

200930015A

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 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 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 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 3
III. 分担研究報告	
1. HCC 切除後の再発予測における術後血清 AFP 値の有用性 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 木下 平 11
2. 肝細胞がんの超早期診断法の開発 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 東京労災病院 野村和弘 東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科 小井戸薫雄 大垣市民病院 消化器科 熊田 卓 13
3. 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 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 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 15
4. Glypican-3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞株・クローンの樹立と解析 ならびにその大量培養法の開発 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 18
5. 肝細胞がんの放射線治療(陽子線含む)と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験 に関する研究 国立がんセンター東病院 放射線部 放射線治療室 河島光彦 20
6. iPS 細胞由来の樹状細胞に関する研究 熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野 千住 覚 21
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 25
V. 研究成果の刊行物・別刷 29

I. 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（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	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
	千住 覚	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	准教授
	河島 光彦	国立がんセンター東病院 放射線部 放射線治療室	医長
	野村 和弘	東京労災病院	院長
	小井戸薫雄	東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科	准教授
研究協力者	西村 泰治	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	教授
	本間 定	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	准教授
	熊田 卓	大垣市民病院 消化器科	部長
	藤山 重俊	NTT 西日本九州病院	院長
	児島 辰也	東京労災病院 消化器内科	部長
	溝上 雅史	国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター	センター長

Ⅱ. 平成 21 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

肝がんは依然として予後不良であり、肝がんの治療成績を上げるためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法に加えて予防法の開発、確立が急務である。今年度の本研究の成果を以下に示す。

(1)HCC 根治的切除後の再発予知における術後 AFP 値の有用性が示され、また、血清中 GPC3 値は肝細胞がんの超早期診断に有用である可能性が示唆された。(2)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。(3)さらに、ワクチン投与患者 PBMC から GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、GPC3 陽性癌細胞株を傷害しうることを示した。(4)治療前インドシアニン・グリーン滞留率 15 分値 (ICG R15%) と、30 Cobalt-Gray-Equivalent (CGE) 以上が投与された非癌部の体積 (V30%) は、切除不能 HCC に対する陽子線治療の適応判断に有用であると考えられた。安全と考えられる ICG R15%と V30%での治療においては、標的となった腫瘍の制御率は 90%を超えており、再発予防のための GPC3 の併用効果に関する臨床試験を検討する意義があると考えられた。(5)ヒトの iPS 細胞は、機能的な樹状細胞を作成するための細胞ソースとなりうることを示された。樹状細胞療法が実用化できれば、肝臓がんに対するワクチン療法をより強力なものにすることが可能であると考えられる。

本研究の成果により、我が国に 350 万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がんの発症抑制、肝がんの治療成績の向上等が期待される。

研究分担者

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
千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部
免疫識別学分野 准教授
河島 光彦 国立がんセンター東病院
放射線部 放射線治療室 医長
野村 和弘 東京労災病院 院長
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 准教授
慈恵医大附属柏病院消化器・肝臓内科

研究協力者

西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部
免疫識別学分野 教授
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所
准教授
熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長
溝上 雅史 国立国際医療センター国府台病院
肝炎・免疫研究センター センター長

A. 研究目的

肝炎研究 7 ヶ年戦略にあるように、肝がんは依然として予後不良であり、肝がんの治療成績を上げるためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法に加えて予防法の開発、確立が急務である。本研究は肝細胞がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発を主な目的とし、肝細胞がんの新規免疫細胞療法の開発も目指す。具体的には、(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発、(2)肝細胞がんのワクチンの開発、(3)CTL 療法の開発、(4)ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発の 4 つの研究テーマを掲げている。本研究の成果により、我が国に 350 万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がんの発症抑制、肝がんの治療成績の向上等が期待される。

B. 研究方法

(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発

・術前・術後の AFP および PIVKA-II の推移と術後再発の関係を retrospective に解析した。

・大垣市民病院にて血清保存がなされていた肝細胞癌 128 例、肝硬変非発癌例 148 例（肝硬変フォロー中 3 年以上非発癌）、肝硬変発癌例 66 例（2005 年以降発癌）の計 342 例を対象として、GPC3 陽性

率を比較検討した。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

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 相試験を完了するために、さらに 10mg、30mg 投与を 3 例ずつ追加した。

(3) CTL 療法の開発

ワクチン投与後の患者末梢血単核球 (PBMC) を GPC3 ペプチドと IL-2 で刺激し、GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、CTL クローンを作製して機能を解析した。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

切除不能肝細胞癌に対する陽子線治療の効果と安全性に関する、DVH 解析を用いた遡及的検討を行った。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

マウス iPS 細胞に由来する樹状細胞 (iPS-DC) に抗原遺伝子を導入し、マウスモデルを用いて細胞ワクチンとしての効果を評価した。さらに、ヒト iPS 細胞の作成、ヒト iPS 細胞からの iPS-DC の作製、およびヒト iPS-DC の機能評価を行った。

[倫理面への配慮]

本研究において、臨床試験や臨床検体を用いた研究は国立がんセンターならびに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し、研究担当者は、ヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。患者に対しては倫理審査委員会承認された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は最大の努力を払っている。

さらに動物実験に際しては、各施設の動物実験指針を遵守し、動物愛護にも留意して研究を遂行するよう努めている。

ヒト ES 細胞および iPS 細胞の作製あるいは使用を伴う研究について

研究分担者の千住らが実施しているヒト ES 細胞の使用を伴う研究については、熊本大学医学薬学研究部倫理委員会ヒト ES 細胞分科会および、文部科学省ヒト ES 細胞倫理委員会からの承認を得たうえで、文部科学省および熊本大学の各々により策定されている倫理規定を遵守しつつ遂行している。また、ヒト iPS 細胞の作製および使用を行う研究については、熊本大学医学薬学研究部倫理委員会による研究計画の審査・承認を得た上で行っている。

C. 研究結果

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

①術前・術中診断において根治的切除が施行できたと考えられても、術後 AFP が正常値まで下がりきらない症例が存在し、それらの症例の多くは術後再発をきたすことが確認された。このことから、術後 AFP 陽性例は術前画像検査でとらえられなかったミクロレベルでの腫瘍残存を表している可能性が示唆された。

②HCC 早期診断における GPC3 の有用性につき多数症例での検討を実施し、血清 GPC3 の肝細胞がんの超早期診断に対する有用性を示すことができた。現在、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を集積中である。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

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、臨床的效果も見出すことができた。

(3) CTL 療法の開発

HLA-A2 患者 3 名、HLA-A24 患者 3 名の合計 6 名から CTL クローンを樹立した。樹立した CTL クローンの GPC3 ペプチド特異性が認められた。樹立した HLA-A2 の CTL クローンは、癌細胞から内因性に提示された GPC3 に由来するペプチドを認識し、細胞を傷害しうることが示唆された。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

現在、経動脈的 (化学) 塞栓術が標準と考えられる本症例群において、陽子線治療はきわめて良好な局所制御率と生存率を示した。治療前インドシアニン・グリーン滞留率 15 分値 (ICG R15%) と、30 Cobalt-Gray-Equivalent (CGE) 以上が投与された非癌部の体積 (V30%) が、陽子線治療後 6 カ月以内に生じる放射線誘発性肝不全の予測因子として重要であった。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

マウス iPS-DC にモデル抗原として OVA を発現させたものをマウス個体へ投与することにより、OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性化と OVA 抗原特異的な抗腫瘍免疫応答の誘導を行うことが可能であった。

OP9 細胞との共培養による血液細胞への分化誘導法に基づき、ヒト iPS 細胞を樹状細胞およびマクロファージへ分化させることができた。ヒト iPS-DC が、アロ T 細胞に対する刺激能力、抗原提示機能、サイトカイン産生能力など、樹状細胞としての機能を備えていることを確認した。

D. 考察

(1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発

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ている。現在、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を集積中である。

(2) 肝細胞がんのワクチンの開発

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。

22年度は、手術・ラジオ波による根治的治療後の再発予防ワクチンと進行がんを対象とする治療ワクチンの開発は、新たに採択された医療技術実用化総合研究事業で実施することとし、本研究では、慢性肝炎・肝硬変患者を対象とした予防ワクチンの開発のための臨床試験を計画し実施する。陽子線との併用も検討する。

(3) CTL療法の開発

今後は、GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子をクローニングし、GPC3 ペプチド特異的 TCR 遺伝子導入細胞移入療法も目指した検討も行う。

(4) 陽子線治療の安全性と有効性の検討

ICG R15%と V30%を用いて症例選択を行うことにより、陽子線治療の局所制御と GPC3 の再発予防との相乗効果が期待できるような臨床試験の対象を適確に抽出できる可能性が示唆された。

(5) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発

ヒトの iPS 細胞から樹状細胞が作製できるということは、技術的には、アフエレーシス操作を伴うことなく大量の樹状細胞を産生できることを意味する。これによって、患者の身体的負担なしに、任意の遺伝的背景の樹状細胞を作成し、細胞ワクチンとして利用できる。この技術の実用化には、さらに、ゼノ(異種成分)フリー培養法の開発が必要である。また、医療技術としての普及させるためには、日本人集団中で頻度の高い HLA ハプロタイプをカバーする iPS 細胞バンクが設立されるなどして、iPS-DC 作製に必要なコストの低減できることが必要であろう。

E. 結論

HCC 根治的切除後の再発予知における術後 AFP 値の有用性が示され、また、血清中 GPC3 値は肝細胞がんの超早期診断に有用である可能性が示唆された。

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。さらに、ワクチン投与患者 PBMC から GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、GPC3 陽性癌細胞株を傷害しうることを示した。

ICG R15%と V30%は、切除不能 HCC に対する陽子線治療の適応判断に有用であると考えられた。安全と考えられる ICG R15%と V30%での治療においては、標的となった腫瘍の制御率は 90%を超えており、再発予防のための GPC3 の併用効果に関する臨床試験を検討する意義があると考えられた。

ヒトの iPS 細胞は、機能的な樹状細胞を作成するための細胞ソースとなりうることを示された。樹状細胞療法が実用化できれば、肝臓がんに対するワクチン療法をより強力なものにすることが可能であると考えられる。

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) Kobayashi S, Gotohda N, Nakagohri T, Takahashi S, Konishi M, Kinoshita T. Risk factors of surgical site infection after hepatectomy for liver cancers. *World J Surg.* 33(2):312-317, 2009.
 - 9) Ikeda M, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M, Sasaki Y. Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 45(1):60-67, 2010.
 - 10) 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* 27:1021-1031, 2009.
 - 11) Inoue M, Senju S, Hirata S, Irie A, Baba H, Nishimura Y. An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2 γ^{null} (NOG) mice. *Immunol. Lett.* 126:67-72, 2009.
 - 12) Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int. J. Cancer.* in press.
 - 13) 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 α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J. Immunotherapy* 32:219-231, 2009.
 - 14) Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of SARS-Cov spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptide-derivative adjuvant. *Int. J. Immunopathology and Pharmacology.* in press.
 - 15) Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuda D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int. J. Hematol.* in press.
 - 16) Kawashima M, Kohno R, Nakachi K, Nishio T, Mitsunaga S, Ikeda M, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Arahira S, Zenda S, Ogino T, Kinoshita T. Dose-volume histogram analysis of the safety of proton beam therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* in press.
 - 17) Homma S, Koido S, Sagawa Y, Suzuki H, Komita H, Nagasaki E, Takahara A, Horiguchi-Yamada J, Tajiri H, Zeldin D, Obata T. Antigenic stimulation with cytochrome P450 2J expressed in mouse hepatocellular carcinoma cells regulates host antitumor immunity. *Clin. Exp. Immunol.* 156: 344-52, 2009.
 - 18) Koido S, Hara E, Homma S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic cells and tumor cells. *Immunotherapy* 1: 49-62, 2009.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 古瀬純司、肝臓—基礎・臨床研究のアップデート— IX. 肝臓の治療. 腫瘍因子からみた治療戦略. 多発肝細胞癌、日本臨床、67 supp3:421-425, 2009.
 - 22) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、肝細胞癌に対する抗癌剤治療の進歩、*Cancer Frontier*、11(1):161-169, 2009.
 - 23) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、肝細胞癌薬物治療の最前線. 進行肝細胞癌に対する分子標的薬の臨床試験、*The Liver Cancer Journal*、1(2):33-40, 2009.
 - 24) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、特集 消化器疾患に対する分子標的治療の最前線. 肝・胆道・膵癌治療の最前線—エルロチニブ、ソラフェニブ、*G. I. Research*、17(5):419-424, 2009.
 - 25) 鈴木英一郎、長島文夫、古瀬純司、肝・胆道・

- 膵がん治療の動向-最新のエビデンス. 肝がん全身化学療法の動向、腫瘍内科、4(4):328-335, 2009.
- 26) 古瀬純司、原発性肝がん(肝細胞がん). What's New in Oncology がん治療エッセンシャルガイド、佐藤隆美、藤原康弘、古瀬純司、大山優編、東京、南山堂、p. 276-285、2009.
 - 27) 古瀬純司、鈴木英一郎、長島文夫、癌治療の現状と展望1-標準治療の連携と分子標的薬剤のバイオマーカー. 肝臓癌-ソラフェニブ導入と肝炎ウイルスキャリアの管理、Current Therapy、27(11):56-60、2009.
 - 28) 古瀬純司、肝・胆・膵. 原発性肝がん. 入門腫瘍内科学、入門腫瘍内科学編集委員会編、東京、篠原出版新社、p. 155-158、2009.
 - 29) 鈴木英一郎、古瀬純司、長島文夫、肝細胞がん、胆道がん、膵がん. 各臓器のがんの標準治療と臨床研究、がん化学療法・分子標的治療update、西條長宏、西尾和人編、東京、中外医学社、p. 656-666、2009.
 - 30) 古瀬純司、原発性肝がん、新臨床腫瘍学改訂第2版、日本臨床腫瘍学会編、東京、南江堂、p. 518-527、2009.
 - 31) 古瀬純司、長島文夫、標準的化学療法. 消化器がん、消化器研修ノート、永井良三総監修、東京、診断と治療社、p. 585-588、2009.
 - 32) 古瀬純司、長島文夫、化学療法の副作用対策. 消化器がん、消化器研修ノート、永井良三総監修、東京、診断と治療社、p. 589-592、2009.
 - 33) 古瀬純司編著、消化器がん化学療法看護完全マスターBOOK. 分子標的薬と従来型抗がん剤のケア 副作用 治療のしくみがやさしくわかる!、消化器外科NURSING210年臨時増刊、大阪、メディカ出版、2010.
 - 34) 福島 聡、西村泰治、千住 覚、ES細胞およびiPS細胞由来の樹状細胞を利用したワクチン、臨床免疫・アレルギー科、52(3):331-338、2009.
 - 35) 千住 覚、iPS細胞から樹状細胞への分化誘導技術と将来の臨床応用、再生医療、8(3):34-37、2009.
 - 36) 千住 覚、多能性細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法、血液フロンティア、19(11):49-56、2009.
 - 37) 千住 覚、多能性細胞由来の樹状細胞を用いたがんの免疫療法、Biotherapy、印刷中
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)、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)、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)、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)、2009年10月22日~24日
 - 7) AFPとPIVKA-II: 従来の2大マーカーはHCC再発診断にどこまで有用か?、信岡大輔、木下平、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会(横浜)、2009年9月30日
 - 8) 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I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)、2009年9月30日
 - 9) 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)、2009年10月1~3日
 - 10) 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）、2009年10月1～3日

- 11) SELDI-TOF-MSによる肝細胞癌の超早期診断マーカー候補、 $\beta 2$ ミクログロブリンの同定、齋藤由美、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1～3日
- 12) HCC切除後の再発予測における術後血清AFP値の有用性、信岡大輔、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、木下平、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1～3日
- 13) Serum alpha-fetoprotein monitoring after curative resection of hepatocellular carcinoma: clinical significance of postoperative level. Nobuoka D, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. The 20th Asia Pacific Cancer Conference (Tsukuba), Nov.12-14, 2009.
- 14) 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）、2009年12月2～4日
- 15) 主腫瘍径15cm以上の巨大進行肝細胞癌に対する外科的切除成績の検討、後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、第109回日本外科学会定期学術集会（福岡）、2009年4月2～4日
- 16) 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）、2009年7月16～18日
- 17) 当院における混合型肝癌手術症例の検討、佐々木滋、後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、第64回日本消化器外科学会総会（大阪）、2009年7月16～18日
- 18) 肝切除クリニカルパスによる簡略化した周期管理とそのアウトカムの検討、後藤田直人、木下平、小西大、中郡聡夫、高橋進一郎、第64回日本消化器外科学会総会（大阪）、2009年7月16～18日
- 19) ソラフェニブに伴う手足皮膚反応：肝細胞癌を対象とした国内第I相臨床試験結果より、清水怜、古瀬純司、池田公史、仲地耕平、光永修一、小島康志、大野泉、高橋秀明、吹野晃一、第47回日本癌治療学会学術集会（横浜）、2009年10月22日
- 20) 肝細胞癌治療におけるソラフェニブの役割とその適正使用について、古瀬純司、第47回日本癌治療学会学術集会（横浜）、2009年10月23日
- 21) 日本から発信するエビデンス～TS-1トライアル、古瀬純司、第47回日本癌治療学会学術集会（横浜）、2009年10月24日
- 22) Future perspective; Sorafenib and beyond. Sorafenib. Working Report-Hepatic Cancer, Furuse J, The 20th Asia Pacific Cancer Conference (Tsukuba), Nov.13, 2009.
- 23) 開発中の分子標的治療の最前線、古瀬純司、第1回日本がん分子標的治療研究会（神戸）、2010年1月16日
- 24) ソラフェニブに関連する高血圧：肝細胞癌患者を対象とした国内第I相試験結果より、池田公史、古瀬純司、仲地耕平、光永修一、鈴木英一郎、清水怜、吹野晃一、第45回日本肝癌研究会（福岡）、2009年7月3～4日
- 25) 切除不能肝細胞癌に対するSM-11355とジノスタチンスチマラマーのランダム化比較第II相試験SM-11355 study group、池田公史、奥坂拓志、春日井博志、石井 浩、工藤正俊、佐田通夫、田中克明、塩山靖和、茶山一彰、熊田博光、吉川正治、第45回日本肝癌研究会（福岡）、2009年7月3～4日
- 26) ソラフェニブ治療開始後早期に見られる腓醇素上昇：肝細胞癌患者を対象とした国内第I相試験結果より、仲地耕平、古瀬純司、池田公史、光永修一、鈴木英一郎、清水怜、吹野晃一、第45回日本肝癌研究会（福岡）、2009年7月3～4日
- 27) ソラフェニブにおける有害事象の対策の整備、船崎秀樹、仲地耕平、光永修一、清水怜、上田育代、山下めぐみ、小田野佳代、小田中みのり、鈴木真也、坂辻侑華子、疋田亮子、原真幸、池田公史、遠藤一司、47回日本癌治療学会学術集会（横浜）、2009年10月22日～24日
- 28) ES細胞を用いた免疫制御の新技术、千住覚、特定領域研究「免疫系自己」平成21年度第1回班会議、2009年5月31日～6月1日
- 29) NOD/SCID γc null (NOG) マウスのin vivoにおける腫瘍抗原特異的ヒトCTLの誘導、井上光弘、千住覚、平田真哉、西村泰治、第13回日本がん免疫学会総会（福岡）、2009年6月24、25日

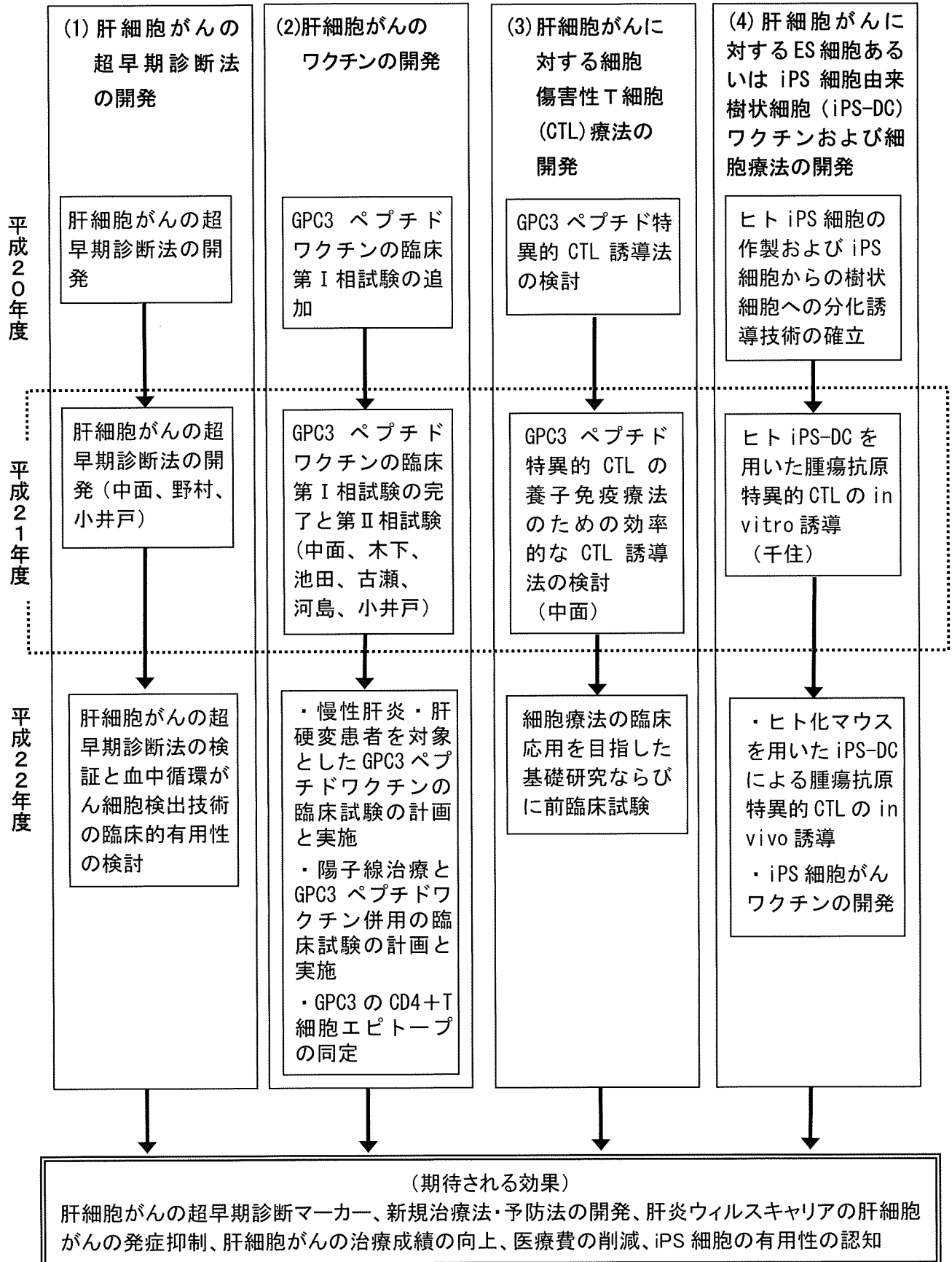
- 30) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDC45Lの同定、富田雄介*、今井克憲、入江厚、池田徳典、平田真哉、原尾美智子、井上光弘、角田卓也、森 毅、千住覚、中村祐輔、伊藤隆明、野守裕明、興梠博次、西村泰治、第13回日本がん免疫学会総会（福岡）、2009年6月24日～25日
- 31) ヒトdiffuse-type 胃癌に高発現するSPARCを標的としたマウス癌免疫療法モデルの構築、林田裕希*、生田義明、平田真哉、入江厚、千住覚、横峰和典、井上光弘、中面哲也、片桐豊雅、古川洋一、角田卓也、馬場秀夫、中村祐輔、佐々木裕、西村泰治、第13回日本がん免疫学会総会（福岡）、2009年6月24日～25日
- 32) 多能性幹細胞技術を用いた免疫細胞医薬の開発、千住覚、第44回熊本大学大学院医学薬学研究部・化血研ジョイントセミナー（熊本）、2009年7月2日
- 33) Immune therapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. 千住覚、平成21年度（戦略的創造研究推進事業）「JST-CIRM 研究交流 幹細胞利用技術への免疫学的アプローチ ワークショップ」ホテルフジタ京都（京都）、2009年8月31日～9月1日
- 34) ES/iPS細胞を利用した医療と組織適合性、千住覚、第18回日本組織適合性学会 認定制度講習会教育講演、（名古屋）、2009年9月26日～27日
- 35) マウスiPS細胞由来の樹状細胞によるがん免疫の誘導、千住覚*、松永雄亮、福島聡、池田徳典、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、西村泰治、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1日～3日
- 36) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDC45Lの同定、富田雄介、今井克憲、平田真哉、千住覚、井上光弘、森毅、角田卓也、伊藤隆明、中村祐輔、野守裕明、興梠博次、西村泰治、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1日～3日
- 37) 新規癌抗原SPARCを用いた癌免疫療法の開発、井上光弘、平田真哉、千住覚、生田義明、原尾美智子、今井克憲、林田裕希、富田雄介、角田卓也、古川洋一、中村祐輔、馬場秀夫、西村泰治、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1日～3日
- 38) $V\alpha 24$ インバリエントNKT細胞による樹状細胞のIL-12/IL-23産生制御、鈴木元晴、植村靖史、成田弥生、Tianyi Liu、廣澤成美、長谷真、千住覚、坂本安、菌田精昭、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1日～3日
- 39) Satoru Senju, Pluripotent stem cell-derived dendritic cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Symposium 7, iPS Cell-Presidential Symposium, Kyoto International Conference Center, Oct.23-24, 2009, Kyoto
- 40) Tokunori Ikeda, Satoru Senju, Immune-therapy with pluripotent stem cell-derived dendritic cells. The Kumamoto University Global COE International Joint Symposium, Nov.26-27, 2009, Kumamoto
- 41) 新規癌関連抗原SPARCを標的とした癌免疫療法の開発、井上光弘、千住覚、平田真哉、生田義明、入江厚、林田裕希、富田雄介、角田卓也、古川洋一、中村祐輔、馬場秀夫、西村泰治、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009年12月2日～4日
- 42) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原 CDC45Lの同定、富田雄介、今井克憲、井上光弘、千住覚、白石健二、森毅、醍醐弥太郎、角田卓也、伊藤隆明、中村祐輔、野守裕明、興梠博次、西村泰治、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009年12月2日～4日
- 43) 制御性T細胞に対するTRAILの作用、池田徳典、平田真哉、福島聡、松永雄亮、伊藤隆明、内野誠、西村泰治、千住覚、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）、2009年12月2日～4日
- 44) ヒトiPS細胞からの樹状細胞の作製、千住覚、春田美和、松村桂子、池田徳典、松永雄亮、福島聡、入江厚、西村泰治、第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）2009年12月2日～4日
- 45) Identification of HLA-A24-restricted CTL epitopes of SARS-CoV protein. Chen Yu-Zhen, Liu Gang, Satoru Senju, Wang Qidi, Atsushi Irie, Miwa Haruta, Masanori Matsui, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Yasuharu Nishimura, 第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）2009年12月2日～4日
- 46) Research on iPS cell-derived dendritic cells and macrophages aiming at clinical application. 千住覚、平成21年度CREST領域ミーティング、JST三番町ビル（東京）、2009年12月17日
- 47) 肝細胞癌に対する陽子線治療の適及的検討、河島光彦、日本放射線腫瘍学会第22回学術大会（京都）、2009年9月17日～19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

HCC 切除後の再発予測における術後血清 AFP 値の有用性

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 副院長

研究要旨

本研究は、肝細胞癌(HCC)の術後再発に対する早期診断における、血清 AFP 値の有用性を検証する retrospective study である。術前・術中診断において根治的切除が施行できたと考えられても、術後 AFP が正常値まで下がりきらない症例が存在し、それらの症例の多くは術後再発をきたすことが確認された。このことから、術後 AFP 陽性例は術前画像検査でとらえられなかったマイクロレベルでの腫瘍残存を表している可能性が示唆された。今後はこれらの症例に対して有効な術後補助療法の開発や、頻回の画像フォローアップが必要と考えられる。

A. 研究目的

我々はこれまで、Glypican-3(GPC3)が肝細胞癌(HCC)の腫瘍マーカーとして有用であることを報告してきたが、現在 HCC の腫瘍マーカーとしては AFP(alpha-fetoprotein)、AFP-L3 分画(レンズマメ結合性AFP)、およびPIVKA-II (prothrombin induced by vitamin K absence or antagonist-II)の3種類が代表的であり、本邦においても保険適応となっている。しかし、いずれも小さなHCCにおいては陽性率が低く、さらにAFPは慢性肝炎や肝硬変でも上昇することがあるため、これらの腫瘍マーカーがHCCの早期診断に寄与することは少なく、診断補助としての利用にとどまっているのが現状である。

今回、HCC再発の早期診断という観点から、HCC再発診断における術前・術後のAFPおよびPIVKA-IIの有用性につき検討を行った。

B. 研究方法

2005年1月から2007年12月までに国立がんセンター東病院にてHCCに対し根治的切除を施行した165例を対象とし、術前・術後のAFPおよびPIVKA-IIの推移と術後再発の関係をretrospectiveに解析した。術後4カ月以内の最低値を術後値として検討に用い、cut-off値はAFP 10ng/ml、PIVKA-II 40mAU/mlとした。

C. 研究結果

観察期間中114例(69%)にHCC再発を認めた。術前にAFP異常高値を示した症例において術後の変化を観察すると、高値が遷延し術後も異常高値を示す症例は再発群において無再発群に比べ有意に多く認められた(48/60, 80.0% vs. 4/23, 17.4%; $P < 0.001$)。一方、PIVKA-IIでは再発の有無に関わらず

多くの症例で術後一旦は正常値まで下がり、異常高値が遷延する症例の割合は両群間に有意差を認めなかった(14/72, 19.4% vs. 2/29, 6.9%; $P = 0.118$)。

術前AFP異常高値を示した症例に限ると術後AFP値は sensitivity 80%、specificity 83%、positive predictive value 92%、negative predictive value 61%と高い正診率を示し、また多変量解析でも術後AFP値は再発の危険因子の一つであった($P < 0.001$)。

AFP値と肝炎活動性との間には明らかな相関を認めなかった($P = 0.599$)。

D. 考察

AFPは再発症例において術後の低下が有意に不良であり、術後AFP陽性例は術前画像検査でとらえられなかったマイクロレベルでの腫瘍残存を表している可能性が示唆された。今後、これらの症例に対して有効な術後補助療法の開発や、頻回の画像フォローアップが必要と考えられる。

E. 結論

今回の検討により、HCC根治的切除後の再発予知における術後AFP値の有用性が示された。しかし、従来の腫瘍マーカーの小さなHCCにおける検出感度は決して満足できるものではなく、これは再発時も同様であり、より検出感度の高い新たなマーカーの探索が求められている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

2. 学会発表

- 1) AFPとPIVKA-II：従来の2大マーカーはHCC再発診断にどこまで有用か？、信岡大輔、木下平、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会（横浜）、2009年9月30日
- 2) HCC切除後の再発予測における術後血清AFP値の有用性、信岡大輔、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、木下平、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1～3日
- 3) Serum alpha-fetoprotein monitoring after curative resection of hepatocellular carcinoma: clinical significance of postoperative level. Nobuoka D, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. The 20th Asia Pacific Cancer Conference (Tsukuba), Nov.12-14, 2009.

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

肝細胞がんの超早期診断法の開発

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 野村 和弘 東京労災病院 院長
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 准教授 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科
研究協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長
溝上 雅史 国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター
センター長
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授

研究要旨

本研究は、肝がんの治療成績向上のために、肝がんの超早期診断マーカーの開発を目指したものである。既に一部の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に Glypican-3 (GPC3) ペプチド特異的に IFN- γ を産生するキラーT 細胞 (CTL) の存在や、GPC3 蛋白、抗 GPC3-IgG 抗体、さらには β 2 ミクログロブリンの検出を認めており、実際の患者の採血と経過観察による大規模な検証を要するフェーズに入ったと認識し、21 年度からは多くの肝硬変患者を抱えている 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スタートしている。今年度は特に HCC 早期診断における GPC3 の有用性につき多数症例での検討を実施し、血清 GPC3 の肝細胞がんの超早期診断に対する有用性を示すことができた。現在、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を集積中である。

A. 研究目的

肝細胞がんでは AFP および PIVKA-II が腫瘍マーカーとして臨床的に用いられており、診断に寄与しているが、現在のところ、がんの診断のゴールドスタンダードは CT などの画像診断である。つまりは画像上描出可能な 1cm 以上の大きさのがんがないと肝細胞がんの発症を確定できない。本研究では、肝細胞がんの超早期診断法の開発を目指す。今回、HCC 早期診断における GPC3 の有用性につき多数症例での検討を行った。

B. 研究方法

1999 年～2007 年に大垣市民病院にて血清保存がなされていた肝細胞癌 128 例、肝硬変非発癌例 148 例（肝硬変フォロー中 3 年以上非発癌）、肝硬変発癌例 66 例（2005 年以降発癌）の計 342 例を対象とした。コントロールとして 2007 年～2009 年に国立がんセンター東病院で血清保存された非肝臓疾患例 66 例を対象とした。各群間での GPC3 陽性率を比較し、さらに他の腫瘍マーカーとの相関、臨床背景についても検討した。cut-off 値は AFP:20ng/ml、AFP-L3:7%、PIVKA-II:40mAU/ml、GPC3:3.5ng/ml とした。

[倫理面への配慮]

臨床検体を用いた多施設共同研究における検体の収集においては、国立がんセンター倫理審査委員会および、東京慈恵会医科大学附属柏病院、東京労災病院、大垣市民病院、NTT 西日本九州病院の倫理委員会に申請し承認を得ている。研究担当者はヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。採血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。

C. 研究結果

GPC3 の cut-off 値を 3.5ng/ml とした場合、感度及び特異度はそれぞれ 37.5%、90.9%であった。stage I 症例で 27.8 %、stageIV 症例で 53.1%と病期の進行とともに陽性率が上昇する傾向を示した。HCC 群中の AFP が 20ng/ml 以下であった 29 例において検討したところ、GPC3 の感度及び特異度は 27.6%、79.5%であった。PIVKA-II と組み合わせた場合、65.5%の HCC を検出することができた（特異度は、74.7%）。3 年以上非発癌であった肝硬変群の GPC3 陽性率（22.3%）に比べ、3 年以内に発癌した肝硬変群では 28.8%と高い陽性率であった。

D. 考察

GPC3 は AFP や PIVKA-II と比較して感度は及ばないものの、肝硬変患者において早期発癌例ほど陽性率が高いことから、他の腫瘍マーカーではとらえられなかった小さな腫瘍の存在を表している可能性が示唆された。今後、GPC3 を補助指標とした肝細胞癌早期診断を目指し、高発癌危険群を選別することにより GPC3 ペプチドワクチン療法などの予防的療法を考慮する症例を効率よく抽出するために肝硬変フォロー中に GPC3 陽性化や上昇してくる患者を蓄積、追跡することが必要と考えられた。

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ている。現在、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、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ており、今後は肝細胞がん発症例が 5 例集積するごとに解析を行う計画である。

E. 結論

血清中 GPC3 値は肝細胞がんの超早期診断に有用である可能性が示唆された。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- γ 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ことを多施設による多検体の臨床研究で検討していく。

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) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of $\beta 2$ -microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* in press.
- 5) 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.

2. 学会発表

- 1) SELDI-TOF-MSによる肝細胞癌の超早期診断マーカー候補、 $\beta 2$ ミクログロブリンの同定、齋藤由美、大場信之、西中川秀太、水口泰宏、児島辰也、野村和弘、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1～3日
- 2) AFPとPIVKA-II：従来の2大マーカーはHCC再発診断にどこまで有用か？、信岡大輔、木下平、中面哲也、第29回日本分子腫瘍マーカー研究会（横浜）、2009年9月30日
- 3) HCC切除後の再発予測における術後血清AFP値の有用性、信岡大輔、後藤田直人、高橋進一郎、中郡聡夫、小西大、木下平、中面哲也、第68回日本癌学会学術総会（横浜）、2009年10月1～3日
- 4) Serum alpha-fetoprotein monitoring after curative resection of hepatocellular carcinoma: clinical significance of postoperative level. Nobuoka D, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Nakatsura T. The 20th Asia Pacific Cancer Conference (Tsukuba), Nov.12-14, 2009.

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

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

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 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

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。一方で、遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めただけのもの、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。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 相試験も国立がんセンター倫理審査委員会承認後に開始した。今後は、慢性肝炎・肝硬変患者を対象とした予防ワクチンの開発のための臨床試験も計画し実施を目指す。

A. 研究目的

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。

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

- 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

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) 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) 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 相試験も国立がんセンター倫理審査委員会承認後に開始した。

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、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。

また、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つ

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。

22 年度は、手術・ラジオ波による根治的治療後の再発予防ワクチンと進行がんを対象とする治療ワクチンの開発は、新たに採択された医療技術実用化総合研究事業で実施することとし、本研究では、慢性肝炎・肝硬変患者を対象とした予防ワクチンの開発のための臨床試験を計画し実施する。陽子線との併用も検討する。

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。

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) 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.
- 3) Kobayashi S, Gotohda N, Nakagohri T, Takahashi S, Konishi M, Kinoshita T. Risk factors of surgical site infection after hepatectomy for liver cancers. *World J Surg.* 33(2):312-317, 2009.
- 4) Ikeda M, Maeda S, Ashihara H, Nagahama H, Tanaka M, Sasaki Y. Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 45(1):60-67, 2010.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 古瀬純司、肝癌—基礎・臨床研究のアップデート