

Fig. 4. Induction of heat shock protein (HSP) 105-specific T cells via immunization with HSP105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells (BM-DC). (a) The *Apc^{Min/+}* mice were inoculated with HSP105-pulsed BM-DC or BM-DC at 6 and 8 weeks of age. The spleen cells were harvested from 10-week-old *Apc^{Min/+}* mice and depleted with either CD4⁺ or CD8⁺ cells using magnetic cell-sorting system. CD4⁺ cells were used as a source of CD8⁺ T cells and antigen-presenting cells, and CD8⁺ cells were used as a source of CD4⁺ T cells and antigen-presenting cells. Thereafter interferon- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays were carried out. Briefly, CD4⁺ or CD8⁺ T cells (5×10^5) in each well were cultured together with 2 μ g/mL HSP105, myelin basic protein, or medium alone for 24 h. The statistical significance of the difference in results was determined using the unpaired t-test. The spleens of three mice from each group were pooled. This experiment was carried out three times, with similar results. (b) The *Apc^{Min/+}* mice were inoculated with HSP105-pulsed BM-DC or BM-DC at 6 and 8 weeks of age. The small intestines were excised from 10-week-old *Apc^{Min/+}* mice and then were analyzed after immunohistochemical staining with anti-CD4 monoclonal antibody or anti-CD8 monoclonal antibody (magnification $\times 200$).

sporadic cases⁽²⁶⁾ and FAP,⁽²⁷⁾ however, recent clinical trials suggest that the use of high doses of COX-2 inhibitor may have dangerous side-effects, such as increased risk of cardiovascular disease.⁽²⁸⁾ In the present study, no apparent autoimmunity was observed in the *Apc^{Min/+}* mice immunized with HSP105-pulsed BM-DC, an observation similar to our previous findings.^(14,22) In some human clinical trials of DC-based cancer immunotherapy, even in patients with advanced stages of cancer, no major toxicity nor severe side-effects were observed.⁽²⁹⁻³¹⁾ These results strongly suggest that DC-based immunotherapy is safe and feasible.

DC vaccination is now considered to be one of the most promising strategies for cancer immunotherapy.^(32,33) DC are the most potent antigen-presenting cells and can present tumor antigens to stimulate a tumor-specific T-cell response. However, this does not occur in most types of cancer and in animal models of spontaneously arising tumors.⁽³⁴⁾ In the present study, immunization with HSP105-pulsed BM-DC vaccine significantly reduced the number of small-intestinal polyps in the *Apc^{Min/+}* mice; however, the duration of survival was not prolonged as had been expected because the adenomas in *Apc^{Min/+}* mice generally did not become malignant. Thereby, the protocol of DC-based vaccination used in the present study was not sufficient to completely prevent the occurrence of the tumors *in vivo*, and we are trying to establish a more effective immunization protocol. New strategies are now being developed to improve the clinical efficacy of DC-based vaccines, for example, the use of overexpression of Akt1 in BM-DC, suppressor of cytokine signaling 1-silenced BM-DC, and CD40-inducible DC.⁽³⁵⁻³⁷⁾ The use of

transfected DC in a protocol such as that used in the present study has the potential to induce a more effective antitumor response. Furthermore, it is necessary to investigate whether combinations of immunotherapy and other therapies, such as combinations of DC vaccines and chemotherapy or low-dose COX-2 inhibitors, induce a more effective antitumor response in comparison to individual therapy alone, thereby developing more effective strategies for treating colorectal cancer. Recent findings have shown the curative potential of combinations of irradiation,⁽³⁸⁾ chemotherapy,⁽³⁹⁾ and subsequent adoptive T-cell immunotherapy against established solid tumors.⁽⁴⁰⁾

The abrogation of the antitumor effect of the HSP105-pulsed BM-DC vaccine, after the depletion of CD4⁺ cells or CD8⁺ cells via the administration of mAb, indicates that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells play a critical role in the antitumor effect of HSP105-pulsed BM-DC. The report that antigen-specific CD4⁺ T helper cells are required for the activation of CD8⁺ effector T cells, their secondary expansion, and memory induction,⁽⁴¹⁾ is consistent with the findings that CD4⁺ T cells played an important role in tumor rejection in the present study. Peptides derived from HSP105 incorporated into BM-DC might be presented in the context of MHC class II on the surface of BM-DC to activate CD4⁺ T cells. Subsequently, CD4⁺ T cells produce interferon- γ and interleukin-2 to activate HSP105-specific CD8⁺ effector T cells and facilitate the development of HSP105-specific CD8⁺ memory T cells. Furthermore, the ELISPOT assay showed that HSP105-specific CD8⁺ T cells were also activated by HSP105-pulsed antigen-presenting cells. These results indicate

that HSP105-pulsed BM-DC can demonstrate peptides derived from exogenously added HSP105 not only in the context of MHC class II molecules to activate CD4⁺ T cells but also in the context of MHC class I molecules via the mechanism of cross-presentation to activate CD8⁺ T cells. Whole-protein-pulsed DC vaccines seem to be superior to peptide-pulsed DC because they can activate both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and it does not require a knowledge of the human leukocyte antigen (HLA) type of the cancer patients.

In conclusion, the results of the present study indicate that HSP105-pulsed BM-DC may provide a potential vaccine to combat human colorectal cancer. It is possible that immunization with HSP105-pulsed BM-DC vaccines could be useful in patients

with colorectal cancer to prevent tumor recurrence after surgical resection. Although there was a noteworthy effect of this type of vaccine on the host immune response to tumors expressing HSP105, further investigation to improve the clinical efficacy of HSP105-pulsed BM-DC vaccines is called for.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grants-in-Aid (no. 12213111 for Y. Nishimura, no. 14770142 for T. Nakatsura, and no. 14770142 for S. Senju) from the Ministry of Education, Science, Technology, Sports, and Culture, Japan, and The Sagawa Foundation for Promotion of Cancer Research and Meiji Institute of Health Science.

References

- Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; **365**: 153–65.
- Tournigand C, André T, Achille E *et al*. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 229–37.
- Rao CV, Cooma I, Rosa Rodriguez JG, Simi B, El-Bayoumy K, Reddy BS. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis development in the *Apc^{min}* mouse model by 1,4-phenylene bis(methylene)selenocyanate. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 617–21.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; **386**: 761–3.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759–67.
- Kikuchi A. Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; **10**: 255–65.
- Sancho E, Battle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; **20**: 695–723.
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H *et al*. Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4452–6.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B *et al*. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992; **256**: 668–70.
- Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990; **247**: 322–4.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999; **61**: 243–82.
- Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **281**: 936–44.
- Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 2003; **10**: 1777–82.
- Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M *et al*. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**: 269–78.
- Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K *et al*. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. *Cancer Sci* 2005; **96**: 695–705.
- Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, Hatayama T, Baba H, Nishimura Y. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci* 2006; **97**: 623–32.
- Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 395–425.
- Manjili MH, Wang XY, Chen X *et al*. HSP110–HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *J Immunol* 2003; **171**: 4054–61.
- Wang XY, Chen X, Manjili MH, Repasky E, Henderson R, Subjeck JR. Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Res* 2003; **63**: 2553–60.
- Dietrich WF, Lander ES, Smith JS *et al*. Genetic identification of *Mom-1*, a major modifier locus affecting *Min*-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993; **75**: 631–9.
- Yamagishi N, Nishihori H, Ishihara K, Ohtsuka K, Hatayama T. Modulation of the chaperone activities of Hsc70/Hsp40 by Hsp105 α and Hsp105 β . *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **272**: 850–5.
- 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 reaction in mice. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 8630–40.
- Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 2002; **64**: 27–43.
- Boivin GP, Washington K, Yang K *et al*. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. *Gastroenterology* 2003; **124**: 762–77.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL *et al*. Suppression of intestinal polyposis in *Apc* Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; **87**: 803–9.
- Reddy BS, Hirose Y, Lubet R *et al*. Chemoprevention of colon cancer by specific cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, administered during different stages of carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; **60**: 293–7.
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS *et al*. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1946–52.
- Solomon SD, McMurray JJV, Pfeffer MA *et al*. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1071–80.
- Nestle FO, Aljajic S, Gilliet M *et al*. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; **4**: 328–32.
- Stift A, Friedl J, Dubsy P *et al*. Dendritic cell-based vaccination in solid cancer. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 135–42.
- Yu JS, Liu G, Ying H, Yong WH, Black KL, Wheeler CJ. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 2004; **64**: 4973–9.
- Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999; **50**: 507–29.
- Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 245–73.
- Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Rev Immunol* 2004; **4**: 941–52.
- Park D, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer D. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 2006; **24**: 1581–90.
- Evel-Kabler K, Song XT, Aldrich M, Huang XF, Chen SY. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *J Clin Invest* 2006; **116**: 90–100.
- Hanks BA, Jiang J, Singh RAK *et al*. Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines *in vivo*. *Nat Med* 2005; **11**: 130–7.
- Reits EA, Hodge JW, Herberts CA *et al*. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 2006; **203**: 1259–71.
- Casares N, Pequignot MO, Tesniere A *et al*. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 2005; **202**: 1691–701.
- Zhang B, Bowerman NA, Salama JK *et al*. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 2007; **204**: 49–55.
- Janssen EE, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 2003; **421**: 852–6.

G.I.Research

別 刷

発行：株式会社 先端医学社

〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 2-17-8 KDX浜町ビル

特

集

— 消化器癌における免疫治療—現状と展望—

Gastrointestinal
Research

Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン による肝細胞癌の予防・治療法

中面哲也*

Summary

肝細胞癌 (HCC) に特異的に高発現する新規癌胎児性抗原 glypican-3 (GPC3) を標的とするペプチドワクチンを用いた新しい HCC の予防・治療法の開発を目指し、当病院において臨床第 I 相試験をスタートした。途中経過ではあるが、全例において安全性に問題はなく、最小投与量 0.3 mg のペプチドワクチン投与でも 8 例全例において末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加が誘導できることを確認している。臨床効果においても、3 回のワクチン投与 1 ヶ月後に CT での RECIST 基準での評価をおこなった 6 例のうち 3 例は評価病変の大きさが 2 ヶ月間変化なく SD であり、ある一定の効果が得られているものと考えている。

Key words

肝細胞癌 glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン CTL HLA

はじめに

1991 年に Boon らによりメラノーマ抗原 (melanoma antigen : MAGE) 遺伝子が同定され、ヒトの免疫系が癌を異物として認識し、排除することに科学的な根拠が与えられた。癌化に関連して特異な蛋白が産生されると、これらに由来するペプチドが human leukocyte antigen (HLA) クラス I 分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (キラー T 細胞, cytotoxic T lymphocyte : CTL) がこれらを識別して活性化され、癌細胞を破壊する。現在までにさまざまな癌拒絶抗原およびペプチドが同定され、それらを用いた臨床試験が世界中でおこなわれてい

る。転移性進行癌を対象にしたペプチドワクチンの臨床試験やトランスレーショナル・リサーチにおいて多くの結果は、腫瘍に反応する CTL は癌患者の体内で誘導できるが、癌の拒絶にまでは至らないといったものであった。しかし、腫瘍に反応する CTL が確かに誘導できたという事実は注目に値し、転移性進行癌には無効であっても根治治療後の再発予防、あるいは発癌の予防には効果を発揮する可能性がある。とくに日本人に多い癌種あるいは難治性の癌種の有効な予防法の開発が待たれる。

われわれは、cDNA マイクロアレイによる癌と正常組織における遺伝子発現の網羅的解析データを利用して、肝細胞癌の新規癌胎児性抗原 glypi-

* NAKATSURA Tetsuya / 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

can-3 (GPC3) を同定し、その有用性を報告してきた。それらの基礎研究で得られた成果をもとに、マウス動物実験でのエビデンスにもとづいて臨床試験のプロトコルを作成し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を受け、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。

本稿では、GPC3 を標的とするペプチドワクチンによる新しい肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) の予防・治療法の開発をめざしたわれわれの一連の研究を紹介する。

1 cDNA マイクロアレイ解析データより同定した肝細胞癌特異抗原 GPC3

癌抗原の免疫療法への応用を考える場合には、発現頻度 (汎用性)、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、抗原消失性、自己免疫などの副作用によって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として、癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原であることはもちろんであるが、発現の組織特異性がすぐれた抗原であるということはきわめて重要な要素となる。

すなわち、癌細胞での発現は強いが、正常組織にはほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないものとして、たとえば、胎生期組織および癌細胞のみに発現する癌胎児性抗原や、癌細胞と免疫系から隔離された組織のみに発現する癌精巣抗原 (cancer testis CT 抗原) などが有望である。

われわれは東大医科研・ヒトゲノムセンター(中村祐輔教授)との共同研究により、cDNA マイクロアレイのデータを用いて、HCC における理想的な癌抗原としてふさわしい GPC3 の同定に成功した¹⁾。まず HCC20 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することにより、多くの症例で癌部/非癌部の発現の比が 5

以上のものを選び、次に 29 臓器 (胎生期の 4 臓器を含む) の正常臓器における 23,040 種類の遺伝子の発現プロフィールを解析して、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を選んだ。われわれが同定した GPC3 は、HCC20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上 (平均 14.4) で、胎盤および胎生期の肝臓、腎臓、肺に発現する以外はほとんどの正常臓器に発現を認めなかった (図 1)。すでに、GPC3 が HCC で高発現することが報告されており、さらにわれわれも GPC3 遺伝子および蛋白質はほとんどの肝細胞癌組織ならびに細胞株で高発現するが、正常組織においては胎生期の肝臓あるいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現がみられないことを実際に確認した。

新しい癌胎児性抗原 GPC3 は 580 アミノ酸からなる 65 kDa の膜蛋白で、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycans: HSPGs) ファミリーに属する糖鎖修飾が強い glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) アンカー蛋白質であり、X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患で、巨人症、嚢胞腎、口蓋裂ほかの症状を呈する Simpson-Golabi-Behmel syndrome (SGBS) の患者において遺伝子変異を認める²⁾³⁾。また、GPC3 遺伝子の標的破壊マウスは、SGBS と同様に巨大化し種々の奇形を発現する (図 2)⁴⁾。HCC における機能についてはまだよくわかっていない。GPC3 は膜蛋白で分泌され、既知の α -fetoprotein (AFP) および protein induced by vitamin K absence or antagonist (PIVKA)-II に次ぐ HCC の第三の腫瘍マーカーとしての有用性も示された¹⁾。また、われわれは GPC3 がメラノーマの腫瘍マーカーとしても有用であることも報告している^{5)~7)}。

このように GPC3 の発現は腫瘍組織特異性がすぐれていることから、理想的な腫瘍拒絶抗原になりうるかどうかを検討した。

日本人の約 60% が陽性である HLA-A24 に結合しうる GPC3 由来のペプチドを合成し、これら

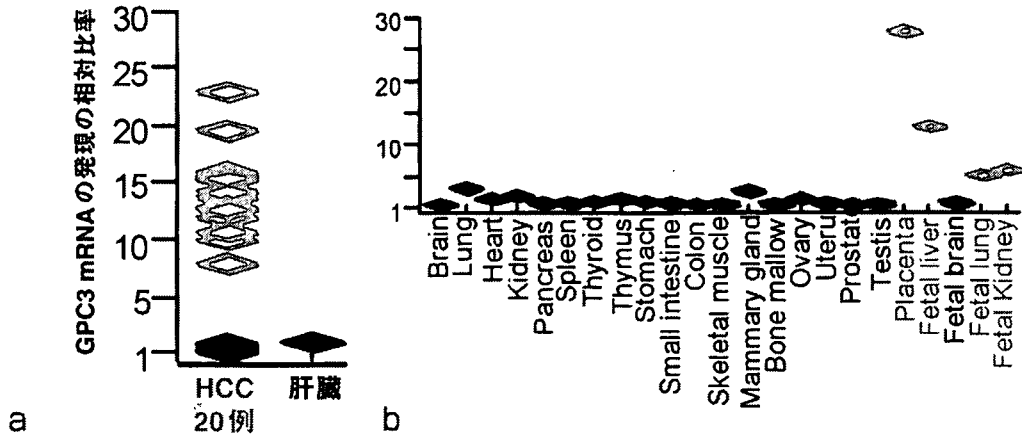


図 1. cDNA マイクロアレイを用いた理想的な癌抗原の探索：GPC3 の発見
東大医科研・ヒトゲノムセンター中村祐輔らの研究成果をもとに解析した。
a は GPC3 が HCC の癌部で非癌部より高発現していることを示し、b は GPC3 が正常組織において胎盤と胎生期の肝臓に高発現するが、成人の正常臓器ではほとんど発現しないことを示す。

(Nakatsura T *et al*, 2003¹⁾より引用)

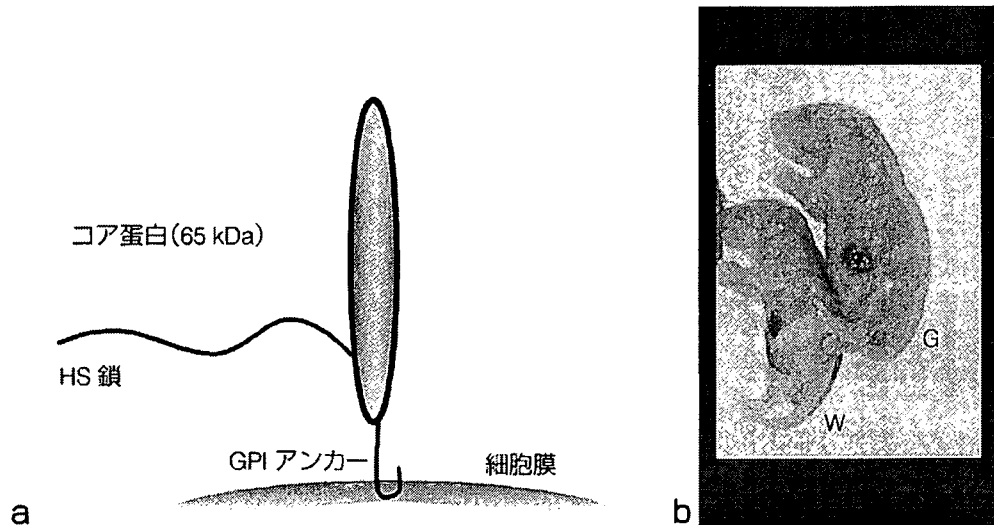


図 2. 癌胎児性抗原 GPC3 に関する既知の情報

a: GPC3 は 580 アミノ酸からなる 65 kDa の膜蛋白で、HSPGs ファミリーに属する GPI アンカー蛋白質であり、分泌もされる。b: GPC3 遺伝子のノックアウトマウス (G) は野生型マウス (W) に比べて巨大化する。ヒトでは X 染色体上の GPC3 遺伝子の変異により、SGBS という巨人症を呈する。

(Cano-Gauci DF *et al*, 1999⁴⁾より引用)

を BALB/c マウスあるいは HLA-A24 transgenic mouse (Tgm) に免疫して解析し、HLA-A24 結合性 CTL エピトープペプチド EYILSLEEL を同定した⁹⁾。このペプチド EYILSLEEL を用いて、ヒトの HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができた⁹⁾。また、日本

人の 40% が陽性である HLA-A2 に結合しうるペプチドを合成し、これらを HLA-A2 Tgm に免疫して解析した。同定した HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド FVGEFFTDV を用いてヒトの HLA-A2 陽性の HCC 患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができた⁹⁾。これらの CTL は GPC3

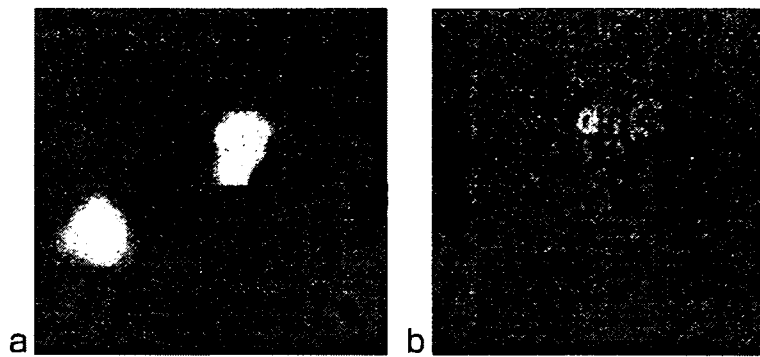


図 3. GPC3 由来ペプチドで誘導した特異的な CTL は、GPC3 を発現する癌細胞を傷害する

a: 緑の蛍光を取り込んでいるのが GPC3 のペプチドを表面に発現している癌細胞。周囲の細胞は CTL。
b: CTL は癌細胞に穴を開けて殺す。4 時間後、多くの CTL の攻撃により、癌細胞は蛍光を放出し死滅している。

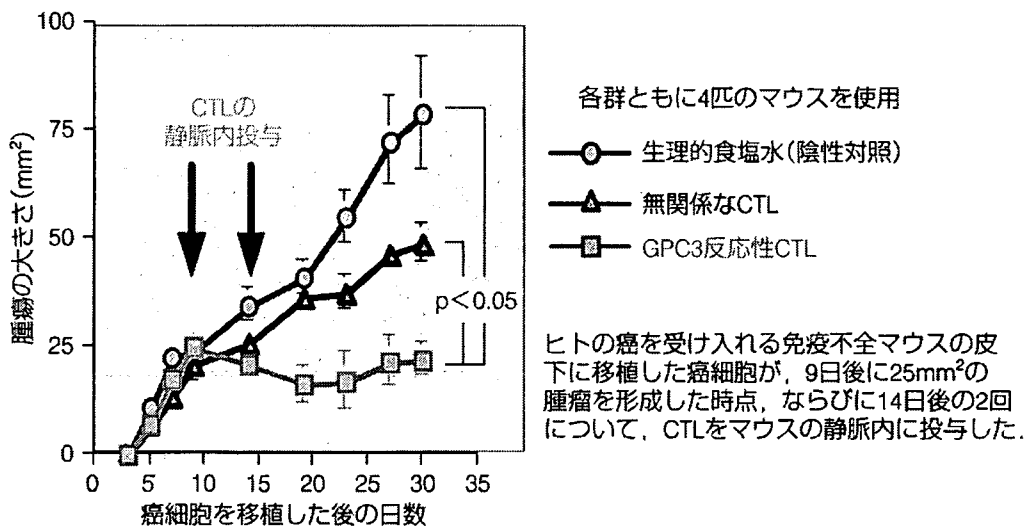


図 4. 免疫不全マウスを用いたヒト肝細胞癌に対するヒト GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法のモデル

免疫不全マウスの皮下に移植した GPC3 陽性ヒト肝癌細胞株の増殖は、肝細胞癌患者より誘導した GPC3 特異的ヒト CTL の静脈内注射により著明に抑制された。

(Komori H *et al.*, 2006⁹⁾より引用)

発現癌細胞を傷害し (図 3), 免疫不全マウスの皮下に移植した GPC3 発現ヒト肝癌細胞株の増殖を抑制した (図 4)。また非常に重要な点であるが、マウスを用いた以上のいずれの実験においても GPC3 抗原の免疫によってペプチド特異的 CTL が誘導され、抗腫瘍効果は認められたが自己免疫現象は誘導されなかった^{8)~10)}

2 ■ 前臨床試験の概要

最善のプロトコル作成のため、臨床試験で用いる 2 種類の GPC3 ペプチドとともに投与する至適アジュバントの検討をおこなった。BALB/c マウスを用いて、ペプチド単独群、不完全フロイントアジュバント (incomplete Freund's adjuvant :

IFA) との併用群, CpG 併用群, α -galactosyl ceramide α -GalCer 併用群, アルミニウム併用群の5群で比較したところ, IFA との併用投与群においてのみ, GPC3 特異的な CTL が誘導された。ペプチド単独では無効で, IFA と混合すると有効になることを証明し, 臨床試験ではペプチドと IFA の混合物を投与することとした。次に, ペプチド投与量によって免疫応答の誘導能に相違がみられるかを検討した。BALB/c マウスに HLA-A24 結合性ペプチドを IFA とともに 0, 5, 10, 20, 50 μ g 投与し比較した。その結果, CTL の誘導能はペプチド投与量に依存し, 50 μ g の投与群で最も多くの CTL が誘導された。次に投与回数について検討した。ペプチド投与量を 1.67, 5, 16.7, 50 μ g の4群に分け, それぞれの投与量において1~4回, 1週間ごとに免疫した。その結果, 2回以上の免疫で投与量が16.7 μ g 以上で, 抗原特異的な免疫応答が観察された。一方で少量の投与量においては, 免疫回数を増やしても同様の免疫反応は観察されなかった。さらに, HLA-A2 に結合するペプチドに関して HLA-A2 Tgm を用いて検討をおこなったところ, 16.7 μ g の少ない量でも特異的 CTL が観察されたが, CTL 誘導能は同様にペプチド投与量に依存することが観察された(投稿中)。

ペプチドワクチンに用いるアジュバントとして, 少なくとも IFA は必須であると考えられた。その他のアジュバントの併用による免疫増強効果に関しては, 今後の検討課題である。また, ペプチドワクチンにおけるペプチド投与量についてのこれまでのコンセンサスとして, 免疫応答の強弱はペプチド量には依存しないと考えられている。しかしながら今回のわれわれがおこなったマウスの実験では, ペプチド投与量に依存して強い免疫を誘導できるとの結果に至った。ただ, 単純に体重換算すると, マウスでの50 μ g はヒトでの100 mg に相当し, その溶液を皮内注射するとなればコストも膨大となるばかりか, 1回に100カ所も

注射しなければならない量であり, 現実的には不可能である。今回の第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用量を増やしていく設定にし, 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。1回10 mg や30 mg の投与がより有効であるのかどうかに関しては今後の検討課題としたい。

3 国立がんセンター倫理審査委員会の承認およびプロトコルの概要

動物を使った毒性試験を第三者機関に委託し, 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て安全性を確認した後に, 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。2007年2月8日, 「進行肝細胞癌患者を対象とした HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3 (GPC3) 由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験」をスタートした。プロトコルの概要を以下に示す。

1) 目的

肝細胞癌には切除術を始めとするさまざまな局所治療法や抗癌剤を用いた動注あるいは全身化学療法がおこなわれているが, これらの治療に抵抗性あるいはその適応のない患者も決して少なくない。このような病状に対する適当な治療法はなく, 症状緩和など支持療法がおこなわれているのが現状である。本研究は, 局所療法または抗癌剤による化学療法が無効あるいはその適応のない, HLA-A24 あるいは-A2 陽性の肝細胞癌患者を対象とした, HLA-A24 あるいは-A2 結合性 GPC3 由来ペプチドワクチンを用いた免疫療法の臨床第I相試験である。本研究は GPC3 由来ペプチドワクチンの安全性を評価するとともに, 本ペプチドワクチンの投与量の違いにより, 末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL が増加するかを評価し, 至適投与量を決定することを目的とする。

2) 対象

局所療法または抗癌剤による化学療法が無効あるいはその適応がないと判断された肝細胞癌患者で、HLA タイピング検査により HLA-A24 あるいは-A2 陽性であることが確認された患者。

3) 治療

HLA のタイプにより、HLA-A24 結合性 GPC3 由来ペプチド (EYILSLEEL) または HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド (FVGEFFTDV) を用いる。2 週間に 1 回、計 3 回投与する。

4) 免疫学的モニタリング

① interferon (IFN)- γ enzyme linked immuno-spot (ELISPOT) 解析と HLA-GPC3 ペプチド複合体ペンタマーを用いて、末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加程度を観察する。

② 遅延型過敏症 (delayed-type hypersensitivity: DTH) 反応を観察する。

5) 主要評価項目

① HLA-A24 結合性 GPC3 由来ペプチド (EYILSLEEL) ワクチンおよび HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド (FVGEFFTDV) ワクチンによる有害事象の種類と発現割合。

② 免疫学的モニタリングによる特異的免疫反応の誘導の観察。

6) 副次評価項目

a. 奏効割合

奏効割合の解析対象集団を対象として 3 回目のワクチン終了 1 ヶ月後に画像診断をおこない、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) に従って 1 回目の判定をし、stable disease (SD), partial response (PR), complete response (CR) の症例に関しては、さらにその 4 週間後以降に同様の検査をおこない、評価する。

b. 腫瘍マーカーの推移

同様に 3 回目のワクチン終了 1 ヶ月後およびその 4 週間後以降に 3 種類の腫瘍マーカー (AFP, PIVKA-II, GPC3) を測定して記録し、ペプチドワクチンの効果を、腫瘍マーカーの値の推移によっても評価する。

4 ■ 臨床第 I 相試験の途中経過

現在、レベル 2 の投与量 1.0 mg の 6 例の登録を終了し、試験継続中である。有害事象は全例において局所の発赤のみで、安全性に問題はなく、最小投与量 0.3 mg の 8 例の結果においては、全例に免疫学的効果、すなわち ELISPOT によるモニタリングにより末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加が認められた。ELISPOT の結果で、GPC3 ペプチド特異的 CTL がワクチン投与前の末梢血中に検出されなかったが、ワクチン投与後の末梢血中には検出された症例のうち、HLA-A24 の症例と HLA-A2 の症例のペンタマーを用いた fluorescence activated cell sorter (FACS) 解析の結果でも GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出され、明らかにワクチンの効果が認められた。3 回のワクチン投与 1 ヶ月後に CT での RECIST 基準での評価をおこなった 6 例のうち 3 例は増悪して progressive disease (PD) であったが、3 例は評価病変の大きさが 2 ヶ月間変化なく SD であった。マウスでの実験結果では投与量が多いほど有効であったが、最小投与量である 0.3 mg でもある一定の効果が得られたといえる。詳細なデータは、レベル 3 の最大投与量 3.0 mg の 6 例が終了した後に報告する。

5 ■ 今後の計画

今年度中に臨床第 I 相試験を終了し、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 相試験の結果にもとづき、次年度以降に臨床第 II 相試験を計画する予定である。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も計画している。

おわりに

癌免疫療法の多くの臨床応用の結果は、われわれに失望を与えたかに見えていたが、さまざまな臨床試験の結果、生体の中で確かに抗腫瘍免疫応答は起きていることが証明されてきており、今回われわれもまだ途中経過ではあるが、最小投与量 0.3 mg のペプチドワクチン投与でも末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加を誘導できることが確認できた。今後は再発予防や発癌予防に対するペプチドワクチンの効果を検証していくとともに、他の治療法と免疫療法との併用により有効な治療法を開発していきたいと考えている。

免疫療法はまだ標準治療にはなっておらず、本当に有効な癌免疫療法を見つけるためには、膨大なスクリーニング、すなわち多数の臨床試験が必要であり、さまざまな癌に対してどのような免疫療法がどのような対象に有効であるのか、多くの施設でさまざまな臨床試験を積み重ねていくことで、着実に結果を出していく必要がある。その中から本当に有効な免疫療法が開発され、標準治療の仲間入りができるよう、われわれはさらに努力を積み重ねなければならない。

文 献

- 1) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S *et al* : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* **306** : 16-25, 2003
- 2) Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A *et al* : Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* **12** : 241-247, 1996
- 3) Neri G, Gurrieri F, Zanni G *et al* : Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet* **79** : 279-283, 1998
- 4) Cano-Gauci DF, Song HH, Yang H *et al* : Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* **146** : 255-264, 1999
- 5) Nakatsura T, Kageshita T, Ito S *et al* : Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* **10** : 6612-6621, 2004
- 6) Nakatsura T, Nishimura Y : Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* **19** : 71-77, 2005
- 7) Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T *et al* : Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* **11** : 8079-8088, 2005
- 8) 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
- 9) Komori H, Nakatsura T, Senju S *et al* : 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
- 10) 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

特集

トランスレーショナルリサーチ

癌免疫療法*

中面哲也**

Key Words : immunotherapy, cancer antigen, peptide, CTL, vaccine

はじめに

1991年にBoonらによりメラノーマ抗原MAGE遺伝子が同定され、ヒトの免疫系が癌を異物として認識し、排除しうることに科学的な根拠が与えられた¹⁾。すなわち、癌化に関連して特異な蛋白が産生されると、これらの分解産物であるたった9ないし10個のアミノ酸からなるペプチドが、HLAクラスI分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8陽性細胞傷害性T細胞(キラーT細胞, cytotoxic T lymphocyte: CTL)がこれらを識別して活性化され、癌細胞を破壊するというメカニズムが存在する。これにより、「癌細胞だけを攻撃する特異的免疫療法」すなわち効率よくしかも副作用のない癌の免疫療法を目指すことが可能になった。体内のすべての細胞の表面のHLAクラスI分子にはペプチドが提示されているが、CTLは、このペプチドの違いによって正常の細胞と癌細胞を見分けて癌細胞を殺すことができる。

現在までに、さまざまな癌拒絶抗原およびペプチドが同定され、それらを用いた臨床試験が世界中で行われている。転移性進行癌を対象にしたペプチドワクチンの臨床試験やトランスレーショナル・リサーチにおいて多くの結果は、腫

瘍に反応するCTLはがん患者の体内で誘導できるが、癌の拒絶にまでは至らないといったものであった。しかし、腫瘍に反応するCTLが確かに誘導できたという事実は注目に値し、転移性進行癌には無効であっても、根治治療後の再発予防、あるいは発癌の予防には効果を発揮する可能性がある。とくに日本人に多い癌種あるいは難治性の癌種の有効な予防法の開発が待たれる。

Rosenbergらによるヒト癌に対する新しい免疫療法の報告

Rosenbergらは、体外で培養したCTLを戻す養子免疫療法Adoptive-Cell-Transfer therapyに、T細胞のHomeostatic Proliferationという考え方を組み合わせた免疫療法について発表した²⁾。Homeostatic Proliferationとは、体内のリンパ球の数は一定に保たれており、その数を減らしてやると、新たに移入されたリンパ球が生き延びて一定数に達するまで増殖するという現象である。あらかじめシクロホスファミドとフルダラビンの前投与により患者のリンパ球数を減らしておいて、そこへ大量に増やしておいた、癌細胞を傷害するCTLを移入すると、CTLが体内で長期にわたって生存し、ついには転移性メラノーマ約50%の例で劇的な腫瘍縮小をもたらし、今までの癌の免疫療法では考えられないほどの抗腫瘍効果が観察された²⁾。一方、この治療で用いられ

* Development of cancer immunotherapy.

** Tetsuya NAKATSURA, M.D.: 国立がんセンター東病院臨床開発センター がん治療開発部先端医療開発室(〒277-8577 柏市柏の葉6-5-1) ; Section for Frontier Medicine, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa 277-8577, JAPAN

たCTLは、MART-1, gp100といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドを用いて誘導したもので、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された²⁾。このことは、癌を拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、そのCTLを誘導するのに使われた抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。すなわちわれわれは、癌特異的に発現する、あるいは重要な正常臓器には発現しない腫瘍拒絶抗原を同定しなければならない。

理想的な腫瘍拒絶抗原が備えているべき性質

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に適用できるかという汎用性、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、抗原消失性および自己免疫などの有害事象誘導の危険性などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として3つが考えられる(表1)。

ヒト腫瘍抗原の同定方法

現在までに同定されているヒト癌抗原を分類すると、①cancer-testis(CT)抗原、②組織特異抗原、③変異ペプチド抗原、④癌遺伝子・癌抑制遺伝子産物、⑤癌胎児性蛋白質、⑥癌細胞で発現が増強している蛋白質などがあげられるが、その同定方法として4つがあげられる(表2)。CT抗原と総称される抗原は、名前が示すとおり種々の癌組織および正常組織では免疫系から隔離されたtestis(精巣、睾丸)、卵巣、胎盤のみに発現する抗原群で、ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原MAGE, SEREX(serological identification of antigens by recombinant expression cloning)で同定されたNY-ESO-1が代表的なCT抗原である。

T細胞により認識される腫瘍拒絶抗原ペプチドの同定方法とHLA多型を考慮した癌の免疫療法

以上のような方法で同定された腫瘍抗原が、

表1 理想的な腫瘍拒絶抗原が備えているべき性質

- | |
|--------------------------|
| 1) 癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原 |
| 2) 発現の組織特異性が優れた抗原 |
| 3) 免疫系からの逃避が起こりにくい抗原 |

癌拒絶抗原と認められるためには、その抗原由来のペプチドで誘導したCTLが、癌細胞上のHLAクラスI分子に結合する同ペプチドを認識して癌細胞を傷害することを証明しなければならない。HLAクラスI分子に結合するペプチドは通常9ないし10個のアミノ酸からなり、HLAの多型性に対応して変化する。それぞれのクラスI分子に結合するペプチドの結合モチーフはほぼわかっており、われわれはインターネット上でサイトにアクセスして抗原のアミノ酸配列を入力するだけで簡単に目的のHLAクラスI分子に結合するペプチドを予測することができる(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)。実際本当に結合するかどうかは、T2細胞やRMA-S細胞を用いたアッセイで確認できる³⁾。

欧米白人ではHLA-A2の頻度が高いこと、メラノーマの患者が多いことなどの理由により、癌拒絶抗原ペプチドとして、現在までにメラノーマ由来のHLA-A2拘束性のものが圧倒的に多く同定されている。日本人でもHLA-A2の抗原頻度は40%と比較的高いが、HLA-A分子の中で日本人にもっとも頻度が高いのは60%を占めるHLA-A24である。どちらももっていない日本人は15%しかいない。したがって、われわれが同定したような、ほとんどの癌患者の癌において高発現している癌抗原に関して、HLA-A24あるいはA2拘束性の癌拒絶抗原ペプチドを同定することにより、多くの日本人癌患者を対象としたペプチドワクチンや樹状細胞(DC)ワクチン、さらには養子免疫療法などの免疫療法が可能になると考えられる。

われわれが同定したがん特異的抗原Glypican-3(GPC3)とHSP105について

1. cDNAマイクロアレイ解析による肝細胞癌・メラノーマの腫瘍マーカーかつ腫瘍拒絶抗原、GPC3の同定

われわれは、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授との共同研究により、cDNAマイ

表2 ヒト腫瘍抗原の同定方法

- 1) 癌化に関連した腫瘍抗原の候補に対するT細胞応答の解析
細胞の癌化に関連した癌遺伝子や癌抑制遺伝子産物の突然変異部分、融合蛋白の境界部分、あるいはウイルス抗原に由来するペプチドを特異的に認識するT細胞の証明
- 2) 癌細胞に特異的に反応するT細胞株(クローン)を利用した、癌細胞由来のcDNA発現ライブラリーのスクリーニング
- 3) 癌患者血清中の抗腫瘍抗原IgGを利用した、癌細胞由来のcDNA発現ライブラリーのスクリーニング(SEREX法)(HSP105ほか)
- 4) cDNAマイクロアレイ解析による、遺伝子発現の組織特異性が抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原候補の同定と、その抗原性の解析(GPC3ほか)

クローアレイを利用した2万種類を超える遺伝子の肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)と正常組織における発現解析データを用いて、上記の理想的な癌抗原としてふさわしいHCC特異的な新規癌胎児性抗原としてGPC3を同定した。血清GPC3は肝細胞癌とメラノーマの腫瘍マーカーとして有用であることを証明した^{4)~6)}。マウスモデルでGPC3が癌拒絶抗原としても有用であることを証明した⁷⁾。メラノーマの腫瘍マーカーSPARCを同定し、GPC3との組み合わせの有用性を示した⁸⁾。マウスGPC3を導入したES細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果も証明した⁹⁾。HLA-A2, A24によりキラーT細胞に提示されるGPC3ペプチドを同定した¹⁰⁾。

2. 膵癌のSEREX法により同定したHSP105

癌細胞由来のcDNAライブラリーを大腸菌に発現させ、その蛋白質を患者の血清中の抗腫瘍抗原IgG抗体でスクリーニングするSEREX法により数多くの癌抗原の候補が同定されている。正常では精巣でのみ高発現し、膵、大腸、食道、乳癌など多様な癌に高発現するHSP105を同定した¹¹⁾。HSP105は癌細胞のアポトーシスの抑制に関わっており、siRNAでHSP105の発現を落とすとさまざまな癌細胞がアポトーシスに陥ることを発見した¹²⁾。マウスモデルでHSP105が腫瘍拒絶抗原としても有用なことを証明した¹³⁾¹⁴⁾。

精巣や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やHSP105を標的とする免疫療法を開発すれば、有害事象のない癌の予防・治療法が可能になってくる。われわれはGPC3とHSP105について、ヒトのHLA-A24あるいは、-A2遺伝子導入マウスを用いてのCTLエピトープペプチドの同定に成功しており、マウスを用いた*in vivo*腫瘍免疫の実験

系において、これらの腫瘍抗原に対する免疫応答が、自己免疫現象を伴うことなく抗腫瘍免疫を誘導できることを証明している。

HSP105は、各種の癌に高頻度に、かつ、ヒトとマウスの腫瘍組織において共通に発現しており、各種癌に対する予防あるいは治療ワクチンの有力な候補であると考えられる。HSP105-DNAや蛋白を用いたワクチンの有効性はすでにマウスモデルを用いて証明しているが、これらはペプチドワクチンと異なり患者のHLAに関係なく使え、CTLのみでなくCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)も誘導できる。

以上の研究成果を利用して、国立がんセンター東病院において医師主導型探索医療としてすでに、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「進行肝細胞癌患者を対象としたHLA-A24および-A2結合性GPC3由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験」をスタートしており、現在、レベル2の投与量1.0mgで試験継続中である。安全性に問題はなく、最小投与量0.3mgの8例の結果においては、全例に免疫学的反応が検出され、3回のワクチン投与を完遂し1か月後にCTでのRECIST基準での評価が終了した6人のうち3人は増悪してprogressive disease(PD)であったが、3人は評価病変の大きさが2か月間変化なくstable disease(SD)であった。今年度中に臨床第I相試験を終了し、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II相臨床試験としては、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も計画している。さらに、HSP105ペプチドおよびDNAワクチンの臨床応用も目指している。

日本で行われているがん免疫療法の トランスレーショナル・リサーチ

1. Wilms腫瘍抗原遺伝子WT1ペプチドワクチン

大阪大学の杉山らは、WT1が白血病やほとんどの固形癌で高発現する汎腫瘍マーカーであり、汎腫瘍抗原であることを報告し、WT1癌抗原ペプチドを用いた癌の免疫療法を今まで200例以上に実施した。分子再発のAMLの3症例では4年以上にわたって本免疫療法を継続しており、完全寛解が持続している。また、再発グリオブラストーマでの病勢コントロール率は56.5%であり、末期癌患者に対しても臨床効果が得られると報告している。

2. 化学療法を併用した腫瘍抗原ペプチド個別免疫療法

関西医大の柳本と久留米大の伊東らは、膵癌13例に対し、塩酸ゲムシタピン併用テーラーメイドペプチドワクチン療法臨床第I相試験を実施し、腫瘍縮小効果あるいは腫瘍マーカー低下症例が85%に認められたと報告した。

3. HER2およびNY-ESO-1癌ワクチン療法

三重大学の珠玖を中心とした多施設共同研究により、短縮形HER2および癌精巢抗原NY-ESO-1蛋白を用いた臨床第I相試験が実施された。特異的免疫反応の誘導・増強がみられ、有効な臨床反応を示した症例も存在した。

4. NKT細胞免疫系を利用した癌免疫療法

NKT細胞は、T, B, NK細胞と異なるリンパ球で、その名のとおりに、NK受容体とともに均一なT細胞抗原受容体を発現している。リガンドである α ガラクトシルセラミドにより活性化し、さまざまな細胞傷害機構を動員して抗腫瘍活性を発揮する。千葉大学の中山らは、 α ガラクトシルセラミド提示樹状細胞投与によりNKT細胞活性化を目指す免疫細胞療法と、活性化NKT細胞を投与する療法の臨床試験を実施しており、現在臨床第I-II相試験へ進行している。

腫瘍抗原特異的Th細胞

より有効な癌治療効果を得るためにはCTLのさらなる増強誘導が必要でありそのためにはThが

大事な役割を担う。Thには細胞性免疫に重要なTh1細胞と体液性免疫の制御に重要なTh2細胞の2種類があるが、一般的に癌に対する免疫を高めるためにはTh1細胞が重要であることが証明されている。北大の西村らは、癌抗原を発現した日本人の70%に適用可能なMAGE-A4特異的Th1細胞治療や、すべての癌患者に応用可能なOK-432特異的Th1細胞治療の臨床研究を計画している。

免疫療法の効果を増強するための さまざまな工夫

獲得免疫の効率よい誘導に自然免疫系の活性化が重要である。従来知られていたアジュバント効果の多くは、自然免疫系の活性化で説明できる。マクロファージ、DC, NKおよびNKT細胞を有効に活性化できるアジュバントの開発が望まれるが、それにはToll様受容体(Toll-like receptor: TLR)を活性化できるTLRリガンドが重要である。たとえば、リポ多糖(LPS)はTLR4を活性化し、非メチル化CpGを含むDNA(CpG DNA)はTLR9を活性化する。

癌免疫療法が乗り越えなくては ならない壁；癌の免疫逃避

癌は長期間かけて免疫防御機構をすり抜けて増殖しており、さまざまな免疫逃避(エスケープ)機構をもっていることがわかってきている。

癌細胞は突然変異を起こすことにより免疫系から逃避する。癌細胞がクラスI分子を発現しなくなると、CTLによる攻撃からエスケープできるので優勢を占めるようになる。実際、癌細胞のすべてのクラスIあるいは特定の対立遺伝子の喪失が少なからず発生している。一般的に、クラスIが喪失している細胞にはNK細胞やNKT細胞が傷害活性を示すことが知られているが、今後はCTL, Th細胞にNKおよびNKT細胞もからめた免疫療法を考えていく必要があると考えられる。その他、癌細胞あるいは免疫担当細胞による免疫抑制因子(TGF- β やIL-10など)の産生も主な免疫逃避のメカニズムとして報告されてきた。

最近、CD4陽性CD25陽性制御性T細胞(Treg)が抗腫瘍免疫応答を自己免疫同様にコントロー

ルしていることが明らかになり、癌免疫療法においてもTregの抑制作用を解除することが重要であると認識されつつあり、重要な課題になっている。さらには、CD11c陽性Gr-1陽性未熟ミエロイド細胞およびそれら由来のサブプレッサーマクロファージなどによる免疫抑制が注目を浴びている。

おわりに

癌免疫療法の多くの臨床応用の結果は、われわれに失望を与えたかに見えていたが、実は、生体の中で確かに抗腫瘍免疫応答は起きており、工夫すれば十分癌の治療法として有効である可能性は示された。さまざまな癌に対してどのような免疫療法がどういう対象に有効なのか、われわれは多くの施設でさまざまな臨床試験を実施することで、着実に結果を出していかねばならない。免疫療法はまだ標準治療にはなっておらず、本当に有効な癌免疫療法を見つけるためには、膨大なスクリーニング、すなわち多数の臨床試験が必要であると考え、その中から本当に有効な免疫療法が開発され、標準治療の仲間入りができるよう、われわれはさらに努力を積み重ねなければならない。

文 献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991 ; 254 : 1643.
- 2) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002 ; 298 : 850.
- 3) 中面哲也, 西村泰治. 腫瘍抗原ペプチドを駆使した癌免疫療法の新展開. 免疫研究のフロンティア. 実験医学 2004 ; 22(5) (増刊) : 215.
- 4) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Comm* 2003 ; 306 : 16.
- 5) Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10 : 6612.
- 6) Nakatsura T, Nishimura Y. Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma (review). *Bio Drugs* 2005 ; 19 : 71.
- 7) 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* 2004 ; 10 : 8630.
- 8) Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, et al. Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum SPARC and Glypican-3 levels. *Clin Cancer Res* 2005 ; 11 : 8079.
- 9) 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* 2006 ; 66 : 2414.
- 10) Komori H, Nakatsura T, Senju S, et al. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 2689.
- 11) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, et al. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Comm* 2001 ; 281 : 936.
- 12) Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, et al. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci* 2006 ; 97 : 623.
- 13) Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, et al. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Comm* 2006 ; 343 : 269.
- 14) Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, et al. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Cancer Sci* 2005 ; 96 : 695.

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пит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, 健康人, 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。

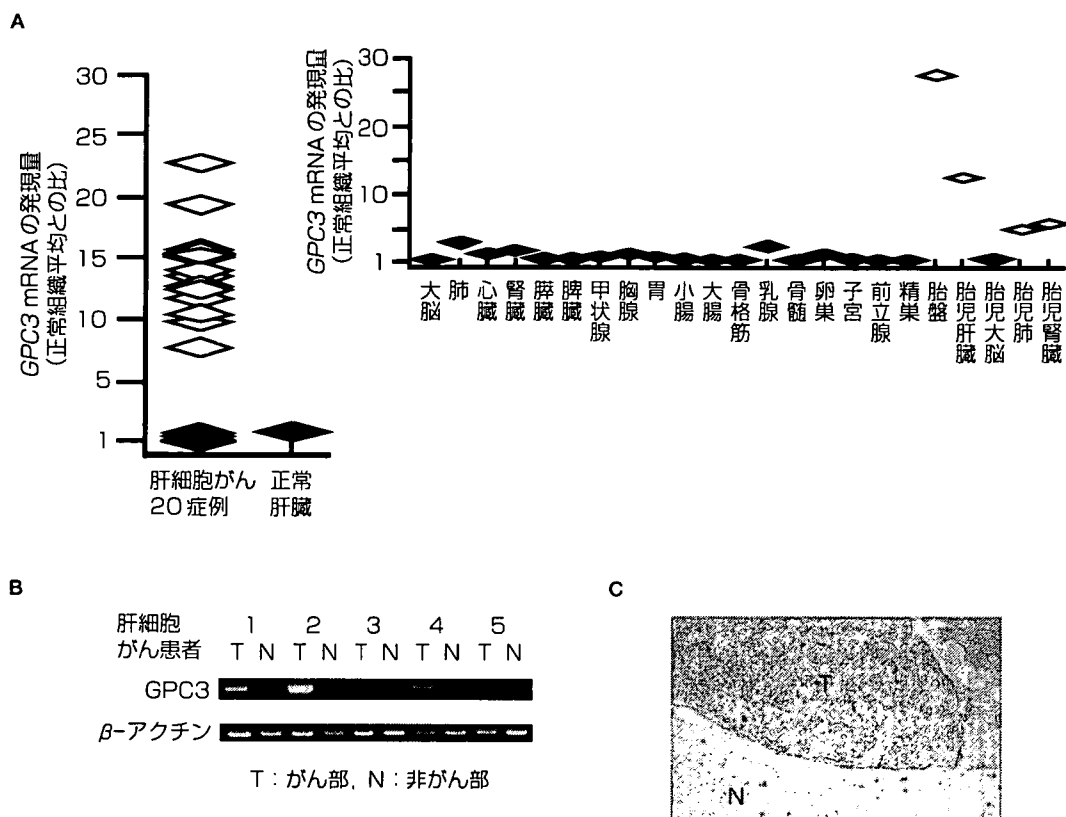
③ 抗腫瘍免疫療法のターゲットとしての GPC3 の有用性

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。このペプチドを骨髄由来樹状細胞 (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⁶⁾と HCC 組織における GPC3 mRNA および蛋白質の発現 (Nakatsura T *et al.*, 2003⁷⁾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ィールを解析した。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: GPC3₁₄₄₋₁₅₂ 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.*, 2006⁹⁾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	+	+	-

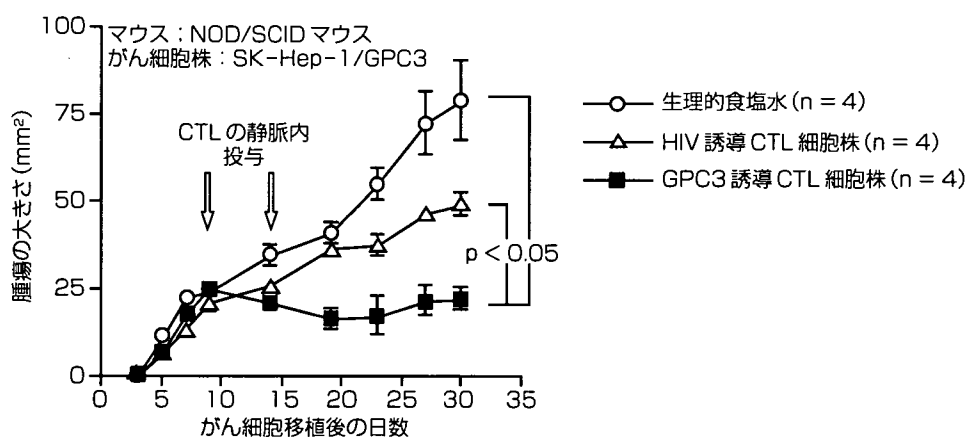
患者	年齢	性別	がんの進行度 ^{*1}	GPC3の発現 ^{*2}	HLAの発現 ^{*3}	CTLの誘導 ^{*4}
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
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.*, 2006⁹⁾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ー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す

ることを期待したい。



- 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