

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

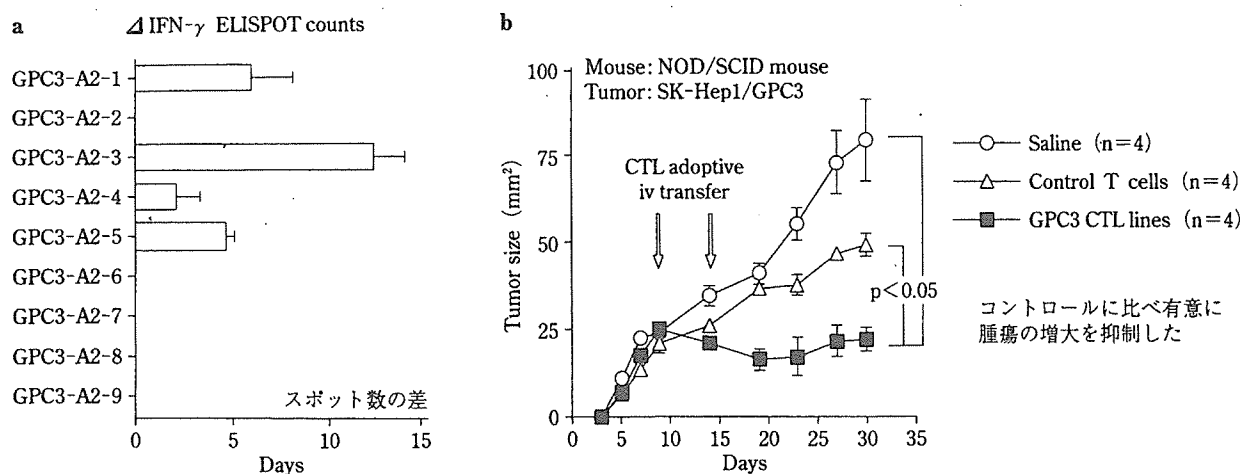


図1 GPC3-A2 エピトープペプチドの決定とその抗腫瘍効果

- 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な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	+	—
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で発現している。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)

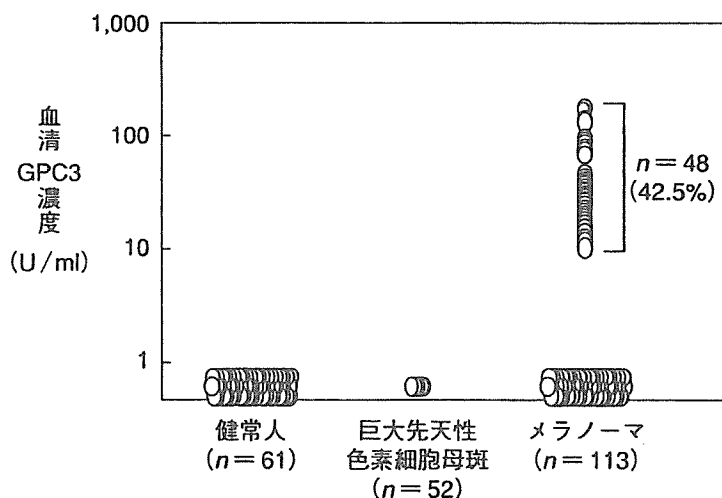


図1 健常人, 巨大先天性色素細胞母斑, メラノーマでの GPC 3 の比較

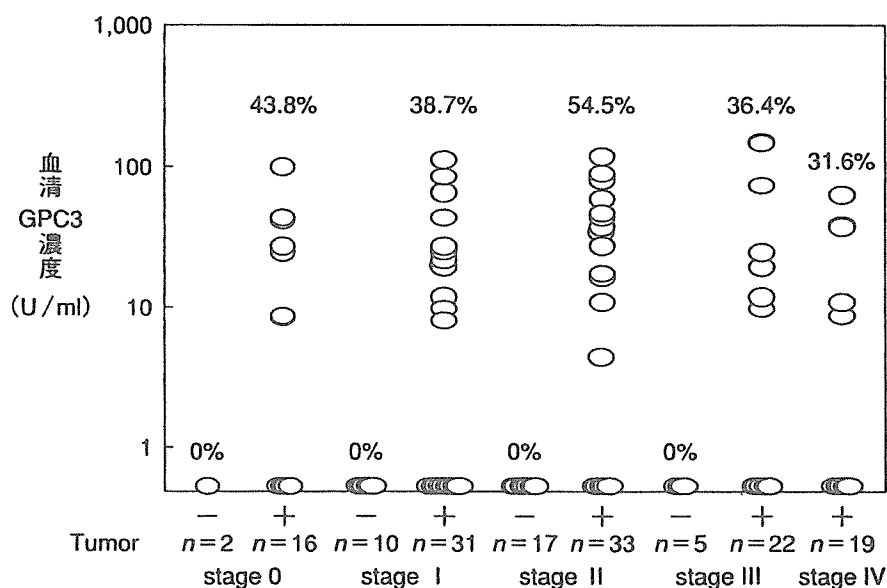


図2 メラノーマ患者血清中の各ステージごとの GPC 3 の陽性率

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⁾。

総論

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

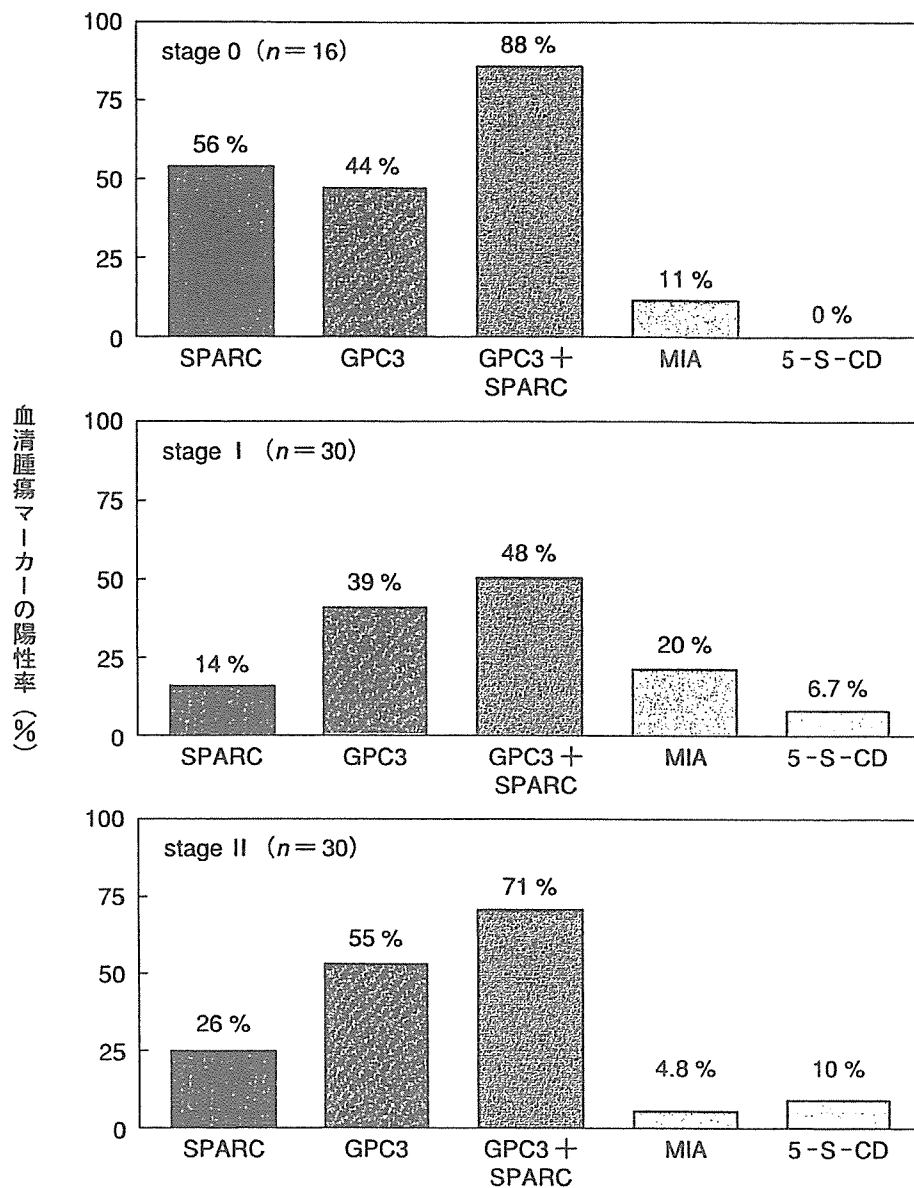


図3 SPARC, GPC3, MIA, 5-S-CD のメラノーマ各ステージでの陽性率の比較

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が特異である。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常人でも検出されず、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 と呼ばれ、280 アミノ酸からなる 43 kDa 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+2 SD 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⁸⁾。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。GPC 3 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。

GPC 3 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。GPC 3 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)⁸⁾。一方、MIA の陽性率は 11, 20, 5%, 5-S-CD は 0, 7, 10%である。

血清 GPC 3・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 GPC 3・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 GPC 3 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。教授診前日までには、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)

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

小森宏之*, ** 中面哲也*** 本村 裕**, ***

石河隆敏** 別府 透** 馬場秀夫** 西村泰治*



- ①肝細胞がん(HCC)は治療後も高頻度に再発をくり返すため予後不良ながんであるが、治療後の再発予防に対する有効な補助療法は確立されていない。
- ②がん部と非がん部の cDNA マイクロアレイ解析を用いて、さまざまながん中で特異的に高発現する遺伝子を網羅的に解析できる。この方法を用いて HCC に特異的に高発現する新規がん胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) を同定した。
- ③GPC3 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 アンカー型膜蛋白質であり、HCC 患者の 80 % のがん組織に発現している。最近、肝細胞がんの増殖を促進することが報告されている。
- ④GPC3 は、HCC 患者の約 40 % の血清中に認められ、HCC の腫瘍マーカーとして有用である。
- ⑤マウスにおいて GPC3 を標的とするがん免疫療法が、自己免疫現象を伴うことなく奏効することを証明した。
- ⑥日本人の HCC 患者の約 80 % に適用できる、GPC3 由来の HLA-A2 あるいは A24 拘束性ヒト・キラー T 細胞エピトープペプチドを同定し、これを用いた HCC 免疫療法の臨床試験を開始した。

Key Words /Glypican-3(GPC3), 肝細胞がん(HCC), がん免疫療法,
ペプチドワクチン

● はじめに

肝細胞がん(HCC)の罹患者数は欧米および、アジア諸国においていぜんとして増加している。HCC は治療後も高頻度に再発をくり返すため予後不良ながんであり、ウイルス性肝炎、肝硬変から発生した、ごく初期のがんに対する早期治療法や、治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれている。Glypican-3 (GPC3) は HCC に高発現し、腫瘍免疫の標的として理

想的ながん胎児性抗原である¹⁾。われわれは HCC に対する免疫療法の新たなターゲットとして GPC3 に着目し、その有用性に関して前臨床試験を完了し^{2)~4)}、臨床試験を開始した。

① HCC に対する免疫療法

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や、HCC 術後における術後化学療法は、いまだ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代よ

* KOMORI Hiroyuki, NISHIMURA Yasuharu/熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野 ** KOMORI Hiroyuki, MOTOMURA Yutaka, ISHIKO Takatoshi, BEPPU Toru, BABA Hideo/熊本大学大学院医学薬学研究部消化器外科学分野 *** NAKATSURA Tetsuya, MOTOMURA Yutaka/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

りリンフォカイン活性化キラー細胞 (lymphokine-activated killer cells : LAK) 細胞, 腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte : TIL), 末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell : PBMC) を用いた養子免疫療法, 樹状細胞 (dendritic cell : DC) ワクチン療法, α -フェトプロテイン (AFP) 由来ペプチドワクチン療法などが試みられている。また HCC において高発現するがん特異的抗原も多数報告されており, 各施設でその有用性が検討されている⁵⁾。

② 新規がん胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3)

われわれは, 東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士らとの共同研究により, がん部と非がん部における cDNA マイクロアレイ解析データ⁶⁾を用いて, 肝細胞がん (HCC) 特異的に高発現する遺伝子として *Glypican-3* (GPC3) を同定した¹⁾ (図①A)。

1) GPC3 の機能

膜結合型の Glypican ファミリーは, 現在までのところ 6 種類が報告されている⁷⁾。GPC3 は, 580 アミノ酸からなる 60 kDa のコア蛋白質に糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で, C 末端が glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) アンカーにより形質膜に結合している。Pilia らは, X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患である巨人症の一つである, Simpson-Golabi-Behmel 症候群 (SGBs) において, *GPC3* の遺伝子変異を報告している。また, *GPC3* ノックアウトマウスでも, SGBs と同様に巨大化などの表現型を示すことが報告されている。GPC3 は, ある種の腫瘍細胞では増殖を抑制したり, あるいはアポトーシスの誘導に関連があると報告されている⁸⁾。近年, GPC3 コア蛋白質が直接 Wnt と結合することにより, Wnt シグナルを活性化し, 肝細胞がんの増殖を促進することが報告されている⁹⁾。

2) HCC がん組織における GPC3 の発現と腫瘍マーカーとしての有用性

われわれは, *GPC3* 遺伝子の発現量の差が, その遺伝子産物である蛋白質量の差として反映されているか否かを RT-PCR 法, ならびに組織切片における免疫組織化

学的解析を用いて確認した (図①B, C)。肝臓組織は, 胎児期において GPC3 を発現するが出生後発現しなくなり, HCC において再び発現するため, GPC3 はがん胎児性蛋白質としての性格を有している。HCC 患者の約 40 % の血液中に可溶性 GPC3 が検出されるが, 健常人, 慢性肝炎, その他の肝疾患ではまったく検出されず, HCC の腫瘍マーカーとして有用である¹⁾。また HCC 切除後は, 血清 GPC3 が消失することから, 治療効果の判定などの臨床への応用が期待される。

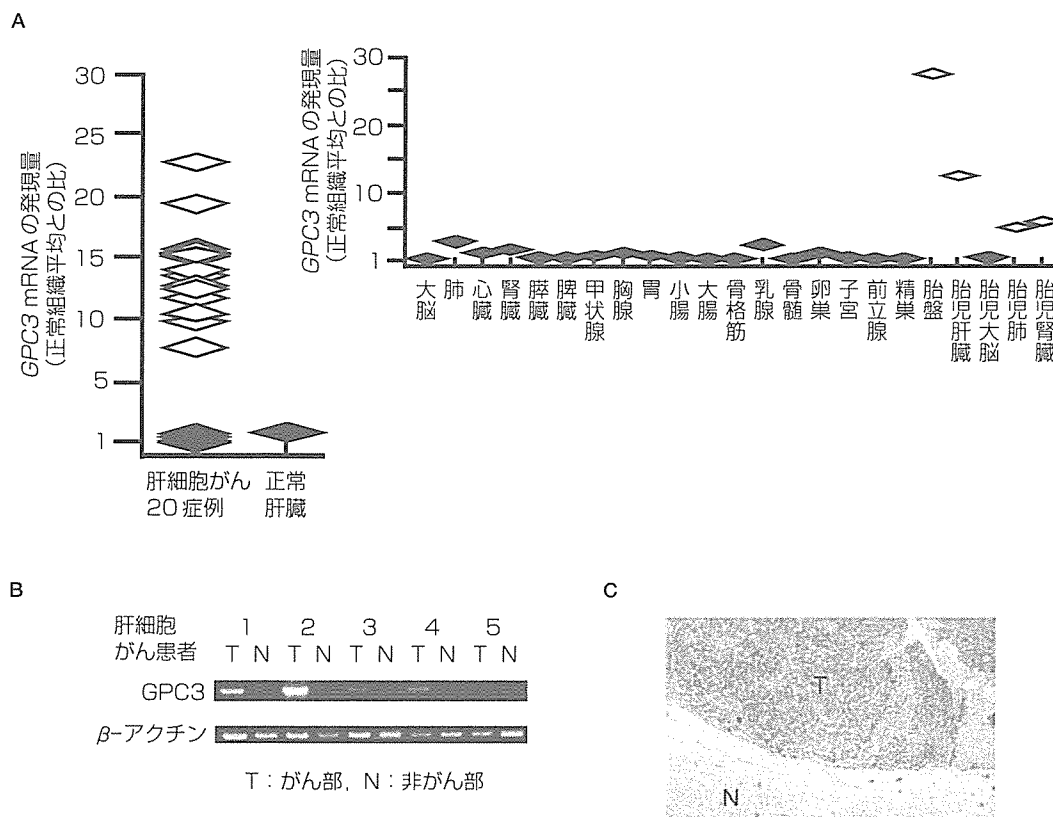
③ 抗腫瘍免疫療法のターゲットとしての GPC3 の有用性

1) マウスにおける腫瘍免疫の解析

発現の組織特異性がすぐれていることから, 中面らは, この新規がん胎児性抗原 GPC3 が, 理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかをマウスを用いて検討した。日本人の約 60 % が所有するヒト白血球抗原 (human histocompatibility leukocyte antigen : HLA) 遺伝子の産物の一つである HLA-A24 と, BALB/c マウスのクラス I 分子の K^d に結合するペプチドの構造モチーフは, 非常に類似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 のいずれにも結合すると予測される GPC3 由来のペプチドを合成した。このペプチドを骨髓由来樹状細胞 (bone marrow-derived dendritic cell : BM-DC) に負荷して BALB/c マウスに免疫して解析することにより, K^d 分子に結合して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される (K^d 拘束性) CTL エピトープペプチドを同定した²⁾。

このエピトープペプチドを負荷した BM-DC ワクチンを腹腔内に予防的に投与した BALB/c マウスでは, コントロール群にくらべ GPC3 発現マウス大腸がん細胞株の増殖が著明に抑制された²⁾。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, 本村らは, 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



図① HCC20 例のがん部、非がん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^{a)}と HCC 組織における *GPC3* mRNA および蛋白質の発現 (Nakatsura T *et al.*, 2003^{b)}より改変引用)

A : HCC 患者 20 例のがん部と非がん部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、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た。*GPC3* は、肝臓がん患者 20 例中 16 例でがん部／非がん部の発現の比が 5 以上 (平均 396.2) で、胎盤や胎生期の肝臓および腎臓に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器に発現を認めない、がん胎児性抗原をコードする遺伝子であった。

B : HCC 組織のがん部 (T) と非がん部 (N) における *GPC3* mRNA の発現の有無を RT-PCR 法により検討したところ、がん部においてのみ *GPC3* 遺伝子の発現を認めた。

C : 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化学的解析により確認した。

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* 発現がん細胞株の増殖と転移が抑制されることを報告した³⁾。

2) HCC 患者における腫瘍免疫の解析

日本人の HLA-クラス 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 20 % 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-A2Tgm*) に最も強く、*GPC3* 特異的 CTL を誘導できるエピトープペプチドを ELISPOT アッセイにて検討することにより、ペプチド A2-3 : *GPC3*₁₄₄₋₁₅₂ を同定した。さらに、この *GPC3* A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した *HLA-A2Tgm* では、重要臓器 (脳、皮膚、心、肺、肝、腎) において自己免疫反応は生じておらず、その安全性が示唆された。

表① 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. (Komori H *et al*, 2006⁴⁾より改変引用)

患者	年齢	性別	がんの進行度 ^{※1}	GPC3の発現 ^{※2}	HLAの発現 ^{※3}	CTLの誘導 ^{※4}
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	+	+	-

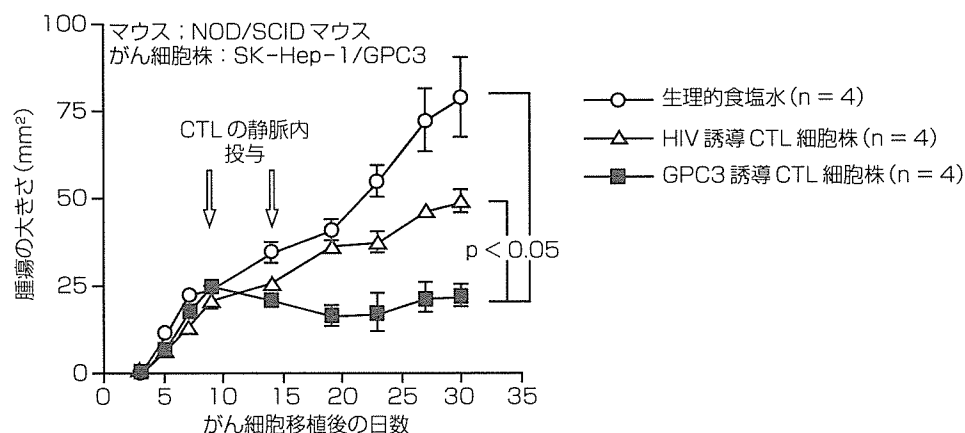
患者	年齢	性別	がんの進行度 ^{※1}	GPC3の発現 ^{※2}	HLAの発現 ^{※3}	CTLの誘導 ^{※4}
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+	+

※1 TNM分類を用いた.

※2 免疫染色を用いて, 腫瘍周囲の正常組織と比較して発現を確認した.

※3 免疫染色により膜が染色された場合に, 発現ありと判断した.

※4 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.



図② 免疫不全マウスに移植したGPC3発現ヒトHCC細胞株に対するヒトCTL養子免疫療法の有効性 (Komori H *et al*, 2006⁴⁾より改変引用)

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, 移植後9日目に 5×5 mmの大きさになった時点と, その5日後(移植後14日目)にCTLを 8×10^7 個, 計2回i.v.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(○)のあいだで比較すると, GPC3特異的CTL投与群ではコントロール群にくらべ, 有意に腫瘍の増殖が抑制されていた.

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ と、H-2K^d(≡ 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、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 10 名中 5 名の PBMC より、また、GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 12 名中 6 名の PBMC より、各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた⁴⁾ (表①)。

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 を皮下移植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 株を静脈注射により養子免疫した。GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL 株を投与した 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⁴⁾ (図②)。現在、国立がんセンター東病院にて HLA-A2 あるいは HLA-A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いたがん免疫療法の臨床第 1 相試験を展開中である。

● おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは、HCC の免疫療法のあらたなターゲットとして、その臨床応用が期待される。がんの免疫逃避に対抗するためには、多様ながん拒絶抗原のレパトリーを確立することが望まれる。GPC3 がその 1 つとして、HCC の再発および発症防止に寄与

ることを期待したい。

文 献

- 1) Nakatsura T *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 *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) Motomura Y *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
- 4) Komori H *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
- 5) Butterfield LH : Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127 : S232-S241, 2004
- 6) Okabe H *et al* : Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 61 : 2129-2137, 2001
- 7) Veugelers M *et al* : Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 274 : 26968-26977, 1999
- 8) Gonzalez AD *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
- 9) Capurro MI *et al* : Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 65 : 6245-6254, 2005

別刷

Biotherapy

VOL. 21 (2007)

癌と化学療法社

Printed in Japan © 禁 無断転載・複写複製

特集

癌ワクチン—最近の進歩—

癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法

*¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部・消化器外科分野, *² 国立がんセンター東病院・臨床開発センター,
*³ 熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野

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

要旨 われわれは, Glypican-3 (GPC3) が肝細胞癌 (HCC) に高発現する新規癌胎児性抗原であり, 腫瘍マーカーとして有用であること, また BALB/c マウスに GPC3 由来のペプチドを負荷した樹状細胞を免疫すると, GPC3 発現腫瘍の増殖が抑制されることを報告している。今回, ヒト CTL が認識する GPC3 由来の HLA-A2 あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチドを同定し, これらを用いて HCC 患者の末梢血単核球 (PBMC) から GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が誘導できるか否かを検討した。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 エピトープに特異的な CTL を誘導できた。また, これらの CTL は NOD/SCID マウスに移植した, GPC3 を発現するヒト HCC 細胞株の増殖を抑制した。これらの結果から, GPC3 由来のペプチドは, HCC 患者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できる。

[Biotherapy 21 (1): 62-68, January, 2007]

Identification of CTL Epitopes of Glypican-3 Useful for Cancer Immunotherapy

Hiroyuki Komori*¹, Tetsuya Nakatsura*², Yutaka Motomura*^{1,2},
Toru Beppu*¹, Yasuharu Nishimura*³ and Hideo Baba*¹

*¹ Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, *² Immunotherapy Section, Investigative Treatment Division, Center for Innovative Medicine, National Cancer Center East, *³ Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Summary

We previously reported that Glypican-3 (GPC3) was overexpressed specifically in hepatocellular carcinoma (HCC) in humans, and it was useful as a novel tumor marker for HCC. We also reported that the pre-immunization of BALB/c mice with bone-marrow-derived dendritic cells pulsed with the H-2K^d-restricted mouse GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) peptide prevented the growth of tumor expressing mouse GPC3.

Because of similarities in the binding peptide motifs between H-2K^d and HLA-A24 (A*2402), the GPC3₂₉₈₋₃₀₆ peptide thus seemed to be useful for the immunotherapy of HLA-A24⁺ patients with HCC. Therefore, we investigated whether or not the GPC3₂₉₈₋₃₀₆ peptide could induce GPC3-specific CTLs from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A24 (A*2402)⁺ HCC patients. In addition, we used HLA-A2.1 (HHD) transgenic mice (Tgm) to identify the HLA-A2 (A*0201)-restricted GPC3 epitopes to expand the applications of GPC3-based immunotherapy to the HLA-A2⁺ HCC patients. We found that the GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) peptide could induce peptide-specific CTLs in HLA-A2.1 (HHD) Tgm without inducing autoimmunity. In 5 out of 8 HLA-A2⁺ GPC3⁺ HCC patients, the GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-

specific CTLs were generated from PBMCs by *in vitro* stimulation with the peptide. The GPC3₂₉₈₋₃₀₆ peptide-specific CTLs were also generated from PBMCs in 4 of 6 HLA-A24⁺ GPC3⁺ HCC patients, and the inoculated CTLs could attack the human HCC tumor mass implanted into NOD/SCID mice.

Our study raises the possibility that these GPC3 peptides may therefore be applicable to cancer immunotherapy for a large number of HCC patients.

Key words : Cancer immunotherapy, CTL, HCC, Glypican-3 (GPC3)

Address request for reprints to : Dr. Hiroyuki Komori or Hideo Baba, Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan

はじめに

肝細胞癌 (HCC) の罹患数は、欧米およびアジア諸国において依然として増大している。HCC 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、肝炎、肝硬変から発生したごく初期の癌に対する早期治療法や治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれる。Glypican-3 (GPC3) は HCC に高発現し、腫瘍免疫のターゲットとして理想的な癌胎児性抗原である。われわれは、HCC に対する免疫療法の新たなターゲットとして GPC3 に着目し、その有用性に関して前臨床試験を終了し、臨床試験を開始する予定である¹⁻³⁾。

I. HCC に対する免疫療法

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や HCC 術後における術後化学療法は、未だ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代より lymphokine activated killer (LAK) cells, tumor infiltrating lymphocytes (TIL), peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いた養子免疫療法、DC ワクチン療法、AFP 由来ペプチドワクチン療法など試みられているが、未だ標準的な治療法として確立されていない⁴⁾。HCC において高発現する癌特異的抗原も多数報告されており、各施設でその有用性が検討されている⁴⁾ (表 1, 2)。

II. 新規癌胎児性抗原 (GPC3)

われわれは、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔博士らとの共同研究により、癌部と非癌部の cDNA マイクロアレイ解析

を用いて HCC 特異的に高発現する遺伝子として GPC3 を同定した (図 1)。

1. GPC3 の構造と機能

膜結合型の Glypican ファミリーは、現在までのところ 6 種類が報告されている⁵⁾。GPC3 は、580 アミノ酸からなる 60 kD のコア蛋白質にヘパラン硫酸プロテオグリカンの糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で、C 末端が GPI アンカーにより形質膜に結合している。Pilia らは、X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患である巨人症の一種 Simpson-Golabi-Behmel 症候群 (SGBs) において、GPC3 の遺伝子変異を報告している。また、GPC3 ノックアウトマウスでも、SGBs と同様に巨大化などの表現型を示すことがわかっている。GPC3 の機能としては、ある種の腫瘍細胞では増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスに関連があると報告されている⁶⁾。近年、GPC3 コア蛋白質が直接 Wnt と結合することにより Wnt signal を活性化し、HCC の増殖を促進することが報告されている⁷⁾。

2. HCC 組織における GPC3 の発現

われわれは、遺伝子の発現量の差が、その遺伝子産物である蛋白質量の差として反映されているか否かを RT-PCR 法ならびに組織切片における免疫染色法を用いて確認した (図 2)。肝臓組織は、胎児期において GPC3 を発現するが出生後発現しなくなり、HCC においては再び発現するため GPC3 は癌胎児性蛋白質としての性格を有しており、恐らく胎児の発生に重要な役割を担っていると推測される。一般に、癌胎児性蛋白質は腫瘍の進行において重要な役割を担っているとは考えられていないが、腫瘍マーカーまたは免疫療法の標的として使用されてきた。

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								
Korangy (2004)									24

*: HCC 組織における各種癌抗原 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 peptidase	Butterfield, <i>et al</i> (2003)	6 stage IVa and IVb	AFP peptidase 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

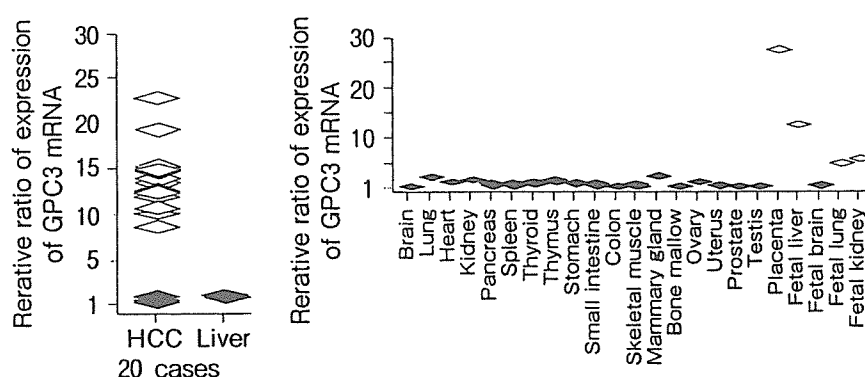


図1 HCC 20 例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター: 中村祐輔博士らの研究成果, Okabe, H., *et al.*: *Cancer Res.* 61: 2129, 2001.)

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。

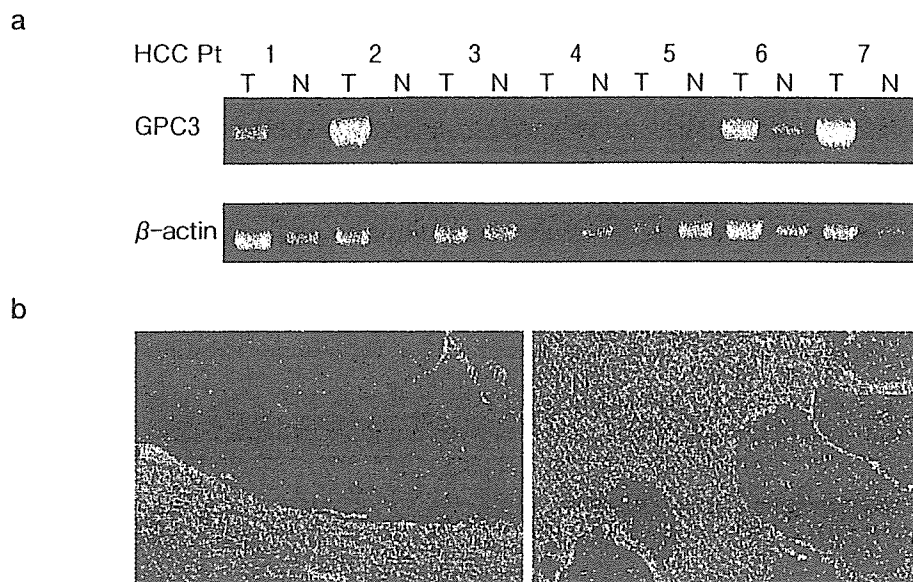


図2 HCC組織におけるGPC3の発現

- 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。

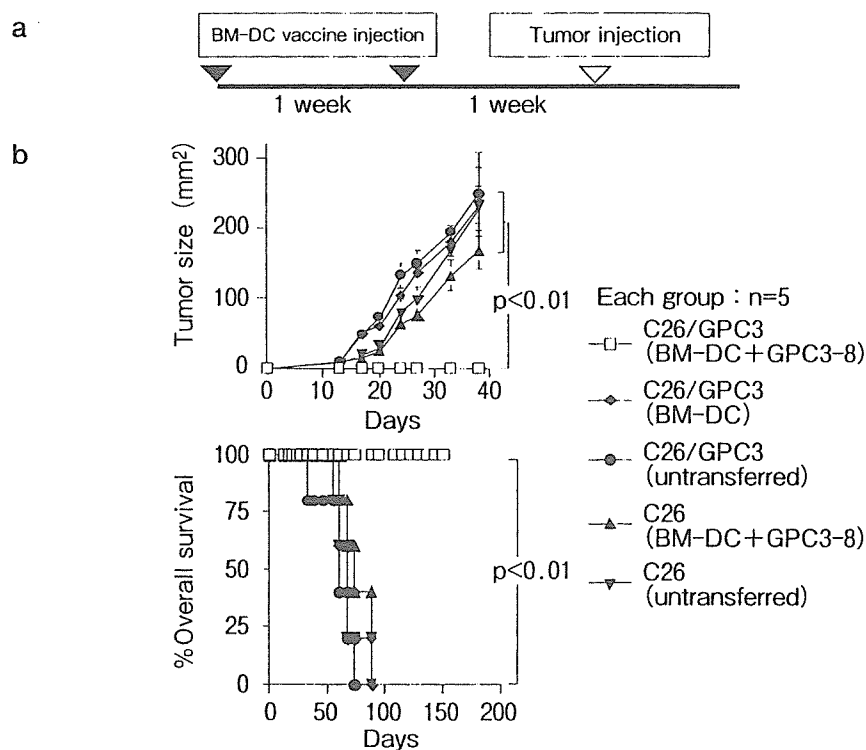


図3 マウスにおける GPC3 ペプチドを負荷した BM-DC ワクチンによる腫瘍抑制効果

- 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)

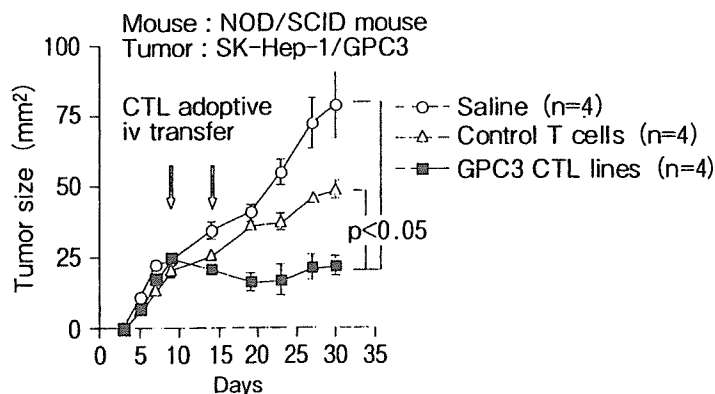


図4 GPC3発現ヒトHCC細胞株に対する養子免疫療法の有効性

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