が期待される。

III. 抗腫瘍免疫療法のターゲットとしてのGPC3の有用性

1. マウスにおける腫瘍免疫の解析

発現の組織特異性が優れていることから, Nakatsuraらは, この新規癌胎児性抗原GPC3が理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかを検討した。日本人の約60%が所有するHLA-A24とBALB/cマウスのclass I分子のK^dに結合するペプチドの構造モチーフは, 非常に一致していることがわかっている。さらに, ヒトとマウスのGPC3では, アミノ酸配列のレベルで95%以上のホモロジーを認めることから, ヒトとマウスのGPC3でアミノ酸配列が完全に一致し, HLA-A24, K^dのいずれにも結合し得るGPC3由来のペプチドを合成した。これらをBALB/cマウスに免疫して解析し, K^d分子に結合して細胞傷害性Tリンパ球(CTL)に提示される(K^d拘束性)

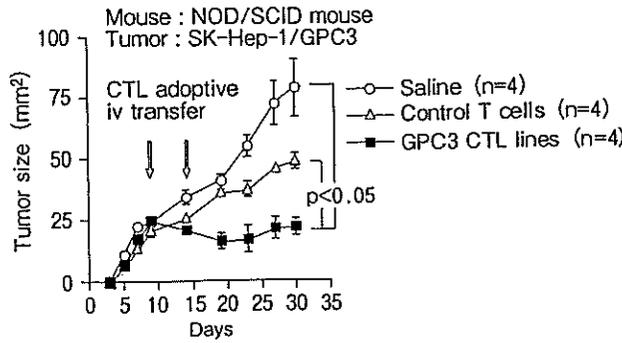


図4 GPC3 発現ヒト HCC 細胞株に対する養子免疫療法の有効性
免疫不全マウスである NOD/SCID マウスに移植した GPC3 発現ヒト HCC 細胞株に対する、ヒト GPC3 特異的 CTL の養子免疫による抗腫瘍効果を検討した。GPC3 エピトープペプチドで誘導したヒト CTL を投与すると、コントロール群に比べ有意に腫瘍の増大が抑制された。NOD/SCID マウスの背部の皮下に、ヒト HCC 細胞株 SK-Hep-1 に GPC3 遺伝子を強制発現させた SK-Hep-1/GPC3 を 1×10^7 個移植し、 5×5 mm の大きさになったところで CTL を 8×10^7 個 iv 投与した。HCC 患者の PBMC を GPC3 エピトープペプチドで刺激して誘導した CTL 投与群 (■) と、コントロールとして HIV エピトープペプチドで誘導した CTL 投与群 (△)、生理食塩水のみを投与した群 (○) の間で比較すると、GPC3 特異的 CTL 投与群ではコントロール群に比べ、有意に腫瘍増殖が抑制された。

CTL エピトープペプチドを同定した¹⁾。このエピトープペプチドを負荷した骨髄由来の樹状細胞 (BM-DC) ワクチンを BALB/c マウスの腹腔内に予防的に投与した場合、コントロール群に比べ、GPC3 発現マウス大腸癌腫瘍の増殖は著明に抑制された (図3)。このエピトープペプチドは HLA-A24 によっても提示され、ヒトでも同様に CTL エピトープとなる可能性があると思われた。また Motomura らは、マウス GPC3 を遺伝子導入したマウス ES 細胞より分化誘導した樹状細胞 (ES-DC-GPC3) を樹立した。ES-DC-GPC3 をマウスに免疫することにより、*in vivo*において GPC3 特異的な CTL が誘導され、移植された GPC3 発現腫瘍の増殖転移が抑制されることを報告している²⁾。

2. HCC 患者における腫瘍免疫の解析

日本人の HLA class I 対立遺伝子のうち、HLA-A24 (A*2402) は日本人の約 60% が所有し、HLA-A2 (A*0201) は約 30% が所有する、ありふれた対立遺伝子である。そこで、ヒトとマウスの GPC3 に保存されたアミノ酸配列をもつペプチドで、HLA-A2 (A*0201) に結合すると推定される GPC3 由来の 9~10 個のアミノ酸からな

るペプチドを 9 種類選択した。このうち、HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) に最も強く、GPC3 特異的な CTL を誘導できるエピトープペプチドを ELISPOT アッセイにて検討した結果、ペプチド A2-3 ; GPC3144-152 が CTL エピトープ候補として同定された。この GPC3 A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC を 2 回免疫した HLA-A2 Tgm では、重要臓器 (脳、皮膚、心、肺、肝、腎) への自己免疫反応は生じておらず、その安全性が示唆された。

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3144-152 と、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3298-306 を用いて、HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の PBMC から、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた。その結果、それぞれのペプチドについてペプチド特異的に CTL が誘導され、HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者の PBMC より GPC3144-152 ペプチドを用いて 8 名中 5 名から、また HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者の PBMC より GPC3298-306 ペプチドを用いて 6 名中 4 名から、各 CTL エピトープ特異的な CTL を誘導できた (表3)。

さらに、NOD/SCID マウスに GPC3 遺伝子を

強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下注射して生着させた後に, HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ で刺激することにより, HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト CTL 株を養子免疫した。GPC3 エピトープペプチドにて誘導した CTL 株を静脈内投与した NOD/SCID マウスでは, コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与した群と比較して, 有意差をもって腫瘍の増殖抑制が観察された (図 4)。現在, 国立がんセンター東病院にて HCC 患者を対象にして, これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床試験を計画中である。

おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは, HCC の免疫療法の新たなターゲットとして, その臨床応用が期待される。腫瘍の免疫逃避に対抗するためには多様な腫瘍拒絶抗原のレパートリーを確立することが望まれる。GPC3 がその一つとして, これを用いた免疫療法が HCC の再発, 発症防止に寄与することを期待したい。

文 献

- 1) Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., *et al.*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res.* 10: 8630-8640, 2004.
- 2) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., *et al.*: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 66: 2414-2422, 2006.
- 3) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., *et al.*: Identification of HLA-A2-or-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 2689-2697, 2006.
- 4) Butterfield, L.H.: Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: S232-241, 2004.
- 5) Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., *et al.*: Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274: 26968-26977, 1999.
- 6) Gonzalez, A.D., Kaya, M., Shi, W., *et al.*: OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell Biol.* 141: 1407-1414, 1998.
- 7) Capurro, M.I., Xiang, Y.Y., Lobe, C., *et al.*: Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res.* 65: 6245-6254, 2005.
- 8) Nakatsura, T., Yoshihiro, Y., Monji, M., *et al.*: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 16-25, 2003.
- 9) Hippo, Y., Watanabe, K., Watanabe, A., *et al.*: Identification of soluble NH₂-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 64: 2418-2423, 2004.
- 10) Capurro, M., Wanless, I.R., Sherman, M., *et al.*: Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 125: 89-97, 2003.

別刷

癌と化学療法

Vol.33(2006)

癌と化学療法社

Glypican-3 (GPC3) を標的とした免疫療法の有用性の検討

小森 宏之^{*1,2} 中面 哲也^{*3} 別府 透^{*1} 西村 泰治^{*2} 馬場 秀夫^{*1}

(*Jpn J Cancer Chemother* 33(12):1742-1744, November, 2006)

Possibilities of Glypican-3-Specific Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma: Hiroyuki Komori^{*1,2}, Tetsuya Nakatsura^{*3}, Toru Beppu^{*1}, Yasuharu Nishimura^{*2} and Hideo Baba^{*1} (^{*1}Dept. of Gastroenterological Surgery, and ^{*2}Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, ^{*3}The Immunotherapy Section, Investigative Treatment Division, Center for Innovative Medicine, National Cancer Center East)

Summary

The patients with hepatitis B or C based liver cirrhosis are at high risk for developing Hepatocellular carcinoma (HCC), and HCC patients treated surgically or by other therapies are also at high risk for recurrence. As a result, the prognosis of HCC remains poor, and new therapies for the prevention of cancer development and recurrence are urgently needed. We previously reported that glypican-3 (GPC3) was over expressed specifically in HCC. In this report, we found the HLA-A2 or HLA-A24 restricted GPC3 epitope peptide, and investigated whether these peptides could induce GPC3 reactive CTLs from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A2⁺ or HLA-A24⁺ HCC patients. We used HLA-A2.1 (HHD) transgenic mice (Tgm) to identify the HLA-A2-restricted GPC3 epitopes. We found that these epitope peptides could induce peptide-reactive CTLs in about 50% of HLA-A2⁺ or HLA-A24⁺, and GPC3⁺ HCC patients. Our study raises the possibility that these GPC3 peptides may therefore be applicable to cancer immunotherapy for prevention of cancer development and recurrence of HCC. Key words: GPC3, HCC, Immunotherapy

要旨 肝細胞癌は治療後も高頻度に再発を繰り返すため予後不良な癌であり、発癌予防や治療後の再発予防のために有効な治療法の確立が望まれる。GPC3は肝細胞癌に高発現し、正常組織にはほとんど発現しないため、腫瘍免疫のターゲットとして理想的な癌特異的抗原である。今回最も抗腫瘍活性が高く、自己免疫現象を誘導しないHLA-A2もしくはHLA-A24拘束性CTLエピトープペプチドを同定し、GPC3をターゲットとした肝癌に対する免疫療法の有用性を検討した。HLA-A2エピトープペプチドに関しては、HLA-A2トランスジェニックマウスを用いて最も効果的にCTLを誘導できるものを決定し、さらにHLA-A2⁺もしくはHLA-A24⁺患者におけるCTL誘導の有無を検討した。それぞれの肝癌患者末梢血単核細胞からGPC3特異的ヒトCTLが半数以上の症例で誘導可能であった。GPC3はウイルス性肝硬変患者の発癌予防や術後再発予防における免疫療法のターゲットとして期待される。

はじめに

glypican-3 (GPC3)は肝細胞癌特異的に高発現し、近年において腫瘍マーカーとしての有用性を報告されている¹⁾。今回、GPC3がHCC患者に対する免疫療法のターゲットとして有用か否かを検討した。

I. 方法

エピトープ候補ペプチドの決定: HLA-A24拘束性のエピトープは以前同定したペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILS-

LEEL)を使用した²⁾。HLA-A2拘束性エピトープは、マウスとヒトとで共通の結合モチーフをもち、HLA-A2分子への結合力の高いペプチド9種類をHLA-A2トランスジェニックマウスを免疫することで決定した。

免疫したマウスの自己免疫現象の検討: 免疫したマウスの重要臓器に対するリンパ球浸潤の有無を免疫染色し検討した。

HCC患者におけるCTLの誘導の検討: 熊本大学医学部消化器外科にて治療中のHLA-A2⁺もしくはHLA-A24⁺のHCC患者からインフォームド・コンセントを得た後、

^{*2} 熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学

^{*3} 国立がんセンター東病院・臨床開発センター

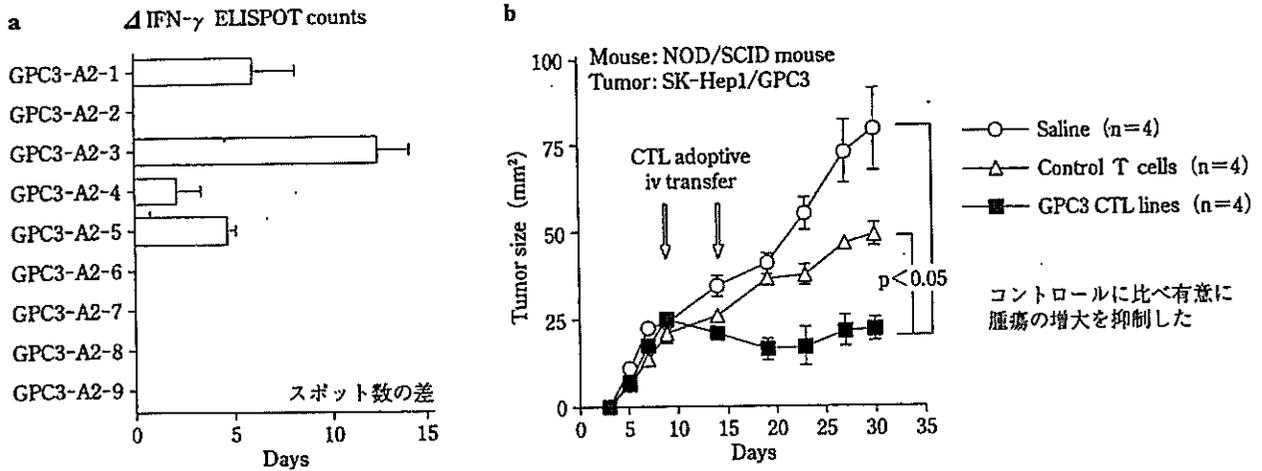


図1 GPC3-A2 エピトープペプチドの決定とその抗腫瘍効果

a: ELISPOT assay によるエピトープペプチドの検討。GPC3-A2-3 ペプチドを提示させた BM-DC をターゲットとした場合においてコントロールに比べ有意に IFN- γ を産生した。
b: 免疫不全マウスである NOD/SCID マウスに移植した GPC3 発現腫瘍に対する増殖抑制効果の検討。GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL を投与すると有意に腫瘍の増大を抑制した。

HLA-A2⁺ 患者 10 人, HLA-A24⁺ 患者 12 人から血液サンプル 30~50 ml を採取した。そのうち CD14⁺ 細胞から樹状細胞を誘導しエピトープを提示させ, CD8⁺ 細胞を 1 週間ごと 3 回刺激した後特異性を Cr release assay, ELISPOT assay にて検討した。

養子免疫療法に関する検討: 免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) に GPC3 を移入したヒト肝癌細胞株 SK-Hep1/GPC3 を移植し 5×5 mm の大きさとなった後, GPC3 エピトープで誘導した HCC 患者由来の CTL を 2 回 iv 投与し, 腫瘍縮小効果を検討した。コントロールとして HIV 由来ペプチド誘導 CTL もしくは生理食塩水のみを投与し比較した。

II. 結 果

エピトープ候補ペプチドの決定: ELISPOT assay を用いて検討した結果 HLA-A2 拘束性の CTL エピトープ候補として, GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) を同定した。図 1a はこのペプチドを提示させた同種骨髄由来樹状細胞に対するスポットがコントロールと比較し, 最も差があることを示す。

免疫したマウスの自己免疫現象の検討: GPC3 由来ペプチドを用いた樹状細胞ワクチンにて免疫されたトランスジェニックマウスの重要臓器には, CD8⁺ 細胞や CD4⁺ 細胞の浸潤は認められず, 自己免疫反応は生じていないと判断した。

HCC 患者における CTL 誘導の検討: 実際の HCC 患者からの CTL 誘導に関しては, HLA-A2 拘束性エピトープペプチドの GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) を用いて 10 人中 5 人, HLA-A24 拘束性エピトープペプチドの

GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) を用いて 12 人中 6 人から GPC3 特異的 CTL が誘導できた (表 1)。

養子免疫療法に関する検討 (図 1b): 各群 4 匹ずつ検討したところ, GPC3 エピトープで誘導したヒト CTL 投与群がコントロールの HIV 由来ペプチド誘導 CTL 投与群や生理食塩水投与群に比較し有意に増殖を抑制した。

III. 考 察

GPC3 は Wnt シグナルを介して HCC の癌化と増殖に重要であると近年報告されている³⁾。肝癌細胞の悪性形質転換に重要な役割を担っている分子で癌抗原として免疫系からの逃避が起こりにくい抗原であると考えられ, ゆえに GPC3 は HCC の癌抗原として非常に有用であると考えられる。われわれは今回 HLA-A2 もしくは HLA-A24 拘束性の GPC3 由来 CTL エピトープを同定し, これらのペプチドを用いて HCC 患者の末梢血から約 50% の頻度で GPC3 に反応する CTL を誘導できた。これらのペプチドによるワクチンは HLA-A2 Tgm に自己免疫反応を引き起こさなかった。

今回の実験では, 最も効果的に CTL を誘導し得るメジャーエピトープを決定することが目的であったため, マウスの免疫では, 9 種類の HLA-A2 拘束性ペプチドの混合物を提示させた BM-DC を投与し, 最も強い反応を示すペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) について検討した。このペプチド以外にも ELISPOT にて差がみられるペプチドが数個存在したが, これらのペプチドについてはエピトープとなり得るか否かを今後検討したい。また, HLA-A2 拘束性のペプチドを選択する際マウス GPC3 とヒト GPC3 とで共通のアミノ酸配列をもつペプチドを

表 1 HLA-A2⁺ もしくは HLA-A24⁺ 肝癌患者の約 50% において GPC3 特異的な CTL が誘導された

Patients	Age	Gender	State of tumor [†]	GPC3 expression [*]	CTL induction ^{**}
Pt-A2-1	80	F	IIIa	+	+
Pt-A2-2	72	M	II	+	+
Pt-A2-3	67	F	II	ND	+
Pt-A2-4	54	M	I	+	+
Pt-A2-5	57	M	I	ND	-
Pt-A2-6	66	M	I	-	-
Pt-A2-7	54	M	IIIa	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	+
Pt-A2-9	68	F	IIIa	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	-
<hr/>					
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+

[†]: TNM 分類を用いた。

^{*}: 免疫染色を用いて腫瘍周囲組織と比較した。

^{**}: GPC3 発現肝癌細胞株 HepG2 に対する細胞傷害活性が, E/T 比 20 で 20% 以上を CTL が誘導できたと判断した。

選んだが, ヒトのみにプロセスされるペプチドを見落している可能性はあると思われる。

われわれを含めた複数の施設より GPC3 は早期の HCC でも発現し, 早期の HCC の診断にも有用であると報告されている。早期から発現することで B, C 型肝炎や肝硬変から発生した肝癌の早期治療においても期待できると考えられる。

今回の検討では, 約 5 割の患者から GPC3 に反応し得る CTL が誘導できた。腫瘍組織における CTL の浸潤や GPC3 反応性の CTL の誘導とその患者の予後との相関について, 初発の HCC 患者 7 名に関して検討したが, 相関は認められなかった。現段階では CTL の誘導と予後, 脈管浸潤との相関は認めなかったが症例を増やし検討する予定にしている。

図 1b に示すように, NOD/SCID マウスに SK-Hep1/GPC3 を移植し, GPC3 反応性 CTL の養子免疫すると, コントロールに比べ有意に腫瘍の増殖を抑制した。しかしながら, 二度目の養子免疫の 2 週間後から再び増殖が認められたことから, 養子免疫を繰り返すことが必要と考えられた。

ま と め

われわれは HCC の新たな治療として, GPC3 をターゲットとした免疫療法の可能性を検討した。HCC の再発, 進行などを予防できる有効な治療法として期待できる。

本論文の要旨は第 27 回癌免疫外科研究会において発表された。

文 献

- 1) Nakatsura T, Yoshitake Y, Nishimura Y, *et al*: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 16-25, 2003.
- 2) Nakatsura T, Komori H, Nishimura Y, *et al*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 10: 8630-8640, 2004.
- 3) Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, *et al*: Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 65: 6245-6254, 2005.

特集

5. 皮膚科医のための臨床トピックス

悪性黒色腫の新しい血清マーカー

glypican-3とSPARC

影下登志郎 福島 聡 尹 浩信 西村 泰治
中面 哲也

臨床皮膚科

第60巻 第5号 増刊号 別刷

2006年4月10日 発行

医学書院

悪性黒色腫の新しい血清マーカー glypican-3 と SPARC

影下登志郎*1・福島 聡*1・尹 浩信*1
西村 泰治*2・中面 哲也*3

要約 悪性黒色腫(メラノーマ)の新しい血清マーカーとして glypican-3(GPC 3)と SPARC を同定した。GPC 3 はヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーに属する糖鎖修飾が強い GPI アンカー蛋白であるが、肝細胞癌とメラノーマに特異的に発現している。血清 GPC 3 はメラノーマの約 40%で検出されるが、健常人では検出されない。一方、SPARC はシステインに富む酸性分泌蛋白で、メラノーマに高頻度に発現している。血清 SPARC はメラノーマの約 30%で検出されるが、健常人ではほとんど検出されない。両者は早期メラノーマにおいても検出され、いずれかが陽性を示す症例は 0 期 88%, I 期 48%, II 期 71%である。両者を併用することで早期メラノーマが血清学的に診断可能になる。

キーワード メラノーマ, 腫瘍マーカー, glypican-3(GPC 3), SPARC

影下登志郎, 他: 臨皮 60(5 増): 169-172, 2006

はじめに

腫瘍マーカーは癌細胞または癌細胞と免疫応答をしている細胞から産生される物質である。腫瘍マーカーは悪性腫瘍の診断や転移巣の検出などに広く応用されている。

現在、悪性黒色腫(メラノーマ)の血清腫瘍マーカーとしては感度や特異性の点から 5-S-cysteinyl-dopa (5-S-CD), melanoma inhibitory activity (MIA), S 100 β 蛋白などが用いられている¹⁻⁴⁾。しかしながら、これらのマーカーは主として進行期で検出されるものが多い。そのため、診断よりも転移巣の検出や経過観察のモニターと

して用いられる。悪性黒色腫は再発・転移を生じやすいので、それらを早期発見できる腫瘍マーカーの意義は大きく、新たなマーカーの発見が望まれる。

最近、筆者らは早期メラノーマにおいても検出できる新たな血清マーカーを同定したので紹介する。



GPC 3

GPC 3(glypican-3) はヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーに属する 60 kDa の糖鎖修飾が強い GPI アンカー蛋白である。その機能は不明

* New melanoma serum markers: Glypican-3 and SPARC

*1 Toshiro KAGESHITA, Satoshi FUKUSHIMA, and Hironobu IHN: 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学(主任: 尹 浩信教授) Department of Dermatology, Graduate School of Medical and Pharmacological Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan(Director: Prof H IHN)

*2 Yasuharu NISHIMURA: 同免疫識別学(主任: 西村 泰治教授) Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan(Director: Prof Y NISHIMURA)

*3 Tetsuya NAKATSURA: 国立がんセンター東病院がん治療開発部(主任: 中面 哲也室長) Immunotherapy Section, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan(Chief: Dr T NAKATSURA)
[連絡先]: 影下登志郎: 熊本大学大学院医学薬学研究部皮膚機能病態学(☎ 860-8556 熊本市本荘 1-1-1)

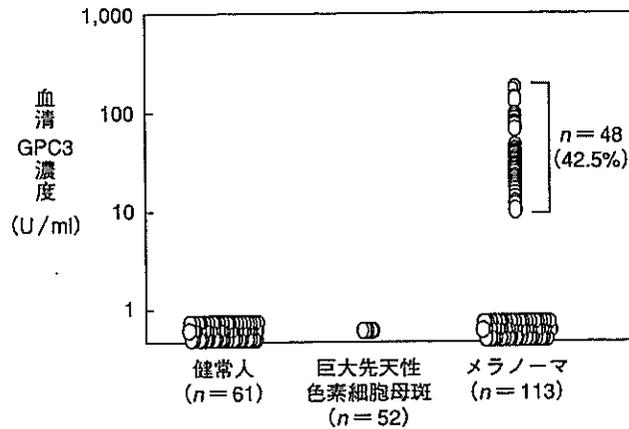


図1 健康人, 巨大先天性色素細胞母斑, メラノーマでの GPC3 の比較

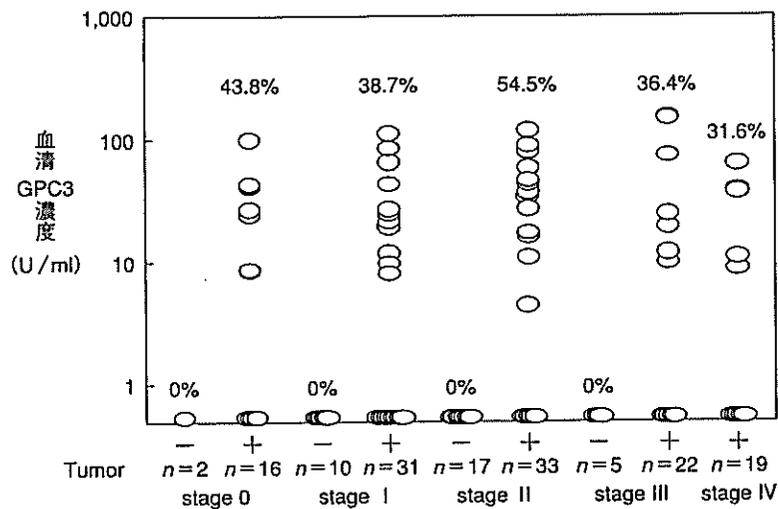


図2 メラノーマ患者血清中の各ステージごとの GPC3 の陽性率

であるが, ヒトの *GPC3* 遺伝子変異が X 染色体関連疾患で巨人症, 嚢胞腎などを呈する Simpson-Golabi-Behmel 症候群患者で見いだされている。また, *GPC3* 遺伝子破壊マウスは胎生期に巨大化し, 種々の奇形を発現, 周産期に死亡する。さらに, ある種の腫瘍細胞では増殖の抑制やアポトーシスの誘導に関連する。

GPC3 は最近 DNA マイクロアレイで肝細胞癌に特異的に発現している遺伝子として同定された⁵⁾。*GPC3* は肝細胞癌の 80% に発現, 胎生期では肝臓, 成人では胎盤のみに発現する, いわゆる癌胎児性抗原の一種である。

GPC3 は肝細胞癌以外の癌では発現していな

いが, 例外的にメラノサイト系細胞に発現している。すなわち, 培養メラノーマ細胞や色素細胞母斑・メラノーマ組織の約 80% に mRNA および蛋白レベルで発現がみられる⁶⁾。

血清 GPC3

血清マーカーとしての GPC3

GPC3 は培養肝細胞癌細胞や培養メラノーマ細胞から分泌され, モノクローナル抗体を用いた ELISA 法で検出することができる^{5,6)}。さらに, 肝細胞癌やメラノーマ患者の血清中でも *GPC3* 蛋白を検出することができる。術前メラノーマ患者血清では 113 人中 48 人 (42.5%) に *GPC3* 蛋白が検出されたが, 術後はすべて陰性化した (図

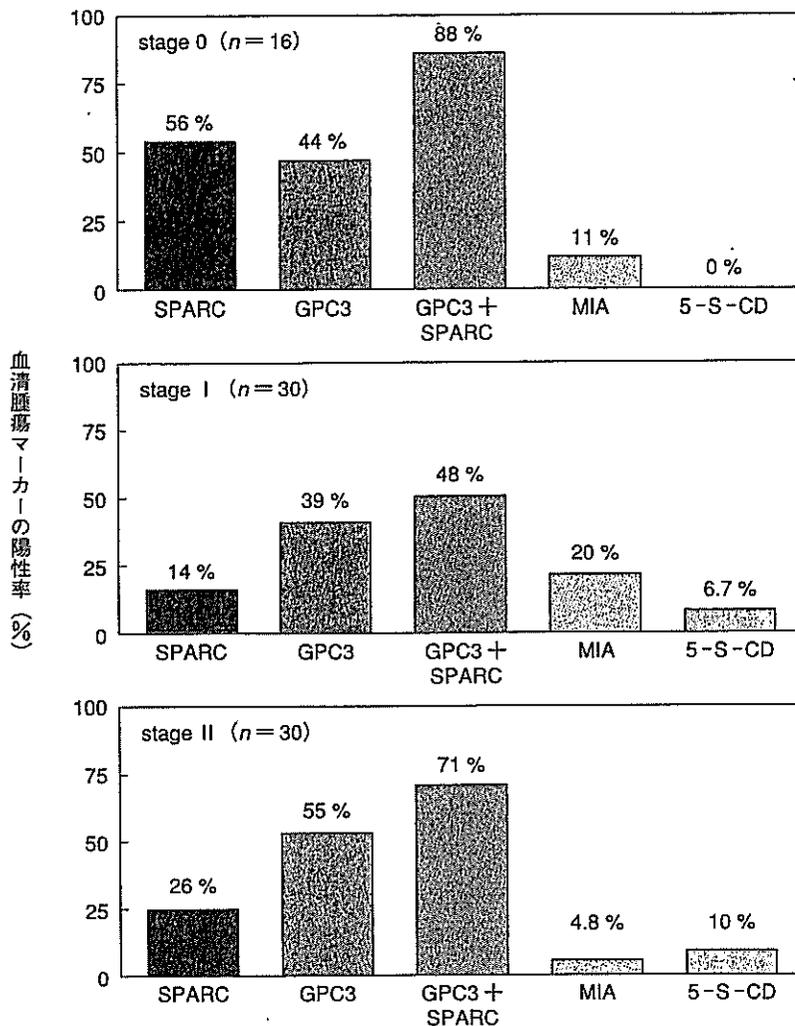


図3 SPARC, GPC3, MIA, 5-S-CDのメラノーマ各ステージでの陽性率の比較

1)⁶⁾ 陽性率は0, I, II, III, IV期でそれぞれ43.8, 38.7, 54.5, 36.4, 31.6%であった(図2)。病期別での陽性率に差は認められなかったが、これまでの腫瘍マーカーと異なり、表皮内メラノーマである0期でも約50%の症例で陽性を示した点の特異である。一方、mRNAおよび蛋白レベルで発現がみられる巨大色素細胞母斑ではまったく検出されず、その他の癌患者や健康人でも検出されず、メラノーマおよび肝細胞癌に特異性が極めて高い(図1)。

SPARC

SPARC(secreted protein, acid and rich in

cystein)はosteonectinやBM-40とも呼ばれ、280アミノ酸からなる43kDaのシステインに富む酸性分泌蛋白である。発現は骨のオステオブラストや血小板、創傷部位、さらには腫瘍内の間質細胞にみられる。メラノーマでは腫瘍細胞自体に高発現し、発現は腫瘍の進行に相関している⁷⁾。また、色素細胞母斑でもmRNAおよび蛋白レベルで発現している。SPARCの機能は創傷治癒、細胞接着・増殖、分化、血管増生など細胞外基質との調節作用が示唆されている。

血清マーカーとしてのSPARC

血清中のSPARCはモノクローナル抗体を用

いたELISA法で検出できる。SPARCは血小板にも存在するため、健常人においても血清に少量ながら検出される。そのため血漿での測定が望ましい。健常人の平均+2SDを正常上限とすると、術前メラノーマ患者117人中38人(33%)、巨大色素細胞母斑6人中2人(33%)、健常人61人中3人(5%)で陽性となった⁹⁾。病期別では0, I, II, III, IV期の陽性率はそれぞれ56, 14, 26, 36, 47%であった。GPC3同様、表皮内メラノーマでも検出できるが、病勢による上昇は認められない。術後は速やかに大部分の症例で低下する。

GPC3とSPARCの最大の特徴は、従来のメラノーマ腫瘍マーカーであるMIA, 5-S-CDに比べ早期でも陽性を示すことである。GPC3とSPARCのいずれかが陽性になれば、第0, I, II期での検出率は88, 48, 71%となる(図3)⁹⁾。一方、MIAの陽性率は11, 20, 5%, 5-S-CDは0, 7, 10%である。

血清GPC3・SPARCはメラノーマの進行度とは相関せず、腫瘍量とも無関係である。これは両者がメラノーマの進展よりも発生に重要な役割を

演じていることを示唆する。メラノーマ細胞におけるGPC3・SPARCの機能や分泌のメカニズムの解明は今後の課題である。

おわりに

メラノーマの新しい血清マーカーとしてGPC3とSPARCが有用であることが示唆された。両者を組み合わせて用いることで、血清学的に早期メラノーマの80%以上が診断可能となる。今後は多施設での追試や、臨床的にメラノーマとの鑑別が重要であるSpitz母斑や異型母斑を含めた検討が必要である。

文献

- 1) Brochez L, Naeyaer JM: Br J Dermatol 143: 256, 2000
- 2) Wakamatsu K, et al: Melanoma Res 12: 245, 2002
- 3) Bosserhoff AK, et al: Cancer Res 57: 3149, 1997
- 4) Bottoni U, et al: Melanoma Res 13: 427, 2003
- 5) Nakatsura T, et al: Biochem Biophys Res Comm 306: 16, 2003
- 6) Nakatsura T, et al: Clin Cancer Res 10: 6612, 2004
- 7) Ledda F, et al: J Invest Dermatol 108: 210, 1997
- 8) Ikuta Y, et al: Clin Cancer Res 11: 8079, 2005

Derm.
2006

陪席医の一日

杉田和成(産業医科大学皮膚科学教室)

やはり教授診を間近でみることでできる陪席医を経験することは有意義だと思います。具体的には、臨床、病理診断だけでなく、問診に始まり皮疹を観察するやり方、処方、必要な検査を的確にオーダーする等々です。しかしながら、診察時間内に教授診の難しい臨床や病理を理解するのは不可能です。教授診前日までは、処方内容や病理組織をチェックする、さらに難しい症例、貴重な症例があればそれらに関する文献を読み、また患者検体の解析結果もそろえておかなければなりません。

いよいよ診察が始まれば、教授自ら処置、注射をし、時間が許せば生検、切除までもされる。また、皮膚症状に合わせた微妙な処方内容の変更も勉強になります。そういう診察医としての姿勢や手技、知識を大いに学んでいます。診察中、教授から「アトピーに合併した〇〇は何例くらいあった？」などと聞かれることもあるし、答えられるように準備しておかなければなりません。診察が終われば、夜は患者リンパ球の表面マーカー解析や培養が待っています。また、貴重な症例があれば論文も書かなければなりません。こうして陪席医の一日が終わるのですが、夜の研究は半分楽しみながらやっているのも事実です。

陪席医を通じて得たことは、臨床症例1例1例を大切に詳細に観察すること、日夜研究を続けその成果を臨床に還元していく姿勢です。そういうことをたたき込まれながら日々成長しているような気がいたします。

(〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1)

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業
がん治療のための革新的新技術の開発研究

平成16～18年度 総合研究報告書

主任研究者 野村 和弘

平成19（2007）年 4月

Vo1-2

H17 年度 研究成果

Recent Advances in Radiology for the Diagnosis of Gastric Carcinoma

GEN IINUMA¹, HIDETO TOMIMATSU¹, YUKIO MURAMATSU¹, NORIYUKI MORIYAMA¹,
TOSHIAKI KOBAYASHI², HIROSHI SAITO², TETSUO MAEDA³, KUNIHISA MIYAKAWA³,
FUMIHIKO WAKAO³, MITSUO SATAKE³, and YASUAKI ARAI³

Introduction

Radiographic diagnosis of gastric carcinoma [1] was first introduced in the 1960s in Japan, which led the world in the early diagnosis of gastric carcinoma by double-contrast method using film-screen systems (FSS) [2,3]. Qualitative diagnostics, including diagnosis of the depth of tumor invasion, were explored thoroughly in the 1970s, and it could be claimed that the radiographic diagnosis of gastric carcinoma was completely established by the beginning of the 1980s [4]. Gastric radiography has now become a standard examination modality in the screening and preoperative staging of gastric carcinoma and is widely used across the globe. The mortality rate from gastric carcinoma is especially high in Japan, and gastric radiography has made a substantial contribution to the detection of gastric carcinoma in mass screening. With recent advances in endoscopic techniques, the primary role in the diagnosis of gastric carcinoma, including its early diagnosis, has been inherited by endoscopy, but it is also a fact that radiography is still widely used in clinical diagnosis in screening and preoperative staging [5]. The demand for computerization of medical information grew in the 1980s, and against a background of advances in image engineering, the digitalization of medical images has proceeded apace [6,7]. In gastric radiography, too, digitalization via digital radiography (DR) using high-resolution charge-coupled device (CCD) cameras (CCD-DR) has been established and disseminated rapidly, and we also have reported its usefulness in the diagnosis of gastric carcinoma [8]. Meanwhile, a recent major development in the field of radiology has been the emergence of multidetector row computed tomography (CT) (MDCT) [9]. With the advent of MDCT in the second half of the 1990s, CT has achieved increased efficiencies and improved image quality in a revolutionary scanning modality [10]. In the preoperative staging of gastric carcinoma, it is now possible to accurately evaluate local inva-

¹Cancer Screening Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, ²Cancer Screening Technology Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, ³Diagnostic Radiology Division, National Cancer Center Hospital, National Cancer Center, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan
e-mail: giinuma@gan2.ncc.go.jp

sion and small metastases, and three-dimensional (3D) MDCT imaging (MDCT gastrography) has arrived on the scene as a new diagnostic tool for primary lesions.

In this chapter, we describe the present status of radiologic diagnosis of gastric carcinoma using CCD-DR at our center, report our experience of MDCT gastrography in the preoperative staging of gastric carcinoma, and discuss the future prospects for radiographic diagnosis of gastric carcinoma using these new diagnostic techniques.

Advanced Digital Radiographic Systems for Gastric Diagnosis

In our hospital, images yielded by radiography of the gastrointestinal tract became completely digitalized with the adoption of CCD-DR (DR-2000H; Hitachi Medical, Tokyo, Japan) in 1999. At present, hard copies of diagnostic images are prepared for interpretation, but monitor-based diagnosis is yet to become a reality. Our radiographic investigations of the gastrointestinal tract use three CCD-DR systems: one C-arm type, one over-tube type, and one under-tube type. Each CCD-DR is connected by a DR network to two laser printers and an image server, and in parallel with the scanning procedure, reference images are forwarded to the hospital information system via a gateway after DICOM (digital imaging and communication in medicine) conversion at the same time as the diagnostic images are processed. After DICOM

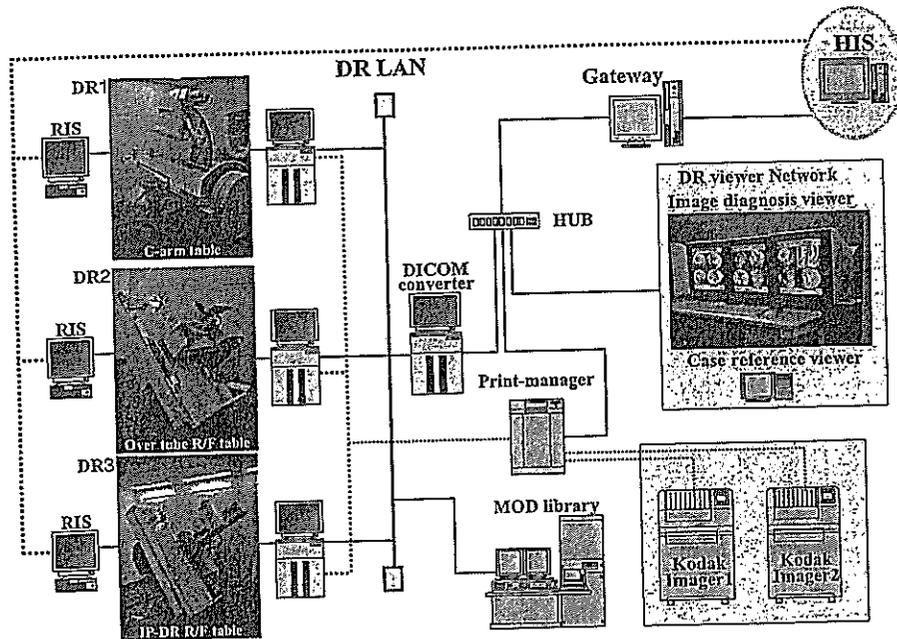


FIG. 1. Advanced digital radiography system for gastric diagnosis. Three charge-coupled device-digital radiography (CCD-DR) units are routinely used for gastric examinations in our hospital. Each unit connects with a DR network, and the images can be diagnosed on an image workstation

conversion, the images are accessible for monitor diagnosis at an image workstation with three viewers (Fig. 1).

The Status of CCD-DR-Based Radiographic Examination of Gastric Carcinoma

At our center, we use 250–300 ml barium at a 130–140 w/v% concentration in gastric radiographic studies. The scanning methods employed are the filling method, double-contrast radiography, and the compression method, but the core diagnostic technique in radiographic diagnosis of gastric carcinoma is double-contrast imaging obtained with barium (positive contrast medium) and gas (negative contrast medium). After barium is swallowed, the patient is given 5 g of a foaming agent, and by distending the stomach via the CO₂ gas so produced, we are able to easily obtain double-contrast images. The barium contained in the gas-distended stomach moves with changes in posture, and double-contrast images of excellent quality are obtained by ensuring that the barium adheres uniformly to the mucosal surfaces. Unlike the filling and compression methods, double-contrast imaging is indispensable for the visualization of early gastric carcinoma, which is characterized by few irregularities of the mucosal surfaces (Fig. 2). With gastric radiography based on the double-contrast method, we can easily identify the macroscopic types of gastric carcinomas, their exact extensions and locations in the stomach (Figs. 3–6). However, viewing double-contrast images obtained with contrast provided by gas and barium requires a broad dynamic range. The dynamic range for CCD-DR images adequately covers the image quality required for gastric radiography, and the image quality matches that in conventional FSS. Additionally, CCD-DR digital images also enable the optimization of image quality via image processing after scanning and, compared with FSS, are relatively well matched image by image and allow standardized diagnostic images to be obtained.

Comparative Evaluation of FSS and CCD-DR in the Diagnosis of Gastric Carcinoma

We conducted a prospective study to evaluate the difference in diagnostic accuracy between FSS and CCD-DR, and reported in a publication of *Radiology* [8]. From January to February 1997, we randomly assigned patients scheduled for gastric radiography to either FSS or CCD-DR; 112 patients were examined by FSS and 113 by CCD-DR. Six radiologists who were blinded to the clinical details assessed the films for each patient with a six-level confidence rating for the presence or absence of gastric carcinoma. The CCD-DR images in this study were prepared as hard copies for diagnosis. The diagnoses for each patient were rated against those produced by three other radiologists who conducted the actual radiographic examinations and were aware of all clinical data, such as endoscopic findings and the pathology of biopsy specimens. The sensitivity and specificity of FSS and CCD-DR for gastric carcinoma were determined from the assessments obtained, the difference between the two modalities was statistically analyzed, and a comparison was performed by receiver-operating characteristic (ROC) analysis. The study yielded a diagnosis of gastric carcinoma by FSS in 24 patients and by CCD-DR in 27 patients; the sensitivity for diagnosing the presence of gastric carcinoma was 64.6% and 75.3%, respectively

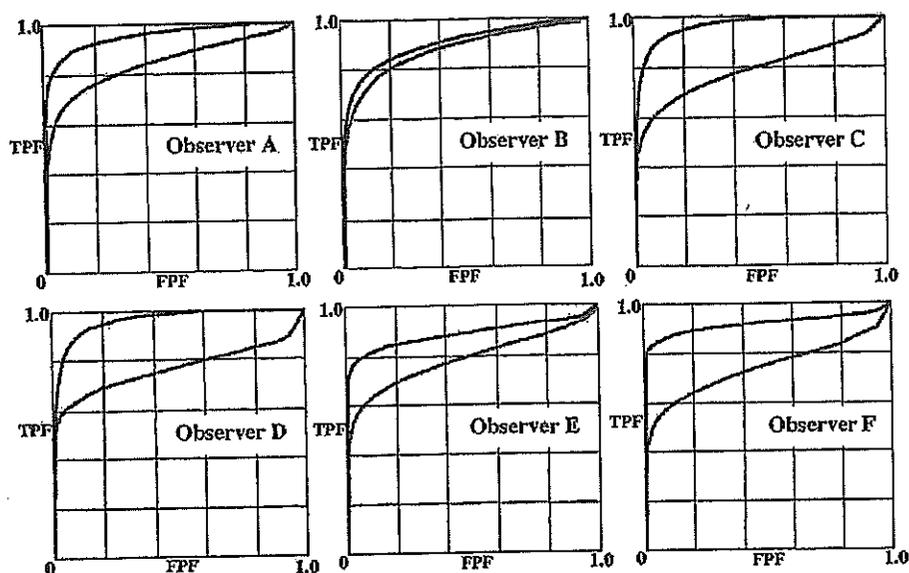


FIG. 7. Receiver operating characteristic (ROC) curves obtained from six observers. All observers achieved more accurate results with CCD-DR than with conventional radiography. Diagnostic accuracy of CCD-DR is clearly superior to that of conventional radiography. (Used with permission from Radiological Society of North America)

($P = 0.278$), and the specificity was 84.5% and 90.5%, respectively ($P = 0.011$). The ROC analysis [11] also showed that the diagnostic performance of CCD-DR was clearly superior (Fig. 7).

Usefulness of Radiography of Gastric Carcinoma by CCD-DR

The diagnostic performance of CCD-DR for gastric carcinoma is adequately comparable to that of FSS, indicating that the digitalization of images in gastric radiography is entirely feasible. The future adoption of diagnosis by monitor display will make possible the real-time display and optimization of diagnostic images and enable greater ease of image storage and retrieval. Capitalizing on these advantages of digitalization promises to yield an efficient and effective diagnostic environment for screening and preoperative staging, as compared with the conventional FSS modality.

Preoperative Evaluation of Gastric Carcinoma Using MDCT

To date, the role of radiographic CT studies in the preoperative staging of gastric carcinoma has primarily involved evaluating invasion of surrounding organs or metastasis to lymph nodes or other organs, and it was rare for it to be used for evaluation of the primary tumor itself [12,13]. However, the advent of MDCT has made possible the arrival of full-scale volume scans, facilitating high-speed, detailed image acquisition over an extensive area. The degree of resolution of CT images has improved