

2007 28007A

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19年度 研究報告書

主任研究者 木下 平

平成20 (2008) 年3月

目 次

I. 構成員名簿	-----	1
II. 平成19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. 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験	-----	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. 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3 特異的細胞傷害性 T 細胞の出現頻度の検討に関する研究	-----	14
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. 肝細胞がん局所療法に付随する抗腫瘍免疫効果の検討	-----	16
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		
4. ヒト肝細胞がんにおける Glypican-3 (GPC3) 免疫染色の有用性に関する研究	-----	18
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臨床開発センターがん治療開発部機能再生室 中面 哲也		
5. がん免疫療法への応用を目指したヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製に関する研究	-----	20
熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野 千住 覚、西村 泰治		
6. 肝癌細胞における細胞死抵抗性の分子基盤の解明	-----	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19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	病棟部長
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	准教授
	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19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 部長

研究要旨

進行肝細胞がん患者を対象として、肝細胞がんの特異的に高発現する新規がん胎児性抗原である Glypican-3 (GPC3) を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を実施した。安全性に問題はなく、ほとんどの症例で末梢血中ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の頻度の増加が検出され、免疫学的有効性も確認された。劇的ではないが臨床効果も見出され、その効果には投与量依存性も示唆された。あと 2 例で完了して評価をし、次年度より第 II 相試験を実施する。

約 20% の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する CTL の存在が認められ、その GPC3 ペプチド特異的 CTL 陽性患者血漿中に、陰性の患者血漿では低く、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを 1 種類見つけた。今後はこれらが肝細胞がんの超早期診断に有用であるかどうかを検討していく。

初回治療の肝細胞がん患者 (RFA 9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例) を対象にした、それぞれの治療前後における末梢血中の GPC3 特異的 CTL の推移の検討により、RFA 治療や動脈塞栓術により腫瘍部位を壊死に陥らせることによって、GPC3 を含めた腫瘍由来の様々ながん抗原に対する特異的免疫応答を誘導できる可能性が示唆された。

免疫組織化学的解析により、肝臓がんにおける肝細胞がん成分と胆管細胞がん成分の鑑別に、GPC3 の免疫染色が極めて有用であることが示された。また、GPC3 を発現しない肝細胞がんでは、発現するものに比べ、有意に予後が良好であった。GPC3 免疫染色は、肝細胞がんの鑑別診断および予後予測に有用であることが示された。さらに、今回 GPC3 染色を施行した肝細胞がんの約 10% において、非癌部のごく狭い領域に GPC3 染色陽性所見を認め、その意義を現在解析中である。

また、ヒト ES 細胞および今話題の iPS 細胞から樹状細胞を分化誘導する培養プロトコルを開発した。今後の発展が期待される。

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 寛 熊本大学大学院医学薬学研究部
免疫識別学分野 准教授
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

我々が同定した GPC3 はがん特異的抗原で、GPC3 は肝細胞がん、メラノーマと胎生期の肝臓、胎盤に高発現する。胎盤は免疫学的に攻撃されないように隔離された臓器であり、したがって、GPC3 を標的とする免疫療法を開発すれば、有害事象のないがん

の予防・治療法が可能になってくる。マウスモデルを用いて開発した安全で有効ながんの予防・治療法を、国立がんセンター東病院において臨床第 I 相試験 (国立がんセンター倫理審査委員会承認済) で検証する。その後に補助療法としての有効性を免疫学的な背景とともに第 II 相試験で検討する予定であり、この治療法の効果に関する基礎的、臨床的な科学的エビデンスを蓄積することを目的とする。今年度はペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の実施を最優先課題とした。

B. 研究方法

1) 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験
投与回数を 2 週間おきに 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た。免疫学的モニタリングと RECIST 基準による臨床効果を総合的に判定して、次相の至適投与量を定める方針とした。

2) 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3 特異的細胞傷害性 T 細胞の出現頻度の

検討に関する研究

本研究は東京労災病院との共同研究であり、東京労災病院の慢性肝炎・肝硬変患者の検体を国立がんセンター東病院臨床開発センターで解析した。各患者末梢血から単核細胞を分離し、HLA-A24 ならびに HLA-A2 結合性 GPC3 ペプチドを用いて ELISPOT assay を行った。SELDI/TOF-MS を用いたプロテインチップ解析においては、慢性肝炎/肝硬変の ELISPOT 陽性、陰性患者、肝細胞がん患者、それぞれ 6 症例ずつ計 18 症例の検体を用いて、ペプチド特異的 CTL 陰性群より陽性群にて有意に高発現しているピークを検索し、HCC 患者での発現量と比較した。

3) 肝細胞がん局所療法に付随する抗腫瘍免疫効果の検討

治療歴のない HLA-A24 あるいは-A2 陽性の肝細胞癌患者 27 人 (RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例) を対象に、それぞれの治療前後における末梢血単核球 (PBMC) 中の GPC3 特異的 CTL の推移を検討した。治療前と治療後 1 ヶ月に得られた PBMC を用いて、IFN- γ Elispot assay を行い、GPC3 特異的 CTL の検出を行った。

4) ヒト肝細胞がんにおける Glypican-3 (GPC3) 免疫染色の有用性に関する研究

国立がんセンター東病院にて肝切除を施行された症例を対象とし、切除標本のホルマリン固定パラフィンブロックを薄切して組織標本スライドを作製し、免疫組織化学的な検討を行った。次に HCC の GPC3 発現と予後との関連を検討した。

5) がん免疫療法への応用を目指したヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製に関する研究

京都大学再生医学研究所において樹立されたヒト ES 細胞株を使用した。ヒト ES 細胞の血球細胞系への分化誘導には、これまでのマウスおよびカニクイザルの ES 細胞を用いた研究成果に準じて、フィーダー細胞共培養法を採用した。フィーダー細胞として、マウス由来ストローマ細胞である、OP9 を使用した。樹状細胞への分化および樹状細胞の成熟を促す因子として、ヒト GM-CSF、M-CSF、IL-4、Flt-3L などのサイトカイン、および LPS の効果を検討した。樹状細胞への分化の確認は、細胞の形態ならびにフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析により行った。

ヒト ES-DC の T 細胞への抗原提示機能については、アロ二次混合リンパ球反応 (MLR) の誘導の有無について検討した。さらに、ヒト ES-DC による抗原のプロセッシングと抗原提示機能を検討した。

6) 肝癌細胞における細胞死抵抗性の分子基盤の解明

まず 2 種類のヒト肝癌細胞株 (HepG2 細胞、Huh7 細胞) と 1 種類のヒト肝細胞株 (Hc 細胞) を対象に、酸化ストレスとしての過酸化水素刺激を加え、細胞

数の変化を WST assay にて、アポトーシス (細胞死) の誘導を FACS にて解析した。次にエピジェネティックな変化を確認するために、脱メチル化剤による遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。さらに酸化ストレスと細胞死を結びつける細胞内応答を遺伝子解析と蛋白質機能解析により検討した。

[倫理面への配慮]

1) の臨床試験および 3) の臨床検体を用いた研究を開始するにあたって、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。2) の臨床検体を用いた研究を開始するにあたって、東京労災病院及び国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。5) の ES 細胞を用いた研究を開始するにあたって、熊本大学倫理委員会および文部科学省ヒト ES 細胞倫理委員会から、ヒト ES 細胞使用研究の承認を得た。さらに、ヒト ES 細胞使用研究の遂行にあたっては、文部科学省のヒト ES 細胞指針および熊本大学の倫理規定を遵守しつつ、熊本大学倫理委員会ヒト ES 細胞分科会の監視のもとに、承認された使用計画書に沿って研究を行なった。これらの臨床試験および研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言に従って本試験を実施し、個人情報保護にも最大限留意している。

C. 研究結果

1) 現在、レベル 3 の最大投与量 3.0mg で試験継続中であり、レベル 2 の投与量 1.0mg まで評価が終了した。計 14 例の安全性に問題はなく、レベル 1 の 0.3mg の 8 例中 7 例に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、3 回のワクチン投与を完遂し 1 ヶ月後に CT で評価した 6 人中 3 人が SD で、3 人は PD であった。またレベル 2 の 1.0mg では、6 例中 5 例に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の評価では 6 人中 4 人が SD で、2 人は PD であった。なお、評価病変の腫瘍径の総和の推移をグラフ化すると、ワクチン登録数ヶ月前の CT と比較できた 9 人中 7 人において、ワクチン投与により、腫瘍径の総和の増大の程度が抑制されていることが示された。現在、レベル 3 の最大投与量 3.0mg の登録予定 6 例中 4 例が終了したところであるが、その 4 例の安全性に問題はなく、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の評価では 4 人中 3 人が SD で、1 人は PD であった。この 4 例には腫瘍マーカーの減少や腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められている。

2) ELISPOT アッセイにおいて、慢性肝炎・肝硬変患者 47 症例中 10 症例 (21%) の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する細胞傷害性 T 細胞の存在が認められた。プロテインチップ解析に

おいては、GPC3 ペプチド特異的 CTL が陽性と陰性の患者血漿を比較して陽性患者血漿にて有意に高発現であった分子について、肝細胞がん患者血漿と比較検討したところ、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを 1 種類見つけた。

3) RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例において、治療前の PBMC 中に GPC3 特異的な CTL を検出された症例は、それぞれ 6 例、5 例、2 例 (27 症例中 13 症例) で、肝細胞がん患者の約半数で PBMC 中に GPC3 特異的 CTL が存在した。さらに、治療後に特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA6 例、肝切除術 1 例、動脈塞栓術 4 例であった。また、RFA 治療後 13 ヶ月後に、肝臓の再発部位を切除した症例について、免疫組織染色による CD8+あるいは CD4+T 細胞の検出を行ったところ、腫瘍内部ならびに周囲に多くの CD8+T 細胞の浸潤が認められた。

4) HCC と ICC の鑑別に GPC3 の免疫染色が極めて有用であることが示された。

GPC3 染色性と予後の検討では、GPC3 染色陽性は 87/107 (81%) であり、GPC3 陽性群 (n=87) と GPC3 陰性群 (n=20) を比較すると、単変量解析にて有意差をもって影響を及ぼす因子は、全生存期間について HBsAg 陽性 ($p = 0.0113$)、HCV 陽性 ($p = 0.0043$)、ICG R15 値 ($p = 0.0466$)、術前 PIVKA-II 値 ($p = 0.016$)、肝切除 \geq Segmentectomy ($p = 0.005$)、再発例 ($p = 0.0191$)、腫瘍個数多発 ($p = 0.0091$)、病理学的胆管侵襲あり ($p = 0.0035$)、肝内転移あり ($p < 0.0001$)、切除断端陽性 ($p = 0.0045$) と、GPC3 染色陽性 ($p = 0.0253$) であった。GPC3 陽性群と陰性群の 5 年生存率は 54.5% と 87.7% であり、HCC 癌部での GPC3 発現と生存期間との関連が示唆された。これらの因子について多変量解析を行うと、GPC3 染色陽性 ($p = 0.0397$)、腫瘍個数多発 ($p = 0.0149$)、肝内転移あり ($p = 0.0275$) が有意な因子であり、GPC3 を発現しない HCC では、発現するものに比べ、有意に予後が良好であった。

また、今回 GPC3 染色を施行した全 HCC153 例中、非癌部のごく狭い領域に染色陽性を認める症例を 15 例認めた。

5) ヒト ES 細胞から ES-DC を分化誘導できることを見出した。樹状細胞としての形態、細胞表面分子 (CD80、CD86、CD40、HLA-DR)、IL-12 などのサイトカイン産生能、アロ T 細胞への一次 MLR 刺激活性、および CD4+T 細胞クローンへの蛋白質ならびにペプチド抗原の提示機能を有する ES-DC を分化誘導できた。

6) HepG2 細胞、Hc 細胞、Huh7 細胞の順に酸化ストレスに対する細胞死抵抗性が認められた。最も抵抗性を呈する HepG2 細胞では、脱メチル化剤により多くの細胞死関連遺伝子の発現が亢進し、逆に GPC3 の発現は低下していた。このようにエピジェネティックな影響が細胞死関連遺伝子や GPC3 の発

現制御に関与している可能性が示された。

D. 考察

1) 第 I 相試験の登録は終了し、レベル 3 の最大投与量 3.0mg のあと 2 例が現在試験中で、計 20 例で完了する。第 II 相では、再発率が高い肝細胞がんの根治的治療後の再発予防効果を評価する臨床試験と、肝硬変患者の肝細胞がん発症予防効果をみる臨床試験も計画している。マウスでの研究結果ではワクチンの効果は投与量に依存していたが、今回の臨床試験でも投与量 3.0mg で見られている臨床効果から、ワクチン効果の投与量依存性が示唆され、進行肝細胞がん患者に対してさらに投与量や投与回数を増やす臨床試験も計画中である。

2) 慢性肝炎・肝硬変患者の少なくとも一部においては、既に GPC3 発現細胞が存在していて、免疫系がそれに反応していると考えられた。GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞の検出あるいは血漿のプロテインチップ解析により、肝細胞がんの超早期診断が出来る可能性が示唆された。今後、患者数を増やして検討すると共に、陽性患者においては再現性を検討し、明らかに陽性であれば肝細胞がんの発症の有無を、厳重に経過観察していく。

3) 治療後に特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA が 9 例中 6 例で最も多く、動脈塞栓術が 4 例であったが、肝切除術はわずか 1 例であった。RFA 治療や動脈塞栓術により腫瘍部位を壊死に陥らせることによって、GPC3 を含めた腫瘍由来の様々ながん抗原に対する特異的免疫応答を誘導できる可能性があると考えられた。さらに、これら局所治療にペプチドワクチンなどの免疫療法を併用することによって、がん抗原特異的な CTL をより多く誘導できるかどうかマウスを用いて現在検討中である。

4) GPC3 を発現する HCC と発現しないものの網羅的遺伝子及び蛋白の発現解析を進めている。GPC3 の前癌病変での発現の報告もあるが、非癌部の GPC3 染色陽性を示した領域に注目し、同部位での遺伝子発現について解析を進めている。今後 HCC における GPC3 発現の意義についてさらなる検討が必要である。

5) ES 細胞は適切な培養条件下では無限に増殖させることが可能であり、樹状細胞を体外で作製するためのソースとして ES 細胞を用いることにより、アフエレーシス操作による単球分離を必要とせず、細胞ワクチン用の樹状細胞の大量生産が可能である。また、養子免疫療法のための腫瘍抗原特異的 T 細胞を刺激するための抗原提示細胞としても有用であると考えられる。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。また、ES

細胞の技術を iPS 細胞にも応用する。

E. 結論

1) GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性が証明でき、劇的ではないが臨床的効果も見出すことができた。

2) 肝細胞がん患者だけでなく、慢性肝炎・肝硬変患者の約 20%は、末梢血中に GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞や肝細胞がん特異的マーカー蛋白が検出されることが示唆された。

3) RFA 治療後に肝細胞がん特異抗原 GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加が観察された。

4) HCC に対する GPC3 免疫染色は、鑑別診断および予後予測に有用であることが示された。

5) 抗原提示機能を有するヒト ES-DC の分化誘導技術の開発に成功した。

以上より、3 年計画の最終年度である今年度も所期の目標を十分に満たす成果が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted Glypican-3-derived peptide vaccine can induce Specific CTLs in preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* in press
- 2) Kobayashi A, Takahashi S, Ishii H, Konishi M, Nakagohri T, Gotohda N, Satake M, Furuse J, Kinoshita T. Factors predicting survival in advanced T-staged hepatocellular carcinoma patients treated with reduction hepatectomy followed by transcatheter arterial chemoembolization. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33: 1019-1024, 2007.
- 3) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99: 159-165, 2008.
- 4) Zytoon AA, Ishii H, Murakami K, El-Kholy MR, Furuse J, El-Dorry A, El-Malah A. Recurrence-free survival after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. A registry report of the impact of risk factors on outcome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37: 658-672, 2007.
- 5) 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.

Stem Cells 25: 2720-2729, 2007

- 6) Tsukamoto H, Irie A, Senju S, Hatzopoulos A.K, Wojnowski L, Nishimura Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur. J. Immunol.* in press
- 7) Yokomine K, Nakatsura T, Senju S, Nakagata N, Minohara M, Kira J, Motomura Y, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in ApcMin/+ mice. *Cancer Sci.* 98: 1930-1935, 2007
- 8) Iwashita H, Fujii S, Kawamura Y, Okamoto T, Sawa T, Masaki T, Nishizono A, Higashi S, Kitamura T, Tamura F, Sasaki Y, Akaike T. Identification of the major antigenic protein of helicobacter cinaedi and the immunogenicity during infections in humans. *Clin. Vaccine Immunol.* in press.
- 9) 中面哲也 Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンによる肝細胞癌の予防・治療法 *G.I.Research* 16(1): 17-23, 2008年
- 10) 中面哲也 癌免疫療法 腫瘍内科 1(5): 449-453, 2007年
- 11) 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 新規癌胎児性抗原Glypican-3を標的とした肝細胞癌の免疫療法 分子細胞治療 6(2): 57-61, 2007年
- 12) 古瀬純司 進行肝細胞癌の化学療法-Sorafenib plasebo-control randomized study (SHARP trial)を中心に 腫瘍内科 1:471-475, 2007年
- 13) 田中基彦, 永濱裕康, 佐々木 裕 臨床講義ウイルス性肝疾患 臨床と研究 84:87-96, 2007年
- 14) 佐々木裕 特集 C型肝炎の治療 新たな展開 瀉血療法 モダンフィジシャン 28: 72-75, 2008年
- 15) 佐々木裕 「新しい診断と治療のABC」肝癌 消化器7 坪内博仁編、発癌機序 pp33-42、最新医学社、東京、2007年

2. 学会発表

- 1) 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験、中面哲也、古瀬純司、本村裕、吉川聡明、黒沼俊光、西村美子、林恵美子、白川博文、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、石井浩、仲地耕平、角田祥之、伊藤雅昭、小森宏之、千住寛、西村泰治、木下平 第 11 回基盤の癌免疫研究会総会(東京)、2007 年 7 月 11、12 日
- 2) Phase I study of Glypican-3(GPC3) peptide vaccine in patients with advanced HCC, 中面哲也、古瀬純司、本村裕、吉川聡明、黒沼俊光、西村美子、林恵美子、白川博文、角田祥之、伊藤雅昭、小森宏之、西村泰治、木下平 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日

- 3) 肝細胞がんを高発現する Glypican-3 由来ペプチドを用いたペプチドワクチンに関する前臨床試験、本村裕、中面哲也、古瀬純司、生田義明、黒沼俊光、小森宏之、伊藤雅昭、馬場秀夫、木下平、江角浩安 第 18 回日本消化器癌発生学会総会(札幌)、2007 年 11 月 8、9 日
- 4) 肝細胞がん特異抗原 Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンの臨床試験、中面哲也、古瀬純司、本村裕、木下平、江角浩安 第 18 回日本消化器癌発生学会総会(札幌)、2007 年 11 月 8、9 日
- 5) 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3 特異的細胞傷害性 T 細胞の出現頻度の検討、林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也 第 11 回基盤的癌免疫研究会総会(東京)、2007 年 7 月 11、12 日
- 6) 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3 特異的細胞傷害性 T 細胞の検出による肝細胞がんの超早期診断の可能性の検討、林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、吉川聡明、児島辰也、水口泰宏、西中川秀太、大場信之、野村和弘、中面哲也 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会(東京)、2007 年 10 月 2 日
- 7) Detection of Glypican-3-specific CTLs in Chronic Hepatitis/Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma Patients 林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日
- 8) Analysis of GPC3-specific immune response induced by Radiofrequency Thermal Ablation, 本村裕、角田祥之、白川博文、黒沼俊光、古瀬純司、木下平、西村泰治、馬場秀夫、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日
- 9) 免疫染色を使用した HCC, CCC, Combined における GPC3 の発現検討—HCC に対する GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相における基礎検討、黒沼俊光、西村美子、本村裕、白川博文、木下平、中野雅行、長谷部孝裕、中面哲也 第 11 回基盤的癌免疫研究会総会(東京)、2007 年 7 月 11、12 日
- 10) GPC3 免疫染色を用いた肝細胞癌と胆管細胞癌の鑑別診断の有用性の検討、西村美子、黒沼俊光、白川博文、長谷部孝裕、太田隆文、中面哲也 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会(東京)、2007 年 10 月 2 日
- 11) 肝細胞癌近接の非癌部領域における Glypican-3 発現の検討、黒沼俊光、西村美子、白川博文、木下平、中野雅行、中面哲也 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会(東京)、2007 年 10 月 2 日
- 12) Investigation of Glypican-3(GPC3) positive micro lesion in non-tumor area adjacent to HCC, 黒沼俊光、西村美子、長谷部孝裕、白川博文、木下平、中野雅行、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日
- 13) Immunohistochemical staining of Glypican-3 in the differential diagnosis of HCC and CCC, 白川博文、黒沼俊光、西村美子、長谷部孝裕、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、木下平、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日
- 14) 高橋進一郎、木下平、小西大、中郡聡夫、後藤田直人、石井浩、仲地耕平、古瀬純司 肝細胞がん切除後 10 年無再発生存例の検討 2007 年 6 月 21-22 日 東京
- 15) 石井浩、古瀬純司、木下平、林孝行、仲地耕平、鈴木英一郎、清水怜、吉野正曠、小西大、佐竹光夫 肝細胞癌に対する血管塞栓化学療法の奏効予知因子 2007 年 6 月 21-22 日 東京
- 16) 池田公史、奥坂拓志、竹内義人、古瀬純司、石井浩、佐竹光夫、佐藤洋造、稲葉吉隆、荒井保明 進行肝細胞癌に対する FMP 動注療法の第 I 相臨床試験 第 5 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2007 年 3 月 23-24 日 札幌市
- 17) Furuse J, Ishii H, Nakajima K, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M. Phase I Study of Sorafenib in Japanese Patients with Hepatocellular Carcinoma. 17th APASL Conference “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia”. March 27-30, 2007. Kyoto.
- 18) 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, Okusa T. Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial of oral Lactoferrin for Chronic Hepatitis C. 17th APASL Conference “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia”. March 27-30, 2007. Kyoto.
- 19) 仲地耕平、古瀬純司、石井浩、鈴木英一郎、清水怜、吉野正曠 進行肝細胞癌に対するシスプラチン肝動注化学療法の奏効予知因子 2007 年 6 月 21-22 日 東京
- 20) Furuse J, Okusaka T, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Ueno H, Ikeda M, Morizane C, Ogura T. Phase I / II study of S-1 in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) : results of phase I part correlation between pharmacokinetics (PK) and hepatic dysfunction. ECCO14 (the European Cancer Conference). September 23-27, 2007. Barcelona.
- 21) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. ILCA (International Liver Cancer Association). 5-7 October, 2007. Barcelona.
- 22) Ikeda M, Furuse J, Okusaka T, Ueno H, Ishii H,

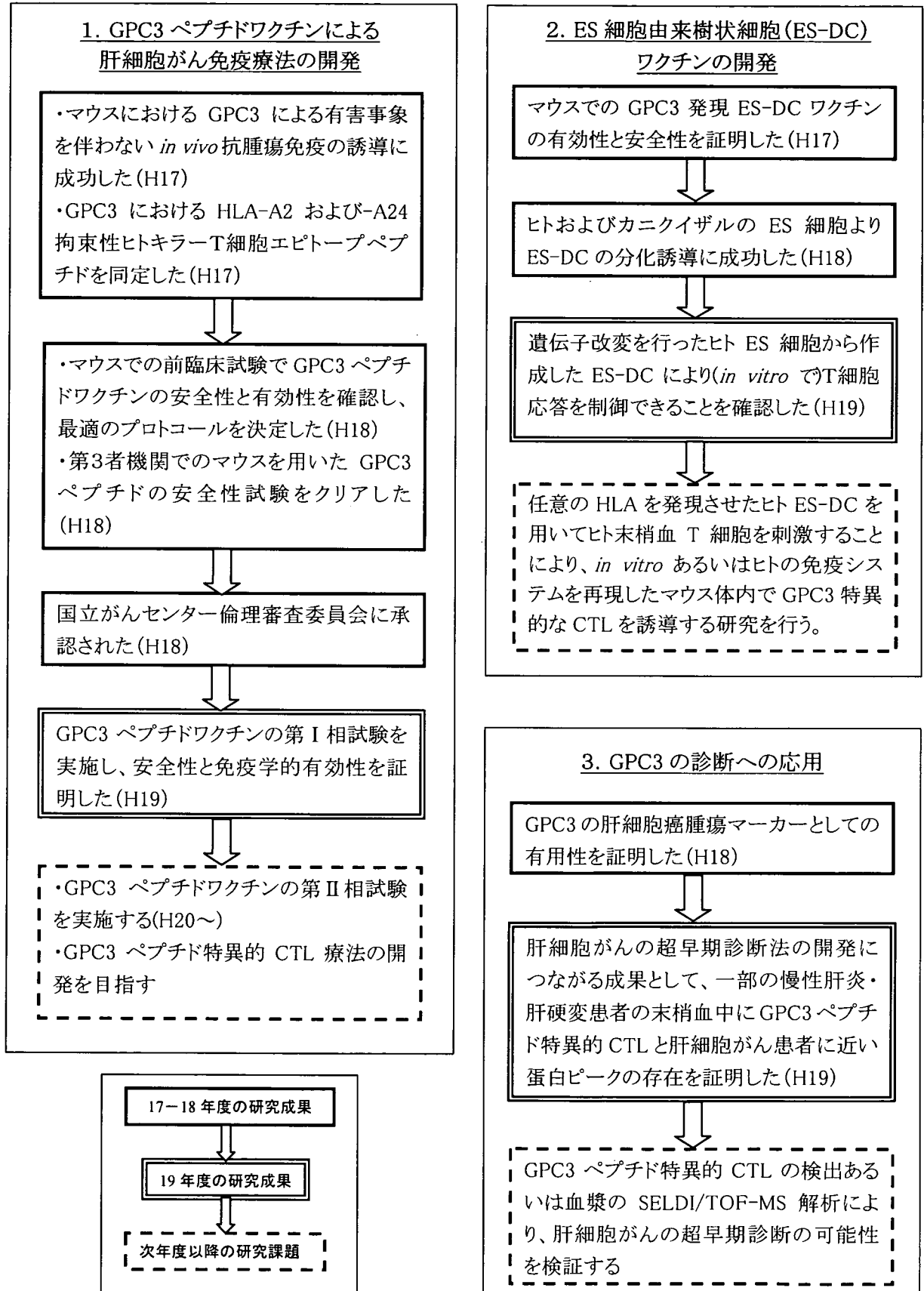
- Nakachi K, Morizane C, Suzuki E, Shimizu S. Phase I and pharmacokinetic study of S-1 for advanced hepatocellular carcinoma : impact of liver disorder. ILCA (International Liver Cancer Association). 5-7 October ,2007. Barcelona.
- 23)古瀬純司、仲地耕平、鈴木英一郎、清水怜 進行肝細胞癌に対する全身化学療法 -分子標的治療を中心に 第45回日本癌治療学会総会 2007年10月24-26日 京都市
- 24)奥坂拓志、古瀬純司、上野秀樹、石井浩、池田公史、仲地耕平、森実千種、鈴木英一郎、清水怜 肝細胞患者における S-1 臨床第 I / II 相試験 -臨床第 I 相試験の成績報告- 第45回日本癌治療学会総会 2007年10月24-26日 京都市
- 25)Nakachi K, Furuse J, Ishii H, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M. Predictive Factor For Response to Arterial Infusion With Cisplatin For Hepatocellular Carcinoma. 17th APASL Conference “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia”. March 27-30, 2007. Kyoto.
- 26)Ishii H, Furuse J, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M, Satake M, Hayashi T. Predictive factors of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. 43st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. June 1-5, 2007.Chicago.
- 27)Furuse J, Nakachi K, Ishii H, Suzuki E, Shimizu S, Gotohda N, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Hayashi T, Satake M, Kinoshita T. Time-to-progression as a parameter for evaluating the therapeutic effects of transcatheter arterial chemoembolization in patients with advanced hepatocellular carcinoma. ILCA (International Liver Cancer Association). October 5-7, 2007. Barcelona.
- 28)Suzuki E, Furuse J, Ishii H, Kinoshita T, Gotohda N, Nakachi K, Shimizu S, Yoshino M. Recurrence and outcomes after local therapy for the treatment of small hepatocellular carcinoma : experience at single center. ILCA (International Liver Cancer Association). October 5-7, 2007. Barcelona.
- 29)Nishimura Y, Komori H, Motomura Y, Senju S, Beppu T, Baba H, Nakatsura T. A novel oncofetal antigen Glypican-3 useful for diagnosis and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)
- 30)Senju S, Suemori H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, Matsuyoshi H, Haruta M, Fukushima S, Matsunaga Y, Nakatsuji N, Nishimura Y. Genetic engineering of human embryonic stem cell-derived dendritic cells. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)
- 31)星田陽明、田中基彦、永濱裕康、佐々木裕 肝癌細胞における酸化ストレスによる遺伝子発現変化の網羅的解析 第 43 回日本肝臓学会総会ワークショップ 2007年6月1日 東京
- 32)永濱裕康、星田陽明、佐々木裕 酸化ストレスによる肝癌細胞の細胞応答を担う分子基盤の解明 第 49 回日本消化器病学会大会 2007年10月18日神戸

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

進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験

主任研究者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科 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 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 機能再生室 室長

研究要旨

進行肝細胞がん患者を対象として、肝細胞がんの特異的に高発現する新規がん胎児性抗原である Glypican-3 を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を実施している。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た。現在まで計 18 例の安全性に問題はなく、解析が終了した 14 例中 12 例に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、免疫学的有効性も確認されている。3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の評価では 16 人中 10 人が SD で 6 人は PD であったが、0.3mg の 6 人中 3 人、1.0mg では 6 人中 4 人、3.0mg では 4 人中 3 人が SD で、SD 率には投与依存性が示唆され、実際に 3.0mg 投与の 4 例には腫瘍マーカーの減少や腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められている。この第 I 相試験はあと 2 例を登録し、計 20 例で完了して評価を行った後、次の第 II 相試験を計画する。

A. 研究目的

肝細胞がんの特異的に高発現する新規がん胎児性抗原である 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がんの予防・治療法の開発を目的としており、今年度は進行肝細胞がん患者を対象とした臨床第 I 相試験を実施している。

B. 研究方法

臨床第 I 相試験では、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た。免疫学的モニタリングと RECIST 基準による臨床効果を総合的に判定して、次相の至適投与量を決める方針とした。

[倫理面への配慮]

本臨床試験を開始するにあたって、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た（平成 18 年 11 月 30 日の国立がんセンター倫理審査委員会で承認済み）。本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言に従って本試験を実施し、個人情報保護にも最大限留意している。

C. 研究結果

現在、レベル 3 の最大投与量 3.0mg で試験継続中であり、レベル 2 の投与量 1.0mg まで評価が終了した。計 14 例の安全性に問題はなく、レベル 1 の 0.3mg の 8 例中 7 例に末梢血中ペプチド特異的 CTL

の頻度の増加が検出され、3 回のワクチン投与を完遂し 1 ヶ月後に CT で評価した 6 人中 3 人が SD で、3 人は PD であった。またレベル 2 の 1.0mg では、6 例中 5 例に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の評価では 6 人中 4 人が SD で、2 人は PD であった。なお、評価病変の腫瘍径の総和の推移をグラフ化すると、ワクチン登録数ヶ月前の CT と比較できた 9 人中 7 人において、ワクチン投与により、腫瘍径の総和の増大の程度が抑制されていることが示された。現在、レベル 3 の最大投与量 3.0mg の登録予定 6 例中 4 例が終了したところであるが、その 4 例の安全性に問題はなく、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の評価では、4 人中 3 人が SD で、1 人は PD であった。この 4 例には腫瘍マーカーの減少や腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められている。

D. 考察

レベル 3 の最大投与量 3.0mg の 6 例の試験を完了し評価する。安全性と免疫学的有効性が確認されたら、本臨床試験により決定した投与量で臨床第 II 相試験を行なう。第 II 相では、再発率が高い肝細胞がんの根治的治療後の再発予防効果を評価する臨床試験と、肝硬変患者の肝細胞がん発症予防効果をみる臨床試験も計画している。マウスでの研究結果ではワクチンの効果は投与量に依存していたが、今回の臨床試験でも投与量 3.0mg で見られている臨床効果は、ワクチン効果の投与量依存性を示唆する

ものであると考えている。進行肝細胞がん患者に対してさらに投与量や投与回数を増やす臨床試験も計画、実施する意義があると考ええる。

E. 結論

GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性が証明でき、劇的ではないが臨床的効果も見出すことができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted Glypican-3-derived peptide vaccine can induce Specific CTLs in preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* in press
- 2) Kobayashi A, Takahashi S, Ishii H, Konishi M, Nakagohri T, Gotohda N, Satake M, Furuse J, Kinoshita T. Factors predicting survival in advanced T-staged hepatocellular carcinoma patients treated with reduction hepatectomy followed by transcatheter arterial chemoembolization. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33: 1019-1024, 2007.
- 3) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99: 159-165, 2008.
- 4) Zytoon AA, Ishii H, Murakami K, El-Kholy MR, Furuse J, El-Dorry A, El-Malah A. Recurrence-free survival after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. A registry report of the impact of risk factors on outcome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37: 658-672, 2007.
- 5) 中面哲也 Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチンによる肝細胞癌の予防・治療法 *G. I. Research* 16(1): 17-23, 2008年
- 6) 中面哲也 癌免疫療法 腫瘍内科 1(5): 449-453, 2007年
- 7) 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 新規癌胎児性抗原 Glypican-3を標的とした肝細胞癌の免疫療法分子細胞治療 6(2): 57-61, 2007年
- 8) 古瀬純司 進行肝細胞癌の化学療法-Sorafenib plasebo-control randomized study (SHARP trial)を中心に 腫瘍内科 1: 471-475, 2007年

2. 学会発表

- 1) Nishimura Y, Komori H, Motomura Y, Senju S, Beppu T, Baba H, Nakatsura T. A novel oncofetal antigen Glypican-3 useful for diagnosis and immunotherapy

of hepatocellular carcinoma. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)

- 2) 進行肝細胞がん患者を対象とした Glypican-3(GPC3) 由来ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験、中面哲也、古瀬純司、本村裕、吉川聡明、黒沼俊光、西村美子、林恵美子、白川博文、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、後藤田直人、石井浩、仲地耕平、角田祥之、伊藤雅昭、小森宏之、千住覚、西村泰治、木下平 第 11 回基盤的癌免疫研究会総会(東京)、2007 年 7 月 11、12 日
- 3) Phase I study of Glypican-3(GPC3) peptide vaccine in patients with advanced HCC, 中面哲也、古瀬純司、本村裕、吉川聡明、黒沼俊光、西村美子、林恵美子、白川博文、角田祥之、伊藤雅昭、小森宏之、西村泰治、木下平 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007 年 10 月 3~5 日
- 4) 肝細胞がんを高発現する Glypican-3 由来ペプチドを用いたペプチドワクチンに関する前臨床試験、本村裕、中面哲也、古瀬純司、生田義明、黒沼俊光、小森宏之、伊藤雅昭、馬場秀夫、木下平、江角浩安 第 18 回日本消化器癌発生学会総会(札幌)、2007 年 11 月 8、9 日
- 5) 肝細胞がん特異抗原 Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンの臨床試験、中面哲也、古瀬純司、本村裕、木下平、江角浩安 第 18 回日本消化器癌発生学会総会(札幌)、2007 年 11 月 8、9 日
- 6) 池田公史、奥坂拓志、竹内義人、古瀬純司、石井浩、佐竹光夫、佐藤洋造、稲葉吉隆、荒井保明 進行肝細胞癌に対する FMP 動注療法第 I 相臨床試験 第 5 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2007 年 3 月 23-24 日 札幌市
- 7) Furuse J, Ishii H, Nakajima K, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M. Phase I Study of Sorafenib in japanese Patients with Hepatocellular Carcinoma. 17th APASL Conference "Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia". March 27-30, 2007.Kyoto.
- 8) 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, Okusa T. Randomized , Double-blind , Placebo-controlled Trial of oral Lactoferrin for Chronic Hepatitis C. 17th APASL Conference "Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia". March 27-30, 2007.Kyoto.
- 9) 仲地耕平、古瀬純司、石井浩、鈴木英一郎、清水裕、吉野正曠 進行肝細胞癌に対するシスプラチン肝動注化学療法の奏効予知因子 2007 年 6 月 21-22 日 東京
- 10) Furuse J, Okusaka T, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Ueno H, Ikeda M, Morizane C, Ogura T.

Phase I/II study of S-1 in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) : results of phase I partcorrelation between pharmacokinetics (PK) and hepatic dysfunction. ECCO14 (the European Cancer Conference). September 23-27, 2007. Barcelona.

- 11) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in Jaoanese patients with hepatocellular caricinoma. ILCA (International Liver Cancer Association). 5-7 October ,2007. Barcelona
- 12) Ikeda M, Furuse J, Okusaka T, Ueno H, Ishii H, Nakachi K, Morizane C, Suzuki E, Shimizu S. Phase I and pharmacokinetic study of S-1 for adovanced hepatocellular carcinoma : impact of liver disorder. ILCA (International Liver Cancer Association). October 5-7, 2007. Barcelona.
- 13) 古瀬純司、仲地耕平、鈴木英一郎、清水怜 進行肝細胞癌に対する全身化学療法 -分子標的治療を中心に- 第45回日本癌治療学会総会 2007年10月24-26日 京都市
- 14) 奥坂拓志、古瀬純司、上野秀樹、石井浩、池田公史、仲地耕平、森実千種、鈴木英一郎、清水怜 肝細胞患者における S-1 臨床第 I / II 相試験 -臨床第 I 相試験の成績報告- 第45回日本癌治療学会総会 2007年10月24-26日 京都市

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。

慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3 特異的細胞傷害性 T 細胞の出現頻度の検討に関する研究

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 機能再生室 室長

研究要旨

ELISPOT アッセイを用いて、慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中における GPC3 ペプチド特異的 CTL の出現頻度を検討した。約 20%の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する細胞傷害性 T 細胞の存在が認められ、慢性肝炎・肝硬変患者の少なくとも一部においては、既に GPC3 発現細胞が存在していて、免疫系がそれに反応していると考えられた。さらに患者血漿のプロテインチップ解析により、GPC3 ペプチド特異的 CTL 陽性患者血漿中に、陰性の患者血漿では低く、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを 1 種類見つけた。今後はこれらが肝細胞がんの超早期診断に有用であるかどうかを検討していく。

A. 研究目的

Glypican-3 (GPC3) は肝細胞がんを高発現する遺伝子として同定された癌胎児性抗原であり、慢性肝炎・肝硬変を背景とした肝細胞がんの発生に密接に関わっている可能性が考えられている。そこで、今回われわれは、肝細胞がんの早期診断、あるいはワクチン療法への応用を念頭に置き、慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中における GPC3 ペプチド特異的 CTL の出現頻度を検討した。

B. 研究方法

本研究は東京労災病院との共同研究であり、東京労災病院の患者検体を国立がんセンター東病院臨床開発センターで解析した。慢性肝炎・肝硬変患者の対象としては、1) 登録前 6 ヶ月以内に、HCV-RNA 陽性あるいは HBs 抗原陽性が確認されている症例、2) 画像所見ならびに血液生化学的検査で、慢性肝炎あるいは肝硬変と臨床的に診断された症例、3) 肝細胞がんの既往がなく、かつ登録前 6 ヶ月以内に超音波検査、CT 等の画像検査でがんが指摘されていない症例、以上 3 つの基準を満たす症例を対象とした。各患者末梢血から単核細胞を分離し、HLA-A24 ならびに HLA-A2 結合性 GPC3 ペプチドを用いて ELISPOT assay を行った。SELDI/TOF-MS を用いたプロテインチップ解析においては、慢性肝炎/肝硬変の ELISPOT 陽性、陰性患者、肝細胞がん患者、それぞれ 6 症例ずつ計 18 症例の検体を用いて、ペプチド特異的 CTL 陰性群より陽性群にて有意に高発現しているピークを検索し、HCC 患者での発現量と比較した。

[倫理面への配慮]

本臨床研究を開始するにあたって、東京労災病

院及び国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言に従って本試験を実施し、個人情報保護にも最大限留意している。

C. 研究結果

ELISPOT アッセイにおいて、慢性肝炎・肝硬変患者 47 症例中 10 症例 (21%) の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する細胞傷害性 T 細胞の存在が認められた。プロテインチップ解析においては、GPC3 ペプチド特異的 CTL が陽性と陰性の患者血漿を比較して陽性患者血漿にて有意に高発現であった分子について、肝細胞がん患者血漿と比較検討したところ、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを 1 種類見つけた。

D. 考察

今後、患者数を増やして検討すると共に、陽性患者においては再現性を検討し、明らかに陽性であれば、肝細胞がんの発症の有無を厳重に経過観察していく。慢性肝炎・肝硬変患者の少なくとも一部においては、既に GPC3 発現細胞が存在していて、免疫系がそれに反応していると考えられた。GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞の検出あるいは血漿のプロテインチップ解析により、肝細胞がんの超早期診断が出来る可能性が示唆された。

E. 結論

肝細胞がん患者だけでなく、慢性肝炎・肝硬変患者の約 20%は、末梢血中に GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞や肝細胞がん特異的マーカー蛋白が検出されることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted Glypican-3-derived peptide vaccine can induce Specific CTLs in preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* in press
- 2) 中面哲也 Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンによる肝細胞癌の予防・治療法 *G.I.Research* 16(1): 17-23, 2008年
- 3) 中面哲也 癌免疫療法 腫瘍内科 1(5): 449-453, 2007年
- 4) 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 新規癌胎児性抗原 Glypican-3を標的とした肝細胞癌の免疫療法 分子細胞治療 6(2): 57-61, 2007年

2. 学会発表

- 1) Nishimura Y, Komori H, Motomura Y, Senju S, Beppu T, Baba H, Nakatsura T. A novel oncofetal antigen Glypican-3 useful for diagnosis and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)
- 2) 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3特異的細胞傷害性T細胞の出現頻度の検討、林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也 第 11 回基盤的癌免疫研究会 総会（東京）、2007年7月11、12日
- 3) 慢性肝炎・肝硬変患者末梢血中における Glypican-3特異的細胞傷害性T細胞の検出による肝細胞がんの超早期診断の可能性の検討、林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、吉川聡明、児島辰也、水口泰宏、西中川秀太、大場信之、野村和弘、中面哲也 第 27 回日本分子腫瘍マーカー研究会（東京）、2007年10月2日
- 4) Detection of Glypican-3-specific CTLs in Chronic Hepatitis/Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma Patients, 林恵美子、本村裕、角田祥之、白川博文、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会（横浜）、2007年10月3～5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。

肝細胞がん局所療法に付随する抗腫瘍免疫効果の検討

主任研究者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科 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 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 機能再生室 室長

研究要旨

治療歴のない HLA-A24 あるいは-A2 陽性の肝細胞癌患者 27 人 (RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例) を対象に、それぞれの治療前後における末梢血単核球 (PBMC) 中の GPC3 特異的 CTL の推移を検討した。肝細胞がん患者の約半数で PBMC 中に GPC3 特異的 CTL が存在したが、治療後に特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA6 例、肝切除術 1 例、動脈塞栓術 4 例であり、RFA 治療や動脈塞栓術により腫瘍部位を壊死に陥らせることによって、GPC3 を含めた腫瘍由来の様々ながん抗原に対する特異的免疫応答を誘導できる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

最近、ラジオ波焼灼療法 (Radiofrequency Thermal Ablation: RFA) などの局所壊死療法は、腫瘍を破壊する効果に加えて、その局所に強烈な免疫反応を惹起して抗腫瘍免疫を活性化するという報告が相次いでなされている。中でもイタリアのグループは、肝細胞がんに対する RFA 治療により、腫瘍特異的な T 細胞応答が増強する事を報告した。これが正しければ、Glypican-3 (GPC3) はほとんどの肝細胞がんを高発現していることから、RFA 治療後に GPC3 ペプチド特異的 CD8 陽性キラー T 細胞 (CTL) が増加しているものと予想される。免疫学的解析により、HLA-A24 あるいは HLA-A2 陽性の肝細胞がん患者に対する肝切除、経皮的局所壊死療法、動脈塞栓療法の治療の前後における採血から得られた末梢血リンパ球の中に、HLA-A24 結合性 GPC3 由来ペプチド (EYILSLEEL) および HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド (RLQPGLKWV、FVGEFFTDV、YILGSDINV) 特異的 CTL が存在するかを検出し、それぞれの治療前後におけるその頻度の変化を調べる。

B. 研究方法

治療歴のない HLA-A24 あるいは-A2 陽性の肝細胞癌患者 27 人 (RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例) を対象に、それぞれの治療前後における末梢血単核球 (PBMC) 中の GPC3 特異的 CTL の推移を検討した。治療前と治療後 1 ヶ月に得られた PBMC を用いて、IFN- γ Elispot assay を行い、GPC3 特異的 CTL の検出を行った。

[倫理面への配慮]

本臨床研究を開始するにあたって、国立がんセ

ンター倫理審査委員会の承認を得た。本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言に従って本試験を実施し、個人情報保護にも最大限留意している。

C. 研究結果

RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例において、治療前の PBMC 中に GPC3 特異的な CTL を検出された症例は、それぞれ 6 例、5 例、2 例 (27 症例中 13 症例) で、肝細胞がん患者の約半数で PBMC 中に GPC3 特異的 CTL が存在した。さらに、治療後に特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA6 例、肝切除術 1 例、動脈塞栓術 4 例であった。また、RFA 治療後 13 ヶ月後に、肝の再発部位を切除した症例について、免疫組織染色による CD8+ あるいは CD4+T 細胞の検出を行ったところ、腫瘍内部ならびに周囲に多くの CD8+T 細胞の浸潤が認められた。

D. 考察

治療後に特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA が 9 例中 6 例で最も多く、動脈塞栓術が 4 例であったが、肝切除術はわずか 1 例であった。RFA 治療や動脈塞栓術により腫瘍部位を壊死に陥らせることによって、GPC3 を含めた腫瘍由来の様々ながん抗原に対する特異的免疫応答を誘導できる可能性があると考えられた。さらに、これら局所治療にペプチドワクチンなどの免疫療法を併用することにより、がん抗原特異的な CTL をより多く誘導できるかどうかについて、マウスを用いて現在検討中である。

E. 結論

RFA 治療後に肝細胞がん特異抗原 GPC3 ペプチド

特異的 CTL の増加が観察された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted Glypican-3-derived peptide vaccine can induce Specific CTLs in preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* in press
- 2) Kobayashi A, Takahashi S, Ishii H, Konishi M, Nakagohri T, Gotohda N, Satake M, Furuse J, Kinoshita T. Factors predicting survival in advanced T-staged hepatocellular carcinoma patients treated with reduction hepatectomy followed by transcatheter arterial chemoembolization. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33: 1019-1024, 2007.
- 3) Furuse J, Ishii H, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Nakajima K. Phase I study of sorafenib in japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 99: 159-165, 2008.
- 4) Zytoon AA, Ishii H, Murakami K, El-Kholy MR, Furuse J, El-Dorry A, El-Malah A. Recurrence-free survival after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. A registry report of the impact of risk factors on outcome. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 37: 658-672, 2007.
- 5) 中面哲也 Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンによる肝細胞癌の予防・治療法 *G.I.Research* 16(1): 17-23, 2008年
- 6) 中面哲也 癌免疫療法 腫瘍内科 1(5): 449-453, 2007年
- 7) 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 新規癌胎児性抗原 Glypican-3を標的とした肝細胞癌の免疫療法 分子細胞治療 6(2): 57-61, 2007年
- 8) 古瀬純司 進行肝細胞癌の化学療法-Sorafenib plasebo-control randomized study (SHARP trial)を中心に 腫瘍内科 1:471-475, 2007年

2. 学会発表

- 1) Nishimura Y, Komori H, Motomura Y, Senju S, Beppu T, Baba H, Nakatsura T. A novel oncofetal antigen Glypican-3 useful for diagnosis and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. 13th International Congress of Immunology, August 21-25, 2007, Rio de Janeiro (Brazil)
- 2) Analysis of GPC3-specific immune response induced by Radiofrequency Thermal Ablation, 本村裕, 角田

祥之、白川博文、黒沼俊光、古瀬純司、木下平、西村泰治、馬場秀夫、中面哲也 第 66 回日本癌学会学術総会(横浜)、2007年10月3~5日

- 3) Nakachi K, Furuse J, Ishii H, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M. Predictive Factor For Response to Arterial Infusion With Cisplatin For Hepatocellular Carcinoma. 17th APASL Conference “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma in Asia”. March 27-30, 2007. Kyoto.
- 4) Ishii H, Furuse J, Nakachi K, Suzuki E, Shimizu S, Yoshino M, Satake M, Hayashi T. Predictive factors of transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. 43st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. June 1-5, 2007.Chicago.
- 5) 石井浩、古瀬純司、木下平、林孝行、仲地耕平、鈴木英一郎、清水怜、吉野正曠、小西大、佐竹光夫 肝細胞癌に対する血管塞栓化学療法の奏効予知因子 2007年6月21-22日 東京
- 6) Furuse J, Nakachi K, Ishii H, Suzuki E, Shimizu S, Gotohda N, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Hayashi T, Satake M, Kinoshita T. Time-to-progression as a parameter for evaluating the therapeutic effects of transcatheter arterial chemoembolization in patients with advanced hepatocellular carcinoma. ILCA (International Liver Cancer Association). October 5-7, 2007. Barcelona.
- 7) Suzuki E, Furuse J, Ishii H, Kinoshita T, Gotohda N, Nakachi K, Shimizu S, Yoshino M. Recurrence and outcomes after local therapy for the treatment of small hepatocellular carcinoma : experience at single center. ILCA (International Liver Cancer Association). October 5-7, 2007. Barcelona.

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。