

20083/020A

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

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と  
発症予防ワクチンの開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

I. 研究班構成員名簿	1
II. 平成20年度総括研究報告	
癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発	3
研究代表者 国立がんセンター東病院 臨床開発センター 機能再生室 中面 哲也	
III. 分担研究報告	
1. 進行肝細胞癌患者に対するGlypican-3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 臨床開発センター 機能再生室 中面 哲也 国立がんセンター東病院 上腹部外科 木下 平 杏林大学医学部 腫瘍内科 古瀬 純司 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 池田 公史	
2. Glypican-3の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである	15
国立がんセンター東病院 臨床開発センター 機能再生室 中面 哲也 国立がんセンター東病院 上腹部外科 木下 平	
3. 肝細胞がんの超早期診断法の開発	17
国立がんセンター東病院 臨床開発センター 機能再生室 中面 哲也	
4. ES細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの開発に関する研究	19
熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野 千住 覚	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
V. 研究成果の刊行物・別刷	27

## I. 研究班構成員名簿

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と  
発症予防ワクチンの開発に関する研究班

	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 機能再生室	室長
研究分担者	木下 平	国立がんセンター東病院 上腹部外科	部長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科	教授
	池田 公史	国立がんセンター東病院 肝胆膵内科	医長
	千住 覚	熊本大学大学院医学薬学研究部 免疫識別学分野	准教授
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 20 年度総括研究報告

## 癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発

研究代表者 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

肝炎研究7ヵ年戦略にあるように、肝がんの再発率は極めて高く、肝がん再発防止策の確立が急務である。また肝がんの治療成績向上のためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法あるいは予防法の開発も必要である。本研究では、臨床第I相試験で進行肝細胞がんに対しても有効である可能性を示したGlypican-3(GPC3)ペプチドを用いて、ワクチンや免疫細胞療法などの新規治療法、再発予防法、予防法の開発を目指すと共に、肝細胞がんの超早期診断法を開発する。

肝細胞がんの超早期診断法の開発においては、大規模な検証を要するフェーズに入ったと認識し、H21年度からは多くの肝硬変患者をもつ5施設を新たに加え、超早期診断法の有効性を検証する大規模な臨床疫学研究を計画している。肝細胞がんのワクチン開発では、臨床第I相試験は当初3mgまでで完了する予定であったが、英文誌に報告したマウスでの研究結果と同様、ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、さらに投与量を増やし、10mg投与3例、30mg投与3例の計6例を追加実施した。そのため第II相試験の実施が遅れたものの、30mgの1例で著明な効果が出現した。また、先端医療開発特区（スーパー特区）に採択され、本GPC3ペプチドワクチンも最優先課題の一つとなり、今後は進行肝細胞がんを対象とするものだけでなく、根治的治療後の再発予防を目的とした第II相試験を実施して一気に有効性を証明したい。ES-DCワクチン及び細胞療法の開発については、 $\beta 2$ ミクログロブリンあるいはTAP1の遺伝子改変を行ったマウスES細胞を用いることにより、任意のMHCハプロタイプのレシピエントに対して細胞ワクチンとして使用可能な樹状細胞を作製できることを明らかにした。さらにマウスのiPS細胞から機能的な樹状細胞とマクロファージを作製できることを確認した。

### 研究分担者

木下 平 国立がんセンター東病院  
上腹部外科 部長  
古瀬 純司 杏林大学医学部 腫瘍内科 教授  
池田 公史 国立がんセンター東病院  
肝胆膵内科 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

### 研究協力者

西村 泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部  
免疫識別学分野 教授

### A. 研究目的

肝炎研究7ヵ年戦略にあるように、肝がんの再発率は極めて高く、肝がん再発防止策の確立が急務である。また肝がんの治療成績向上のためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法あるいは予防法の開発も必要である。本研究では、臨床第I相試験で進行肝細胞がんに対しても有効である可能性を示したGlypican-3(GPC3)ペプチドを用いて、ワクチンや免疫細胞療法などの新規治療法、再発予防法、予防法の開発を目指すと共に、肝細胞がんの超早期診断法を開発する。

### 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

#### 対象と治療

HLA-A24 あるいはA2 陽性の進行肝細胞がん患者に、HLA-A24 結合性またはHLA-A2 結合性GPC3由来ペプチドを、2週間に1回、計3回投与する。

#### 主要評価項目

- ①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

#### 副次評価項目

- ① 奏効割合(RECIST)
- ② 腫瘍マーカーの推移

#### プロトコール改訂

ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は3mgまでの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg投与3例、30mg投与3例の計6例を第I相試験に追加して実施した。

2) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

血清・血漿中GPC3および抗GPC3抗体、 $\beta 2$ ミクログロブリン測定

ELISA 法等を用いて GPC3 および抗 GPC3 抗体の定量的検出と  $\beta 2$  ミクログロブリンの検出を行う。

#### 免疫学的解析

以下の解析により、末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の頻度を調べる。

- ① IFN- $\gamma$  ELISPOT 解析
- ② HLA-GPC3 ペプチド複合体ペンタマーによるフローサイトメトリー (FACS) 解析

#### プロテオーム解析

血清及び血漿に対して、プロテインチップ解析を行う。

### 3) Glypican-3 の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである

2001～2002 年に国立がんセンター東病院にて切除された肝細胞がん (HCC) 症例 (n=107) を対象とした。切除検体のパラフィンブロックより組織を薄切し (全染色枚数 137 枚) GPC3 免疫染色により HCC 癌部での GPC3 発現を検討した。臨床病理学的情報の収集は当院に保管されている診療録を参考とし、GPC3 染色性と予後および臨床病理学的项目の相関を検討した。

### 4) ES 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの開発に関する研究

#### TAP1 遺伝子欠損 ES 細胞の作製

TAP は、細胞質内でプロテアソームによる分解により産生されたペプチドを MHC クラス I 分子へ負荷させるべく小胞体内へ輸送するペプチドトランスポーターである。TAP 遺伝子を標的破壊した細胞では、抗原ペプチドの供給が断たれるため、細胞表面への MHC クラス I 分子の発現が消失する。このような細胞に細胞外からクラス I 分子と結合親和性を有する合成ペプチドを加えることにより、加えたペプチドと当該クラス I 分子のみを発現する細胞を作成することができると考えられる。

群馬大学の根岸泉博士より、TAP1 遺伝子の標的破壊ベクターの供与を受け、E14ES 細胞 (H-2b アリル) において TAP1 遺伝子の標的破壊を行った。さらに、TAP1 欠損 ES 細胞に H-2d ハプロタイプの MHC クラス I 分子 (H-2Kd) の遺伝子を導入した。この ES 細胞に由来する ES-DC による、BALB/c マウス (H-2d ハプロタイプ) 体内における抗原特異的 T 細胞活性化および抗腫瘍免疫誘導効果を検討した。

#### $\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) 遺伝子欠損 ES 細胞の作製

$\beta 2m$  は、クラス I 分子重鎖と会合する分子であり、この遺伝子を破壊すると全ての MHC クラス I の細胞表面への発現が消失する。米国ハーバード大学の R. Jaenish 博士より、 $\beta 2m$  遺伝子が標的破壊されたマウス ES 細胞 (H-2b アリル) の供与を受けた。この細胞から、高濃度 G418 選択法によりホモ接合のノックアウト ( $\beta 2m^{-/-}$ ) ES 細胞を作製し

た。さらに、この細胞に、 $\beta 2m$  を共有結合させた H-2d ハプロタイプの MHC クラス I 分子 (H-2Kd) の遺伝子を導入した。そして、TAP1 欠損 ES-DC の場合と同様に、BALB/c マウス体内における抗原特異的 T 細胞活性化および抗腫瘍免疫誘導効果を検討した。

#### マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製

京都大学の山中教授よりマウス iPS 細胞の供与を受け、我々がこれまでにマウス ES 細胞を用いて確立してきた分化誘導培養法により、マウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製を試みた。

#### [倫理面への配慮]

1) の臨床試験を実施するにあたって、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得ている (平成 18 年 11 月 30 日、および変更については平成 20 年 6 月 20 日の国立がんセンター倫理審査委員会で承認済み)。2) の臨床検体を用いた研究の実施においては、国立がんセンター倫理審査委員会および、一部は東京労災病院の倫理委員会に申請し承認を得た後に実施した。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、患者に対しては説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認している。また、患者のプライバシー保護に最大の努力を払っている。4) の研究については、本年度はマウス由来の細胞およびマウス個体を用いるものであった。マウス個体を用いる研究に関しては熊本大学の動物実験委員会により承認された実験計画に基づいて実施した。

## C. 研究結果

### 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

- ・ 1 回 0.3mg 投与から 30mg 投与まで 26 例全例に痒みや痛みを伴わない投与局所の発赤や硬結を認めた以外、2 例に一過性の異所性の発疹、3 例に一過性の 38 度までの発熱を認めたが、計 26 例の安全性に問題はなかった。
- ・ ほぼ全例に末梢血中ペプチド特異的キラー T 細胞 (CTL) の頻度の増加が検出された。英文誌に報告した我々のマウスでの研究結果と同様、その頻度には投与量依存性が示唆された。実際、ワクチン後のがん組織内に、ワクチンによって CD8 陽性キラー T 細胞が多数浸潤していることが、複数の症例で証明できた。
- ・ 約 60% の症例において初回ワクチン投与後 2 ヶ月の間に腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認めた。その頻度にも投与量依存性が示唆された。
- ・ 3.0mg 投与の 6 例には腫瘍マーカーの減少だけでなく、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床

効果も認められた。ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は3mgまでの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg投与3例、30mg投与3例の計6例を第I相試験に追加して実施した。

- ・ 初回ワクチン投与2ヶ月後のRECIST基準での評価では約60%の症例が安定 (stable disease ; SD) であった。
- ・ 30mg、3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現した。

## 2) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

- ・ HLA-A24 あるいは A2 陽性の慢性肝炎・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- $\gamma$  を産生する CTL の存在が認められた。
- ・ その GPC3 ペプチド特異的 CTL 陽性患者血漿中に、SELDI/TOF-MS を用いたプロテオーム解析により、CTL 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見つけた。この蛋白は  $\beta 2$  ミクログロブリンと考えられ、現在検証を進めている。
- ・ 我々はこれまでに血清中の GPC3 が肝細胞がんの腫瘍マーカーになることを報告してきたが、その感度は 40-50% である。現在作成中の GPC3 に対する新規抗体を用いて血清 GPC3 の高感度検出法を確立し、既存の腫瘍マーカー、AFP・PIVKA-II と比較する。
- ・ 血清中の GPC3 に対する IgG 抗体価の測定も肝細胞がんの診断に有用であることを見出しつつある。

## 3) Glypican-3 の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである

全症例の平均観察期間は  $3.4 \pm 2.0$  年であった。HCC における GPC3 免疫染色陽性率は、87 例 (81.3%) であった。術後 5 年生存率は、GPC3 染色陽性群 54.5% に対し陰性群 87.7% であり、有意に陽性群は予後不良であった ( $p=0.03$ )。さらに多変量解析においても、腫瘍個数と肝内転移の有無とともに有意であった ( $p=0.04$ )。さらに HCC における GPC3 発現の意義を探るため、GPC3 発現 HCC 組織と発現陰性の組織を用いて網羅的な遺伝子の発現解析を cDNA マイクロアレイにて行い、複数の遺伝子発現の差を認めた。

## 4) ES 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチンの開発に関する研究

$\beta 2$ -ミクログロブリン ( $\beta 2m$ ) 遺伝子あるいは TAP1 遺伝子を欠損 ES 細胞から作製した ES-DC は、MHC クラス I 分子の発現を完全に欠損していた。このような ES-DC は、H-2b ハプロタイプを認識するプロ反応性細胞傷害性 T 細胞から認識されなくなった。

$\beta 2m$  を欠損させ、さらに  $\beta 2m$ -Kd を導入した ES-DC では、H-2Kd のみが発現していた。また、TAP

を欠損させ、さらに、Kd を導入した ES-DC に、上述の RSV 由来のペプチドを負荷することにより、Kd のみを細胞表面へ発現させることができた。これらの遺伝子改変 ES-DC に Kd に結合性を有する Respiratory Syncytial Virus (RSV) 由来のペプチドを負荷し、BALB/c マウスに投与することにより、H-2Kd で RSV 特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導することができた。さらに、抗腫瘍免疫応答の誘導も可能であった。

マウス iPS 細胞 (Nanog-selected iPS cells) から、機能的な樹状細胞 (iPS-DC) を作製することができた。iPS 細胞へモデル抗原 (OVA) 遺伝子を導入し、これより OVA 発現 iPS-DC を作製した。OVA 発現 iPS-DC をマウス個体へ投与し、OVA 特異的な免疫応答および腫瘍拒絶効果を誘導することができた。

## D. 考察

- 1) 30mg、3 回投与の 1 例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現したが、投与局所の反応が 3.0mg 投与よりも強いことや、著明な効果が見られたのは 1 例だけということもあり、効果・安全性評価委員会では進行肝細胞がんに対する次相の推奨投与量を決定できず、さらに 10mg、30mg 投与を 3 ないし 6 例ずつ追加して最終決定する方針にした。根治的治療後の再発予防効果を検証する臨床第 II 相試験の推奨投与量は 3.0mg に決定した。
- 2) これまでの研究成果により、肝細胞がんの超早期診断につながる可能性のあるいくつかの方法を得た。今後は、慢性肝炎・肝硬変の患者の多い東京慈恵会医科大学附属柏病院、東京労災病院、国立国際医療センター国府台病院、大垣市民病院、NTT 西日本九州病院との共同研究により、慢性肝炎・肝硬変の経過観察中に肝細胞がんを発症した症例 15 例を目指して症例を集積し、肝細胞がん発症率が 5 例集積するごとに解析を行う。
- 3) GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になりうる可能性がある。GPC3 ペプチドワクチン療法を切除癌部の GPC3 発現陽性症例をハイリスク群とし、治療後再発予防を目的に用いることの有用性を秘めており、GPC3 を標的とした新規抗がん治療の開発にも貢献しうる。
- 4) 遺伝的改変により樹状細胞上に発現する MHC クラス I 分子を置換することにより、レシピエントに適合する樹状細胞ワクチンとして使用し、腫瘍拒絶を誘導できることが判明した。また、マウス iPS 細胞から樹状細胞を作製することも可能であり、ES 細胞を用いて開発してきた技術は、iPS 細胞へも応用可能と予想される。以上の成果は、



ES 細胞あるいは iPS 細胞から作製した人工樹状細胞による抗腫瘍ワクチン技術の実用化への有意義な技術的進歩であると考えられる。

## E. 結論

- 1) 進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験により、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を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。今後の臨床第 II 相試験において、進行肝細胞がんへの効果だけでなく、根治的治療後の再発予防効果に期待する。
- 2) 一部の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- $\gamma$  を産生する CTL の存在や、GPC3 蛋白、抗 GPC3-IgG 抗体、さらには  $\beta 2$  ミクログロブリンの検出を認めており、今後はこれらが超早期診断に有用であるかを多施設による多検体の臨床研究で検討していく。
- 3) GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になりうる可能性が示唆された。
- 4)  $\beta 2$  ミクログロブリンあるいは TAP1 の遺伝子改変を行ったマウス ES 細胞を用いることにより、任意の MHC ハプロタイプのレシピエントに対して細胞ワクチンとして使用可能な樹状細胞を作製できることを明らかにした。さらに、マウスの iPS 細胞から機能的な樹状細胞とマクロファージを作製できることを確認した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2009; 34:649-656.
- 2) Ikuta Y\*, Hayashida Y\*, Hirata S, Irie A, Senju S, Kubo T, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H, Nishimura Y. (\*These two authors contributed equally.) Identification of the H2-K<sup>d</sup>-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci.* 2009; 100(1):132-137.

- 3) 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 induce Specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 2008; 32:985-990.
- 4) Muchemwa F.C, Nakatsura T, Fukushima S, Nishimura Y, Kageshita T, Ihn H. Differential Expression of Heat Shock Protein 105 in melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* 2008; 18(3): 166-171.
- 5) Harao M, Hirata S, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Komori H, Ikuta Y, Yokomine K, Imai K, Inoue M, Harada K, Mori T, Tsunoda T, Nakatsuru S, Daigo Y, Nomori H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer.* 2008; 123(11):2616-25.
- 6) Nakagohri T, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N. Surgical outcome of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008; 15(3):318-321.
- 7) 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.* 2008; 99:159-165.
- 8) Thomas MB, O'Beirne JP, Furuse J, Chan AT, Abou-Alfa G, Johnson P. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy and Immunotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15:1008-1014.
- 9) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67:8-15.
- 10) Ishii H, Furuse J, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M. Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma Patients Who Meet the Milan Criteria. *Hepato-Gastroenterology* 2008; 55:621-626.
- 11) Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Sugiyama E, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Ikeda M, Morizane C, Yamamoto N, Yoshida T, Kamatani N, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Twenty novel genetic variations and haplotype structures of the DCK gene encoding human deoxycytidine kinase (dCK). *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23:379-384.

- 12) Sato Y, Laird NM, Nagashima K, Kato R, Hamano T, Yafune A, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kim SR, Furuse J, Ishii H, Ueno H, Okusaka T, Saijo N, Sawada JI, Yoshida T. A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies. *Pharmacogenomics J*. 2008 Dec 23. [Epub ahead of print].
- 13) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Kojima Y, Iwasa S, Hagihara A. Predictive Factors of Outcome and Tumor Response to Systemic Chemotherapy in Patients with Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2008; 38: 675-82.
- 14) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Nishimura Y. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. in press.
- 15) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with  $\alpha$ -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J. Immunotherapy*. in press.
- 16) Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tsunoda T, Nakatsuru S, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of a novel tumor-associated antigen, Cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric and colorectal cancers. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14:6487-6495.
- 17) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata H, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y, Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by  $\beta$ 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J. Immunol*. 2008; 181:6635-6643.
- 18) 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*. 2008; 38:518-527.
- 19) 中面哲也, 肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第I相試験 リンパ学, 2008;31(2):66-70.
- 20) 中郡聡夫, 木下平, 小西大, 高橋進一郎, 後藤田直人, 盛川浩志, 河合隆史, 【最新の肝胆膵の3Dイメージ】肝門部胆管癌および肝内胆管癌のインタラクティブな胆管・門脈・肝動脈3DCG画像 胆と膵, 2008;臨増特大(29):1207-1212.
- 21) 高橋遍, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 高橋進一郎, 後藤田直人, 【再発癌への挑戦 肺・肝転移, 手術でどこまで制御できるか】胃癌肝転移再発に対する外科的切除の検討 癌の臨床, 2008;54(10):847-851.
- 22) 高橋遍, 後藤田直人, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 高橋進一郎, 化学療法が奏効し切除可能となった大腸癌肝転移の1例 *Liver Cancer*, 2008;14(2):237-243.
- 23) 古瀬純司, 仲地耕平, 鈴木英一郎, 清水怜, 光永修一, 特集 肝細胞癌の治療戦略, トピックス 分子標的治療 消化器外科, 2008;31:1017-1023.
- 24) 古瀬純司, 特集 肝内胆管癌-2008, up-to-date-化学療法による治療成績 肝胆膵, 2008;57:135-142.
- 25) 古瀬純司, 特集 国際共同臨床試験, 国際共同臨床試験の現状と課題, 肝・胆道・膵がん 腫瘍内科, 2008;2:197-204.
- 26) 古瀬純司, がん薬物療法学 - 基礎・臨床研究のアップデート- IV. 作用機序からみた抗悪性腫瘍薬の分類, 殺細胞性抗悪性腫瘍薬, 代謝拮抗薬(フッ化ピリミジン・非フッ化ピリミジン) 日本臨床, 2009;67:224-230.
- 27) 古瀬純司, Sorafenibの分子作用機構と肝癌治療 癌の基礎から臨床へ ベンチからベッドサイドへ, 牛島俊和, 後藤典子, 西尾和人編, 篠原出版新社(東京), 2008;p. 111-117.
- 28) 古瀬純司, 肝細胞癌/胆道癌/膵癌 肝・胆道・膵癌化学療法の最近の動向 エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック2009, 有吉寛監修, メディカルレビュー社(大阪市), 2008; p. 239-247.
- 29) 古瀬純司, 肝がん治療の方向性 ~今後の治療法~ 分子標的治療(ソラフェニブ) インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝がん, 沖田極, 幕内雅俊編, 医薬ジャーナル社(大阪市), 2009;p. 72-75.

## 2. 学会発表

- 1) Phase I Clinical study of glypican-3 peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Nakatsuru T. 2008 AACR Annual Meeting (San Diego), April 12-16, 2008
- 2) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine

- for Hepatocellular Carcinoma. Nakatsura T, BIT's World Cancer Congress 2008 (Shanghai), June 12-15, 2008
- 3) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Nakatsura T, Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. Symposium "Translational Research of Cancer Therapy and Diagnosis" 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (ISOBM 2008) (Tokyo), October 5-9, 2008
  - 4) Glypican-3 peptide vaccine in patients with hepatocellular carcinoma. Nakatsura T, Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine (Hersonissos, Crete, Greece), October 9-11, 2008. The awards of the best presentations.
  - 5) The effect of Glypican-3 peptide vaccine for patients with advanced Hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study (進行肝細胞がん患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第I相試験での安全性と有効性) 中面哲也, 吉川聡明, 黒沼俊光, 白川博文, 林恵美子, 西村美子, 土原昌巳, 本村裕, 古瀬純司, 小森宏之, 千住覚, 西村泰治, 木下平 English workshop 第67回日本癌学会 (名古屋), 2008年10月28~30日
  - 6) 肝細胞癌リンパ節転移に対する外科的切除について 小林信, 高橋進一郎, 後藤田直人, 小西大, 中郡聡夫, 木下平 第108回日本外科学会定期学術集会 (長崎), 2008年5月15日
  - 7) Liver hanging maneuverを用いた肝鎌状間膜温存肝右葉切除 後藤田直人, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 高橋進一郎 第108回日本外科学会定期学術集会 (長崎), 2008年5月16日
  - 8) 大腸癌肝転移に対する焼灼術施行例の検討 北田浩二, 高橋進一郎, 後藤田直人, 中郡聡夫, 小西大, 木下平 第63回日本消化器外科学会総会 (札幌), 2008年7月16日
  - 9) 肝転移巣摘除のタイミング 再発形式からみた大腸癌肝転移切除, 補助化学療法のタイミング 高橋進一郎, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 後藤田直人, 齋藤典男, 杉藤正典, 大津敦, 土井俊彦 第63回日本消化器外科学会総会 (札幌), 2008年7月17日
  - 10) 肝内胆管原発腺扁平上皮癌の1切除例 高橋遍, 高橋進一郎, 木下平, 小平大, 中郡聡夫, 後藤田直人 第63回日本消化器外科学会総会 (札幌), 2008年7月18日
  - 11) Phase I/II study of the efficacy and safety of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Kudo M, Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, Ueshima K, Nakachi K, Ikeda M, Yamashita T. The 2nd International Liver Cancer Association (Chicago), September 6-7, 2008
  - 12) A phase II trial of hepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis. Okusaka T, Ikeda M, Furuse J, Nakachi K, Morizane C, Ueno H, Yamaura H, Inaba Y, Satake M, Arai Y. The 33rd ESMO (European Society for Medical Oncology) Congress (Stockholm), September 12-16, 2008
  - 13) 肝内胆管癌全身化学療法例における予後因子の特徴と、それに基づく適応 鈴木英一郎, 古瀬純司, 仲地耕平, 光永修一, 清水怜 第44回日本肝癌研究会 ワークショップ (大阪), 2008年5月22日
  - 14) 5大がん オンコロジストからの提言: シームレスな医療のために 肝細胞癌の臨床的特徴 古瀬純司, 仲地耕平 第13回日本緩和医療学術大会 ワークショップ (静岡), 2008年7月5日
  - 15) 肝細胞癌における分子標的薬の位置づけと副作用マネジメント 肝細胞癌に対する治療の現状と今後の動向一期待される分子標的治療の実際— 古瀬純司 第23回日本がん看護学会学術集会 教育セミナー (宜野湾) 2009年2月8日
  - 16) Genetic modifications of ES cell-derived DC to modify cell surface MHC class. Senju S. 第10回国際樹状細胞シンポジウム (神戸), 2008年10月1~5日
  - 17) 免疫細胞療法への応用を目指したマウスiPS細胞からの樹状細胞の作製技術の確立 千住覚 第17回日本組織適合性学会大会 (大阪), 2008年9月19~21日
  - 18) Activation of antigen-specific CTL by  $\beta$  2-microglobulin or TAP1 gene-disrupted and recipient-matched MHC class I gene-introduced allogeneic ES cell-derived dendritic cells. 千住覚 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都), 2008年12月1~3日
  - 19) マウスiPS細胞からの樹状細胞の作製 千住覚 第38回日本免疫学会総会・学術集会 (京都), 2008年12月1~3日

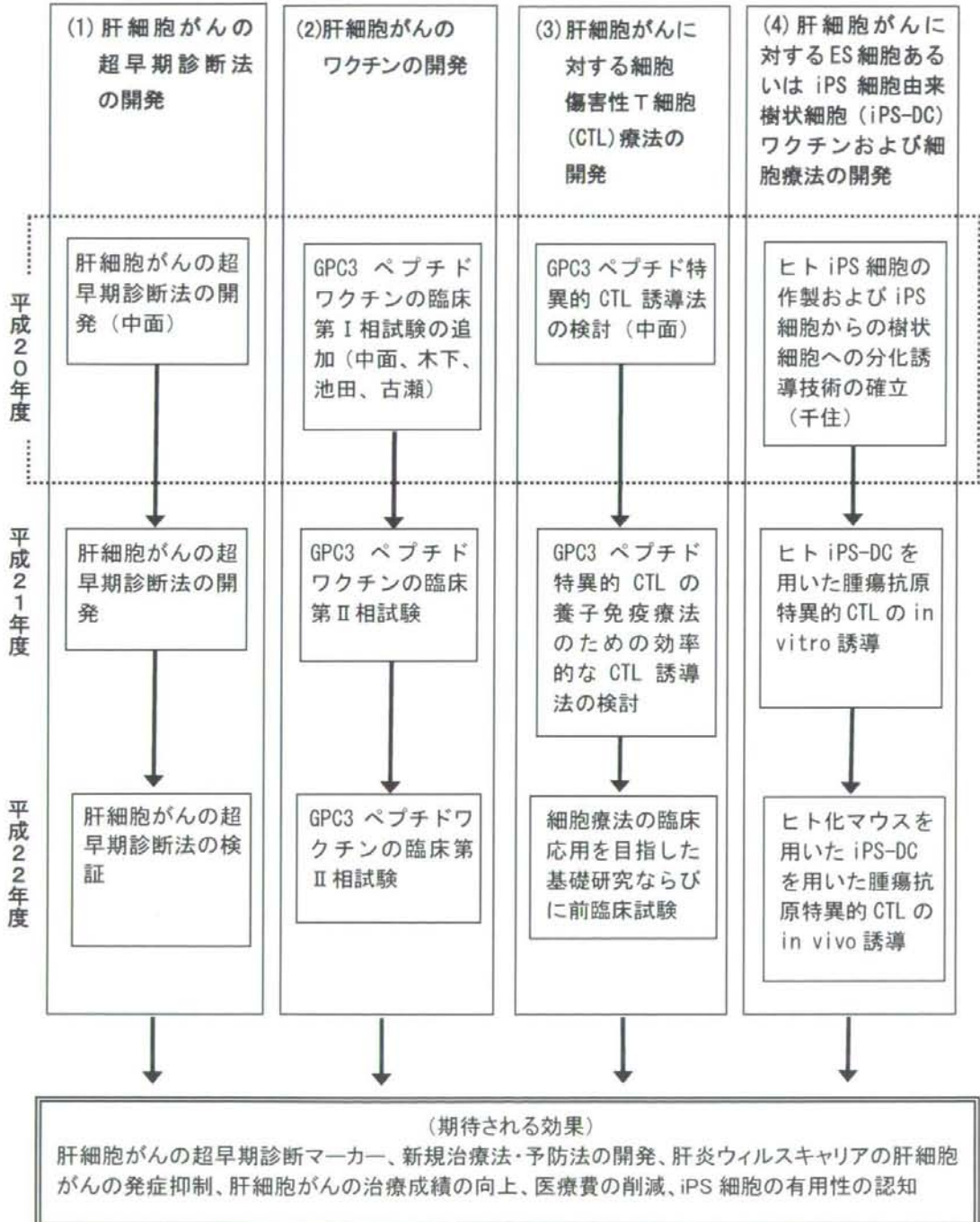
- 20) Establishment of hu-SCID mouse system to analyze priming in vivo of antigen-specific human CTLs by DC. 千住 覚 第38回日本免疫学会総会・学術集会（京都）、2008年12月1～3日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

研究成果の概要図

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発



### Ⅲ. 分担研究報告

## 進行肝細胞癌患者に対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験

研究代表者 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  
研究分担者 木下 平 国立がんセンター東病院 上腹部外科 部長  
研究分担者 古瀬 純司 杏林大学医学部 腫瘍内科 教授  
研究分担者 池田 公史 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 医長

### 研究要旨

本研究は、Glypican-3(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る、末梢血中の GPC3 ペプチド特異的キラーT 細胞 (CTL) の増加と臨床効果を評価し、至適投与量を決定することを目的としている。ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は 3mg 投与までの予定であったが、プロトコルを改訂し、さらに投与量を増やして 10mg 投与 3 例、30mg 投与 3 例の計 6 例を追加して実施した。30mg、3 回投与の 1 例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現したが、投与局所の反応が 3.0mg 投与よりも強いことや、著明な効果が見られたのは 1 例だけということもあり、効果・安全性評価委員会では進行肝細胞がんに対する次相の推奨投与量を決定できず、さらに 10mg、30mg 投与を 3 ないし 6 例ずつ追加して最終決定する方針にした。根治的治療後の再発予防効果を検証する臨床第 II 相試験の推奨投与量は 3.0mg に決定し、来年度の実施を目指す。

### A. 研究目的

Glypican-3(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る、末梢血中の GPC3 ペプチド特異的キラーT 細胞 (CTL) の増加と臨床効果を評価し、至適投与量を決定することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 対象と治療

局所療法または抗がん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がん患者で、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。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。

#### 主要評価項目

- ①HLA-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

#### 副次評価項目

- ①奏効割合 (RECIST)
- ②腫瘍マーカーの推移

#### [倫理面への配慮]

本臨床試験の実施にあたっては、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得ている（平成 18 年 11 月 30 日、および変更については平成 20 年 6 月 20 日承認済み）。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い臨床研究を実施する。患者に対しては説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認する。また、患者のプライバシー保護に最大の努力を払う。

### C. 研究結果

- 1) 1 回 0.3mg 投与から 30mg 投与まで 26 例全例に痒みや痛みを伴わない投与局所の発赤や硬結を認めた以外、2 例に一過性の異所性の発疹、3 例に一過性の 38 度までの発熱を認めたが、計 26 例の安全性に問題はなかった。
- 2) ほぼ全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た。英文誌に報告した我々のマウスでの研究結果と同様、その頻度には投与量依存性が示唆された。実際、ワクチン後のがん組織内に、ワクチンによって CD8 陽性キラー T 細胞が多数浸潤していることが、複数の症例で証明できた。
- 3) 約 60% の症例において初回ワクチン投与後 2 ヶ月の間に腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認めた。その頻度にも投与量依存性が示唆された。
- 4) 3.0mg 投与の 6 例には腫瘍マーカーの減少だけでなく、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められた。ワクチン効果に投与量依存

性が示唆されたため、当初は3mgまでの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg投与3例、30mg投与3例の計6例を第I相試験に追加して実施した。

- 5) 初回ワクチン投与2ヶ月後のRECIST基準での評価では約60%の症例が安定 (stable disease ; SD) であった。
- 6) 30mg、3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現した。

#### D. 考察

30mg、3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果が出現したが、投与局所の反応が3.0mg投与よりも強いことや、著明な効果が見られたのは1例だけということもあり、効果・安全性評価委員会では進行肝細胞がんに対する次相の推奨投与量を決定できず、さらに10mg、30mg投与を3ないし6例ずつ追加して最終決定する方針にした。根治的治療後の再発予防効果を検証する臨床第II相試験の推奨投与量は3.0mgに決定した。

#### E. 結論

進行肝細胞がん患者を対象としたGPC3ペプチドワクチンの臨床第I相試験により、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を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。今後の臨床第II相試験において、進行肝細胞がんへの効果だけでなく、根治的治療後の再発予防効果に期待する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2009; 34:649-656.
- 2) Ikuta Y\*, Hayashida Y\*, Hirata S, Irie A, Senju S, Kubo T, Nakatsura T, Monji M, Sasaki Y, Baba H, Nishimura Y. (\*These two authors contributed equally.) Identification of the H2-K<sup>d</sup>-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Sci.* 2009; 100(1):132-137.
- 3) 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 induce Specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 2008; 32:985-990.

- 4) Muchemwa F.C, Nakatsura T, Fukushima S, Nishimura Y, Kageshita T, Ihn H. Differential Expression of Heat Shock Protein 105 in melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res.* 2008; 18(3): 166-171.
- 5) Harao M, Hirata S, Irie A, Senju S, Nakatsura T, Komori H, Ikuta Y, Yokomine K, Imai K, Inoue M, Harada K, Mori T, Tsunoda T, Nakatsura S, Daigo Y, Nomori H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *Int. J. Cancer.* 2008; 123(11):2616-25.
- 6) Nakagohri T, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N. Surgical outcome of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008; 15(3):318-321.
- 7) 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.* 2008; 99:159-165.
- 8) Thomas MB, O'Beirne JP, Furuse J, Chan AT, Abou-Alfa G, Johnson P. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy and Immunotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15:1008-1014.
- 9) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67:8-15.
- 10) Ishii H, Furuse J, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M. Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma Patients Who Meet the Milan Criteria. *Hepato-Gastroenterology* 2008; 55:621-626.
- 11) Kim SR, Saito Y, Maekawa K, Sugiyama E, Kaniwa N, Ueno H, Okusaka T, Ikeda M, Morizane C, Yamamoto N, Yoshida T, Kamatani N, Furuse J, Ishii H, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Twenty novel genetic variations and haplotype structures of the DCK gene encoding human deoxycytidine kinase (dCK). *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23:379-384.
- 12) Sato Y, Laird NM, Nagashima K, Kato R, Hamano T, Yafune A, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E, Kim SR, Furuse J, Ishii H, Ueno H, Okusaka T, Saijo N,



- Sawada JI, Yoshida T. A new statistical screening approach for finding pharmacokinetics-related genes in genome-wide studies. *Pharmacogenomics J.* 2008 Dec 23. [Epub ahead of print].
- 13) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Kojima Y, Iwasa S, Hagihara A. Predictive Factors of Outcome and Tumor Response to Systemic Chemotherapy in Patients with Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38: 675-82.
  - 14) 中面哲也, 肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第I相試験 リンパ学, 2008;31(2):66-70.
  - 15) 中郡聡夫, 木下平, 小西大, 高橋進一郎, 後藤田直人, 盛川浩志, 河合隆史, 【最新の肝胆膵の3Dイメージ】肝門部胆管癌および肝内胆管癌のインタラクティブな胆管・門脈・肝動脈3DCG画像 胆と膵, 2008;臨増特大(29):1207-1212.
  - 16) 高橋遍, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 高橋進一郎, 後藤田直人, 【再発癌への挑戦 肺・肝転移, 手術でどこまで制御できるか】胃癌肝転移再発に対する外科的切除の検討 癌の臨床, 2008;54(10):847-851.
  - 17) 高橋遍, 後藤田直人, 木下平, 小西大, 中郡聡夫, 高橋進一郎, 化学療法が奏効し切除可能となった大腸癌肝転移の1例 *Liver Cancer*, 2008;14(2):237-243.
  - 18) 古瀬純司, 仲地耕平, 鈴木英一郎, 清水怜, 光永修一, 特集 肝細胞癌の治療戦略 トピックス 分子標的治療 消化器外科, 2008;31:1017-1023.
  - 19) 古瀬純司, 特集 肝内胆管癌-2008, up-to-date-化学療法による治療成績 肝胆膵, 2008;57:135-142.
  - 20) 古瀬純司, 特集 国際共同臨床試験, 国際共同臨床試験の現状と課題, 肝・胆道・膵がん 腫瘍内科, 2008;2:197-204.
  - 21) 古瀬純司, がん薬物療法学-基礎・臨床研究のアップデート- IV, 作用機序からみた抗悪性腫瘍薬の分類, 殺細胞性抗悪性腫瘍薬, 代謝拮抗薬(フッ化ピリミジン・非フッ化ピリミジン) 日本臨床, 2009;67:224-230.
  - 22) 古瀬純司, Sorafenibの分子作用機構と肝癌治療 癌の基礎から臨床へ ベンチからベッドサイドへ, 牛島俊和, 後藤典子, 西尾和人編, 篠原出版新社 (東京), 2008;p. 111-117.
  - 23) 古瀬純司, 肝細胞癌/胆道癌/膵癌 肝・胆道・膵癌化学療法の最近の動向 エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック2009, 有吉寛監修, メディカルレビュー社 (大阪市), 2008; p. 239-247.
  - 24) 古瀬純司, 肝がん治療の方向性 ~今後の治療法~ 分子標的治療(ソラフェニブ) インフォームドコンセントのための図説シリーズ 肝がん, 沖田極, 幕内雅俊編, 医薬ジャーナル社 (大阪市), 2009;p. 72-75.
- ## 2. 学会発表
- 1) Phase I Clinical study of glypican-3 peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma, Nakatsura T. 2008 AACR Annual Meeting (San Diego), April12-16, 2008
  - 2) 肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)のペプチドワクチンの効果(臨床第I相試験より) 中面哲也 第4回肝免疫・ウイルス・フロンティア(Liver 2008) (東京), 2008年4月19日
  - 3) 肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)のペプチドワクチンの臨床第I相試験 中面哲也 シンポジウム「癌に対する免疫療法の新たな展開」第32回日本リンパ学会総会(東京), 2008年6月7日
  - 4) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine for Hepatocellular Carcinoma, Nakatsura T. BIT's World Cancer Congress 2008 (Shanghai), June12-15, 2008
  - 5) 肝細胞癌特異抗原Glypican-3ペプチドワクチン 中面哲也 シンポジウム「外科医が行う免疫を利用した癌治療」第29回癌免疫外科研究会(東京), 2008年6月19, 20日
  - 6) 進行肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)のペプチドワクチンの効果(臨床第I相試験より) 中面哲也 ワークショップ「癌ワクチン療法の標準化を目指して」第12回基盤的癌免疫研究会総会(大宮), 2008年7月2, 3日
  - 7) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Nakatsura T., Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. Symposium "Translational Research of Cancer Therapy and Diagnosis" 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (ISOBM 2008) (Tokyo), October5-9, 2008
  - 8) Glypican-3 peptide vaccine in patients with hepatocellular carcinoma. Nakatsura T., Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International

Symposium on Molecular Medicine (Hersonissos, Crete, Greece), October 9-11, 2008. The awards of the best presentations.

- 9) The effect of Glypican-3 peptide vaccine for patients with advanced Hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study (進行肝細胞がん患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第I相試験での安全性と有効性) 中面哲也、吉川聡明、黒沼俊光、白川博文、林恵美子、西村美子、土原昌巳、本村裕、古瀬純司、小森宏之、千住覚、西村泰治、木下平 English workshop 第67回日本癌学会(名古屋)、2008年10月28-30日
- 10) 標準化へ向けたGlypican-3ペプチドワクチンの臨床試験 中面哲也 がんワクチン療法コンセンサスミーティング 第21回日本バイオセラピー学会(東京)、2008年11月19日
- 11) 進行肝細胞がんを対象としたGlypican-3ペプチドワクチン臨床第I相試験における免疫学的モニタリングの評価方法の検討(The method for evaluation of immunological monitoring in phase I study of Glypican-3 peptide vaccine in patients with HCC) Yoshikawa T, Motomura Y, Shirakawa H, Kuronuma T, Hayashi E, Nakatsura T. 第38回日本免疫学会(京都)、2008年12月1~3日
- 12) 肝細胞癌リンパ節転移に対する外科的切除について 小林信、高橋進一郎、後藤田直人、小西大、中郡聡夫、木下平 第108回日本外科学会定期学術集会(長崎)、2008年5月15日
- 13) Liver hanging maneuverを用いた肝鎌状間膜温存肝右葉切除 後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎 第108回日本外科学会定期学術集会(長崎)、2008年5月16日
- 14) Phase I/II study of the efficacy and safety of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Kudo M, Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, Ueshima K, Nakachi K, Ikeda M, Yamashita T. The 2nd International Liver Cancer Association(Chicago), September6-7, 2008
- 15) A phase II trial of hepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis. Okusaka T, Ikeda M, Furuse J, Nakachi K, Morizane C, Ueno H, Yamaura H, Inaba Y, Satake M, Arai Y. The 33rd ESMO (European Society for Medical Oncology) Congress (Stockholm), September12-16, 2008
- 16) 肝内胆管癌全身化学療法例における予後因子の特徴と、それに基づく適応 鈴木英一郎、古瀬純司、仲地耕平、光永修一、清水怜 第44回

日本肝癌研究会 ワークショップ(大阪)、2008年5月22日

- 17) 5大がん オンコロジストからの提言：シームレスな医療のために 肝細胞癌の臨床的特徴 古瀬純司、仲地耕平 第13回日本緩和医療学会大会 ワークショップ(静岡)、2008年7月5日
- 18) 肝細胞癌における分子標的薬の位置づけと副作用マネジメント 肝細胞癌に対する治療の現状と今後の動向一期待される分子標的治療の実際一 古瀬純司 第23回日本がん看護学会学術集会 教育セミナー(宜野湾) 2009年2月8日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Glypican-3 の発現は肝細胞がんの予後不良マーカーである

研究代表者 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  
研究分担者 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

Glypican-3 (GPC3)は肝細胞がんの特異的に発現するが、その機能および発現意義は未だ明らかではない。我々は肝細胞がん切除検体を用い、肝細胞がんにおける GPC3 発現を免疫組織学的に検証し、臨床病理学的項目との相関について検討を行った。その結果、GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が肝細胞がんの予後予測因子になりうる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

Glypican-3 (GPC3)は肝細胞がんの特異的に発現し、正常組織では胎生期の肝臓あるいは胎盤でしか発現が見られない。GPC3 の機能および発現意義は未だ明らかではない。我々は肝細胞がん切除検体を用い、肝細胞がん (hepatocellular carcinoma, HCC) における GPC3 発現を免疫組織学的に検証し、臨床病理学的項目との相関について検討を行った。

### B. 研究方法

2001～2002年に国立がんセンター東病院にて切除された HCC 症例 (n=107) を対象とした。切除検体のパラフィンブロックより組織を薄切し (全染色枚数 137 枚) GPC3 免疫染色により HCC 癌部での GPC3 発現を検討した。臨床病理学的情報の収集は当院に保管されている診療録を参考とし、GPC3 染色性と予後および臨床病理学的項目の相関を検討した。

### C. 研究結果

全症例の平均観察期間は  $3.4 \pm 2.0$  年であった。HCC における GPC3 免疫染色陽性率は、87 例 (81.3%) であった。術後 5 年生存率は、GPC3 染色陽性群 54.5% に対し陰性群 87.7% であり、有意に陽性群は予後不良であった ( $p=0.03$ )。さらに多変量解析においても、腫瘍個数と肝内転移の有無とともに有意であった ( $p=0.04$ )。さらに HCC における GPC3 発現の意義を探るため、GPC3 発現 HCC 組織と発現陰性の組織を用いて網羅的な遺伝子の発現解析を cDNA マイクロアレイにて行い、複数の遺伝子発現の差を認めた。

### D. 考察

GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になり

うる可能性がある。GPC3 ペプチドワクチン療法を切除癌部の GPC3 発現陽性症例をハイリスク群とし、治療後再発予防を目的に用いることの有用性を秘めており、GPC3 を標的とした新規抗がん治療の開発にも貢献しうる。

### E. 結論

GPC3 発現陽性 HCC は陰性 HCC に比べ予後不良であり、また GPC3 の発現が HCC の予後予測因子になりうる可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2009; 34:649-656.
- 2) 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 induce Specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 2008; 32:985-990.
- 3) 中面哲也, 肝細胞癌に対する Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験 リンパ学, 2008;31(2):66-70.

#### 2. 学会発表

- 1) 肝細胞がんにおける Glypican-3 発現の検討 白川博文、鈴木ひとみ、下村真菜美、小嶋基寛、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、

小林展章、木下平、中面哲也 第28回日本分子腫瘍マーカー研究会（名古屋）、2008年10月27日

学術集会（長崎）、2008年5月16日

- 2) Glypican-3 positive expression is the prognostic factor in Hepatocellular Caecinoma (Glypican-3発現陽性は肝細胞癌の予後因子である) 白川博文、鈴木ひとみ、齋藤由美、下村真菜美、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、木下平、中面哲也 International sessions 第67回日本癌学会（名古屋）、2008年10月28日
- 3) Phase I Clinical study of glypican-3 peptide vaccine in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Nakatsura T. 2008 AACR Annual Meeting (San Diego), April12-16, 2008
- 4) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine for Hepatocellular Carcinoma. Nakatsura T. BIT's World Cancer Congress 2008 (Shanghai), June12-15, 2008
- 5) Phase I Clinical Trial of Glypican-3 Peptide Vaccine in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Nakatsura T., Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. Symposium "Translational Research of Cancer Therapy and Diagnosis" 36th Congress of the International Society of Oncology & BioMarkers (ISOBM 2008) (Tokyo), October5-9, 2008
- 6) Glypican-3 peptide vaccine in patients with hepatocellular carcinoma. Nakatsura T., Yoshikawa T, Kuronuma T, Shirakawa H, Hayashi E, Nishimura Y, Tsuchihara M, Motomura Y. 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine (Hersonissos, Crete, Greece), October 9-11, 2008. The awards of the best presentations.
- 7) The effect of Glypican-3 peptide vaccine for patients with advanced Hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study (進行肝細胞がん患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第I相試験での安全性と有効性) 中面哲也、吉川聡明、黒沼俊光、白川博文、林恵美子、西村美子、土原昌巳、本村裕、古瀬純司、小森宏之、千住覚、西村泰治、木下平 English workshop 第67回日本癌学会（名古屋）、2008年10月28～30日
- 8) 肝細胞癌リンパ節転移に対する外科的切除について 小林信、高橋進一郎、後藤田直人、小西大、中郡聡夫、木下平 第108回日本外科学会定期学術集会（長崎）、2008年5月15日
- 9) Liver hanging maneuverを用いた肝鎌状間膜温存肝右葉切除 後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎 第108回日本外科学会定期

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし