

201015035A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿	1
II. 平成 22 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	13
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	17
3. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発	20
4. 卵巣明細胞腺がんに対する HLA-A24 および-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド ワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験	22
5. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発	25
6. GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの樹立と GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発	27
7. ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入	30
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
V. 研究成果の刊行物・別刷	35

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 22 年度）

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がん研究センター東病院 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 小菅 智男 小西 大 池田 公史 古瀬 純司 國土 典宏 石井 浩 建石 良介 若林 剛 有賀 淳 斎田 俊明 木庭 幸子 山崎 直也 尹 浩信 中川原 章 原 純一 熊谷 昌明 (H22. 11 月まで) 塩田 曜子 (H22. 12 月から) 真部 淳 木下 義晶 孝橋 賢一 吉川 史隆 永井 完治 佐藤 昇志 水野 正一	国立がん研究センター東病院 国立がん研究センター中央病院 国立がん研究センター東病院 消化管腫瘍科 国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 杏林大学医学部 腫瘍内科 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 東京大学医学部附属病院 消化器内科 岩手医科大学 外科学講座 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 国立がん研究センター中央病院 皮膚腫瘍科 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 国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 聖路加国際病院 小児科 九州大学大学院医学研究院 小児外科分野 九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 国立がん研究センター東病院 呼吸器腫瘍科 札幌医科大学医学部 病理学第一講座 国立健康・栄養研究所	副院長 副院長 科長 副科長 教授 教授 副部長 助教 教授 教授 特任教授 助教 科長 教授 センター長 副院長 医長 医員 医長 准教授 助教 教授 科長 教授 プロジェクト リーダー
研究協力者	松下 茂人 福島 聡 藤本 純一郎	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 国立成育医療研究センター 臨床研究センター	講師 助教 センター長

Ⅱ. 平成 22 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 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長

研究要旨

本研究は、肝細胞がんを中心として glypican-3 (GPC3) を発現するがんを対象に、GPC3 ペプチドワクチン療法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ており、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。製薬企業は引き続き関心を示しており実現の可能性は高いと考えている。

我々は肝細胞がんのがん胎児性抗原 GPC3 を同定しその有用性を報告してきた。基礎研究の成果を基に、国立がん研究センター東病院において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 相試験を実施した結果、安全性とほぼ全例でのペプチド特異的キラーT細胞(CTL)の誘導効果を確認しており、63%の症例に最低 2 ヶ月間は腫瘍を増悪させない効果が、76%には腫瘍マーカーの低下が認められた。また 17%の症例では、腫瘍の縮小、消失、懐死などの臨床的な効果も認められ、30mg、3 回投与の 1 例では著明な腫瘍縮小効果が出現した。総合的に判断して推奨投与量は 3.0mg に決定した。

ペプチドワクチンは、がんの再発予防や予防においてより有効であると見込まれ、既に、肝細胞がんの根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験の症例登録が進んでおり、早急な登録完了を目指している。陽子線治療との併用で再発予防を目指した第 II 相試験も実施する。さらには予防ワクチンの開発を見据えたペプチド溶液のみワクチンの臨床試験や新剤の開発も検討している。進行肝細胞がんを対象とした次の試験として、ペプチドワクチン単独投与のもの、ソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価する多施設共同ランダム化比較試験を実施する。

名古屋大学で実施中の卵巣明細胞腺がんの第 II 相試験は登録の加速化を目指し、小児がん、肺扁平上皮がんにおいても臨床試験を実施する。悪性黒色腫に関しては腫瘍の悪性度を規定しているとの報告が多い先進部のマクロファージと思われる細胞に GPC3 の発現を認め興味深い知見が得られており、他のがん種とは異なる臨床試験を計画中である。いずれの臨床試験も倫理面に十分配慮した上で実施する。

その一方で、ペプチドワクチン療法単独では進行がんへの効果は決して劇的とは言えない現状もあり、GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いた CTL 療法や、ペプチドワクチン療法の効果を増強させるような併用療法などを、主にマウスモデルを用いて開発して、臨床応用を目指している。第 I 相試験に派生した免疫学的解析により多数の GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの樹立に成功し、それを基にした様々な解析、基礎研究への展開、CTL 療法への応用が期待される研究成果などが得られた。

本研究班の強力な研究体制での質の高い臨床試験の遂行による科学的エビデンスの創出こそが、GPC3 ペプチドワクチンの迅速な創薬化への近道であり、がん難民の減少、がん患者の生活の質 (QOL)・予後の改善、医療費の削減など保健医療への多大な貢献につながるものと期待される。

研究分担者

木下 平	国立がん研究センター東病院 副院長	石井 浩	癌研究会有明病院 消化器内科 副部長
小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長	建石 良介	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教
小西 大	国立がん研究センター東病院 消化管腫瘍科 科長	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
池田 公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 副科長	有賀 淳	東京女子医科大学 先端生命医学研究所 教授
古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 教授	斎田 俊明	信州大学医学部 皮膚科 特任教授
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	木庭 幸子	信州大学医学部 皮膚科 助教
		山崎 直也	国立がん研究センター中央病院 皮膚腫瘍科 科長

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
中川原 章 千葉県がんセンター センター長
原 純一 大阪市立総合医療センター 副院長
熊谷 昌明 国立成育医療研究センター
固形腫瘍科 医長
(平成 22 年 11 月まで)

塩田 曜子 国立成育医療研究センター
固形腫瘍科 医員
(平成 22 年 12 月より)

真部 淳 聖路加国際病院 小児科 医長
木下 義晶 九州大学大学院医学研究院
小児外科分野 准教授
孝橋 賢一 九州大学大学院医学研究院
形態機能病理学 助教
吉川 史隆 名古屋大学大学院医学系研究科
産婦人科 教授
永井 完治 国立がん研究センター東病院
呼吸器腫瘍科 科長
佐藤 昇志 札幌医科大学医学部
病理学第一講座 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

研究協力者

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
藤本純一郎 国立成育医療研究センター
臨床研究センター センター長

A. 研究目的

本研究は、肝細胞がんを中心として GPC3 を発現するがんを対象に、GPC3 ペプチドワクチン療法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ており、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。製薬企業は引き続き関心を示しており実現の可能性は高い。

我々は肝細胞がんのがん胎児性抗原 GPC3 を同定しその有用性を報告してきた。基礎研究の成果を基に、国立がん研究センター東病院において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 相試験を実施した結果、安全性とほぼ全例でのペプチド特異的キラー T 細胞 (CTL) の誘導効果を確認しており、63% の症例に最低 2 ヶ月間は腫瘍を増悪させない効果が、76% には腫瘍マーカーの低下が認められた。また 17% の症例では、腫瘍の縮小、消失、懐死などの臨床的な効果も認められ、30mg、3 回投与の 1 例では著明な腫瘍縮小効果が出現した。総合的に判断して推奨投与量は 3.0mg に決定した。

この結果を受け、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、倫理審査委員会承認後に実施する。ペプチドワクチンは、がんの再発予防や予防においてより有効であると見込まれるが、既に、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 相試験をスタートし、順調に症例登録が進んでいる。小児がん、卵巣がん、肺扁平上皮がんにおいても同様に臨床試験を計画、実施する。悪性黒色腫に関しては GPC3 にこだわらず有用な免疫療法を開発する。

現在までに様々ながん拒絶抗原ペプチドが同定され、国内外においてそれらを用いた様々な臨床試験が実施されているが、その有効性は未だ明らかでない。最近日本国内の様々な施設からがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告が散見されるが、その中でも GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の結果は、十分がん治療薬としての可能性を期待させる。現時点ではがん治療薬として承認されている例は無く、スーパー特区を利用して GPC3 ペプチドワクチンの創薬化を一気に加速したい。

その一方で、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し、臨床応用を目指す。

B. 研究方法

I. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

(1) 臨床第 I 相試験の結果の解析

(2) 肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験

・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。

(3) 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 II 相試験

完了した臨床第 I 相試験の結果をふまえ、有効性を証明するための適切なプロトコールを作成して、倫理審査委員会承認後に実施する。

(4) 陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第 II 相試験

現在進行中の肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第 II 相試験を参考にプロトコールを作成した。

II. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて、悪性黒色腫細胞株 (HLA-A0201 陽性 GPC3 陽性である CRL1579 および 526me1、GPC3 陽性 HLA-A0201 陰性である MM-LH に対して HLA-A0201 遺伝子を導入した MM-LH. A2 の 3 株) に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

悪性黒色腫 5 例を対象として、GPC3 の蛋白質発現を免疫組織染色 (パラフィン切片) で確認した。同時に、悪性黒色腫の抗原である gp100, Melan-A とマクロファージのマーカーである CD68, CD204、さらには我々が悪性黒色腫に発現するがん抗原として見出している HSP105, SPARC のタンパク質発現も免疫組織染色で確認した。

III. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて、腎芽腫細胞株 (G-401) および肝芽腫細胞株 (Huh-6) に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

また、国立がん研究センター中央病院が参画し、実施施設も増やして、データセンターに委託する方針に変更して研究計画書を改正して倫理審査委員会に出しなした。

IV. 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

卵巣明細胞腺がん患者を対象とした臨床第 II 相試験をスタートさせた。臨床試験にてペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者 4 症例 (進行群 2 例および寛解群 2 例) における免疫学的モニタリングを Ex vivo IFN- γ ELISPOT assay にて行った。また、国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

肺の扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験のプロトコールを作成した。

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。

VI. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、Dextramer ソート、Ex vivo Dextramer ソート、CD107a ソートの 3 通りの方法から、FACSria を使用したシングルセルソートにより CTL クローンを作製した。

新規 CTL 誘導法により GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、*in vitro*、*in vivo* のアッセイを実施した。

VII. ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入

in vitro において、標的細胞にペプチドをパルスすることによりペプチド特異的 CTL の反応が高まることを IFN γ ELISPOT 法および細胞傷害性試験により確認した。腫瘍を穿刺して内部に注入したペプチドががん細胞表面上の HLA class I 上に載ることを確認するために、免疫不全マウスに接種したががん細胞株の皮下腫瘍内部にペプチド溶液を注入し、その後腫瘍を摘出、がん細胞を分散単離して IFN γ ELISPOT 法を行った。また、免疫不全マウスの皮下腫瘍にペプチドを注入し、その後ペプチド特異的 CTL を注入して腫瘍の増殖に与える影響について観察した。C57BL/6 マウスに ovalbumin (OVA) のペプチドワクチンを行って自己の OVA 特異的 CTL を体内に誘導したうえで、OVA 非発現がん細胞株の皮下腫瘍に対する OVA ペプチド腫瘍内注入の抗腫瘍効果と副作用につき観察した。

[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研究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で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。

C. 研究結果

I. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

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 (PR) が出現したが、この症例では末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加も顕著であり、免疫染色においても GPC3 と HLA class I の発現も認めた。一方、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された同じく 30mg、3回投与の症例では短期での臨床効果が見

出せずPDであったが、この症例は免疫染色で GPC3もHLA class Iの発現も認めなかった。

- 2) 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、順調に症例登録が進んでおり、早急な40例登録完了を目指す。
- 3) 進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験を倫理審査委員会に申請し、承認され、スタートした。
- 4) ソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価する多施設共同ランダム化比較試験を計画し、倫理審査委員会に申請した。近々承認予定で、承認後は東病院でスタートし、その他の施設では各施設の IRB 承認後に体制が整い次第スタートする予定である。予定登録数：84例(各群42例)。主要評価項目は、全生存期間。データセンターに委託して臨床試験の質を確保した。
- 5) 陽子線治療とGPC3ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験を計画し、倫理審査委員会に申請した。主要評価項目は、治療対象標的病変以外の新病変出現抑制効果としての2年再発率。

Ⅱ. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは悪性黒色腫細胞株に対して IFN- γ ELISPOT assay において、GPC3 特異性および HLA-class I 拘束性を示した。また、HLA-A0201 陽性および GPC3 陽性である悪性黒色腫細胞株 (CRL1579 および 526mel) に対して細胞傷害活性を示した。肝細胞がん細胞株を含む様々ながん細胞株での GPC3 発現量と GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの免疫応答についての検討では mRNA レベル、タンパクレベル共に GPC3 の発現量に左右される結果であった。

GPC3 免疫染色の結果 5 例とも、gp100, Melan-A 陽性の悪性黒色腫細胞には明らかな発現を認めず、悪性黒色腫の先進部の CD68, CD204 陽性のマクロファージ様細胞 (メラノファージ) に GPC3 の発現を認めた。HSP105, SPARC はメラノファージも陽性であったが、悪性黒色腫細胞にも発現を認めた。一方、メラノファージには Melan-A も発現していた。

Ⅲ. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

G-401 および HuH-6 においても HLA class I の発現低下が認められたが、IFN- γ 刺激によってその発現は上昇がみられた。HLA class I 発現量の低下が認められるものの用いた HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは G-401 および HuH-6 に対して IFN- γ ELISPOT assay において、GPC3 特異性お

よび HLA-class I 拘束性を示した。また、G-401 に対して細胞傷害活性を示した。

各種小児がんに対する GPC3 由来 ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅰ相試験の研究計画書が近々国立がん研究センター倫理審査委員会承認される予定である。

Ⅳ. 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

卵巣明細胞腺がん患者のうち、①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群、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群を対象とした臨床第Ⅱ相試験をスタートさせた。臨床試験にてペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者4症例(進行群2例および寛解群2例)における免疫学的モニタリングを Ex vivo IFN- γ ELISPOT assay にて行った。また、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験に参加した HLA-A0201 陽性患者から国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対する基礎的検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

Ⅴ. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

術後再発肺扁平上皮がん患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験の研究計画書を作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請したが、問題点を指摘され、現在研究計画書を改訂中である。

Lengsin 由来 HLA-A*0201 結合性ペプチドを4種類選択し、まず HLA-A*0201 トランスジェニック (HHD) マウスに免疫し、ペプチドの免疫原性を評価した。4種類のうち、2種類のペプチド(Lengsin(206-215), Lengsin(270-279))で、ペプチド特異的 CTL が HHD マウスにて誘導された。2種類のペプチド各々に対する特異的な CTL クローンが樹立された。Lengsin 遺伝子導入した HLA-A*0201 陽性細胞株や、内在性 Lengsin 陽性肺がん細胞株に HLA-A*0201 遺伝子導入した安定細胞株を標的細胞として認識するかどうか検討したところ、Lengsin(270-279) 特異的 CTL クローンのみ、標的細胞を認識し、細胞傷害性を発揮することが確認できた。以上の結果より、Lengsin(270-279)は、ヒト末梢血単核球で CTL が誘導可能であり、かつ肺がん細胞表面に内在性提示されるペプチドであることが示唆された。

Ⅵ. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

3通りの方法で CTL クローンを樹立した。これら

の CTL クロームは高親和性で HLA-A*02:01 陽性、GPC3 陽性肝癌細胞株に対して IFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。しかし、GPC3 弱陽性のメラノーマ細胞株 526mel に対しては、最も高親和性である A2-8 クローム (10-11 M) のみが IFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。さらに、CTL クロームの IFN- γ 産生及び細胞傷害性は、抗 HLA-A2 抗体、抗 HLA-class I 抗体により抑制された。また、GPC3-siRNA 導入により肝癌細胞株 HepG2 の GPC3 発現量を低下させることで CTL クロームの IFN- γ 産生は抑制された。

GPC3 ペプチドワクチン投与患者 7 名 11 検体の少量の PBMC (2×10^6 個) から GPC3 ペプチド特異的 CTL が誘導可能である (1.8×10^5 個 $\sim 6.1 \times 10^7$ 個, 増加率:490 倍 $\sim 170,000$ 倍) ことが確認された。*in vivo* 試験において、NOD/Scid マウスの系で CTL の抗腫瘍効果を評価した結果、GPC3 特異的 CTL と $\gamma \delta$ T 細胞、それぞれに起因する抗腫瘍効果が確認できた。また培養前の PBMC の情報から細胞の増え方の予測が可能となる因子の探索を行った。Day0 の *ex vivo* ELISPOT アッセイによる IFN- γ 産生細胞数と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。また Day0 の $\gamma \delta$ T 細胞率と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。

Ⅶ. ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入

ELISPOT 法および細胞傷害性試験にて、GPC3 非発現がん細胞株に対しては GPC3 ペプチド特異的 CTL は反応を示さないが、がん細胞株にペプチドパルスを行った後では強い CTL 反応が確認された。一方、GPC3 発現がん細胞株に対してはペプチドパルス前でもある程度の CTL 反応が確認されたものの、ペプチドパルス後にはそれが著明に増強した。この結果は CMV ペプチドと CMV ペプチド特異的 CTL クロームを用いても同様に観察された。

免疫不全マウスに接種したがん細胞株の皮下腫瘍に GPC3 あるいは CMV ペプチド溶液の腫瘍内注入を行い、その後摘出して採取した腫瘍細胞をターゲットに ELISPOT 法を行い、腫瘍を穿刺して内部に注入したペプチドががん細胞表面上の HLA class I 上に載ることが確認された。

また、ペプチド注入後に CTL も注入することで腫瘍増殖抑制効果が確認された。

C57BL/6 マウスを用いたペプチドワクチンモデルでは、ペプチド腫瘍内注入群の腫瘍増殖抑制効果と生存延長効果が示され、一方、副作用は確認されなかった。

D. 考察

Ⅰ. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

進行肝細胞がんにおいては、ペプチドワクチン投与後に CTL ががんの中に入るかを検討する臨床試験と、ソラフェニブとの併用効果を検討するランダム化比較試験を実施する。また、再発しやすい肝細胞がんの再発予防を目的とした臨床試験としては、現行の切除後、ラジオ波後の臨床試験に加え、新たに陽子線治療との併用の臨床試験を計画した。

Ⅱ. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫の先進部のマクロファージ様細胞 (メラノファージ) が悪性黒色腫の悪性度に関与しているという報告も散見されるが、これらに GPC3 が発現しているのは興味深く、今後の検討課題である。

GPC3 ペプチド特異的 CTL は GPC3 発現量の少ない悪性黒色腫細胞株に対しても弱いながらも反応することが示された。しかし、GPC3 タンパクの悪性黒色腫細胞での発現がはっきりしない今までの結果では積極的に GPC3 ペプチドワクチン単独での臨床試験への展開には進みにくい。GPC3 発現量の比較的低い悪性黒色腫については腫瘍抗原の発現回復や CTL による免疫応答増強を期待できるような併用療法や GPC3 以外の HSP105 や SPARC などの腫瘍抗原も標的とすることにより有用なペプチドワクチン療法の開発につながる可能性が考えられた。

Ⅲ. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

小児がんには多彩な組織型が存在するが、総じて HLA class I 発現量が低下している。引き続き小児がんにおける GPC3 発現の程度を評価していくとともに、ペプチドワクチン療法の有効性を期待しうるのに十分な HLA class I 発現量を検討していく必要があると考えられた。ペプチドワクチン療法は副作用が少ないため他のさまざまな療法との併用も期待される。腫瘍抗原および HLA class I 発現量の上昇や CTL による免疫応答増強を期待できるような併用療法を検討することにより有用なペプチドワクチン療法の開発につながると考えられた。

時間はかかったが、実施体制も強力になり、いよいよ来年度から小児がんに対して多施設で GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を実施できる見込みとなった。

Ⅳ. 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

現在までの登録症例は 8 例と少数例ではあるが、卵巣明細胞腺がん患者においても安全性および免疫学的有効性が確認できつつある。GPC3 発現量と GPC3 ペプチド特異的 CTL クロームの免疫応答について相関関係が認められたことから、臨床試験に用いている HLA-A2 の GPC3 ペプチドについては、HLA-A2 陽性の GPC3 陽性がん細胞から内因性に提示

される本ペプチド量は、GPC3 自体の発現量を調べることで推測されうると考えられ、今後、GPC3 の発現量を基準に HLA-A2 の GPC3 ワクチンの不適格患者を選別することや、治療効果を予測する一指標として検討することの基礎的根拠となるかと考えられた。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、ペプチドワクチン療法は副作用が少ないため他のさまざまな療法との併用も期待される。subtoxic な抗がん剤用量での前治療と GPC3 特異的 CTL の併用によって細胞傷害性に上乘せ効果が得られたことから、卵巣がんに一般に使用される抗がん剤のうち、低用量であっても CTL 療法との併用によって有効性が期待できる抗がん剤の種類やその機序を明らかにできれば、副作用などで抗がん剤の減量を余儀なくされたような卵巣がん患者に対しては早期の臨床応用が期待できるのではないかと考えられた。卵巣明細胞腺がんの GPC3 ペプチドワクチン臨床第 II 相試験における対象には、抗がん剤併用群も設定されており、現在の卵巣がん治療をふまえて有効性を検証できるプロトコルとなっていることもあり、その作用機序を含め今後の追加解析を計画している。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

倫理審査委員会の指摘を受けて、肺扁平上皮がん患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験の研究計画を改訂中である。

新規肺がん抗原 Lengsin 由来ペプチド Lengsin(270-279)は、肺がんに対するペプチドワクチン療法を含む免疫療法の新たな標的として有用であると考えられた。

VI. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

GPC3-siRNA 導入による解析から、GPC3 特異的 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。Dextramer ソートにより樹立した CTL クローンは、GPC3 陽性の肝癌細胞株を傷害したが、GPC3 弱陽性の 526mel は認識できなかった。より高い親和性の CTL クローンを樹立するために CD107a ソートを行い、Dextramer ソートよりもさらに親和性が高く、526mel も傷害できる CTL クローンが樹立された。このことより、GPC3 発現量の低い癌細胞を傷害するには、より高い親和性が必要であると考えられた。

新規 CTL 培養法により、簡便な方法で約 50ml の採血量で細胞移入療法を行う数の CTL を誘導できる可能性が見込まれた。これまで *in vitro* での GPC3

ペプチド特異的 CTL の誘導は困難であったが、今回用いたワクチン投与後の患者 PBMC からは、比較的容易に誘導可能であり、GPC3 ペプチドワクチンと CTL 療法を組み合わせた治療により、多くの患者に適応可能になると考えられた。今回行った新規 CTL 誘導法においても、細胞の増加率には個人差があるが、培養前の PBMC から予測できる可能性が見込まれた。今後細胞が増殖しにくい患者に対して細胞が増殖する培養条件を検討し、培養前の予測と至適培養条件を組み合わせるオーダーメイド細胞療法を確立することにより、より多くの患者に適応できる治療につながる可能性があると考えられる。

さらに、別の研究として行っている TCR 遺伝子導入細胞移入療法については、GPC3 ペプチドワクチン投与患者 PBMC から HLA-A2⁺, GPC3⁺癌細胞株を傷害し得る GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを複数樹立した。現在、CTL クローンからの TCR 遺伝子のクローニングが完了しており、TCR 遺伝子導入細胞移入療法へ向けた検討を行っている。

VII. ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入

ペプチドを腫瘍内に注入することで、がん細胞表面上の HLA class I 上に提示されるペプチドの密度が増加し、がん細胞がペプチド特異的 CTL に殺傷されやすくなることが示された。さらに、このペプチド腫瘍内注入がペプチド特異的免疫療法の効果を増強する治療オプションとして臨床応用を目指すうえでは、ペプチド腫瘍内注入により全身の免疫反応が活性化され、ペプチドを注入しない腫瘍に対しても抗腫瘍効果を生じることが重要であり、現在、抗原 spreading に関する追加実験を行っている。

E. 結論

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 相試験の結果を踏まえて、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験として 2 種類の臨床試験を計画した。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、順調に症例登録が進んでおり、早急な登録完了を目指す。陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第 II 相試験も計画し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは、肝細胞がん細胞株と比較して GPC3 発現量の少ない悪性黒色腫細胞株に対しても IFN- γ ELISPOT assay にて IFN- γ の産生が確認でき、免疫応答が認められた。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開発を目指す。

今後はGPC3にこだわらずHSP105やSPARC由来のペプチドなどを標的とした免疫療法の開発を目指す。

HLA-A2拘束性GPC3ペプチド特異的CTLクローンは、他ががん腫細胞株と比較してHLA class I発現量の少ない小児がん細胞株に対してもGPC3特異的な免疫応答が認められた。今後の臨床試験の結果が期待される。

卵巣明細胞腺がんに対するGPC3ペプチドワクチンの臨床第II相試験において科学的エビデンスを創出しうるためには、卵巣がん標準治療をふまえたプロトコールが必要であると考えられる。2010年より名古屋大学医学部附属病院において、「卵巣明細胞腺がんに対するHLA-A24および-A2結合性Glypican-3 (GPC3)由来ペプチドワクチン療法の臨床第II相試験」を実施している。

肺扁平上皮がん患者を対象としたGPC3由来ペプチドワクチン療法の臨床第II相試験の研究計画書を倫理審査委員会からの指摘を受け、改訂中である。札幌医大との共同研究で肺がん免疫療法に応用可能な、新規肺がん抗原Lengsin由来HLA-A*0201拘束性CTLエピトープを同定した。

樹立したCTLクローンの解析により、GPC3特異的CTLはGPC3ペプチドに対して高親和性であり、HLA-class I拘束性かつGPC3特異的に癌細胞を傷害しうることを示された。

新規CTL誘導法、及びTCR遺伝子導入細胞移入療法より、多くの患者に適応できるCTL療法が開発可能となる見込みを得た。

ペプチド腫瘍内注入は、将来的にペプチド特異的免疫療法の効果を増強する治療オプションとなる可能性を秘めた新戦略と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 24(2): 521-528, 2010.
- 2) Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G₁ arrest induction. *Cancer Sci.* 101(4):913-919, 2010.
- 3) Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* in press, 2011.
- 4) Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, Kudo M, Nakachi K, Ueno H, Yamashita T, Ueshima K. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 101(12):2606-2611, 2010.
- 5) Kanai F, Yoshida H, Tateishi R, Sato S, Kawabe T, Obi S, Kondo Y, Taniguchi M, Tagawa K, Ikeda M, Morizane C, Okusaka T, Arioka H, Shiina S, Omata M. A phase I/II trial of the oral antiangiogenic agent TSU-68 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67:315-324, 2011.
- 6) Goto E, Tateishi R, Shiina S, Masuzaki R, Enooku K, Sato T, Ohki T, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M. Hemorrhagic complications of percutaneous radiofrequency ablation for liver tumors. *J Clin Gastroenterol.* 44(5):374-380, 2010.
- 7) Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23(1):64-71, 2010.
- 8) Umezu T, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nawa A, Kikkawa F. Glypican-3 expression predicts poor clinical outcome of patients with early-stage clear cell carcinoma of the ovary. *J Clin Pathol.* 63(11):962-966, 2010.
- 9) Sakurai M, Shibata K, Umezu T, Kajiyama H, Yamamoto E, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Growth-suppressing function of glypican-3 (GPC3) via insulin like growth factor II (IGF-II) signaling pathway in ovarian clear cell carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 119(2):332-336, 2010.
- 10) Shimada Y, Ishii G, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K. Extratumoral vascular invasion is a significant prognostic indicator and a predicting factor of distant metastasis in non-small cell lung cancer. *J thorac Oncol.* 5(7):970-975, 2010.
- 11) Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A, Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y, Nakamori K, Nagai I, Sato N, Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for

patients with advanced or recurrent oral cancer. *Cancer Sci.* 102(2):324-329, 2011.

- 12) 中面哲也、がん抗原の同定法と種類 それを用いた免疫療法、次世代ワクチンの産業応用技術 (神谷齊 監修)、シーエムシー出版、p213-218, 2010.
- 13) 木庭幸子、メラノーマに免疫療法は有効か?、EBMがん化学療法・分子標的治療法2010-2011 (西條長宏 監修)、中外医学社、p602-608, 2010.
- 14) 中面哲也、ペプチドワクチンの開発から臨床応用に向けた新たな展開、胆と膵 32(2):135-140, 2011.
- 15) 中面哲也、ペプチドワクチン 国内で臨床試験の行われているペプチドワクチン療法 GPC3、月刊Mebio 27(12):49-55, 2010.
- 16) 中面哲也、免疫療法、理大科学フォーラム、2010年11月号、p32-35, 2010.
- 17) 木庭幸子、メラノーマの免疫療法 ー最近の動向ー、癌と化学療法 37(4):629-633, 2010.
- 18) 山崎直也、メラノーマの進行期における治療戦略、MB Derma 166:26-32, 2010.
- 19) 田尻達郎、木下義晶、宗崎良太、田中桜、東真弓、孝橋賢一、田口智章、神経芽腫の治療ー外科的立場からー、小児がん 47(1):40-45, 2010.

2. 学会発表

- 1) Prognostic value of postoperative alpha-fetoprotein level on recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yuichiro Kato, Naoto Gotohda, Shinichiro Takahashi, Masaru Konishi, Taira Kinoshita, Tetsuya Nakatsura. AACR 101th Annual Meeting 2010 (Washington, DC), April 17-21, 2010.
- 2) 肝細胞がん免疫療法で立ち向かう、中面哲也 ランチョンセミナー6、第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (仙台)、2010年5月26~28日
- 3) 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、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、土原昌巳、白川博文、黒沼俊光、中面哲也 第14回日本がん免疫学会総会 (熊本)、2010年7月22~23日
- 4) Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitope of a novel tumor-associated antigen, Lengsin Nakatsugawa M, Yoshikawa T, Sakemura N, Horie K, Shimomura M, Saito Y, Kikuchi Y,

Hirohashi Y, Torigoe T, Sato N, Nakatsura T. 14th International Congress of Immunology (第14回国際免疫学会議) (神戸)、2010年8月22~25日

- 5) Simple and useful ex vivo expansion of antigen-specific CTLs and V γ 9V δ 2 T cells simultaneously without DCs. Tomiyama M, Takahara M, Yoshikawa T, Sakemura N, Nakatsura T, Nieda M, Maekawa R. 14th International Congress of Immunology (第14回国際免疫学会議) (神戸)、2010年8月22~25日
- 6) Glypican-3-derived peptide vaccine therapy for cancer. (Workshop 3: The present status and the future perspective in cancer vaccine) Tetsuya Nakatsura. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (第9回アジア臨床腫瘍学会学術集会) (岐阜)、2010年8月25~27日
- 7) 肝細胞癌における血清腫瘍マーカーとしての Glypican-3の有用性、鈴木史朗、土原昌巳、齋藤由美、熊田卓、中面哲也 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 (大阪)、2010年9月21日
- 8) The effect of SPARC-specific siRNA on the growth of cancer-associated fibroblasts. (SPARC特異的 siRNAの腫瘍関連線維芽細胞増殖に対する効果)、堀江和峰、下村真菜美、中面哲也 第69回日本癌学会学術総会 (大阪)、2010年9月22~24日
- 9) 国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み、中面哲也 第7回DIA日本年会 (東京)、2010年10月28~29日
- 10) Glypican-3を標的としたがんワクチン、中面哲也 シンポジウム20「がん免疫療法」第48回日本癌治療学会学術集会 (京都)、2010年10月28~30日
- 11) 国立がん研究センター東病院におけるがんペプチドワクチン療法臨床試験の経験から、中面哲也 日本がん免疫学会緊急シンポジウム「がんワクチン治療の現状と臨床」(東京)、2010年10月30日
- 12) 肝がんの免疫療法、中面哲也 特別企画【最近の話題】1、第38回日本肝臓学会東部会 (東京)、2010年12月2~3日
- 13) The Frequency of Glypican-3 Peptide-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Changes after Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yutaka Motomura, Hirofumi Shirakawa, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Mari Takahashi,

Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Noriko Sakemura, Manami Shimomura, Kazutaka Horie, Toshiyoshi Fujiwara, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1日～3日

- 14) Establishment of High Avidity CTL Clones from PBMCs of Patients Vaccinated with Glypican-3 Peptide. Toshiaki Yoshikawa, Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Hirofumi Shirakawa, Daisuke Nobuoka, Noriko Sakemura, Yutaka Motomura, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1日～3日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

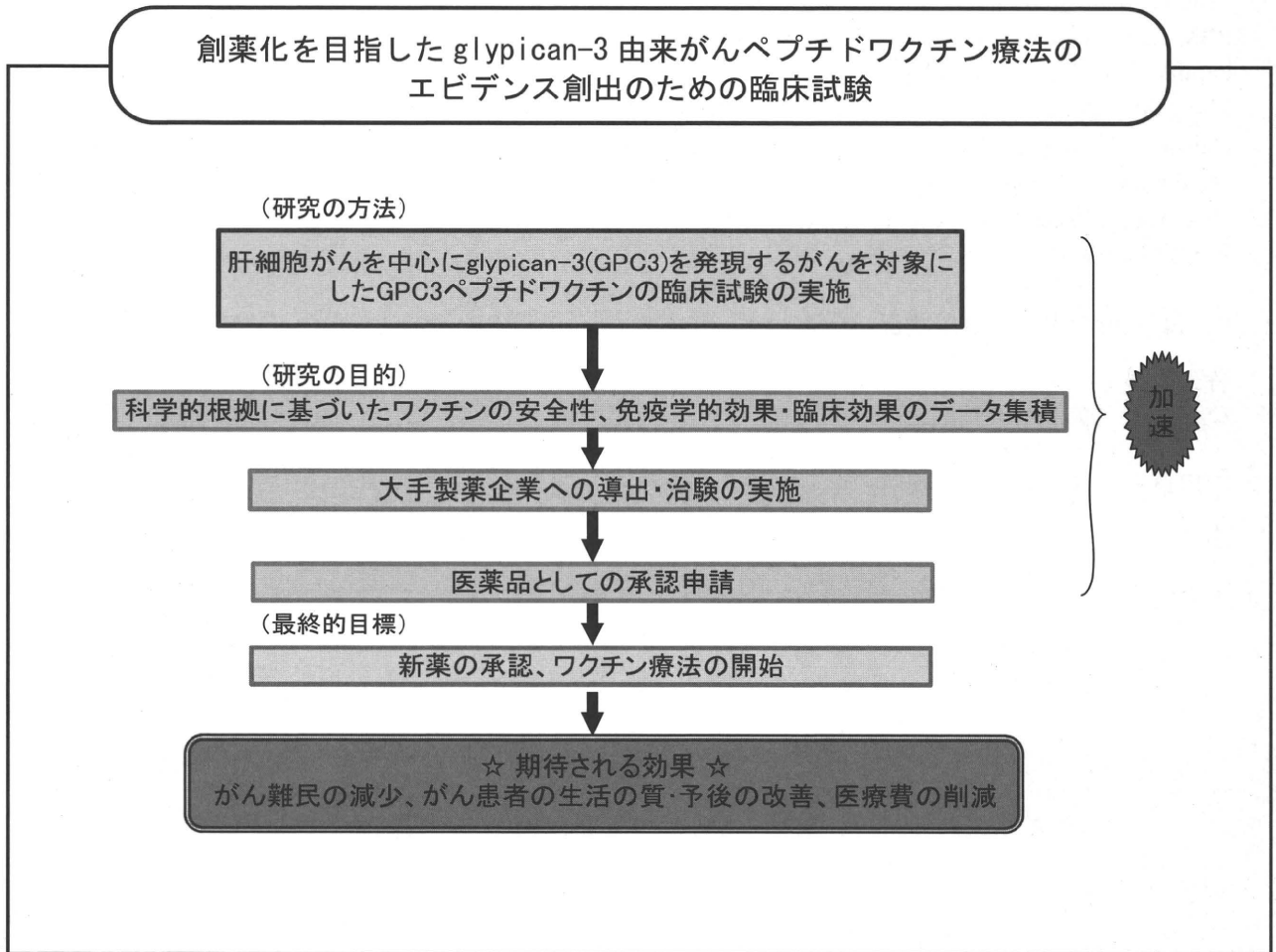
2. 実用新案登録

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	国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長
研究分担者	木下 平	国立がん研究センター東病院 副院長
	小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長
	小西 大	国立がん研究センター東病院 消化管腫瘍科 科長
	池田 公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 副科長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 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
	建石 良介	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教
	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
	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
	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相試験の結果を踏まえて、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験として2種類の臨床試験を計画した。腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験を国立がん研究センター倫理審査委員会に申請し、承認され、スタートした。ソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価する多施設共同ランダム化比較試験も計画し、まずは国立がん研究センター東病院での実施を目指して、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。近々承認予定で、承認後は東病院でスタートし、その他の施設では各施設のIRB承認後に体制が整い次第スタートする予定である。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、順調に症例登録が進んでおり、早急な40例登録完了を目指す。陽子線治療とGPC3ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験も計画し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。GPC3ペプチドワクチン療法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ており、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す。

A. 研究目的

本研究は、肝細胞がんを中心としてGPC3を発現するがんを対象に、GPC3ペプチドワクチン療法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ており、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。製薬企業は引き続き関心を示しており実現の可能性は高い。

我々は肝細胞がんのがん胎児性抗原GPC3を同定しその有用性を報告してきた。基礎研究の成果を基に、国立がん研究センター東病院において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相試験を実施した結果、安全性とほぼ全例でのペプチド特異的キラーT細胞(CTL)の誘導効果を確認しており、63%の症例に最低2ヶ月間は腫瘍を増悪させない効果が、76%には腫瘍マーカーの低下

が認められた。また17%の症例では、腫瘍の縮小、消失、懐死などの臨床的な効果も認められ、30mg、3回投与の1例では著明な腫瘍縮小効果が出現した。総合的に判断して推奨投与量は3.0mgに決定した。

この結果を受け、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、倫理審査委員会承認後に実施する。ペプチドワクチンは、がんの再発予防や予防においてより有効であると見込まれるが、既に、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相試験をスタートし、順調に症例登録が進んでいる。

また、国立がん研究センター東病院では、高度先進医療として原発性肝細胞がんに対する陽子線治療を行っており、その治療成績は、他の肝細胞がん根治的治療に匹敵することが判明しつつある。切除・穿刺局所療法と並ぶ根治的治療法としてその有用性が示されつつある陽子線治療について、GPC3

ペプチドワクチンを併用することでその再発抑制に対する有効性を検討する第Ⅱ相試験も計画する。

B. 研究方法

(1) 臨床第Ⅰ相試験の結果の解析

完了した臨床第Ⅰ相試験の結果をふまえ、最も臨床効果の出た Partial Response (PR) の症例と、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出されたが短期での臨床効果が見出せず PD になった症例の GPC3 と HLA class I の発現を免疫組織化学的に解析した。

(2) 肝切除あるいはラジオ波焼灼療法によ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 40 例。

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、本登録時適格基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。

(3) 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Ⅱ相試験

完了した臨床第Ⅰ相試験の結果をふまえ、有効性を証明するための適切なプロトコールを作成して、倫理審査委員会承認後に実施する。現状では、進行がんに対しては効果が限定的であることは否めないため、進行がんに対する薬としての承認申請を目指すためにはプロトコールが重要であると考えており、慎重に最適のプロトコールを検討した。

(4) 陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験

現在進行中の肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験を参考にプロトコールを作成した。

[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

研究は国立がん研究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で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。

C. 研究結果

- 完了した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相試験において、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 (PR) が出現したが、この症例では末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加も顕著であり、免疫染色においても GPC3 と HLA class I の発現も認めた。一方、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された同じく 30mg、3 回投与の症例では短期での臨床効果が見出せず PD であったが、この症例は免疫染色で GPC3 も HLA class I の発現も認めなかった。
- 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、順調に症例登録が進んでおり、早急な 40 例登録完了を目指す。
- 進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験を国立がん研究センター倫理審査委員会に申請し、承認され、スタートした。予定登録数はペプチドワクチン投与前後の腫瘍生検が施行された症例 (評価症例) が 20 例に達するまで。末梢血中のペプチド特異的 CD8 陽性 T 細胞の頻度の解析だけでなく、腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞浸潤も評価して GPC3 由来ペプチドワクチン療法のさらなる免疫学的エビデンスを得ることを主目的に計画した。
- ソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価する多施設共同ランダム化比較試験を計画し、まずは国立がん研究センター東病院での実施を目指して、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。近々承認予定で、承認後は東病院でスタートし、その他の施設では各施設の IRB 承認後に体制が整い次第スタートする予定である。予定登録数：84 例 (各群 42 例)。主要評価項目は、全生存期間。データセンターに委託して臨床試験の質を確保した。
- 陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験を計画し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。予定登録数は 20 例。主要評価項目は、治療対象標的病変以外の新病変出現抑制効果としての 2 年再発率。近々承認予定で、承認後は東病院でスタートし、可能であれば多施設への展開

も検討している。

D. 考察

進行肝細胞がんにおいては、ペプチドワクチン投与後に CTL ががんの中に入るかを検討する臨床試験と、ソラフェニブとの併用効果を検討するランダム化比較試験を実施する。また、再発しやすい肝細胞がんの再発予防を目的とした臨床試験としては、現行の切除後、ラジオ波後の臨床試験に加え、新たに陽子線治療との併用の臨床試験を計画した。

E. 結論

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 相試験の結果を踏まえて、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験として 2 種類の臨床試験を計画した。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、順調に症例登録が進んでおり、早急な登録完了を目指す。陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第 II 相試験も計画し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。

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.* 24(2): 521-528, 2010.
- 2) Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G₁ arrest induction. *Cancer Sci.* 101(4):913-919, 2010.
- 3) Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, Kudo M, Nakachi K, Ueno H, Yamashita T, Ueshima K. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 101(12):2606-2611, 2010.
- 4) Kanai F, Yoshida H, Tateishi R, Sato S, Kawabe T, Obi S, Kondo Y, Taniguchi M, Tagawa K, Ikeda M, Morizane C, Okusaka T, Arioka H, Shiina S, Omata M. A phase I/II trial of the oral antiangiogenic agent TSU-68 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67:315-324, 2011.
- 5) 中面哲也, がん抗原の同定法と種類 それを用

いた免疫療法、次世代ワクチンの産業応用技術 (神谷齊 監修)、シーエムシー出版、p213-218, 2010.

- 6) 中面哲也, ペプチドワクチンの開発から臨床応用に向けた新たな展開、胆と膵 32(2):135-140, 2011.
- 7) 中面哲也, ペプチドワクチン 国内で臨床試験の行われているペプチドワクチン療法 GPC3、月刊Mebio 27(12):49-55, 2010.
- 8) 中面哲也, 免疫療法、理大科学フォーラム、2010年11月号、p32-35, 2010.

2. 学会発表

- 1) Prognostic value of postoperative alpha-fetoprotein level on recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yuichiro Kato, Naoto Gotohda, Shinichiro Takahashi, Masaru Konishi, Taira Kinoshita, Tetsuya Nakatsura. AACR 101th Annual Meeting 2010 (Washington, DC), April 17-21, 2010.
- 2) 肝細胞がん免疫療法で立ち向かう、中面哲也 ランチョンセミナー6、第22回日本肝胆膵外科学会・学術集会 (仙台)、2010年5月26~28日
- 3) 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、吉川聡明、中津川宗秀、酒村智子、信岡大輔、土原昌巳、白川博文、黒沼俊光、中面哲也 第14回日本がん免疫学会総会 (熊本)、2010年7月22~23日
- 4) Glypican-3-derived peptide vaccine therapy for cancer. (Workshop 3: The present status and the future perspective in cancer vaccine) Tetsuya Nakatsura. 9th International Conference of The Asian Clinical Oncology Society (第9回アジア臨床腫瘍学会学術集会) (岐阜)、2010年8月25~27日
- 5) 肝細胞癌における血清腫瘍マーカーとしての Glypican-3 の有用性、鈴木史朗、土原昌巳、齋藤由美、熊田卓、中面哲也 第30回日本分子腫瘍マーカー研究会 (大阪)、2010年9月21日
- 6) 国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み、中面哲也 第7回DIA日本年会 (東京)、2010年10月28~29日
- 7) Glypican-3を標的としたがんワクチン、中面哲也 シンポジウム20「がん免疫療法」第48回日本癌治療学会学術集会 (京都)、2010年10月28

～30日

- 8) 国立がん研究センター東病院におけるがんペプチドワクチン療法臨床試験の経験から、中面哲也 日本がん免疫学会緊急シンポジウム「がんワクチン治療の現状と臨床」(東京)、2010年10月30日
- 9) 肝がんの免疫療法、中面哲也 特別企画【最近の話題】1、第38回日本肝臓学会東部会(東京)、2010年12月2～3日
- 10) The Frequency of Glypican-3 Peptide-Specific Cytotoxic T-Lymphocytes Changes after Treatment for Hepatocellular Carcinoma. Daisuke Nobuoka, Yutaka Motomura, Hirofumi Shirakawa, Toshiaki Yoshikawa, Toshimitsu Kuronuma, Mari Takahashi, Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Noriko Sakemura, Manami Shimomura, Kazutaka Horie, Toshiyoshi Fujiwara, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1日～3日
- 11) Establishment of High Avidity CTL Clones from PBMCs of Patients Vaccinated with Glypican-3 Peptide. Toshiaki Yoshikawa, Shiro Suzuki, Munehide Nakatsugawa, Hirofumi Shirakawa, Daisuke Nobuoka, Noriko Sakemura, Yutaka Motomura, Tetsuya Nakatsura. The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference (浦安)、2011年3月1日～3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