

## 悪性黒色腫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	斎田 俊明	信州大学医学部 皮膚科 特任教授
	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
	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

### 研究要旨

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傾向があるが、今回、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。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、悪性黒色腫細胞株に対する反応と細胞傷害性の検討を行った。用いた HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは GPC3 の発現レベルの低い悪性黒色腫細胞株に対しても IFN- $\gamma$  ELISPOT assay にて IFN- $\gamma$  の産生が確認でき、細胞傷害活性を示した。

### A. 研究目的

GPC3 は、まず肝細胞がんの特異的に高発現することが同定されたがん胎児性抗原であるが、その後の研究において、悪性黒色腫、小児がん、肺扁平上皮がんなどでも発現することが報告されてきている。昨年度までの検討から悪性黒色腫での GPC3 発現の程度は、肝細胞がん比すると細胞株においても組織検体においてもタンパク質レベルでは少ない発現量であるものの、mRNA レベルでは高い陽性率を示している。今回、悪性黒色腫に対する GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の妥当性を評価するための基礎的検討を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

進行肝細胞がん患者を対象とした臨床第 I 相試験に参加した 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、悪性黒色腫細胞株（HLA-A0201 陽性 GPC3 陽性である CRL1579 および 526mel1、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- $\gamma$  ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

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 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。

### [倫理面への配慮]

本研究において、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

用いた 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- $\gamma$  ELISPOT assay において、GPC3 特異性（GPC3-siRNA 導入により GPC3 発現量を低下させることでの CTL の免疫応答の抑制）および HLA-class I 拘束性（抗 HLA-class I 抗体による選択的免疫応答の阻止）を示した。MM-LH. A2 に対する IFN- $\gamma$  ELISPOT assay からは HLA-A2 拘束性が示された。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 526mel1）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。

#### D. 考察

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。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。肝細胞がんに対して 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。

#### E. 結論

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クロームは、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- $\gamma$  ELISPOT assay にて IFN- $\gamma$  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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

##### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 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

## 小児がん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 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  
塩田 曜子 国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 医員  
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  
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 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

### 研究要旨

GPC3 は小児がんにおいても肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍などで発現している。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で承認される予定であり、承認後に多施設で臨床試験をスタートする。また、今回、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、小児がん（腎芽腫および肝芽腫）細胞株に対する反応と細胞傷害性の検討を行った。HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは両小児がん細胞株に対しても GPC3 特異的および HLA-class I 拘束性の免疫反応を示した。

### A. 研究目的

GPC3 は、まず肝細胞がんの特異的に高発現することが同定されたがん胎児性抗原であるが、その後の研究において、悪性黒色腫、小児がん、肺扁平上皮がんなどでも発現することが報告されてきている。これまでの検討から小児がんでは細胞株においても組織検体においても HLA class I の発現低下が認められている。今回、GPC3 陽性小児がんである、腎芽腫および肝芽腫に対する GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の妥当性を評価するための基礎的検討を行うことを目的とした。

また、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試験のプロトコールを作成し、倫理審査委員会に申請して早急な臨床応用を目指す。

### B. 研究方法

進行肝細胞がん患者を対象とした臨床第 I 相試験に参加した 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、腎芽腫細胞株 (G-401) および肝芽腫細胞株 (Huh-6) に対する基礎的検討を IFN- $\gamma$  ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

また、当初は聖路加国際病院と大阪市立総合医療

センターで臨床試験をスタートする予定であったが、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おした。

### [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

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- $\gamma$  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- $\gamma$  ELISPOT assay において、GPC3 特異性 (GPC3-siRNA 導入により GPC3 発現量を低下させることでの CTL の免疫応答の抑制) および HLA-class I 拘束性 (抗 HLA-class I 抗体による選択的免疫応

答の阻止)を示した。また、G-401に対して細胞傷害活性 (Calcein-AM-based Terascan assay および CD107a mobilization assay)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で承認される予定である。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは、他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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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、胆と臍 32(2):135-140, 2011.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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—外科的立場から— 小児がん 47(1):40-45, 2010.

#### 2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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

## 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

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 吉川 史隆 名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 教授

### 研究要旨

GPC3 を発現する悪性卵巣腫瘍に対する 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。臨床試験開始に向けて、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、2010 年 6 月より共同研究施設である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」をスタートさせた。ペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者における Ex vivo IFN $\gamma$  ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにて 4 症例中 3 症例においてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認できた。また、基礎的検討では、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 クロームは卵巣明細胞腺がん株に対しても GPC3 ペプチド特異性および HLA-class I 拘束性を示した。

### A. 研究目的

HLA-A24 あるいは-A2 陽性である卵巣明細胞腺がん患者を対象に、「HLA-A24 および-A2 結合性 GPC3 由来ペプチドワクチン療法」の有効性を評価、検討できるプロトコールを作成し、臨床第Ⅱ相試験をスタートさせ、ペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者における免疫学的モニタリングを行うことを目的とした。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 クローム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行った。

### B. 研究方法

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- $\gamma$  ELISPOT assay (GPC3 ペプチド特異的 spot 数 / PBMC  $5 \times 10^5$ ) 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 クローム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- $\gamma$  ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

### [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

ペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者における Ex vivo IFN $\gamma$  ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにて 4 症例中 3 症例においてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認できた。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が確認できつつある。HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クロームを用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対して行った基礎的検討では、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay 及び細胞傷害性試験により、GPC3 ペプチド特異性が認められ、HLA-A0201 陽性および GPC3 陽性である卵巣明細胞腺がん細胞株 KOC-7c を傷害した。HLA-A0201 陰性明細胞腺がん細胞株 TOV-21G に HLA-A0201 遺伝子を導入し、強制発現させた TOV-21G. A2 に対しても IFN- $\gamma$  ELISPOT assay にて HLA-A2 拘束性を示した。KOC-7c に対する、抗 HLA-class I 抗体によるブロック試験では、抗

体量に依存した CTL クローンの選択的免疫応答の阻止が、ELISPOT アッセイ、細胞傷害性試験ともに確認でき、HLA-class I 拘束性が認められた。shRNA 導入により GPC3 の発現量を低下させた場合の解析でも ELISPOT アッセイ、細胞傷害性試験ともに GPC3 特異的 CTL クローンの免疫応答の抑制が確認され、用いた CTL クローンは卵巣明細胞腺がん株に対しても GPC3 特異性を示した。GPC3 陽性と考えられる様々ながん種での 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、リアルタイム PCR によって解析した mRNA レベル、FACS による細胞膜表面上のタンパク発現レベル共に GPC3 の発現量と ELISPOT アッセイにおけるスポット数には相関関係が認められた。さらに細胞膜表面上の GPC3 タンパク量との関係については、FACS を用いて GPC3 陽性分画と陰性分画に分取して解析した検討を加え、GPC3 の発現量が多いほど ELISPOT アッセイにおけるスポット数が多く、CTL クローンに傷害されやすいことが確認された。軽度の増殖抑制はおこなうもののアポトーシスはきたさない程度の subtoxic な抗がん剤用量であっても、前治療を併用することで CTL による細胞傷害効果の上乗せがみられる細胞傷害性試験の結果を得た。

#### D. 考察

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 クローン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の上乗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ー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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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、胆と膝 32(2):135-140, 2011.
- 5) 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.
- 6) 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) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

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



## 肺がん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 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

### 研究要旨

Glypican-3 (GPC3)は肺の扁平上皮がんの約半数の症例に発現しているとの報告があるが、我々の検討でも、約半数の肺扁平上皮がんにおいて GPC3 蛋白の発現を認めている。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倫理審査委員会に申請した。承認後に臨床試験をスタートする。また、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。

### A. 研究目的

Glypican-3 (GPC3)は肺の扁平上皮がんの約半数の症例に発現しているとの報告がある。我々の昨年度の研究でも同様の結果が得られた。今年度は 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、最適なプロトコルを作成して倫理審査委員会に申請し、臨床試験のスタートを目指した。また札幌医大との共同研究で、我々は、肺がんの約半数の症例で発現している新規肺がん抗原 Lengsin を標的とした肺がん免疫療法の確立を目的として、Lengsin 由来 HLA-A\*0201 拘束性 CTL エピトープの同定を行った。

### B. 研究方法

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。

#### [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

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。

コンピューターアルゴリズム (BIMAS) を用いて 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。次に、ヒト末梢血単核球を HHD マウスで CTL 誘導が可能であったその 2 種類のペプチドでそれぞれ刺激したところ、2 種類のペプチド各々に対する特異的な CTL が誘導され、さらにペプチド特異的 CD3+CD8+ CTL クローンが樹立された。ペプチド特異的 CTL クローンを用いて、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。

### D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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、胆と膝 32(2):135-140, 2011.
- 5) 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.
- 6) 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) 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
- 2) 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

- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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

## 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

## 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

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

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 GPC3 特異的 CTL クローンを樹立できた。また、新規 CTL 誘導法により、簡便な方法で約 50ml の採血量から細胞移入療法を行う数の CTL を誘導することが可能となった。細胞の増加率には個人差がみられたが、培養前の PBMC の情報から培養後得られる CTL 数を予測出来る可能性が見込まれた。NOD/Scid マウスを用いた *in vivo* 試験において、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された。また、これまでに樹立した GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を単離しており、TCR 遺伝子導入細胞移入療法へ向けた検討も行っている。

### A. 研究目的

GPC3 ペプチドワクチン投与患者の PBMC 中に検出される GPC3 ペプチド特異的 CTL のクローン樹立を試みた。がん患者に対する抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 療法の臨床応用を目指し、ペプチド特異的な CTL を効率良く誘導する培養方法を確立すること、及び、免疫不全マウスを用いて、ペプチド特異的 CTL のがんに対する治療効果を実証することを目的とした。

### B. 研究方法

GPC3 ワクチン投与患者末梢血単核球 (PBMC) を GPC3 ペプチドと IL-2 で刺激し、GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導した。Dextramer ソート、Ex vivo Dextramer ソート、CD107a ソートの 3 通りの方法から、FACS Aria 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。CTL クローンの機能解析として、GPC3-Dextramer 再解析、癌細胞株をターゲットに用いた IFN- $\gamma$  ELISPOT assay、及び細胞傷害性試験を行った。

新規 CTL 誘導法により GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導した。誘導された CTL を Dextramer アッセイにより評価した。NOD/Scid マウス 1 匹につき両側に肝癌細胞株 SK-Hep-1/hGPC3 (SK/hG) と SK-Hep-1/vec (SK/vec) を移植し、誘導されたエフェクター細胞を 2 回尾静脈投与し、腫瘍径を測定した。エフェクター細胞としては、CTL クローン、誘導された細胞 (all)、誘導された細胞中の CD8<sup>+</sup>T 細胞のみ、誘導された細胞から CD8<sup>+</sup>T 細胞を除いた CD8<sup>-</sup>群、コントロールとして PBS を使用した。

#### [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

患者 3 名 (A2-9、A2-14、A2-8) の PBMC から 3 通りの方法で CTL クローンを樹立した。GPC3-Dextramer 再解析により、樹立した CTL クローンの GPC3 ペプチド特異性が認められた。また、その親和性はそれぞれ A2-9:10-10 M、A2-14:10-10 M、A2-8:10-11 M であり高親和性であった。これらの CTL クローンは HLA-A\*02:01 陽性、GPC3 陽性肝癌細胞株に対して IFN- $\gamma$  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 526mel1 に対しては、最も高親和性である A2-8 クローン (10-11 M) のみが IFN- $\gamma$  産生及び細胞傷害性を示した。さらに、CTL クローンの IFN- $\gamma$  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 クローンの IFN- $\gamma$  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 ( $2 \times 10^6$  個) から GPC3 ペプチド特異的 CTL が誘導可能である ( $1.8 \times 10^5$  個 ~  $6.1 \times 10^7$  個、増加率: 490 倍 ~ 170,000 倍) ことが確認された。さらに細胞ソーティングにより GPC3 CTL クローンの作製に成功しており、細胞傷害活性等の機能評価に用いることができた。*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  $\gamma$  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。

#### D. 考察

GPC3-siRNA 導入による解析から、GPC3 特異的 CTL クローム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 クロームは、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 クロームを樹立するために 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 クロームが樹立された。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<sup>+</sup>, GPC3<sup>+</sup>癌細胞株を傷害し得る GPC3 ペプチド特異的 CTL クロームを複数樹立した。現在、CTL クロームからの 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。

#### E. 結論

樹立した CTL クロームの解析により、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が示された。

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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) 肝細胞がんに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
- 2) 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細胞クロームの樹立、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
- 3) Simple and useful *ex vivo* expansion of antigen-specific CTLs and V $\gamma$ 9V $\delta$ 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回国際免疫学会会議) (神戸)、2010年8月22~25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) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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

## 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

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

がんに対するペプチド特異的免疫療法の効果を増強するための方法の開発が求められている。われわれはがん細胞表面の HLA class I に載ったペプチドの密度が多くの患者で十分に高くはないことに注目し、標的細胞であるがん細胞の抗原性を高めることができれば、ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が効率よくがんを集積してがん細胞がこれら CTL に殺傷されやすい状況が作り出せると考えた。本研究では、*in vitro* ではがん細胞にペプチドパルスを行うことにより、*in vivo* では腫瘍を穿刺してペプチド溶液を注入することにより、CTL 反応や抗腫瘍効果が生じることが示された。本法は、理論的に免疫療法の特異性をさらに増強させる方法であり、がんの個別化治療におけるオプションの一つとして癌免疫療法のブレイクスルーに貢献する可能性を秘めた新戦略と考えている。

### A. 研究目的

がんに対する特異的免疫療法は、安全で有効な新規抗がん療法として大いに注目されている分野であるが、現時点では特に進行がんにおける免疫療法単独の抗腫瘍効果には限界があることも事実である。世界中から報告される免疫療法に関する臨床試験の結果は、免疫反応の誘導は確認される一方で臨床効果については不十分なものが多い。そこで、誘導された免疫反応を臨床効果へと結び付け、より強い臨床効果を導くための研究が重要であると考えられた。

がん細胞表面の HLA class I に載ったペプチドの密度が高ければ高いほどペプチド特異的 CTL の殺傷能力が増すことがわかっているが、患者によってがん細胞表面の HLA class I に提示されているペプチドの密度は様々であり、しかも多くの患者では十分に高くはないと考えられている。本研究では、標的細胞であるがん細胞の抗原性を高め、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が効率よくがんを集積してがん細胞がこれら CTL に殺されやすい状況を作り出すことに焦点を絞り、『ペプチドを腫瘍内へ局所投与することにより、がん細胞表面のペプチドの密度を高めることができれば、ペプチド特異的 CTL が効率よくがんを集積し、殺傷能力が高まる。』という仮説のもとに基礎研究を行った。

### B. 研究方法

まず *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 $\gamma$  ELISPOT 法および細胞傷害性試験により確認した。これらの実験には glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンを受けた患者の末梢血単核球より樹立した GPC3 ペプチド特異的

CTL クローン、および健常者の末梢血単核球より樹立したサイトメガロウイルス (CMV) ペプチド特異的 CTL クローンを使用した。

続いて、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 $\gamma$  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。

最後に、よりペプチド特異的免疫療法を受けている患者の状態に近いモデルとして、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な努力を払っている。

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

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 クローン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

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

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. 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. 学会発表

なし

## 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

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表



書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	神谷齊 監修	次世代ワクチンの産業応用技術	シーエムシー出版	東京	2010	213-218
木庭幸子	メラノーマに免疫療法は有効か？	西條長宏 監修	EBMがん化学療法・分子標的治療法 2010-2011	中外医学社	東京	2010	602-608

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, <u>Konishi M</u> , <u>Kinoshita T</u> , <u>Nakatsura T</u> .	Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma.	Oncol Rep.	24(2)	521-528	2010
Horie K, Tsuchihara M, <u>Nakatsura T</u> .	Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G <sub>1</sub> arrest induction.	Cancer Sci.	101(4)	913-919	2010
<u>Furuse J</u> , 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
Kanai F, Yoshida H, <u>Tateishi R</u> , Sato S, Kawabe T, Obi S, Kondo Y, Taniguchi M, Tagawa K, <u>Ikeda M</u> , 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
Goto E, <u>Tateishi R</u> , 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
Takata M, Murata H, <u>Saida T</u> .	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

Umezu T, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nawa A, <u>Kikkawa F.</u>	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
Sakurai M, Shibata K, Umezu T, Kajiyama H, Yamamoto E, Ino K, Nawa A, <u>Kikkawa F.</u>	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
Shimada Y, Ishii G, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, <u>Nagai K.</u>	Extratatumoral 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
Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A, Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y, Nakamori K, Nagai I, <u>Sato N.</u> , 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
<u>中面哲也</u>	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（特集：膵癌・胆道癌に対する免疫療法、ワクチン療法の新展開）	胆と膵	32(2) (2011年 2月号)	135-140	2011
<u>中面哲也</u>	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（特集：がん免疫療法の進歩と問題点ーペプチドワクチン療法、抗体療法、細胞療法ー）	月刊 Mebio	27(12) (2010年 12月号)	49-55	2010
<u>中面哲也</u>	免疫療法（特集：がん治療の最前線）	理大科学フォーラム	2010年 11月号	32-35	2010
<u>木庭幸子</u>	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
<u>山崎直也</u>	メラノーマの進行期における治療戦略	MB Derma	166	26-32	2010
田尻達郎, <u>木下義晶</u> , 宗崎良太, 田中桜, 東真弓, <u>孝橋賢二</u> , 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

## V. 研究成果の刊行物・別刷

## 2 がん抗原の同定法と種類, それを用いた免疫療法

中面哲也\*

### 2.1 はじめに

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

現在までに, 様々ながん拒絶抗原およびペプチドが同定され, 海外では, 各種がんの効果的ながん抗原ペプチド, 蛋白, 遺伝子, ウイルスベクター, 患者自己腫瘍由来抗原蛋白, がん抗原感作樹状細胞を利用したがんワクチンの開発が精力的に行われ, 臨床試験が進められている。最近ではいくつかの第3相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でも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。

本稿では, われわれの研究成果を含めて, がん抗原の同定法と種類, それを用いた免疫療法について概説する。

### 2.2 理想的ながん拒絶抗原が備えているべき性質

免疫療法への応用を考える場合には, 多くの患者に適用できるかという汎用性, がん特異性, 免疫原性, がん拒絶能, 抗原消失性および自己免疫などの有害事象誘導の危険性などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的ながん拒絶抗原が備えているべき性質として, ①がん患者の体内において免疫応答を誘導する抗原, ②発現の組織特異性が優れた抗原, ③免疫系からの逃避が起こりにくい抗原, の3つが重要である。

### 2.3 ヒトがん抗原の同定方法

現在までに同定されているヒトがん抗原を分類すると, ①cancer-testis (CT) 抗原, ②組織

---

\* Tetsuya Nakatsura 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