

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18年度 研究報告書

主任研究者 木下 平

平成19 (2007) 年3月

目 次

I. 構成員名簿	----- 1
II. 平成18年度総括研究報告	----- 3
新規癌胎児性抗原を利用した肝細胞癌の診断と治療	
主任研究者 国立がんセンター東病院上腹部外科 木下 平	
III. 分担研究報告	
1. HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3 (GPC3)由来ペプチドワクチンの前臨床試験	----- 11
国立がんセンター東病院上腹部外科 木下 平	
国立がんセンター東病院肝胆膵内科 古瀬 純司	
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 中面 哲也	
2. 肝細胞癌と胆管細胞癌の鑑別における GPC3 免疫染色の有用性に関する研究	----- 15
国立がんセンター東病院上腹部外科 木下 平	
国立がんセンター東病院肝胆膵内科 古瀬 純司	
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 中面 哲也	
3. Glypican-3 を用いた肝細胞癌の診断法ならびに免疫療法の開発に関する基礎研究	----- 17
熊本大学医学薬学研究部免疫識別学分野 千住 覚、西村 泰治	
4. 酸化ストレスによる細胞応答の分子基盤の解明	----- 23
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	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 25
V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 29

I. 平成18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	木下 平	国立がんセンター東病院上腹部外科	外来部長
分担研究者	古瀬 純司	国立がんセンター東病院肝胆膵内科	病棟医長
	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
	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
	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
研究協力者	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

II.平成18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

主任研究者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科（外来部長）

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である Glypican-3 (GPC3) を用いた肝細胞癌の診断法、ならびに GPC3 を標的とするペプチドワクチンを用いた新しい肝細胞癌の治療法の開発を目的とする。17年度の研究成果に基づき、本年度はマウスによる前臨床試験およびペプチドの安全性試験を実施し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て19年2月から国立がんセンター東病院において進行肝細胞癌患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験を開始した。本試験により安全性と免疫学的有効性を検証し、次相以降の至適投与量、投与回数を決める。また、ES細胞由来樹状細胞 (ES-DC) ワクチンの開発においては、モデル抗原遺伝子を導入したヒトES細胞より分化誘導した樹状細胞 (ヒトES-DC) を用いて、ヒトT細胞に抗原特異的な免疫応答を誘導することに成功した。以上の研究成果に基づき、最終年度の平成19年度は、集大成としての臨床第I相試験を円滑に遂行するとともに、GPC3 遺伝子を導入したヒトES-DCを用いた癌の細胞ワクチン開発に関わる基礎研究や GPC3 の診断への応用などについてさらに研究を進め、次年度以降の第II相、第III相試験への足がかりとすることを目標とする。

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
古瀬 純司 国立がんセンター東病院肝胆膵内科
病棟医長
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
佐々木 裕 熊本大学大学院医学薬学研究部
消化器内科学 教授

研究協力者

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

A. 研究目的

肝細胞癌の治療としては、根治的治療としての肝切除、ラジオ波焼灼療法 (RFA) などの局所壊死療法、ならびに進行癌に対する動脈塞栓療法や化学療法が広く行われている。しかしこれらの治療では根治的治療後においても他部位再発が高率に認められ、進行癌では根治は難しく、早晚肝

機能が低下し、既存の治療では制御が難しくなることが問題となる。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おり、肝細胞癌の発生および再発の早期発見法、ならびに診断確率の向上、予防および再発予防法や患者の負担が少ない有効な治療法の開発が重要である。

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である Glypican-3 (GPC3) を用いた肝細胞癌の診断法、ならびに GPC3 を標的とするペプチドワクチンを用いた新しい肝細胞癌の治療法の開発を目的とする。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において、以下の事項を解明することを目指す。

- (1) 血清 GPC3 の測定により、肝細胞癌の診断確率を向上させる。また肝細胞癌の発生と再発の早期発見、ならびに胆管細胞癌との鑑別が可能であるかについて検討する。
- (2) マウス *in vivo* 実験と患者リンパ球を用いた *in vitro* 実験により開発した、GPC3 を標的とする免疫療法について、国立がんセンター東病院において第I相臨床試験により、その安全性と免疫学的有効性を検証する。

- (3) 第 I 相試験の後に、再発予防を目的とした補助療法、あるいは予防法としての GPC3 免疫療法の有効性について、第 II 相試験として検討することにより、この治療法の効果に関する基礎的および臨床的な科学的エビデンスを収集する。
- (4) 新たな癌免疫療法の開発を目指して、強い腫瘍抗原特異的 T 細胞応答を誘導できる樹状細胞を、ヒト ES 細胞より分化誘導する方法を確立する。無限増殖を持つ ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を利用して、抗腫瘍免疫を強力に誘導できる細胞ワクチンの開発を目指す。

B. 研究方法、C. 研究結果

木下 平 主任研究者
古瀬 純司、中面 哲也 分担研究者

臨床試験の実施にあたり、マウス動物実験でのエビデンスに基づいてプロトコールを作成した。最善のプロトコール作成のため、マウスを用いて、臨床試験で用いる 2 種類の GPC3 ペプチドと共に投与する至適アジュバントの検討を行なった。ペプチド単独では無効で、不完全フロイントアジュバント (IFA) と混合すると有効になる事を証明し、臨床試験ではペプチドと IFA の混合物を投与する事にした。ペプチドの投与量、投与回数についてもマウスを用いて検討し、CTL の誘導能がペプチド投与量に依存し、1 回の免疫では無効で 2-4 回の免疫が有効であることを示した。したがって第 I 相臨床試験では、投与回数を 3 回、投与量を 0.3, 1.0, 3.0 mg の 3 段階とし、安全性を確認しながら容量を増やしていく設定にして、免疫学的モニタリングにより、次相の至適投与量、投与回数を決める方針にした。

当初、ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治的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、国立がんセンター倫理審査委員会に申請したが、動物を使った毒性試験と、対象を進行癌患者に変更する事を要求されたため、第三者機関である日本生物科学センター岐阜研究所に依頼し、GPC3 ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験を実施し、安全性を確認した。

上記のプロトコールに従って、進行癌患者を対象とする第 I 相試験を計画し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て、平成 19 年 2 月から臨床試験を開始した。現在、投与量 0.3mg の 6 例の登録が終了し、安全に試験が遂行されている。

肝細胞癌の診断マーカーとしての有用性については、臨床においてしばしば肝細胞癌と胆管細胞癌の鑑別が困難な症例に遭遇するが、両者の治療は大きく異なり、その鑑別は重要である。両者の鑑別における GPC3 の免疫組織化学的検索の有用性を明らかにした。

千住 覚 分担研究者
西村 泰治 研究協力者

本年度の研究により、バイオモザイク社の GPC3 ELISA キットによる血清 GPC3 測定の信頼性を確認し、HCC 患者血清中の GPC3 を検出できることを示した。さらに、昨年度の研究で同定した GPC3 由来のヒトキラー T 細胞 (CTL) エピトープペプチドで、HCC 患者の末梢血単核細胞を刺激して樹立した CTL 細胞株を、GPC3 発現ヒト HCC 細胞株を皮下移植した NOD/SCID マウスの静脈内に投与することにより、腫瘍の増殖を抑制できることを証明した。また、モデル抗原遺伝子を導入したヒト ES 細胞より分化誘導した樹状細胞 (ヒト ES-DC) を用いて、ヒト T 細胞に抗原特異的な免疫応答を誘導することに成功した。さらにヒト ES-DC の抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を示唆した。

佐々木 裕 分担研究者

内因性あるいは外因性に発生する活性酸素種 (ROS) が消去系を凌駕すると酸化ストレスとなり、さまざまな細胞応答を惹起する。その分子基盤を明らかにするために、肝癌細胞株を対象に酸化ストレスである過酸化水素 (H_2O_2) 刺激下に遺伝子発現、蛋白質発現の網羅的解析を行った。細胞株は H_2O_2 刺激によりアポトーシスに陥った。Gene Chip を用いた遺伝子発現の網羅的解析では、刺激後早期の 1 時間、3 時間で 1.5 倍以上の発現亢進を認めた遺伝子はそれぞれ約 150 個、約 520 個であった。それらの中にはアポトーシス関連遺伝子、細胞内情報伝達関連遺伝子、転写関連遺伝子などが含まれていた。一方、刺激前後で cell lysate を調整して 2 次元ダイファレンシャル電気泳動にて蛋白質発現あるいはリン酸化の変化を評価した。リン酸化蛋白質の発現量の変化は約 40-180% であり、質量分析器にてこれらリン酸化蛋白質が主に細胞骨格や分子シャペロンに関与する蛋白質であることが判明した。これらの結果を統合した Key Molnet による pathway 解析から、酸化ストレス刺激後早期から転写や細胞接着に関連する分子群が誘導され、細胞応答としてのアポトーシスを誘

導することが示唆された。

D. 考察

本年度の研究成果および次年度以降の方向性について考察した。(研究成果の概要図参照)

(1) GPC3 ペプチドワクチンによる肝細胞癌免疫療法の開発

マウスを使った前臨床試験により、至適アジュバントと投与量、投与回数の検討を行ってプロトコルを作成した。また、第三者機関である日本生物科学センター岐阜研究所に依託した GPC3 ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験によりペプチドの安全性が証明された。進行癌患者を対象とする第 I 相試験を計画し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て、平成 19 年 2 月から臨床試験を開始した。

本臨床試験によりペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認し、次相以降の至適投与量、投与回数を決定する。第 I 相試験の結果により、次年度以降に第 II 相臨床試験を計画する。再発率が高い肝細胞癌の根治的治療後の再発予防効果を評価する臨床試験と共に、肝炎・肝硬変患者の肝細胞癌発症予防効果を検討する臨床試験を計画している。

(2) ES 細胞由来樹状細胞 (ES-DC) ワクチンの開発

モデル抗原の遺伝子を発現させたヒト ES 細胞から、当該抗原に特異的なヒト CD4⁺T 細胞に抗原提示機能を有する、樹状細胞の分化誘導が可能であることを示した。これまでのマウスを用いた ES-DC の *in vivo* 投与による免疫制御の研究結果と合わせ、本研究により、ヒト ES-DC による抗原特異的な T 細胞性免疫応答を誘導する方法の臨床応用に向けて、一歩前進したものと考えている。今後の実用化への課題として、技術的には、アロ反応の問題の解決と GMP 対応の培養技術の開発が求められる。また、ES 細胞由来の分化細胞のヒトへの投与について、倫理的な観点からの議論を行う必要があると考えられる。

(3) GPC3 の診断への応用

今回使用したバイオモザイク社の GPC3-ELISA キットは測定信頼性が高く、今後ともこのキットを利用して、HCC の腫瘍マーカーとしての血清 GPC3 測定の意義について、大規模な研究を推進す

る予定である。

GPC3 を認識抗原として免疫療法を行う場合、肝細胞癌における GPC3 の発現を正確に把握することは必須であり、免疫染色の諸条件を再検討し GPC3 の発現を高感度に染色し得る染色法を確立した。HCC と CCC の鑑別にも GPC3 免疫染色を用いることは有用であった。特に中分化型 HCC と充実性、中索状 CCC との鑑別が困難である症例には、GPC3 を用いた免疫染色の有用性が期待される。Combined 型症例における GPC3 染色性においては病理学的 CCC 部分あるいは HCC と CCC の移行部に弱陽性の所見も認められこれが何を意味するのか、HCC・CCC の分化や幹細胞のマーカーとの関連も今後検討していく考えである。さらに GPC3 の予後因子としての可能性の検討や GPC3 蛋白の機能解析も行っていく。

E. 結論

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において 2 年目となる本年度は、GPC3 を標的とした肝細胞癌の免疫療法に関する臨床第 I 相試験をスタートさせ、3 年計画の最終年度内に終了できる見通しとなり、所期の目標を十分に満たす成果が得られたと考える。

最終年度の平成 19 年度は、集大成としての臨床第 I 相試験を円滑に遂行するとともに、GPC3 遺伝子を導入したヒト ES-DC を用いた癌の細胞ワクチン開発に関わる基礎研究や GPC3 の診断への応用などについてさらに研究を進め、次年度以降の第 II 相、第 III 相試験への足がかりとすることを目標とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gotohda, N., Iwasaki, H., Ozeki, M., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Yagi, T., Kinoshita, T., et al. The Role of a Protease Inhibitor against Hepatectomy. *Hepato-gastroenterology*. 53: 115-119, 2006.
- 2) Gotohda, N., Kinoshita, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., et al. New Indication for Reduction Surgery in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma with Major Vascular

- Involvement. *World Journal of Surgery*. 30(3): 431-438, 2006.
- 3) Gotohda, N., Ishii, H., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., Yoshino, M., and Kinoshita, T. Selection Criteria for Reduction Hepatectomy in Multiple Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*. 26: 4671-4674, 2006.
 - 4) Ueno, H., Sato, T., Yamamoto, S., Tanaka, K., Ohkawa, S., Takagi, H., Yokosuka, O., Furuse, J., Saito, H., Sawaki, A., Kasugai, H., Osaki, Y., Fujiyama, S., Sato, K., Wakabayashi, K., Okusaka, T. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Cancer Sci*. 97(10): 1105-10, 2006.
 - 5) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 12: 2689-2697, 2006.
 - 6) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., Nishimura, Y. 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 Research*. 66: 2414-2422, 2006.
 - 7) Hosaka, S., Nakatsura, T., Tsukamoto, H., Hatayama, T., Baba, H., and Nishimura, Y. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces the apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Science*. 97: 623-632, 2006.
 - 8) Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., Nishimura, Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Submitted*
 - 9) Yokomine, K., Nakatsura, T., Monohara, M., Kira, J-I., Kubo, T., Sasaki, Y., Nishimura, Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 343: 269-278, 2006.
 - 10) Goto, H., Oda, Y., Murakami, Y., Tanaka, T., Hasuda, K., Goto, S., Sasaki, Y., Sakisaka, S., Hattori, M. Proportion of de novo cancers among colorectal cancers in Japan. *Gastroenterology*. 131:40-46, 2006.
 - 11) Sasaki, Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol*. 41: 1135-1148, 2006.
 - 12) 後藤田直人、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、木下 平 バリエーション解析からみた肝切除クリニカルパスの適応 日本消化器外科学会雑誌 39 (1) : 9-15 2006年
 - 13) 中郡聡夫、木下 平、小西 大、高橋進一郎、後藤田直人 膵癌・胆道癌の診断と治療 肝内胆管癌の手術 日本臨牀 64 (1) : 469-475 2006年
 - 14) 古瀬純司、鈴木英一郎、仲地耕平、清水 怜、石井 浩、吉野正曠 肝内胆管癌の化学療法 (動注を含む) 肝胆膵 53 (5) : 1001-1007 2006年
 - 15) 小森宏之、中面哲也、別府 透、西村泰治、馬場秀夫 Glypican-3(GPC3)を標的とした免疫療法の有用性の検討 癌と化学療法 33(12) : 1742-1744 癌と化学療法社 (東京) 2006年
 - 16) 影下登志郎、福島聡、尹浩信、西村泰治、中面哲也 悪性黒色腫の新しい血清マーカー glypican-3 と SPARC 臨床皮膚科 60(5)増刊号: 169-172 医学書院 (東京) 2006年
 - 17) 小森宏之、中面哲也、本村 裕、別府 透、石河隆敏、馬場秀夫、西村泰治 新規がん胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞がんの免疫療法分子細胞治療 6(2) : 57-61 先端医学社 (東京) 2007年
 - 18) 小森宏之、中面哲也、本村 裕、別府 透、西村泰治、馬場秀夫 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法 Biotherapy 21(1) : 62-68 癌と科学療法社 (東京) 2007年
 - 19) 長岡克弥、佐々木 裕 特集 肝癌の診療 -最新の進歩- 肝細胞癌における遺伝子異常 臨床消化器内科 増刊号 21 : 73-81 2006年
 - 20) 佐々木 裕 「別冊 医学のあゆみ 酸化ストレス -フリーラジカル医学生物学の最前線 -」 吉川敏一 編、消化器疾患 NASHと酸化ストレス (分担) pp294-298 医歯薬出版 (東京) 2006年

21) 佐々木 裕 「別冊 医学のあゆみ 消化器疾患 Ver.3 - state of arts II. 肝・胆・膵 -」竹井謙之、川崎誠治 編、肝障害とその機序 酸化ストレスと肝疾患 (分担) pp76-80 医歯薬出版 (東京) 2006 年

2. 学会発表

- 1) 黒沼俊光、生田義明、本村 裕、下村真菜美、芦原淳子、土原昌巳、伊藤雅昭、西村泰治、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のために行った基礎研究-その1 第10回基盤的癌免疫研究会総会 (札幌) 2006 年 7 月 13 日、14 日
- 2) 本村 裕、生田義明、小森宏之、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、西村泰治、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のために行った基礎研究-その2 第10回基盤的癌免疫研究会総会 (札幌) 2006 年 7 月 13 日、14 日
- 3) 中面哲也、本村 裕、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭 ペプチド特異的 CTL の検出におけるペンタマーの有用性及び Cr を用いない顕微蛍光法による細胞傷害試験の有用性の検討 第10回基盤的癌免疫研究会総会 (札幌) 2006 年 7 月 13 日、14 日
- 4) 中面哲也 癌特異抗原の癌の診断と治療への応用を目指した基礎研究 第65回日本癌学会学術総会 (横浜) 日本癌学会奨励賞受賞講演 2006 年 9 月 28~30 日
- 5) 本村 裕、生田義明、小森宏之、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、馬場秀夫、西村泰治、江角浩安、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のためのマウスでの前臨床試験、第65回日本癌学会学術総会 (横浜) 2006 年 9 月 28~30 日
- 6) 下村真菜美、本村 裕、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、江角浩安、中面哲也 Glypican-3 由来がん拒絶抗原ペプチド特異的 CTL の検出におけるペンタマー及び顕微蛍光法による細胞傷害試験の有用性、第65回日本癌学会学術総会 (横浜) 2006 年 9 月 28~30 日
- 7) 後藤田直人、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎 進行肝細胞癌における減量切除の位置づけ

第61回日本消化器外科学会定期学術総会 (横浜) 2006 年 7 月 13~15 日

- 8) 高橋進一郎、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、佐竹光夫、縄野 繁、石井 浩、古瀬純司、小林昭彦、木下 平 (ワークショップ) 進行肝細胞がんに対する減量切除の適応 第44回日本癌治療学会総会 (東京) 2006 年 10 月 18~20 日
- 9) 後藤田直人、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎 (パネルディスカッション) 再発肝細胞癌に対する再肝切除の治療成績と今後の適応 第68回日本臨床外科学会総会 (広島) 2006 年 11 月 9~11 日
- 10) 鈴木英一郎、古瀬純司、石井 浩、仲地耕平、吉野正曠 進行肝細胞癌に対する Uracil /Tegafur・Mitoxantrone 併用化学療法の第特相試験、第4回日本臨床腫瘍学会総会 (大阪) 2006 年 3 月
- 11) 古瀬純司、石井 浩、中島圭子、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠 肝細胞癌患者を対象とした BAY43-9006 の第 I 相臨床試験 第42回日本肝癌研究会 (東京) 2006 年 7 月
- 12) 河島光彦、古瀬純司、西尾禎治、小西 大、石井 浩、木下 平、荻野 尚 肝細胞癌に対する陽子線治療の第 II 相試験 第42回日本肝癌研究会 (東京) 2006 年 7 月
- 13) 石井 浩、古瀬純司、木下 平、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人 肝細胞癌・新規病期分類の提案 第42回日本肝癌研究会 (東京) 2006 年 7 月
- 14) 高橋進一郎、木下 平、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、古瀬純司、石井 浩 肝細胞癌リンパ節転移に対する外科的切除 第42回日本肝癌研究会 (東京) 2006 年 7 月
- 15) 鈴木英一郎、石井 浩、池田公史、古瀬純司、奥坂拓志、上野秀樹、森実千種、仲地耕平、吉野正曠 遠隔転移を有する肝細胞癌に対する TACE~全身化学療法との比較から~ 第42回日本肝癌研究会 (東京) 2006 年 7 月
- 16) 石井 浩、古瀬純司、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠 Milan 基準を満たす BCLC の病期 A の肝細胞癌に対する切除・ablation 第44回日本癌治療学会総会 (東京) 2006 年 10 月

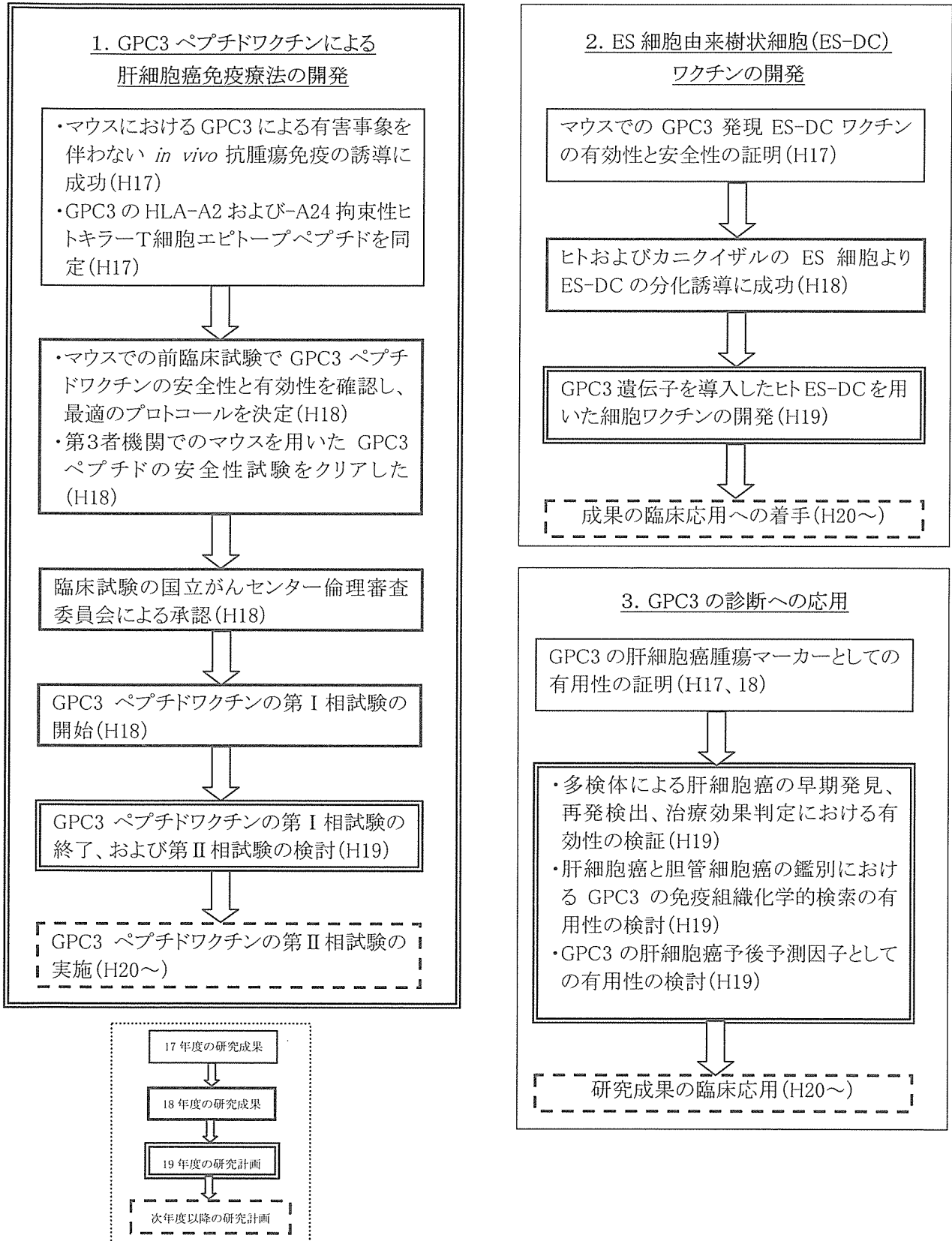
- 17) 高橋進一郎、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、佐竹光夫、縄野 繁、石井 浩、古瀬純司、小林昭彦、木下 平 進行肝細胞がんに対する減量切除の適応 第 44 回日本癌治療学会総会（東京）2006 年 10 月
- 18) Furuse, J., Ishii, H., Nakachi, K., Suzuki, E., Yoshino, M. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. 18th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. (Prague, Czech Republic) November 7-10, 2006.
- 19) Ishii, H., Furuse, J., Nakachi, K., Suzuki, E., Yoshino, M., Satake, M., Hayashi, T. Predictive factors of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. The Joint meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and the 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. (Tokyo) December 6-8, 2006.
- 20) 永濱裕康、葦原浩、佐々木 裕 酸化ストレスによりミトコンドリアを介して誘導される肝細胞死の新たな評価法 第 92 回日本消化器病学会総会（シンポジウム 1）「消化器疾患における酸化ストレスの関与と counterstrategy」（北九州）2006 年 4 月 20 日
- 21) 永濱裕康、星田陽明、佐々木 裕 酸化ストレスによる肝細胞障害の分子機構の解明どのように肝細胞死を修飾するか？ 第 10 回日本肝臓学会大会（ワークショップ 14）「トランスクリプトーム・プロテオーム解析の肝疾患への応用」（札幌）2006 年 10 月 12 日
- 22) Senju, S., Suemori, H., Hirata, S., Matsuyoshi, H., Uemura, Y., Fukuma, D., Shimomura, M., Chen Yu-Zhen, Furuya, M., Nakatsuji, N., Nishimura, Y. Generation of immune-competent dendritic cells from human embryonic stem cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会（大阪）2006年12月11日～13日
- 23) Nishimura, Y. Usefulness of a Novel Oncofetal Antigen Glypican-3 for Diagnosis and Immunotherapy of Cancers. The 3rd China-Japan Cooperative Life Science Symposium in Kumamoto (Kumamoto), Oct.24, 2006.
- 24) 千住 覚、栗崎朱里、平田真哉、福間大喜、松吉秀武、下村真菜美、西村泰治 腫瘍抗原特異的ヘルパーT細胞の活性化を目的としたインバリエント(Ii)鎖融合抗原提示ベクターの開発 第65回日本癌学会学術総会（横浜）2006年9月28日～30日
- 25) 西村泰治 消化器系癌の診断と治療に有用な新規癌特異抗原 第2回熊本分子消化器病学研究会（熊本）2006年6月9日（招待）
- 26) 西村泰治、小森宏之、Chen Yu-Zhen、横峰和典、Gang Liu、中面哲也、松井政則、中潟直己、千住 覚 遺伝子操作マウスを利用したT細胞活性化ワクチンの開発 日本人類遺伝学会第51回大会（シンポジウム2）（米子）2006年10月17日～20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度研究によるものはない。

研究成果の概要図

新規癌胎児性抗原 (Glypican-3 : GPC3) を利用した肝細胞癌の診断と治療



III. 分担研究報告

HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3 (GPC3) 由来ペプチドワクチンの前臨床試験

主任研究者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科（外来部長）
分担研究者 古瀬 純司 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科（病棟医長）
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）

研究要旨

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) を標的とするペプチドワクチンの臨床試験を実施するにあたって、第三者機関である日本生物科学センター岐阜研究所に依頼した GPC3 ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験によりペプチドの安全性を証明し、マウスを使った前臨床試験により、至適アジュバントと投与量、投与回数検討を行ってプロトコルを作成した。進行癌患者を対象とする第 I 相試験を計画し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得て、平成 19 年 2 月から臨床試験を開始した。

A. 研究目的

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) を標的とするペプチドワクチンを用いた新しい肝細胞癌の予防・治療法の開発を目的としている。最善のプロトコルを作成するために、ペプチドの至適アジュバント、投与量、投与回数、投与間隔などを決定する必要があるため、マウスを用いた前臨床試験を行った。また、国立がんセンター東病院において臨床試験を施行するにあたり、国立がんセンター倫理審査委員会から、動物を使った毒性試験の実施と、対象を進行癌患者に変更する事を要求され、それに対応して第三者機関に毒性試験を委託した。

B. 研究方法

- 1) マウスを用いて、ペプチドの至適アジュバントを免疫学的に検討した。またプロテインチップシステムを用いて、血清中でのペプチドの壊れやすさの観点から至適アジュバントを検討した。
- 2) マウスを用いて、2 種類の GPC3 ペプチドの至適投与量、投与回数につき免疫学的に検討した。
- 3) 第三者機関である日本生物科学センター岐

阜研究所に依頼し、GPC3 ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験を実施した。

[倫理面への配慮]

国立がんセンターでは、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されており、倫理面への配慮が十分になされる体制が整っている。本研究における臨床第 I 相試験は同委員会の承認を得て実施しているものである。また、動物実験に際しては、国立がんセンターの動物実験指針を遵守して動物愛護にも留意して行っている。

C. 研究結果

- 1) マウス動物実験でのエビデンスに基づいて臨床試験のプロトコルを作成した。

至適アジュバントの検討の結果、ペプチド単独では無効で、不完全フロイントアジュバント (IFA) と混合すると有効になる事を証明し、臨床試験ではペプチドと IFA の混合物を投与する事にした。ペプチドの投与量、投与回数については、CTL の誘導能がペプチド投与量に依存し、1 回の免疫では無効で 2-4 回の免疫が有効であることを示した。したがって第 I 相臨床試験では、

投与回数を3回、投与量を0.3, 1.0, 3.0 mgの3段階にし、安全性を確認しながら容量を増やしていく設定とし、免疫学的モニタリングによって次相の至適投与量、投与回数を決める方針にした。

また、有効なペプチド特異的 CTL の検出法を検討し、ELISPOT、ペンタマー、顕微蛍光法による細胞傷害性試験の有用性を確認した。

2) 国立がんセンター倫理審査委員会の承認を受け、臨床第 I 相試験をスタートした。

日本生物科学センター岐阜研究所に依頼した GPC3 ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験により、ペプチドの安全性が証明された。上記のプロトコールに従って、進行癌患者を対象とする第 I 相試験を計画し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。平成 19 年 2 月から臨床試験を開始し、現在、投与量 0.3 mg の 6 例の登録が終了し、安全に試験が遂行されている。

D. 考察

今後の 1 年間で、臨床第 I 相試験により、GPC3 由来ペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認し、次相以降の至適投与量、投与回数を決定する。第 I 相試験の結果に基づき、次年度以降に第 II 相臨床試験を計画する。再発率が高い肝細胞癌の根治的治療後の再発予防効果を評価する臨床試験とともに、肝炎・肝硬変患者の肝細胞癌発症予防効果を検討する臨床試験を計画している。

E. 結論

マウス *in vivo* 実験と患者リンパ球を用いた *in vitro* 実験により開発した、GPC3 ペプチドワクチンの前臨床試験を終了し、国立がんセンター東病院において臨床第 I 相試験をスタートした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T.,

Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H. and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 2689-2697, 2006.

2) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y. 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 Research.* 66: 2414-2422, 2006.

3) Gotohda, N., Kinoshita, T., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., et al. New Indication for Reduction Surgery in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma with Major Vascular Involvement. *World Journal of Surgery.* 30(3):431-438, 2006.

4) Gotohda, N., Iwasaki, H., Ozeki, M., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Yagi, T., Kinoshita, T., et al. The Role of a Protease Inhibitor against Hepatectomy. *Hepato-gastroenterology.* 53:115-119, 2006.

5) Gotohda, N., Ishii, H., Konishi, M., Nakagohri, T., Takahashi, S., Furuse, J., Yoshino, M., and Kinoshita, T. Selection Criteria for Reduction Hepatectomy in Multiple Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research.* 26:4671-4674, 2006.

6) Ueno, H., Sato, T., Yamamoto, S., Tanaka, K., Ohkawa, S., Takagi, H., Yokosuka, O., Furuse, J., Saito, H., Sawaki, A., Kasugai, H., Osaki, Y., Fujiyama, S., Sato, K., Wakabayashi, K., Okusaka, T. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Cancer Sci.* 97(10):1105-10, 2006.

7) 小森宏之、中面哲也、別府 透、西村泰治、馬場秀夫 Glypican-3(GPC3)を標的とした免疫療法の有用性の検討 癌と化学療法 33(12) : 1742-1744 癌と化学療法社 (東京) 2006 年

8) 小森宏之、中面哲也、本村 裕、別府 透、石河隆敏、馬場秀夫、西村泰治 新規がん胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞がんの免疫療法 6(2) : 57-61 分子細胞治療 先端医学社 (東京) 2007 年

- 9) 後藤田直人、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、木下 平 バリアンス解析からみた肝切除クリニカルパスの適応 日本消化器外科学会雑誌 39 (1) : 9-15 2006年

2. 学会発表

- 1) 黒沼俊光、生田義明、本村 裕、下村真菜美、芦原淳子、土原昌巳、伊藤雅昭、西村泰治、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のために行った基礎研究—その1 第10回基盤的癌免疫研究会総会(札幌) 2006年7月13日、14日
- 2) 本村 裕、生田義明、小森宏之、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、西村泰治、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のために行った基礎研究—その2 第10回基盤的癌免疫研究会総会(札幌) 2006年7月13日、14日
- 3) 中面哲也、本村 裕、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭 ペプチド特異的 CTL の検出におけるペンタマーの有用性及び Cr を用いない顕微蛍光法による細胞傷害試験の有用性の検討 第10回基盤的癌免疫研究会総会(札幌) 2006年7月13日、14日
- 4) 中面哲也 癌特異抗原の癌の診断と治療への応用を目指した基礎研究 第65回日本癌学会学術総会(横浜) 日本癌学会奨励賞受賞講演 2006年9月28~30日
- 5) 本村 裕、生田義明、小森宏之、下村真菜美、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、馬場秀夫、西村泰治、江角浩安、中面哲也 肝細胞がんに対する Glypican-3 由来ペプチドワクチンを用いた臨床試験のプロトコール作成のためのマウスでの前臨床試験、第65回日本癌学会学術総会(横浜) 2006年9月28~30日
- 6) 下村真菜美、本村 裕、芦原淳子、黒沼俊光、土原昌巳、伊藤雅昭、江角浩安、中面哲也 Glypican-3 由来がん拒絶抗原ペプチド特異的 CTL の検出におけるペンタマー及び顕微蛍光法による細胞傷害試験の有用性、第65回日本癌学会学術総会(横浜) 2006年9月28~30日
- 7) 後藤田直人、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎 進行肝細胞癌における減量切除の位置づけ 第61回日本消化器外科学会定期学術総会(横浜) 2006年7月13~15日
- 8) 高橋進一郎、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、佐竹光夫、縄野 繁、石井 浩、古瀬純司、小林昭彦、木下 平 (ワークショップ) 進行肝細胞癌に対する減量切除の適応 第44回日本癌治療学会総会(東京) 2006年10月18~20日
- 9) 後藤田直人、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎(パネルディスカッション) 再発肝細胞癌に対する再肝切除の治療成績と今後の適応 第68回日本臨床外科学会総会(広島) 2006年11月9~11日
- 10) 鈴木英一郎、古瀬純司、石井 浩、仲地耕平、吉野正曠 進行肝細胞癌に対する Uracil /Tegafur・Mitoxantrone 併用化学療法の第特相試験 第4回日本臨床腫瘍学会総会(大阪) 2006年3月
- 11) 古瀬純司、石井 浩、中島圭子、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠 肝細胞癌患者を対象とした BAY43-9006 の第 I 相臨床試験 第42回日本肝癌研究会(東京) 2006年7月
- 12) 河島光彦、古瀬純司、西尾禎治、小西 大、石井浩、木下 平、荻野 尚 肝細胞癌に対する陽子線治療の第 II 相試験 第42回日本肝癌研究会(東京) 2006年7月
- 13) 石井 浩、古瀬純司、木下 平、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人 肝細胞癌・新規病期分類の提案 第42回日本肝癌研究会(東京) 2006年7月
- 14) 高橋進一郎、木下 平、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、古瀬純司、石井 浩 肝細胞癌リンパ節転移に対する外科的切除 第42回日本肝癌研究会(東京) 2006年7月
- 15) 鈴木英一郎、石井 浩、池田公史、古瀬純司、奥坂拓志、上野秀樹、森実千種、仲地耕平、吉野正曠 遠隔転移を有する肝細胞癌に対する TACE ~全身化学療法との比較から~ 第42回日本肝癌研究会(東京) 2006年7月
- 16) 石井 浩、古瀬純司、木下 平、小西 大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、仲地耕平、鈴木英一郎、吉野正曠 Milan 基準を満たす BCLC の病期 A の肝細胞癌に対する切除・ablation 第44回日本癌治療学会総会(東京) 2006年10月

- 17) 高橋進一郎、小西 大、中郡聡夫、後藤田直人、佐竹光夫、縄野 繁、石井 浩、古瀬純司、小林昭彦、木下 平 進行肝細胞がんに対する減量切除の適応 第44回日本癌治療学会総会（東京）2006年10月
- 18) Furuse, J., Ishii, H., Nakachi, K., Suzuki, E., Yoshino, M. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. 18th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. (Prague, Czech Republic) November 7-10, 2006.
- 19) Ishii, H., Furuse, J., Nakachi, K., Suzuki, E., Yoshino, M., Satake, M., Hayashi, T. Predictive factors of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. The Joint meeting of The 3rd ISC International Conference on Cancer Therapeutics and the 11th International Symposium on Cancer Chemotherapy. (Tokyo) December 6-8, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度研究によるものはない。

肝細胞癌と胆管細胞癌の鑑別における GPC3 免疫染色の有用性に関する研究

主任研究者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科（外来部長）
分担研究者 古瀬 純司 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科（病棟医長）
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）

研究要旨

HCC および CCC、Combined 型症例に対し、GPC3 発現を免疫染色を用いて把握した。GPC3 は HCC に高頻度に発現し、CCC においては全症例に発現が見られないことから、両者の鑑別診断に有用であることが分かった。Combined 型においても病理組織学的 HCC 成分にのみ GPC3 中等度以上陽性所見を認めたが、一方で病理学的 CCC 部分あるいは HCC と CCC の移行部に弱陽性の所見も認められた。

A. 研究目的

肝細胞癌（HCC）、胆管細胞癌（CCC）は肝臓に原発する悪性腫瘍の代表である。両者の治療は大きく異なり、鑑別は临床上重要であるが判別困難な症例も見受けられる。今回は肝細胞の癌化に伴って発現する GPC3 に着目し、GPC3 免疫染色が両者の鑑別に有用か否かを検討した。

B. 研究方法

1992～2006 年に国立がんセンター東病院において腫瘍摘出手術を行った症例のうち、肝細胞癌 46 症例（高分化型 15 例、中分化型 18 例、低分化型 13 例）、胆管細胞癌 28 症例（高分化型 8 例、中分化型 10 例、低分化型 10 例）、病理組織学的 Combined 型 11 症例を対象とした。各症例に対し、年齢、性別、腫瘍径、手術年代のマッチングを行った。染色標本の選定においては腫瘍の組織多様性を加味し、腫瘍内部で分化度が異なる場合は分化度ごとに複数ブロックを選択し、GPC3 染色を施行した。GPC3 染色における中等度以上の染色強度を示した面積、強度、染色態度を各症例に対し評価した。

C. 研究結果

HCC における単純陽性率は 36/46 症例 (78.3%)、CCC は全例陰性であった。HCC の組織的分化度による陽性率は、高分化型 9/15 症例 (60%)、中分化型 16/18 症例 (88.9%)、低分化型 11/13 症例

(84.6%) であった。中等度以上の染色強度を示した面積は、高分化型 30%、中分化型 49%、低分化型 50% であり、分化度が低下するに従い、陽性面積率、強度ともに上昇する傾向を示した。染色態度においては、膜型、びまん型、顆粒型の 3 種類に大別された。

病理組織学的 Combined 型 11 症例は肉眼（マクロ）所見で、①HCC 成分と CCC 成分が比較的明瞭に判別可能な群（4 症例）、②CCC 成分の混在が判別困難な群（4 症例）、③CCC 成分のみの群（3 症例）、の 3 群に分類出来た。①②の 8 症例においては、病理組織学的 HCC 成分にのみ GPC3 中等度以上陽性所見を認め、病理組織学的 CCC 成分には認めなかった。うち 5 症例においては、CCC 成分のごく一部に GPC3 弱陽性所見を認めた。③においては、病理組織学的 HCC 成分にも CCC 成分にも GPC3 陽性所見を認めなかった。

D. 考察

GPC3 を認識抗原として免疫療法を行う場合、肝細胞癌における GPC3 の発現を正確に把握することは必須であり、本研究では免疫染色の諸条件を再検討し GPC3 の発現を高感度に染色し得る染色法を確立した。実験結果から、HCC と CCC の鑑別に GPC3 免疫染色を用いることは有用であると考えられる。特に中分化型 HCC と充実性、中索状 CCC との鑑別が困難である症例には、GPC3 を用いた免疫染色の有用性が期待される。Combined 型症例における GPC3 染色性においては病理学的

CCC 部分あるいは HCC と CCC の移行部に弱陽性の所見も認められこれが何を意味するのか、HCC・CCC の分化や幹細胞のマーカーとの関連も今後検討していく考えである。

E. 結論

HCC および CCC、Combined 型症例に対し、GPC3 発現を免疫染色を用いて把握した。GPC3 は HCC に高頻度に発現し、CCC においては全症例に発現が見られないことから、両者の鑑別診断に有用であることが分かった（論文投稿準備中）。今後、癌化および増殖過程に GPC3 がいかに関与するかを詳細に検討する必要がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中郡聡夫、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人 膵癌・胆道癌の診断と治療 肝内胆管癌の手術 日本臨牀 64 (1) : 469-475 2006 年
- 2) 古瀬純司、鈴木英一郎、仲地耕平、清水 怜、石井浩、吉野正曠 肝内胆管癌の化学療法（動注を含む）肝胆膵 53 (5) : 1001-1007 2006 年

2. 学会発表

- 1) 井上和人、高山忠利、森口正倫、檜垣時夫、加藤高明、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人（要望演題）リンパ節転移陽性の肝内胆管癌の治療方針 第 18 回日本肝胆膵外科関連会議（第 18 回日本肝胆膵外科学会／第 35 回日本胆道外科研究会／第 33 回日本膵切研究会）（東京） 2006 年 5 月 10～12 日
- 2) 橋本真治、中郡聡夫、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人（ポスターセッション）リンパ節転移陽性の肝内胆管癌の外科治療成績 第 18 回日本肝胆膵外科関連会議（第 18 回日本肝胆膵外科学会／第 35 回日本胆道外科研究会／第 33 回日本膵切研究会）（東京）2006 年 5 月 10～12 日
- 3) 中郡聡夫、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人（ワークショップ）肝内胆管癌に対する外科治療成績 第 68 回日本臨床外科学会総会（広島） 2006 年 11 月 9～11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度研究によるものはない。

Glypican-3 を用いた肝細胞癌の診断法ならびに免疫療法の開発に関する基礎研究

分担研究者 千住 覚 熊本大学医学薬学研究部 免疫識別学分野（助教授）
研究協力者 西村 泰治 熊本大学医学薬学研究部 免疫識別学分野（教授）

研究要旨

本研究は、肝細胞癌 (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、バイオモザイク社の GPC3 ELISA キットによる血清 GPC3 測定の信頼性を確認し、HCC 患者血清中の GPC3 を検出できることを示した。さらに、昨年度の研究で同定した GPC3 由来のヒトキラーT細胞 (CTL) エピトープペプチドで、HCC 患者の末梢血単核細胞を刺激して樹立した CTL 細胞株を、GPC3 発現ヒト HCC 細胞株を皮下移植した NOD/SCID マウスの静脈内に投与することにより、腫瘍の増殖を抑制できることを証明した。また、モデル抗原遺伝子を導入したヒト ES 細胞より分化誘導した樹状細胞 (ヒト ES-DC) を用いて、ヒト T 細胞に抗原特異的な免疫応答を誘導することに成功した。以上の研究成果により、GPC3 を標的とした HCC の免疫療法に関する前臨床試験を完了し、有用性と安全性を示した。さらにヒト ES-DC の抗腫瘍免疫療法への応用の可能性を示唆した。

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)。さらに、マウスの *in vivo* における GPC3 発現腫瘍モデルを利用して、GPC3 を標的とする癌免疫療法の有効性と安全性を証明した (Clin. Cancer Res. 10: 8630, 2004.)。

本年度は、血清 GPC3 の測定キットの検定、ヒトへの GPC3 免疫療法の応用を目指した HCC 患者における GPC3 特異的キラーT細胞 (CTL) の誘導、ならびに将来の抗腫瘍細胞ワクチンへの応用を目指した、ヒト ES 細胞より分化誘導した樹状細胞 (ヒト ES-DC) の開発を目的として研究を遂行した。

B. 研究方法

1) 血清 GPC3 測定用 ELISA キットの検定

従来、我々が血清 GPC3 測定用 ELISA に使用していた抗 GPC3 抗体は、その後のロットの変更後に測定が困難となった。そこで安定した抗 GPC3 抗体の供給を目指して、マウス単クローン抗体の作製に着手したが、2年間の努力にもかかわらず、有用なものを得ることができなかった。このような状況の中で、バイオモザイク社が血清 GPC3 測定用 ELISA キットの販売を開始した。そこで、同キットを購入して、その信頼性について、ヒト組み換え GPC3 と HCC 患者血清を利用した ELISA を実施して検討した。