

200918043A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチド
ワクチン療法のエビデンス創出のための臨床試験
に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿 1
II. 平成 21 年度総括研究報告 創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法のエビデンス創出 のための臨床試験 3
III. 分担研究報告	
1. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験 11
2. 悪性黒色腫患者を対象としたペプチドワクチン療法の開発 15
3. 小児がん患者を対象としたペプチドワクチン療法の開発 18
4. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの 臨床第Ⅱ相試験の実施に向けて 21
5. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発 24
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 27
V. 研究成果の刊行物・別刷 31

I. 研究班構成員名簿

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法の
エビデンス創出のための臨床試験に関する研究班（平成 21 年度）

区分	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	小西 大 小菅 智男 奥坂 拓志 國土 典宏 石井 浩 有賀 淳 斎田 俊明 高田 実 (H22年1月まで) 木庭 幸子 (H22年2月より) 尹 浩信 中川原 章 原 純一 熊谷 昌明 真部 淳 木下 義晶 吉川 史隆 永井 完治 佐藤 昇志	国立がんセンター東病院 上腹部外科 国立がんセンター中央病院 国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 胆・膵臓科 東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 癌研究会有明病院 消化器内科 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 信州大学医学部 皮膚科 信州大学医学部 皮膚科 信州大学医学部 皮膚科 熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 千葉県がんセンター 大阪市立総合医療センター 国立成育医療センター 固形腫瘍科 聖路加国際病院 小児科 九州大学大学病院 小児外科 名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 国立がんセンター東病院 呼吸器外科 札幌医科大学医学部 病理学第一講座	手術部長 副院長 医長 教授 副部長 教授 特任教授 准教授 助教 教授 センター長 副院長 医長 医長 助教 教授 内視鏡部長 教授
研究協力者	木下 平 古瀬 純司 池田 公史 若林 剛 山崎 直也 松下 茂人 福島 聡 孝橋 賢一 藤本純一郎 水野 正一	国立がんセンター東病院 杏林大学医学部 腫瘍内科 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 岩手医科大学 外科学講座 国立がんセンター中央病院 第二領域外来部 皮膚科 鹿児島大学大学院 皮膚科 熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 国立成育医療センター 研究所 国立健康・栄養研究所	副院長 教授 医長 教授 医長 講師 助教 医員 副所長 プロジェクト リーダー

Ⅱ. 平成 21 年度総括研究報告

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法の
エビデンス創出のための臨床試験

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

研究要旨

肝細胞がんのがん胎児性抗原 glypican-3 (GPC3) を同定し、その有用性を報告してきた。それらの基礎研究の成果を基に、国立がんセンター東病院において進行肝細胞がん患者を対象に GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施、完了した。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、現在実施中の根治的治療後の再発予防効果に期待している。

悪性黒色腫においては、GPC3 の発現程度は肝細胞がんには比べると低い可能性が示唆された。今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドを標的とした免疫療法の開発を目指す。

小児がんにおいては、肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍以外にも GPC3 発現陽性の様々な小児がんが存在する可能性が示唆された。GPC3 発現小児がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験の計画、実施を目指す。

卵巣がんにおいては、明細胞腺がんと再発・進行卵巣卵黄嚢腫瘍を対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験のプロトコールを作成し、倫理審査委員会に申請した。今後の成果が期待される。

肺がんにおいては、肺扁平上皮がんの約半数に GPC3 の発現が確認された。GPC3 を発現する肺扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を計画する。

研究分担者

小西 大	国立がんセンター東病院 上腹部外科 手術部長	吉川 史隆	名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 教授
小菅 智男	国立がんセンター中央病院 副院長	永井 完治	国立がんセンター東病院 呼吸器外科 内視鏡部長
奥坂 拓志	国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 胆・膵臓科 医長	佐藤 昇志	札幌医科大学医学部 病理学第一講座 教授
國土 典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 教授		
石井 浩	癌研究会有明病院 消化器内科 副部長	研究協力者	
有賀 淳	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授	木下 平	国立がんセンター東病院 副院長
斎田 俊明	信州大学医学部 皮膚科 特任教授	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 教授
高田 実	信州大学医学部 皮膚科 准教授 (平成 22 年 1 月まで)	池田 公史	国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 医長
木庭 幸子	信州大学医学部 皮膚科 助教 (平成 22 年 2 月より)	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 教授	山崎 直也	国立がんセンター中央病院 第二領域外来部 皮膚科 医長
中川原 章	千葉県がんセンター センター長	松下 茂人	鹿児島大学大学院 皮膚科 講師
原 純一	大阪市立総合医療センター 副院長	福島 聡	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 助教
熊谷 昌明	国立成育医療センター 固形腫瘍科 医長	孝橋 賢一	九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 医員
真部 淳	聖路加国際病院 小児科 医長	藤本純一郎	国立成育医療センター 研究所 副所長
木下 義晶	九州大学大学病院 小児外科 助教	水野 正一	国立健康・栄養研究所 生物統計プロジェクトリーダー

A. 研究目的

国立がんセンター東病院において進行肝細胞がん患者を対象に GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施して、ワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認してきた。

本研究は、肝細胞がんを中心として GPC3 を発現する悪性黒色腫、小児がん、卵巣がん、肺扁平上皮がんを対象に GPC3 ペプチドワクチンの有効性を検証する様々な臨床試験を実施し、科学的エビデンスを創出することを目的とし、GPC3 ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指している。

承認申請を目指した上では基幹となる肝細胞がんを対象とした臨床試験においては、手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験をスタートさせ、進行肝細胞がんに対しては、実施中の臨床第 I 相試験を完了し、有効性を証明するための適切な第 II 相試験のプロトコルを（必要性によっては複数、あるいは進行がんでない患者を対象としたプロトコルも）作成して、倫理審査委員会承認後に実施することを目指す。

GPC3 を発現していることが報告されている悪性黒色腫、小児がん、卵巣がん、肺扁平上皮がんにおいては、GPC3 の発現量等を再確認し、そのまま肝細胞がんと同様の臨床試験が可能かどうかを班会議を実施して検討した。

B. 研究方法

(1)肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

進行肝細胞がんを対象とした臨床第 I 相試験を完了させ、その結果を基に、進行がんを対象とした有効性を証明するための適切な第 II 相試験のプロトコルを皆で議論して作成する。

○根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験 ・対象と治療

初回病変の肝細胞がん患者で、肝切除あるいはラジオ波焼灼療法により根治的治療が施行されたと判断され、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。

根治的治療後 4 週間以降 6 週間以内に、本登録時適格規準を満たしていることを確認し、本登録する。根治的治療後 1 年間の経過観察期間中に、2 週間に 1 回を計 6 回投与、その後は 2 ヶ月に 1 回を計 4 回投与し、全 10 回の投与を行う。再発が明らかになった時点で投与は中止する。

・主要評価項目

①再発抑制効果としての 1 年および 2 年再発率。

・副次評価項目

①有害事象の種類と発現率。

②免疫学的モニタリングによる末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の頻度の増加の評価。

(2)悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、悪性黒色腫における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した。

(3)小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

小児がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、様々な小児がんにおける GPC3 蛋白質の発現を検討した。

(4)卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性卵巣腫瘍における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した後、GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験のプロトコルを作成して倫理委員会に申請する。

(5)肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

GPC3 ペプチドワクチンを肺の扁平上皮がんへも臨床応用すべく、切除検体のパラフィンブロックを用い、肺扁平上皮がんにおける GPC3 発現を免疫組織学的に検証した。

また、札幌医大との共同研究で、HLA-A2 トランスジェニックマウスならびにヒトの末梢血単核球を用いて、新規肺がん抗原 Lengsin の HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定を試みた。

[倫理面への配慮]

肝細胞がんを対象とした 2 種類の臨床試験については、国立がんセンター倫理審査委員会に申請し承認を得た後に実施している。本研究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している。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。

また、今後新たに計画・実施する臨床試験については、同様に国立がんセンターあるいは関連する施設の倫理審査委員会に申請し承認を得た後に実施する。

C. 研究結果

(1)肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

進行肝細胞がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了した。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。遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたが、肝臓内の腫瘍量が多い症例にはペプチドワクチン療法が効きにくい傾向も見えてきた。手術・ラジオ波の根治的治療後の再発予防効果を検証する第 II 相試験は、国立がんセンター倫理審査委員会承認後に開始した。順調に症例登録が進んでいる。

(2)悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

GPC3 は悪性黒色腫にも発現はしていると考えられるが、その発現程度は肝細胞がん比べると低い可能性が示唆された。

(3)小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍での GPC3 蛋白質発現が再確認できた。神経芽腫やその他の小児がんの中でも GPC3 発現陽性のがんが存在する可能性が示唆された。

(4)卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

これまでの悪性卵巣腫瘍における免疫染色による GPC3 発現の報告と比較しても同様な結果（胚細胞腫瘍では卵黄嚢腫瘍においてほぼ 100%発現、上皮性卵巣がんのうちでは明細胞腺がん有意に発現頻度が高く、ほぼ半数で GPC3 発現）が得られた。

明細胞腺がんでは①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群（adjuvant 症例）、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とし、卵巣卵黄嚢腫瘍は再発・進行症例のみを対象として GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験のプロトコルを作成して、名古屋大学医学部倫理審査委員会に申請した。

(5)肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

文献同様、我々の検討でも、約半数の肺扁平上皮がんにおいて GPC3 蛋白の発現を認めた。札幌医大との共同研究で新規肺がん抗原 Lengsin の HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープを同定した。

D. 考察

(1)肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたものの、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された症例では臨床効果が見出せなかった。なぜ効いたのか、なぜ効かなかったのかの解析も今後の課題として残された。現在計画中の進行肝細胞がんに対する臨床第 II 相試験において有効性を見出すためには、やはりプロトコルが重要であると考えられ、内科外科の先生方と議論を重ねているところである。ペプチドワクチン療法単独ではまだ進行がんへの効果は限定的であり、さらに強力な免疫療法あるいは様々な治療法との併用なども基礎研究で開発することも必要と考えられた。一方で、再発予防効果を検証する臨床第 II 相試験は順調に症例集積がなされており、結果が期待されるところである。

(2)悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫において、GPC3 mRNA 発現の陽性率は高いが、発現量としては肝細胞がんほど多くなく、蛋白質レベルでは明らかな強陽性の頻度が低く、全体的にみても発現量が低く、腫瘍組織中のごく一部の腫瘍細胞しか発現していない可能性も示唆された。この結果では、肝細胞がんと同様には GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を見出せない可能性が高いと考えられた。我々は、悪性黒色腫に発現する有望な腫瘍抗原として、その他にも HSP105 や SPARC を同定しており、今後はそれらの抗原も含めて、悪性黒色腫に有望なペプチドワクチン療法のプロトコルの作成を目指す。

(3)小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍での GPC3 蛋白質発現はほぼ確実であり、GPC3 ペプチドワクチン療法への応用は問題ないと考えられるが、神経芽腫においては、mRNA レベルでは GPC3 の発現が確認できるものの蛋白質レベルでは明らかに強い発現が確認できておらず悪性黒色腫と同じような状況になっている。ELISA においては良性腫瘍も含む様々な小児の腫瘍で血清中の GPC3 蛋白陽性の頻度が極めて高く、今後は健常小児の血清中に GPC3 は検出されないのか、さらには生まれたばかり、あるいは 1-2 歳児の正常臓器に GPC3 が発現していないことを確認する必要がある。

(4)卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

現在、卵巣がんの標準的初回化学療法は TC 療法

(タキソール+カルボプラチン)であり、再発症例においても化学療法が卵巣がん治療の中心となっているが、明細胞腺がんは抗がん剤抵抗性であり、予後不良な組織亜型であることが認識されているため、組織特異的な臨床試験を通じてより効果的な新規治療法を評価すべきである。GPC3 ペプチドワクチン療法の効果が期待される。

(5)肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

今後は肺扁平上皮がんにおける GPC3 陽性と臨床病理学的項目や予後との相関について検討を行い、肺扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を計画する。

新規肺がん抗原 Lengsin については、さらなる解析を行う。

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している。

悪性黒色腫においては、GPC3 の発現程度は肝細胞がんに比べると低い可能性が示唆された。今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドを標的とした免疫療法の開発を目指す。

小児がんにおいては、肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍以外にも GPC3 発現陽性の様々な小児がんが存在する可能性が示唆された。GPC3 発現小児がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験の計画、実施を目指す。

卵巣がんにおいては、明細胞腺がんでは、①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群 (adjuvant 症例)、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とし、卵巣卵黄嚢腫瘍は再発・進行症例のみを対象としてプロトコールを作成し、倫理審査委員会に申請した。今後の成果が期待される。

肺がんにおいては、肺扁平上皮がんの約半数に GPC3 の発現が確認された。GPC3 を発現する肺扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を計画する。

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.* 34:649-656, 2009.
- 2) Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep.* 22:149-54, 2009.
- 3) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 100(8): 1403-1407, 2009.
- 4) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int J Cancer.* in press.
- 5) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of β 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol Rep.* in press.
- 6) Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T. Silencing of SPARC inhibits the growth of human melanoma cells with G1 arrest induction. *Cancer Sci.* in press.
- 7) Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* in press.
- 8) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 125:2854-2862, 2009.
- 9) Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, Tanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T.

Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial. *J Hepatol.* 51(6): 1030-1036, 2009.

- 10) Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 115(11):2491-2504, 2009.
- 11) Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer Res.* 69(6):2647-2654, 2009.
- 12) Lin J, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, Saida T. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst.* 101(20):1423-1427, 2009.
- 13) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Haruta M, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunotherapy.* 32(3):219-231, 2009.
- 14) Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene.* 28(5):662-673, 2009.
- 15) Kinoshita Y, Souzaki R, Tajiri T, Ieiri S, Hashizume M, Taguchi T. A preoperative evaluation for neo-infantile liver tumors using a three-dimensional reconstruction of multidetector row CT. *Oncol Rep.* 21(4):881-886, 2009.
- 16) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Hara T, Taguchi T. Risks and benefits of ending of mass screening for neuroblastoma at 6 months of age in Japan. *J Pediatr Surg.* 44(12): 2253-2257, 2009.
- 17) Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Mizutani S, Nawa A, Kikkawa F. The expression of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV/CD26) is associated with enhanced chemosensitivity to paclitaxel in epithelial ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* 101(2):347-354, 2010.
- 18) Umezu T, Shibata K, Shimaoka M, Kajiyama H, Yamamoto E, Ino K, Nawa A, Senga T, Kikkawa F. Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 101(1):143-148, 2010.
- 19) Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci.* 100(11): 2054-2059, 2009.
- 20) Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojika M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage I B squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer.* 63(3):418-424, 2009.
- 21) Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inosa S, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasi H, Tamura Y, Kamiguchi K, Shijubo N, Honda R, Nomura N, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lentsin splicing variant 4. *Cancer Sci.* 100(8):1485-1493, 2009.
- 22) Honma I, Kitamura H, Torigoe A, Takahashi T, Tanaka T, Sato E, Hirohashi Y, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 58(11):1801-1807, 2009.
- 23) Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Kobayashi J, Nakatsugawa M, Mori T, Hara I, Sato N. The functioning antigens; beyond just as the immunologic targets. *Cancer Sci.* 100(5):798-806, 2009.
- 24) 中面哲也、臨床編5. 肝細胞がん—新規腫瘍抗原 (glypican-3<GPC3>) を利用したワクチン療法、がんペプチドワクチン療法、中村祐輔編、中山書店、p76-83, 2009.
- 25) 中津川宗秀、中面哲也、第2章 がん化学療法の標的 12. がん免疫療法、がん化学療法・分子標的治療update、西條長宏、西尾和人編、中外医学社、p86-91, 2009.

2. 学会発表

- 1) 進行肝細胞がん患者に対するGlypican-3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2「癌のトランスレーショナルリサーチ」第46回日本臨床分子医学会学術集会（東京）、2009年4月12日

- 2) Glypican-3 peptide Vaccine could induce immunological and clinical effect to the patients with advanced hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study. Tetsuya Nakatsura, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Hirofumi Shirakawa, Masami Tsuchihara, Masaaki Ito. AACR 100th Annual Meeting 2009 (Denver), Apr.18-22,2009.
- 3) 進行肝細胞がんに対するペプチドワクチンの臨床試験の結果と今後の展望、中面哲也、シンポジウム-1「がんワクチン療法の現状と展望 トランスレーショナルリサーチから学んだこと」第13回日本がん免疫学会総会（北九州市）、2009年6月24、25日
- 4) 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、吉川聡明、白川博文、黒沼俊光、酒村智子、中面哲也、第13回日本がん免疫学会総会（北九州市）、2009年6月24、25日
- 5) がん特異的免疫療法はがん治療を変えることができるか、中面哲也、ランチョンセミナー7 第64回日本消化器外科学会総会（大阪市）、2009年7月16日
- 6) グリピカン3ペプチドワクチンの臨床試験結果と今後の展望、中面哲也、ワークショップ17「高まる免疫療法への期待・エビデンスの確立をめざして」第47回日本癌治療学会学術集会（横浜市）、2009年10月22日～24日
- 7) 進行肝細胞癌患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第1相試験における患者末梢血を用いた有効性のモニタリングの検討、土原（廣田）昌巳、吉川聡明、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会（横浜市）、2009年9月30日
- 8) グリピカン3-陰性肝細胞癌におけるErbB3の活性化、土原昌巳、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜市）、2009年10月1～3日
- 9) Glypican-3(GPC3)由来ペプチド特異的細胞傷害性T細胞株の樹立と解析、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜市）、2009年10月1～3日
- 10) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン後の患者PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立 / Establishment of

Glypican-3(GPC3)-derived peptide specific CTL clones from PBMCs of patients vaccinated with GPC3 peptide. 吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪市）、2009年12月2～4日

- 11) Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンを用いた進行肝細胞癌に対する臨床第一相試験、木下平、中面哲也、白川博文、第64回日本消化器外科学会総会（大阪市）、2009年7月16～18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

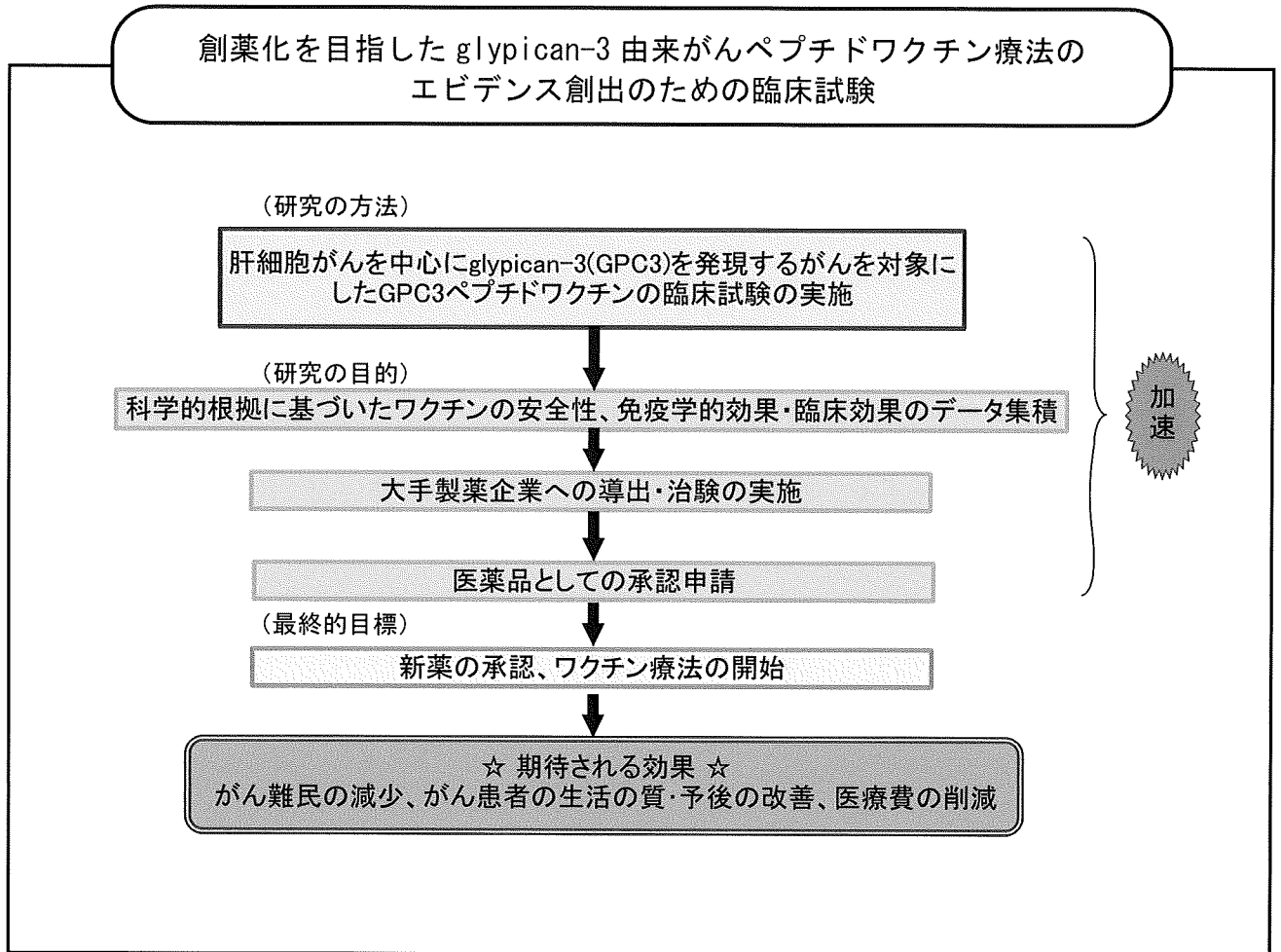
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究の概要図



Ⅲ. 分担研究報告

肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

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	小西 大	国立がんセンター東病院 上腹部外科 手術部長
	小菅 智男	国立がんセンター中央病院 副院長
	奥坂 拓志	国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 胆・膵臓科 医長
	國土 典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 教授
	石井 浩	癌研究会有明病院 消化器内科 副部長
	有賀 淳	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授
	佐藤 昇志	札幌医科大学医学部 病理学第一講座 教授
研究協力者	木下 平	国立がんセンター東病院 副院長
	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
	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
	水野 正一	国立健康・栄養研究所 生物統計プロジェクトリーダー

研究要旨

進行肝細胞がんを対象とした Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了した。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きたが、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。肝臓内の腫瘍量が多い症例にはペプチドワクチン療法が効きにくい傾向も見えてきた。一方で、遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたものの、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された症例では臨床効果が見出せなかった。なぜ効いたのか、なぜ効かなかったのかの解析も今後の課題として残された。現在計画中の進行肝細胞がんに対する臨床第 II 相試験において有効性を見出すためには、やはりプロトコールが重要であると考えられ、内科外科の先生方と議論を重ねているところである。手術・ラジオ波の根治的治療後の再発予防効果を検証する第 II 相試験は、国立がんセンター倫理審査委員会承認後に開始した。順調に症例登録が進んでいる。

A. 研究目的

我々は肝細胞がんのがん胎児性抗原 glypican-3 (GPC3) を同定し、その有用性を報告してきた。さらに 2007 年 2 月からは、国立がんセンター東病院において進行肝細胞がん患者を対象に GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施し、その結果からワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認してきた。本研究では、3 年間の研究期間内に、肝細胞がんに対する有効性を検証する臨床試験を実施し、科学的エビデンスを創出することを目的としており、GPC3 ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指している。

今年度は、進行肝細胞がん患者を対象にした GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を完了し、進行がんに対する有効性を証明するための適切な

第 II 相試験のプロトコールを作成してスタートを目指すことと、肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験の実施を目標とした。

B. 研究方法

(1) 臨床第 I 相試験

・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

(2)根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験

・対象と治療

初回病変の肝細胞がん患者で、肝切除あるいはラジオ波焼灼療法により根治的治療が施行されたと判断され、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。

根治的治療後 4 週間以降 6 週間以内に、本登録時適格規準を満たしていることを確認し、本登録する。根治的治療後 1 年間の経過観察期間中に、2 週間に 1 回を計 6 回投与、その後は 2 ヶ月に 1 回を計 4 回投与し、全 10 回の投与を行う。再発が明らかになった時点で投与は中止する。

・主要評価項目

- ①再発抑制効果としての 1 年および 2 年再発率。

・副次評価項目

- ①有害事象の種類と発現率。
- ②免疫学的モニタリングによる末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の頻度の増加の評価。

[倫理面への配慮]

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。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) 進行肝細胞がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了した。
- 2) 1 回 0.3mg 投与から 30mg 投与まで 6 例ずつ計 30 例全例に痒みや痛みをほとんど伴わない投与局所の発赤や硬結を認めた。ただし、30mg 投与による発赤や硬結は 3mg 投与によるものより明らかに強く、今後の試験の推奨投与量としては課題が残った。その他、2 例に一過性の異所性の発疹、2 例に一過性の 38 度以上の発熱を認めたが、計 30

例の安全性に問題はなかった。

- 3) 30 例中 27 例 (90%) 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も示唆された。また、発赤や硬結の強い症例は CTL の頻度が高い傾向も見受けられた。さらに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。
- 4) 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。ワクチン投与前血清 GPC3 陽性患者 15 例全例において初回ワクチン投与後 2 ヶ月の間に血清 GPC3 の低下を認めた。
- 5) 腫瘍マーカーの減少だけでなく、腫瘍内の壊死や一部腫瘍の縮小など臨床効果も認められた。
- 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 (Partial Response; PR) が出現した。一方、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された症例では臨床効果が見出せなかった。
- 7) 初回ワクチン投与 2 ヶ月後の RECIST 基準での評価では 30 例中 19 例 (63%) の症例が安定 (stable disease; SD) ないし PR であった。臨床試験登録前の画像と RECIST 基準での腫瘍径の総和の増加率と比べて初回ワクチン投与後 2 ヶ月間の増加率が下がった症例は、比較できた 23 例中 16 例 (70%) であった。
- 8) ワクチン投与前の RECIST 基準での腫瘍径の総和が 10.1 cm 以上の 15 例中 SD は 7 例 (47%) だったのに対し、10 cm 以下の 15 例では 12 例 (80%) が SD であった。肝臓内のがんが比較的控制されている遠隔転移の 18 症例 (腫瘍径の総和の平均 11.1 cm) 中、SD は 13 例 (72%) に対し、肝臓内のがんが治療抵抗性の 12 症例 (腫瘍径の総和の平均 15.3 cm) 中、SD は 6 例 (50%) であった。生存期間が 6 ヶ月に満たなかった 6 例中 5 例は肝臓内のがんが治療抵抗性の症例であり、腫瘍径の総和の平均は 18.9 cm であった。直前の治療をみても、SD 率は肝動脈塞栓術 (TACE) 群 8 例中 4 例、肝動注 (TAI) 群 6 例中 2 例、計 14 例中 6 例 (43%) と、その他の治療 (初回 1 例、手術 2 例、ラジオ波 1 例、放射線 5 例、抗がん剤全身投与 7 例) 群 16 例中 13 例 (81%) と比較して明らかに悪かった。
- 9) 肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験は既にスタートし、順調に症例登録が進んでいる。

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、さらに 10mg、30mg 投与を 3 例ずつ追加したものの、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しかねている。進行肝細胞がんに対する臨床第Ⅱ相試験において有効性を見出すためには、やはりプロトコールが重要であると考えられ、内科外科の先生方と議論を重ねているところである。

肝臓内の腫瘍量が多い症例にはペプチドワクチン療法が効きにくい傾向も見えてきた。一方で、遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたものの、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された症例では臨床効果が見出せなかった。なぜ効いたのか、なぜ効かなかったのかの解析も今後の課題として残された。

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している。

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*. 34:649-656, 2009.
- 2) Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep*. 22:149-54, 2009.
- 3) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 100(8):1403-1407, 2009.
- 4) Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. in press.
- 5) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 125:2854-2862, 2009.
- 6) Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, Tanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial. *J Hepatol*, 51(6):1030-1036, 2009.
- 7) Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*. 115(11):2491-2504, 2009.
- 8) Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inosa S, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasi H, Tamura Y, Kamiguchi K, Shijubo N, Honda R, Nomura N, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lengsin splicing variant 4. *Cancer Sci*. 100(8):1485-1493, 2009.
- 9) Honma I, Kitamura H, Torigoe A, Takahashi T, Tanaka T, Sato E, Hirohashi Y, Masumori N, Tsukamoto T, Sato N. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 58(11):1801-1807, 2009.
- 10) Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Kobayashi J, Nakatsugawa M, Mori T, Hara I, Sato N. The functioning antigens; beyond just as the immunologic targets. *Cancer Sci*. 100(5):798-806, 2009.
- 11) 中面哲也、臨床編5. 肝細胞がん—新規腫瘍抗原 (glypican-3<GPC3>) を利用したワクチン療法、がんペプチドワクチン療法、中村祐輔編、中山書店、p76-83, 2009.
- 12) 中津川宗秀、中面哲也、第 2 章 がん化学療法 の標的 12. がん免疫療法、がん化学療法・分子標的治療 update、西條長宏、西尾和人編、中外医学社、p86-91, 2009.

2. 学会発表

- 1) 進行肝細胞がん患者に対するGlypican-3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2「癌のトランスレーショナルリサーチ」第46回日本臨床分子医学会学術集会(東京)、2009年4月12日
- 2) Glypican-3 peptide Vaccine could induce immunological and clinical effect to the patients with advanced hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study. Tetsuya Nakatsura, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Hirofumi Shirakawa, Masami Tsuchihara, Masaaki Ito. AACR 100th Annual Meeting 2009 (Denver), Apr.18-22,2009.
- 3) 進行肝細胞がんに対するペプチドワクチンの臨床試験の結果と今後の展望、中面哲也、シンポジウム-1「がんワクチン療法の現状と展望 トランスレーショナルリサーチから学んだこと」第13回日本がん免疫学会総会(北九州市)、2009年6月24、25日
- 4) 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、吉川聡明、白川博文、黒沼俊光、酒村智子、中面哲也、第13回日本がん免疫学会総会(北九州市)、2009年6月24、25日
- 5) がん特異的免疫療法はがん治療を変えることができるか、中面哲也、ランチョンセミナー7 第64回日本消化器外科学会総会(大阪市)、2009年7月16日
- 6) グリピカン3ペプチドワクチンの臨床試験結果と今後の展望、中面哲也、ワークショップ17「高まる免疫療法への期待・エビデンスの確立をめざして」第47回日本癌治療学会学術集会(横浜市)、2009年10月22日～24日
- 7) 進行肝細胞癌患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第1相試験における患者末梢血を用いた有効性のモニタリングの検討、土原(廣田)昌巳、吉川聡明、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会(横浜市)、2009年9月30日
- 8) グリピカン3-陰性肝細胞癌におけるErbB3の活性化、土原昌巳、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会(横浜市)、2009年10月1～3日
- 9) Glypican-3(GPC3)由来ペプチド特異的細胞傷害性T細胞株の樹立と解析、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会(横浜市)、2009年10月1～3日
- 10) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン後の患者PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立 / Establishment of Glypican-3(GPC3)-derived peptide specific CTL clones from PBMCs of patients vaccinated with GPC3 peptide. 吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪市)、2009年12月2～4日
- 11) Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンを用いた進行肝細胞癌に対する臨床第一相試験、木下平、中面哲也、白川博文、第64回日本消化器外科学会総会(大阪市)、2009年7月16～18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

悪性黒色腫患者を対象としたペプチドワクチン療法の開発

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
研究分担者	齋田 俊明	信州大学医学部 皮膚科 特任教授
	高田 実	信州大学医学部 皮膚科 准教授
	木庭 幸子	信州大学医学部 皮膚科 助教
	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 教授
研究協力者	山崎 直也	国立がんセンター中央病院 第二領域外来部 皮膚科 医長
	松下 茂人	鹿児島大学大学院 皮膚科 講師
	福島 聡	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 助教

研究要旨

悪性黒色腫を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、悪性黒色腫における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した。GPC3 は悪性黒色腫にも発現はしていると考えられるが、その発現程度は肝細胞がんに比べると低い可能性が示唆された。この結果では、肝細胞がんと同様には GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を見出せない可能性が高いと考えられた。今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドを標的とした免疫療法の開発を目指す。

A. 研究目的

GPC3 は肝細胞がんに特異的に高発現するが、その後の研究において、悪性黒色腫においても発現することを過去に報告した。悪性黒色腫を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、悪性黒色腫における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した。

B. 研究方法

信州大学皮膚科および熊本大学皮膚科で経験した悪性黒色腫を対象とした。GPC3 の mRNA 発現を RT-PCR (47 例) で、蛋白質発現を Western blotting (19 例) および免疫組織染色 (パラフィン切片 19 例、凍結切片 10 例) で確認した。血清中の GPC3 分泌を評価するため sandwich ELISA 法 (検出法①23 例、②28 例) を実施した。

また、ヒト悪性黒色腫細胞株における遺伝子および蛋白質レベルでの GPC3 発現を RT-PCR (10 株) および Western blotting (13 株) にて確認した。

C. 研究結果

RT-PCR にて 59.6% (28/47) で mRNA 発現を認めた。手術時に凍結保存された切除検体から得られた lysate による Western blotting では 19 例中陽性 1 例 (弱々陽性 9 例) であった。GPC3 免疫染色の結果、パラフィン切片では 19 例中強陽性 0 例 (一部

弱陽性 5 例)、凍結切片では 10 例中 6 例で弱陽性と判定された。肝細胞がんに比して悪性黒色腫では、mRNA レベルでの発現頻度に対して、蛋白質レベルでの GPC3 検出は少ない結果であった。

細胞株での検討でも、RT-PCR は 80% (8/10) 陽性であるが、蛋白質レベル (Western blotting) において 13 株中明らかな陽性株は 1 株であった。

悪性黒色腫患者およびコントロールの血清を用いて 2 つの異なる時期、異なる症例群、異なる抗体組み合わせで GPC3-ELISA を施行した。Sheep ポリクローナル抗体を coating し、GPC3 の C 末端側を認識するモノクローナル抗体を検出抗体とした sandwich 法 (悪性黒色腫患者 23 例、健常コントロール 7 例) では cut off 値をそれぞれ Average+SD および Average+2SD とした場合の感度および特異度は 69.6%、85.7% と 39.1%、100% であった。しかし、その後の多数症例での検討で、この抗体組み合わせでは健常コントロールの測定値に著しい高低の幅があることが判明したため、コントロールが少数であることから陽性率が過大評価となってしまった可能性があった。そのため、悪性黒色腫患者 28 例、コントロール 66 例 (健常および非肝臓疾患例) を、はさむ抗体の上下を逆とした検出系で新たに再評価したところ、cut off 値を 3.5 ng/mL とした場合、陽性率 14.3% (4/28、肝細胞がんでは同じ cut off にて 37.5%) という結果であった。

D. 考察

悪性黒色腫において、GPC3mRNA 発現の陽性率は高いが、発現量としては肝細胞がんほど多くなく、蛋白質レベルでは明らかな強陽性の頻度が低く、全体的にみても発現量が低く、腫瘍組織中のごく一部の腫瘍細胞しか発現していない可能性も示唆された。この結果では、肝細胞がんと同様には GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を見出せない可能性が高いと考えられた。我々は、悪性黒色腫に発現する有望な腫瘍抗原として、その他にも HSP105 や SPARC を同定しており、今後はそれらの抗原も含めて、悪性黒色腫に有望なペプチドワクチン療法のプロトコルの作成を目指す。

E. 結論

GPC3 は悪性黒色腫にも発現はしていると考えられるが、その発現程度は肝細胞がんに比べると低い可能性が示唆された。今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドを標的とした免疫療法の開発を目指す。

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*. 34:649-656, 2009.
- 2) Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep*. 22:149-54, 2009.
- 3) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 100(8):1403-1407, 2009.
- 4) Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. in press.
- 5) Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of

melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer Res*. 69(6):2647-2654, 2009.

- 6) Lin J, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, Saida T. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst*. 101(20):1423-1427, 2009.
- 7) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Haruta M, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunotherapy*. 32(3):219-231, 2009.
- 8) 中面哲也, 臨床編 5. 肝細胞がん—新規腫瘍抗原 (glypican-3<GPC3>) を利用したワクチン療法、がんペプチドワクチン療法、中村祐輔編、中山書店、p76-83, 2009.
- 9) 中津川宗秀, 中面哲也, 第 2 章 がん化学療法の標的 12. がん免疫療法、がん化学療法・分子標的治療 update、西條長宏、西尾和人編、中外医学社、p86-91, 2009.

2. 学会発表

- 1) 進行肝細胞がん患者に対する Glypican-3 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2「癌のトランスレーショナルリサーチ」第46回日本臨床分子医学会学術集会(東京)、2009年4月12日
- 2) Glypican-3 peptide Vaccine could induce immunological and clinical effect to the patients with advanced hepatocellular carcinoma in Phase I clinical study. Tetsuya Nakatsura, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Hirofumi Shirakawa, Masami Tsuchihara, Masaaki Ito. AACR 100th Annual Meeting 2009 (Denver), Apr.18-22,2009.
- 3) 進行肝細胞がんに対するペプチドワクチンの臨床試験の結果と今後の展望、中面哲也、シンポジウム-1「がんワクチン療法の現状と展望 トランスレーショナルリサーチから学んだこと」第13回日本がん免疫学会総会(北九州市)、2009年6月24、25日
- 4) 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、吉川聡明、白川博文、黒沼俊光、酒村智子、中面哲也、第13回日本がん免疫学会総会(北九州市)、2009年6月24、25日
- 5) がん特異的免疫療法はがん治療を変えることが

できるか、中面哲也、ランチョンセミナー7 第64回日本消化器外科学会総会（大阪市）、2009年7月16日

- 6) グリピカン3ペプチドワクチンの臨床試験結果と今後の展望、中面哲也、ワークショップ17「高まる免疫療法への期待・エビデンスの確立をめざして」第47回日本癌治療学会学術集会（横浜市）、2009年10月22日～24日
- 7) 進行肝細胞癌患者に対するグリピカン3ペプチドワクチンの臨床第1相試験における患者末梢血を用いた有効性のモニタリングの検討、土原（廣田）昌巳、吉川聡明、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会（横浜市）、2009年9月30日
- 8) グリピカン3-陰性肝細胞癌におけるErbB3の活性化、土原昌巳、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜市）、2009年10月1～3日
- 9) Glypican-3(GPC3)由来ペプチド特異的細胞傷害性T細胞株の樹立と解析、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜市）、2009年10月1～3日
- 10) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン後の患者PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立 / Establishment of Glypican-3(GPC3)-derived peptide specific CTL clones from PBMCs of patients vaccinated with GPC3 peptide. 吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、白川博文、黒沼俊光、中面哲也、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪市）、2009年12月2～4日
- 11) Glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンを用いた進行肝細胞癌に対する臨床第一相試験、木下平、中面哲也、白川博文、第64回日本消化器外科学会総会（大阪市）、2009年7月16～18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