

膵癌・胆道癌に対する免疫治療、ワクチン療法の新展開

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

中面 哲也¹⁾

要約：われわれが cDNA マイクロアレイデータを用いて同定した肝細胞癌特異的な癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) 由来のペプチドワクチン療法の臨床第 I 相試験を完了した。安全性、免疫学的有効性に加え、ある程度の臨床効果の手ごたえのようなものが得られたが、有効性に関しては、今後の臨床第 II 相試験で確認していく。また、GPC3 ペプチドを投与された癌患者の末梢血単核球 (PBMC) より、GPC3 ペプチド特異的 CTL を効率よく誘導し増幅させる技術を確立しており、また、たくさんの GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立している。GMP 準拠の細胞培養施設 Cell Processing Center (CPC) を利用してまずは GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の実施を目指している。さらに、現在開発を進めようとしている胆膵癌にも高発現している HSP105 を標的としたペプチドワクチン療法の開発計画についても述べ、癌ワクチン療法の臨床導入への問題点についても言及したい。

Key words : ペプチドワクチン, Glypican-3 (GPC3), CTL, HSP105

I. 免疫療法における科学的根拠

もう治療がないと言われ、積極的治療が受けられなくなった進行癌患者の多くが民間療法や健康食品などに頼っている中で、免疫療法への期待や需要は大きい。あるいは、再発予防や予防法としての期待も高まっている。免疫療法は癌の第 4 の治療法と言われて久しいが、残念ながらもまだ標準治療としては確立されていないのが現状である。適切な臨床試験と基礎研究の繰り返しによる科学的根拠に基づいた癌免疫療法の開発の必要がある。

1991 年に Boon ら¹⁾によりメラノーマ抗原 MAGE 遺伝子が同定され、ヒトの免疫系が癌を異物として認識し、排除しうること科学的根拠が与えられた。すなわち、癌化に関連して特異なタンパクが産生されると、これらに由来するペプチドが、HLA クラス I 分子

に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺細胞傷害性 T 細胞 (キラー T 細胞, CTL) がこれらを識別して活性化され、癌細胞を破壊するというメカニズムが存在する。現在までに、さまざまな癌拒絶抗原およびペプチドが同定され、それらを用いた臨床試験が世界中で行われている。米国 NCI の Rosenberg ら²⁾ は、2004 年の Nature Medicine に癌ワクチンの Review として、440 例中 CR, PR の response rate はわずか 2.6% であったと報告したが、そのことは 2009 年の米国癌学会でも議論になり、ペプチドワクチン単独では進行癌にはあまり有効ではないかもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長等の可能性はあり、再発予防にも有効な可能性はある、またさまざまな免疫抑制分子に対する抗体との併用などに期待が持てるとの意見も多かった。一方、最近、日本国内のさまざまな施設から癌に対するペプチドワクチンの有効例の報告も散見される。以下、概要を表 1 に示す。

最近では、前立腺癌に対して「Provenge」という樹状細胞療法が FDA に承認され話題になったが、その他にもいくつかの第 III 相臨床試験での有効性も報告されている。一方では、最近、子宮頸癌の予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのは、癌の再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用い

Development and Translational Research of Peptide Vaccine

Tetsuya Nakatsura

1) 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 (〒 277-8577 柏市柏の
業 6-5-1)

表 1 癌ペプチドワクチン療法臨床試験の臨床効果の報告

報告施設	癌ワクチンの種類	臨床効果	文献
NCI	癌ワクチンの Review	440 例中の奏効率率はわずか 2.6%	2
大阪大	WT1 ペプチド	骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、乳癌、肺癌、脳腫瘍などで有効例	3~5
札幌医大	サブイビン 2B ペプチド	進行大腸直腸癌で奏効例	6, 7
久留米大	テラーメード癌ペプチド	子宮頸癌、大腸癌、脳腫瘍、膀胱癌で著効例	8, 9
近畿大	CA9 ペプチド	腎癌で複数の奏効例	10
山口大	KOC1, RNF43, TOMM34, VEGFR1, VEGFR2 の 5 種類のペプチド	大腸癌で奏効例	11
山梨医大	TTK, LY6K (URLC10), IMP-3 (KOC1) の 3 種類のペプチド	食道癌で奏効例	12
岩手医大	MPHOSPH1, DEPDC1 のペプチド	膀胱癌での抗腫瘍効果	13
和歌山医大	VEGFR2 ペプチド	切除不能進行肺癌に生存期間延長の期待	14
当院	GPC3 ペプチド	進行肝細胞癌で奏効例	15

た根治治療後の再発予防法や癌発症予防法の開発も必要である。本稿では、まずわれわれが先行して研究している胆膵癌には発現の認められない glypican-3 (GPC3) 由来ペプチドを用いたワクチン療法について述べたあとで、現在開発を進めようとしている胆膵癌にも高発現している HSP105 を標的としたペプチドワクチン療法の開発計画についても述べたいと思う。

II. 理想的な癌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、癌特異性、免疫原性、癌拒絶能、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。理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として、①癌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三つが重要である。

III. 癌特異的抗原 Glypican-3 (GPC3) の同定

われわれは、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授（現国立がん研究センター研究所長）との共同研究により、cDNA マイクロアレイを利用した 2 万種類を越える遺伝子の肝細胞癌と正常組織における発現解析データを用いて、肝細胞癌特異的な癌胎児性抗原として GPC3 を同定した。GPC3 遺伝子および蛋白質は、ほとんどの肝細胞癌組織ならびに細胞株で高発現するが、正常組織においては、胎生期の肝臓あ

るいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現がみられない。GPC3 は肝細胞癌の腫瘍マーカーとしても有用であることも示した¹⁶⁾。われわれは、GPC3 が理想的な腫瘍拒絶抗原になりえるかどうかを検討した。日本人の約 60% が陽性である HLA-A24 と BALB/c マウスの MHC クラス I 分子の K^d にはほぼ同じペプチドが結合することがわかっている。さらに、ヒトとマウスの GPC3 では、93% のホモロジーを認めることから、HLA-A24, K^d のいずれにも結合しうる GPC3 由来のペプチドを合成した。これらを BALB/c マウスに免疫して解析し、K^d 拘束性の HLA-A24 結合性 CTL エピトープペプチド (EYILSLEEL) を同定した¹⁷⁾。同様にこれらを HLA-A24 transgenic mouse (Tgm) に免疫して解析した結果もやはり、同じ CTL エピトープペプチド (EYILSLEEL) が同定された。この HLA-A24 結合性 GPC3 由来ペプチド (EYILSLEEL) を用いて、ヒトの HLA-A24 陽性の肝細胞癌患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができた¹⁸⁾。GPC3 特異的 CTL 株を、GPC3 高発現ヒト肝細胞癌細胞株を移植したヌードマウスに移入して、その治療効果を証明した¹⁸⁾。また、日本人の 40% が陽性で、欧米白人のメジャータイプである HLA-A2 拘束性の CTL エピトープペプチドを同定するために、HLA-A2 に結合しうるペプチドを合成し、これらを HLA-A2 Tgm に免疫して解析した。同定した HLA-A2 結合性 GPC3 由来ペプチド (FVGEFFTDV) を用いてヒトの HLA-A2 陽性の肝細胞癌患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数から GPC3 特異的 CTL を誘導することができた¹⁸⁾。また、非常に重要なことであるが、以上のいずれのマウスの実験においても、GPC3 抗原の免疫によって、

ペプチド特異的 CTL が誘導され、抗腫瘍効果は認められたが、自己免疫現象は決して誘導されなかった^{17,18)}。

IV. GPC3 ペプチドワクチンの 臨床第 I 相試験¹⁹⁾

肝細胞癌においては、海外では目立った成績を示す癌ワクチンは開発されていない。国内では、われわれが、HLA-A24、-A2 陽性進行肝細胞癌患者を対象に、GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了した。安全性に問題は無く、ほぼ全例の血液中にペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、その頻度はペプチド投与量が多いほど増えることが示唆された。また、CD8 陽性 CTL が、ペプチドワクチン後の癌組織内に多数浸潤して癌細胞を攻撃していることを、複数の患者さんで証明できた。約 60% の症例において初回ワクチン投与後 2 ヶ月の間に腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認め CT や MRI の画像検査での評価では約 60% の症例で 2 ヶ月間癌の増悪なし (安定 SD) であった。30 mg、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 (部分奏効 PR) が出現した。今後はもう他に治療法がない進行肝細胞癌患者にとって有用であるかを第 II 相試験で検証するとともに、このようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、あるいは CT でみえない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えられ、現在、手術やラジオ波焼灼療法 (RFA) などの肝細胞癌根治的治療後の再発予防効果を検証する第 II 相試験を実施中である。進行肝細胞癌患者にとって有用であるかを検証する第 II 相試験としては、Sorafenib と GPC3 ペプチドワクチンの併用療法と Sorafenib 単独療法を比較する非盲検多施設共同ランダム化第 II 相臨床試験と、GPC3 ペプチドワクチン単独療法の腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する第 II 相臨床試験の 2 種類の試験を計画している。GPC3 は肝細胞癌だけでなく、一部の小児癌 (肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍)、卵巣明細胞腺癌、肺扁平上皮癌にも発現しており、それらの癌種に対しての応用も期待される。卵巣明細胞腺癌を対象とした第 II 相臨床試験は既に名古屋大学で開始されている。GPC3 を発現する小児癌および肺扁平上皮癌を対象とした臨床試験も計画している。

V. Rosenberg らによるヒト癌に対する 強力な免疫療法の報告

米国国立がん研究所 (NCI) の Rosenberg らは、体外で培養した CTL を戻す養子免疫療法 Adoptive-Cell-Transfer therapy に、T 細胞の Homeostatic Proliferation という考え方を組み合わせた免疫療法について発表した²⁰⁾。Homeostatic Proliferation とは、体内のリンパ球の数は一定に保たれており、その数を減らしてやると、新たに移入されたリンパ球が生き延びて一定数に達するまで増殖するという現象である。あらかじめシクロホスファミドとフルダラビンの前投与により患者のリンパ球数を減らしておいて、そこへ大量に増やしておいた、癌細胞を傷害する CTL を移入すると、CTL が体内で長期間にわたって生存し、ついには転移性メラノーマ約 50% の例で劇的な腫瘍縮小をもたらした。今までの癌の免疫療法では考えられないほどの抗腫瘍効果が観察された²¹⁾。最近では、抗癌剤と全身放射線照射にて体内リンパ球除去前処置後、体外で大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を体内へ戻す TIL 養子細胞免疫療法によって、奏効率 70% という驚異的な結果を報告している。一方、この治療で用いられた CTL は、MART-1、gp100 といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドを認識するもので、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された²²⁾。このことは、癌を拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、その CTL が認識する抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。すなわちわれわれは、癌特異的に発現する、あるいは重要な正常臓器には発現しない癌拒絶抗原を同定しなければならない。免疫療法も工夫したり他の治療と併用したりすることでペプチドワクチン単独療法よりもさらに有効な画期的治療法となりえる可能性を十分に秘めている。日本ではメラノーマの患者は少ないが、日本人に多い癌を対象に、癌特異抗原を用いて培養した CTL の養子免疫療法を開発することで、日本人の癌治療に大きなブレイクスルーが起ることは十分期待できる。われわれも、GPC3 ペプチドを投与された癌患者の末梢血単核球 (PBMC) より、GPC3 ペプチド特異的 CTL を効率よく誘導し増幅させる技術を確立しており、また、たくさんの GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立している。GMP 準拠の細胞培養施設 Cell Processing Center (CPC) を利用してまずは GPC3 ペ

チド特異的 CTL 療法の実施を目指している。

VI. 理想的な腫瘍拒絶抗原, HSP105

HSP105 は、ヒトの大腸、膵臓、胆道、食道、咽頭、乳腺、メラノーマなどの多様な癌と正常組織では精米でのみ高発現を認めるため、抗腫瘍免疫療法の格好のターゲットといえる^{22,23}。HSP105 は HSP105/110 ファミリーに属する高分子の熱ショック蛋白で、われわれが腫瘍の SEREX 法 (患者血清中の IgG 抗体で癌の cDNA ライブラリーをスクリーニングして抗原を同定する方法) で同定し²⁴、大腸癌でも同定されている。

われわれは、この発現の組織特異性が優れている HSP105 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になりえることをさまざまなマウスモデルで検討し報告してきた²⁵⁻²⁷。さらに GPC3 と同様に、HLA-A24 と HLA-A2 拘束性の CTL エピトープペプチドを各 2 種類ずつ計 4 種類同定した。HLA-A24 と K^d の両方に結合すると予測されるヒト・マウス HSP105 共通のペプチドを HSP105 のシークエンスより選出し、9 または 10 のアミノ酸からなる 9 種類のペプチドを合成し、これらを BALB/c マウスあるいは HLA-A24 トランスジェニックマウス (Tgm) に免疫して解析し、HLA-A24 結合性 CTL エピトープペプチド (NYGIYKQDL および EYVYE-FRDKL) を同定した。また、HLA-A2 に結合しうる 16 種類のペプチドを合成し、これらを HLA-A2 Tgm に免疫して解析し、HLA-A2 結合性 CTL エピトープペプチド (RLMNDMTAV) を同定した。さらにヒトの HLA-A2 陽性の大腸癌患者の末梢血リンパ球をこれらのペプチドで刺激することで、HSP105 を高発現する癌細胞を高率に傷害できる CTL を誘導できるペプチド (KLMSSNSTDL) を同定した。また、以上のいずれのマウスの実験においても、HSP105 抗原の免疫によって、ペプチド特異的 CTL が誘導され、抗腫瘍効果は認められたが、自己免疫現象は決して誘導されなかった。さらにわれわれは *ex vivo* IFN- γ ELISPOT アッセイを用いて、原発性大腸癌術前患者の 21 例中 14 例 (67%) の末梢血中にこれら 4 種の HSP105 ペプチドのいずれかに特異的な CTL が存在することを示した。現在、膵・胆道癌を含む進行癌患者を対象とした臨床試験を計画中である。

VII. 癌ワクチン療法の臨床導入への問題点

まず、免疫療法自体が、そもそも有望な治療法と思われて来なかったことがブレーキをかけてきた。ペプ

チドワクチンは初めて科学的根拠をもって開発された免疫療法であったが、当初のペプチドワクチンの第 I 相の臨床試験は従来の抗癌剤と同じくもう治療法のないそもそも有効性を証明することが難しい進行癌を対象として実施されてきたため、かえって失望感を与えてしまった。米国 NCI の Rosenberg らの報告² がさらに追い討ちをかけた。この点に関しては、われわれも含めた日本各地のグループから有効例の報告も増えてきて、エビデンスも次第に証明されつつあり、その結果、国内の製薬企業の参画も出てきた。

製薬企業が本気で参画して開発するかどうかは今後癌ワクチン市場がどうなっていくかの鍵を握っている。そのためには、現時点ではわれわれを含めて日本全国で展開されている医師主導の臨床試験でどれだけの説得力のあるエビデンスを出せるかが一番重要であり、必須であると考えているわけであるが、本来は今回計画中の HSP105 ペプチドワクチン療法の臨床試験のようなものに製薬企業が Phase 0 のところから開発に関わって Phase I から治験で行えばもちろん理想的である。日本にはまだまだ体制も不足しており、現場の医師や研究者が苦勞して医師主導の臨床試験を実施しているのが現状である。今後アカデミアが開発したものを医師主導試験で安全性と有効性のある程度示せない製薬企業が開発に乗り出さないという現状を、日本でも最初から企業が参画して治験でやる時代に変えられるのかどうか、われわれの施設もまずはそのモデルケースづくりにも挑戦していきたい。

通常、抗癌剤や分子標的薬などの開発において、大規模な治験に行くためには、大金をつぎ込んだ Phase 0 の毒性試験などの実施が必要であるが、ペプチドワクチンのようなものは従来の抗癌剤の Phase 0 より省略できるところも多いと考えられる。多くの臨床試験が安全性を証明している。PMDA 医薬品機構がどれだけ規制緩和してくれるかもポイントである。日本での癌ワクチンの医師主導の臨床試験は、資金面、体制面とも不足しており、そこで有望そうな結果が出たとしても、しっかりとしたエビデンスを証明できるに至っていないため、製薬企業が開発に乗り出さず、大規模にスピード感を持って進まなかった。国家プロジェクトでできるだけ可能性のある多くの臨床試験に対してしっかりとエビデンスを構築できるような惜しみない支援をし、製薬企業が開発意欲をそそる臨床試験を抬い上げられるような仕組みをつくる必要がある。日本中の患者や、紹介する医師側に、現在登録できる臨床試験のリストがいつでも閲覧できるような仕組みも必要である。

おわりに

腫特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチン等の免疫療法により癌の予防法が確立できれば、国内癌患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものとする。ワクチンはより安価に提供でき、一般の医療施設でもできる治療である。今後示される有効性によっては、抗癌剤治療に頼ってきた癌治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものとする。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、腫特異的免疫療法が癌治療を変える可能性を信じて質の高い研究と臨床試験を繰り返していきたい。

参考文献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Boon T, et al. : A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254** : 1643-1647, 1991.
- 2) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP : Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10** : 909-915, 2004.
- 3) Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, et al. : WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* **20** : 211-220, 2008.
- 4) Izumoto S, Tsuboi A, Oka Y, et al. : Phase II clinical trial of Wilms tumor 1 peptide vaccination for patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* **108** : 963-971, 2008.
- 5) 岡 芳弘, 杉山治夫 : 造血器および固形悪性腫瘍を標的にした WT1 ペプチドワクチン療法. *Biotherapy* **23** : 170-177, 2009.
- 6) Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, et al. : Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, surviving-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med* **2** : 19-29, 2004. <http://www.translational-medicine.com/content/2/1/19>
- 7) 鶴間哲弘, 亀嶋秀和, 岩山祐治, ほか : サバイビン 2B ペプチドワクチン療法-第 1 相臨床試験からの知見. *Biotherapy* **23** : 178-184, 2009.
- 8) 峯 孝志 : テーラーメイド癌ペプチドワクチン療法の解析と実用化へ向けて. *Biotherapy* **23** : 185-191, 2009.
- 9) Yajima N, Yamanaka R, Mine T, et al. : Immunologic evaluation of personalized peptide vaccination for

- patients with advanced malignant glioma. *Clin. Cancer Res* **11** : 5900-5911, 2005.
- 10) Uemura H, Fujimoto K, Tanaka M, et al. : A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12** : 1768-1775, 2006.
 - 11) 畚 彰一, 吉田 晋, 友近 忍, ほか : 大腸癌に対する新しいワクチン療法の展望. *Biotherapy* **23** : 160-164, 2009.
 - 12) Kono K, Mizukami Y, Daigo Y, et al. : Vaccination with multiple peptides derived from novel cancer-testis antigens can induce specific T-cell responses and clinical responses in advanced esophageal cancer. *Cancer Sci* **100** : 1502-1509, 2009.
 - 13) 小原 航, 兼平 貢, 高田 亮, ほか : 膀胱がん, 新規腫瘍抗原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, 63-70, 中山書店, 2009.
 - 14) Miyazawa M, Ohsawa R, Tsunoda T, et al. : Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Sci* **101** : 433-439, 2009.
 - 15) 中面哲也 : 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, 76-83, 中山書店, 2009.
 - 16) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Comm* **306** : 16-25, 2003.
 - 17) Nakatsura T, Komori H, Kubo T, et al. : Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* **10** : 8630-8640, 2004.
 - 18) Komori H, Nakatsura T, Senju S, et al. : Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **12** : 2689-2697, 2006.
 - 19) 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. *Mebio* **27** : 49-55, 2010.
 - 20) Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. : Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298** : 850, 2002.
 - 21) Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. : Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma : evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* **26** : 5233-5239, 2008.
 - 22) Kai M, Nakatsura T, Egami H, et al. : Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human

- tumors. *Oncol Rep* **10** : 1777-1782, 2003.
- 23) Muchemwa FC, Nakatsura T, Fukushima S, et al. : Differential Expression of Heat Shock Protein 105 in melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* **18** : 166-171, 2008.
- 24) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, et al. : Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys Res Comm* **281** : 936-944, 2001.
- 25) Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, et al. : DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4+ and CD8+ T cells. *Cancer Sci* **96** : 695-705, 2005.
- 26) Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, et al. : Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Comm* **343** : 269-278, 2006.
- 27) Yokomine K, Nakatsura T, Senju S, et al. : Regression of intestinal adenomas by vaccination with heat shock protein 105-pulsed bone marrow-derived dendritic cells in *Apc^{Min/+}* mice. *Cancer Sci* **98** : 1930-1935, 2007.

* * *

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

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）

Point

- 肝細胞がん特異的ながん胎児性抗原としてGPC3を同定し、GPC3が肝細胞がんの腫瘍マーカーとしても有用であることも示した。
- 進行肝細胞がん患者を対象としたGPC3由来ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験の結果、免疫学的効果や臨床的な効果が認められた。無増悪期間中央値は4ヵ月、全生存期間中央値は9ヵ月であった。
- GPC3ペプチドワクチン3回投与で終了した後は末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度は持続せず、4回目以降のワクチンは意味があると考えられた。
- 初回肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第Ⅱ相試験を実施中であり、腫瘍量が少なく免疫抑制のない患者での検証が行われている。卵巣明細胞腺がんを対象とした第Ⅱ相臨床試験も行われている。
- わが国でのがんワクチンの医師主導の臨床試験は、資金面、体制面とも不足しており、国家プロジェクトでしっかりとエビデンスを構築できるような支援が必要とされる。

がんの免疫療法の概念はすでに19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこ

から生まれたColey's vaccine (toxin)は、時にはがんの完全退縮を得たが、広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、自然退縮が

起こる。これにはおそらく免疫も関与している。1967年ごろには、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万個、10万個、100万個、1,000万個、1億個とその患者の皮下に移植した結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することがわかった。これらの研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示しているといえよう。

1991年にBoonらにより、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りことによって、またがん免疫研究は勢いを盛り返し現在に至っている。現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、世界中で臨床試験が進められている。最近では、前立腺がんに対して「Provenge®」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第Ⅲ相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でもさまざま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。一方では、最近、子宮頸がんの手防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのは、がんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。本稿では、われわれが研究しているglypican-3(GPC3)ペプチドを用いたワクチン療法について述べたいと思う。

がん特異的抗原 glypican-3(GPC3) の同定

われわれは、東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授(現国立がん研究センター研究所長)との共同研究により、cDNAマイクロアレイを利用して2万種類を超える遺伝子の肝細胞がんと正常組織における発現解析データを用いて、肝細胞がん特異的ながん胎児性抗原としてGPC3を同定した。GPC3遺伝子および蛋白質は、ほとんどの肝細胞がん組織ならびに細胞株で高発現するが、正常組織においては、胎生期の肝臓あるいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現がみられない。GPC3は肝細胞がんの腫瘍マーカーとしても有用であることも示した²⁾。われわれは、GPC3が理想的な腫瘍拒絶抗原になりうるかどうかを検討した。日本人の約60%が陽性であるHLA-A24とBALB/cマウスのMHCクラスI分子のK^dにはほぼ同じペプチドが結合することがわかっている。さらに、ヒトとマウスのGPC3では93%のホモロジーを認めることから、HLA-A24、K^dのいずれにも結合しうるGPC3由来のペプチドを合成した。これらをBALB/cマウスに免疫して解析し、K^d拘束性のHLA-A24結合性CTLエピートープペプチド(EYILSLEEL)を同定した³⁾。同様にこれらをHLA-A24 transgenic mouse (Tgm)に免疫して解析した結果もやはり、同じCTLエピートープペプチド(EYILSLEEL)が同定された。このHLA-A24結合性GPC3由来ペプチド(EYILSLEEL)を用いて、

ヒトのHLA-A24陽性の肝細胞がん患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数からGPC3特異的CTLを誘導することができた⁴⁾。GPC3特異的CTL株を、GPC3高発現ヒト肝細胞がん細胞株を移植したヌードマウスに移入して、その治療効果を証明した⁴⁾。また、日本人の40%が陽性で、欧米白人のメジャータイプであるHLA-A2拘束性のCTLエピートープペプチドを同定するために、HLA-A2に結合しうるペプチドを合成し、これらをHLA-A2 Tgmに免疫して解析した。同定したHLA-A2結合性GPC3由来ペプチド(FVGEFFTDV)を用いてヒトのHLA-A2陽性の肝細胞がん患者の末梢血リンパ球を刺激することで、約半数からGPC3特異的CTLを誘導することができた⁴⁾。また、非常に重要なことであるが、以上のいずれのマウスの実験においても、GPC3抗原の免疫によって、ペプチド特異的CTLが誘導され、抗腫瘍効果は認められたが、自己免疫現象は決して誘導されなかった^{3,4)}。

進行肝細胞がん患者を 対象としたGPC3由来 ペプチドワクチンの臨床 第Ⅰ相試験の結果

平成19年2月、臨床第Ⅰ相試験をスタートし、平成21年11月に完了した。1回の投与量を0.3、1、3、10、30mgの5段階とし、2週間おきに3回、左右の腋窩部、腹部および鼠径部の皮内に不完全フロイントアジュバント(incomplete Freund's adjuvant; IFA)とともに、安全性を確認しながら

有害事象	Grade 1	Grade 2
アレルギー反応(潮紅あるいは皮疹) 24(80%)	投与時の一過性の潮紅 22(73.3%)	異所性の皮疹あるいは潮紅 2(6.7%)
アレルギー反応(薬剤熱) 6(20%)	<38℃の薬剤熱 3(10%)	≥38℃の薬剤熱 3(10%)
注射部位の反応 30(100%)	掻痒; 紅斑 30(100%)	炎症反応を伴う疼痛や腫脹 0
掻痒 5(16.7%)	軽度または限局性の掻痒 5(16.7%)	激しいまたは広範囲の掻痒 0

表1 CTCAE v3.0による有害事象の評価(計30例中の出現頻度)

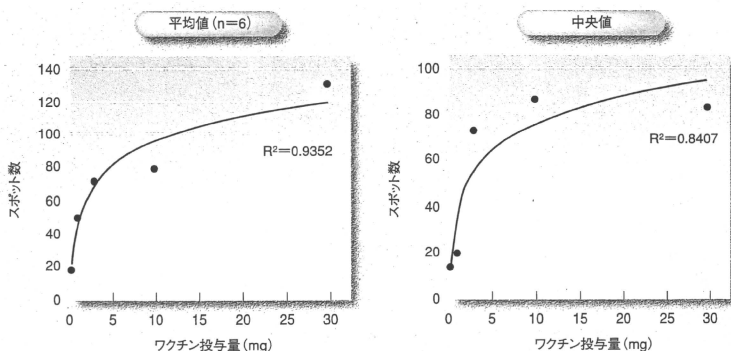


図1 ワクチンの投与量と投与後GPC3特異的CTLの頻度の最大値の相関

用量を増して投与した。

合計30症例全例に用量規制毒性(dose limiting toxicity; DLT)は発現せず、安全性に問題はないと判断された。投与時の一過性の潮紅は24例(80%)に認められ、うち1例には一過性の異所性の皮疹、1例には一過性の広範の潮紅を認めた。発熱は37.5℃

以上が6例で、うち38℃以上が3例にみられたがいずれも一過性で、解熱剤の使用を要しなかった。注射部の紅斑は30例全例にみられ、うち5例には軽度の掻痒があり、クロタミトン(オイラックス®)クリームを処方した。炎症反応を伴う疼痛や腫脹は認められなかった(表1)。

免疫学的解析を実施した全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、その頻度は投与量依存性に増加しており(図1)、免疫学的有効性も確認された。7例ではワクチン後の腫瘍の生検を行い、うち5例でワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかったCD8陽性

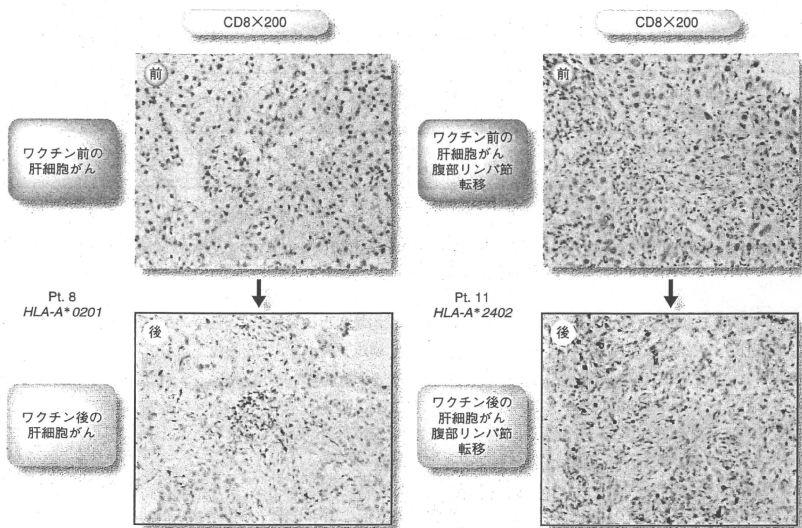


図2 ワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかったCD8陽性キラーT細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している2例

のキラーT細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している像も観察できた(図2)。

3回のワクチン投与後1ヵ月後のCTのRECIST version 1.0での評価では、30人中1人がpartial response；PR(図3)、18人がstable disease；SD(SD以上63.3%)で、11人はprogression disease；PDであったが、その内訳は0.3mgの6人中3人(50.0%)、1.0mgでは6人中4人(66.7%)、3.0mgでは6人中4人(66.7%)、10mgでは6人中4人(66.7%)、30mgでは6人中1人の

PRを含む4人(66.7%)がSD以上であり、0.3mgの1人、3.0mgの3人、30mgの1人の計5人には腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの所見も認められた。経過中に一度でもAFP、PIVKA-II、あるいはGPC3の腫瘍マーカーの低下がみられた症例は、29例中22例(75.9%)で、その内訳は、0.3mgの6人中1人(16.7%)、1.0mgでは6人中4人(66.7%)、3.0mgでは5人中5人(100%)、10mgでは6人中6人(100%)、30mgでは6人中6人(100%)と、臨床効果に関しても投与

量に依存して増加する傾向が示唆された(表2)。

腫瘍量も多く免疫抑制もかかっている患者が多いと考えられる(実際、サイトメガロウイルス由来のペプチドに反応するキラーT細胞の頻度が少ない患者も多かった)今回の進行肝細胞がんの対象に対してわずか3回のワクチン投与で、以上に示したように、免疫学的効果や臨床的な効果が認められた。

全30例の最終結果においても、DLTは1例も発生せず、GPC3ペプチ

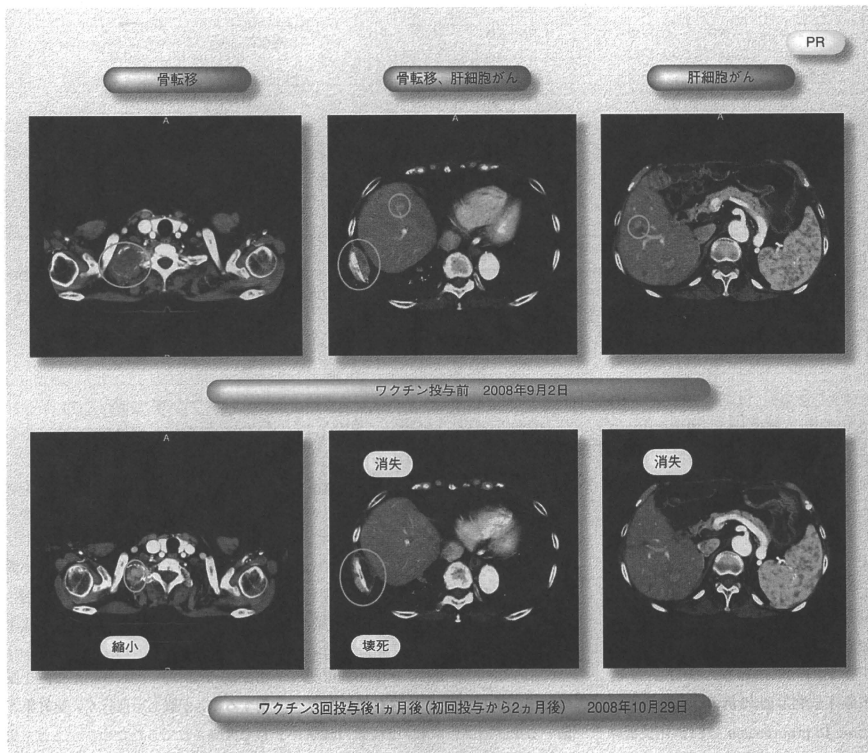


図3 Pt. 24 75歳女性 多発肝細胞がん、骨転移、肺転移、リンパ節転移 HLA-A*0207/1101
HLA-A2 glypican-3 ペプチドワクチン療法：1回30mg、3回投与により著明な臨床効果出現

ドワクチンの安全性は証明されたが、DLTを基に推奨用量を決定することはできなかった。30mg投与の1例にPRの臨床効果が認められたこと、腫瘍マーカーならびに免疫学的モニタリングの結果において用量依存性が認められたことから、高用量投与の優位性が

示唆されたものの、30mg投与例では、Grade 2の有害事象が全体の30例中5例(0.3mg投与に1例、3.0mg投与に1例)に対して6例中3例(発熱2例、広範な潮紅1例)と高頻度に認められたこと、3.0mg投与の10倍量の6mLも量を皮内に投与するため投与手技が

煩雑なうえ、患者の苦痛も大きく、投与部位の発赤・硬結が同じGrade 1でも6例中4例では明らかに大きかったことから、その臨床効果と合わせて考えるとGPC3ペプチドワクチンの推奨投与量は3.0mgが妥当であると判断した。

	PR	SD	PR+SD	PD	腫瘍内の壊死、 一部腫瘍の縮小	腫瘍マーカーの低下 がみられた症例
0.3mg	0	3	3 (50.0%)	3	1	1/6 (16.7%)
1.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	4/6 (66.7%)
3.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	3	5/5 (100%)
10mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	6/6 (100%)
30mg	1	3	4 (66.7%)	2	1	6/6 (100%)
計	1	18	19 (63.3%)	11	5	22/29 (75.9%)

表2 3回のワクチン投与後1ヵ月後のCTのRECIST version 1.0での評価と、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小がみられた症例数、および経過中に一度でもAFP、PIVKA-II、あるいはGPC3の腫瘍マーカーの低下がみられた症例数

また、2週間に1回の3回皮内投与で30例中27例において末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度が増加する効果は認められたものの、3回投与で終了した後はその頻度は30例中25例で減少し持続しなかった。継続投与を可能とするプロトコル改訂後、12例において継続投与を実施したが、そのうち9例で末梢血中ペプチド特異的CTLの頻度の増加を認め、4回目以降のワクチンは意味があると考えられた。また、本臨床試験参加30例の、無増悪期間(time to progression; TTP)中央値は4ヵ月、全生存期間(overall Survival: OS)中央値は9ヵ月であった。

現在実施中もしくは 計画中のGPC3ペプチド ワクチン療法臨床試験

このようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、あるいはCTで見えない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えら

れ、現在、手術やラジオ波焼灼療法(radiofrequency ablation; RFA)による初回肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第II相試験を実施中である。進行肝細胞がん患者にとって有用であるかを検証する第II相試験としては、ソラフェニブとGPC3ペプチドワクチンの併用療法とソラフェニブを比較する非盲検多施設共同ランダム化比較第II相臨床試験と、GPC3ペプチドワクチン単独療法との腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する第II相臨床試験の2種類の試験を計画している。

GPC3は肝細胞がんだけでなく、一部の小児がん(肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫)、卵巣明細胞腺がん、肺扁平上皮がんにも発現しており、それらががん種に対しての応用も期待される。卵巣明細胞腺がんを対象とした第II相臨床試験はすでに名古屋大学で開始されている。GPC3を発現する小児がんおよび肺扁平上皮がんを対象とした臨床試験も計画している。

がんワクチン療法の 臨床導入への問題点

まず、免疫療法自体が、そもそも有望な治療法と思われてこなかったことがブレイキをかけてきた。ペプチドワクチンは初めて科学的根拠をもって開発された免疫療法であったが、当初のペプチドワクチンの臨床第I相の臨床試験は従来の抗がん剤と同じくもう治療法のない、そもそも有効性を証明することが難しい進行がんを対象として実施されてきたため、かえって失望感を与えてしまった。米国NCIのRosenberg SAらが、2004年のNat Med.にがんワクチンのReviewとして、440例中complete response; CR、PRのresponse rateはわずか2.6%であったと報告した⁵⁾ことがさらに追い討ちをかけた。この点に関しては、われわれも含めた日本各地のグループから有効例の報告も増えてきて、エビデンスも次第に証明されつつあり、その結果、国内の製薬企業の参画も出

てきた。

製薬企業が本気で参画して開発するかどうかは、今後がんワクチン市場がどうなっていくかの鍵を握っている。そのためには、われわれを含めて日本全国で展開されている医師主導の臨床試験でどれだけの説得力のあるエビデンスを出せるかがもちろん一番重要であり、必須である。そのためには資金も必要である。

通常、抗がん剤や分子標的治療薬などの開発において、大規模な治療に行くためには、大金をつぎ込んだPhase 0の毒性試験などの実施が必要であるが、ペプチドワクチンのようなものは従来の抗がん剤のPhase 0より省略できることも多いと考えられる。多くの臨床試験が安全性を証明している。医薬品医療機器総合機構(PMDA)がどれだけ規制緩和してくれるかもポイントである。

わが国でのがんワクチンの医師主導

の臨床試験は、資金面、体制面とも不足しており、そこで有望そうな結果が出たとしても、しっかりとエビデンスを証明できるに至っていない。そのため、製薬企業が開発に乗り出さず、大規模にスピード感をもって進まなかった。例えば、国家プロジェクトでできるだけ可能性のある多くの臨床試験に対してしっかりとエビデンスを構築できるような惜しみない支援をし、製薬企業が開発意欲をそそる臨床試験を拾い上げられるような仕組みをつくる必要がある。日本中の患者や、紹介する医師側に、現在登録できる臨床試験のリストがいつでも閲覧できるような仕組みも必要であろう。

おわりに

がん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起

こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチンなどの免疫療法によりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考えられる。ワクチンはより安価に提供でき、一般の医療施設でもできる治療である。今後示される有効性によっては、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものと考えられる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、がん特異的免疫療法ががん治療を変える可能性は十分にあるのではないだろうか。

文献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
- 2) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Moriji M, Komori H, Motomura Y, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 16-25.
- 3) Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8630-40.
- 4) Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, et al. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2689-97.
- 5) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-15.

免疫療法

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 中面 哲也

はじめに

がんの3大治療は、未だに切除手術、抗がん剤による化学療法、放射線治療である。がんの免疫療法が第4の治療法と期待されて久しい。

がんの免疫療法の概念はすでに19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこからColey's vaccine (toxin) が生まれた。時にはがんの完全退縮を得たが、いつも同じ結果が出たわけではなかった。広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、10万例に1例くらいの頻度で自然退縮が起こる。これにはおそらく免疫も関与している。また、私が生まれた1967年のころには、今では考えられないが、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万個、10万個、100万個、1000万個、1億個とその患者の皮下に移植するのである。その結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することが分かった。この研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示していると言えよう。

がん免疫研究の歴史はしばしばサインカーブに例えられるように、一喜一憂を繰り返してきた。モノクローナル抗体やサイトカインの出現時はそれだけでがんが治るのではとい

う期待が一気に高まったが、がんは手ごわかった。現在では、一部の腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体による免疫療法が標準化しているに過ぎない。1991年にBoonらにより、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しうることによって科学的な根拠が与えられたことによって、またがん免疫研究は勢いを盛り返し現在に至っている。

現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、海外では、各種がんにも効果的ながん抗原ペプチド、タンパク質、遺伝子、ウイルスベクター、患者自己腫瘍由来抗原タンパク質、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、前立腺がんに対して「Provenge」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第3相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でもさまざま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。

一方では、最近、子宮頸がんの予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのは、がんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。果たして、がんの免疫療法は今後、期待にどこまで応えられるのであろうか？ 研究者たちの試行錯誤が続いている。がん免疫療法といっても幅広く、さまざまなものが存在するが、本稿では、我々が主に研究しているがん

特異的な抗原ペプチドを用いた免疫療法について述べたいと思う。

免疫療法における科学的根拠

1991年にBoonらによりメラノーマ抗原MAGE遺伝子が同定され、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しようことに科学的な根拠が与えられた¹⁾。すなわち、がん化に関連して特異なタンパク質が産生されると、これらに由来するペプチドが、HLAクラスI分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺細胞傷害性T細胞（キラーT細胞、CTL）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。現在までに、さまざまながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、それらを用いた臨床試験が世界中で行われている。

米国国立がん研究所（NCI）のRosenberg SAらは、2004年のNature MedicineにがんワクチンのReviewとして、440例中奏効例はわずか2.6%であったと報告した²⁾が、そのことは2009年の米国がん学会でも議論になり、ペプチドワクチン単独では進行がんにはあまり有効ではないかもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長等の可能性はあり、再発予防にも有効な可能性はある、また、さまざまな免疫抑制分子に対する抗体との併用などに期待が持てるとの意見も多かった。

一方、最近、日本国内のさまざま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も散見される。大阪大学の杉山治夫らはWT1ペプチドワクチンが、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、乳がん、肺がん、glioblastoma（脳腫瘍）などで有効例を報告しているが、中でもglioblastomaでは、奏効例がみられている³⁾。札幌医大の佐藤昇志らのグループはサバイピン2Bペプチドワクチンにより進行大腸直腸がんが奏効例の報告をしている⁴⁾。久留米大学の伊東恭悟らはテーラメードがんペプチドワクチン療法により、

子宮頸がん、大腸がん、脳腫瘍、膀胱がんで著効例を報告しているが、なかでもglioblastomaでは、奏効例を複数認めている⁵⁾。また、近畿大学泌尿器科の植村天受らは、腎がんに対するCA9ペプチドワクチンによる複数の奏効例を報告している⁶⁾。山口大学の岡正朗らは、東大医科研の中村祐輔らとの共同研究により、大腸がんに対して、KOC1, RNF43, TOMM34, VEGFR1, VEGFR2の5種類のペプチドワクチン同時投与により、奏効例を報告している⁷⁾。山梨医大の河野らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、食道がんに対して、TTK, LY6K (URLC10), IMP-3 (KOC1)の3種類のペプチドワクチン同時投与により、奏効例を報告している⁸⁾。岩手医大の藤岡らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、膀胱がんに対して、MPHOSH1, DEPDC1の2種類のペプチドワクチンを用いて、抗腫瘍効果を報告している⁹⁾。さらに、和歌山医大の山上らは、東大医科研の中村らとの共同研究により、腫瘍新生血管を標的とするVEGFR2ペプチドワクチン療法を開発し、切除不能進行膵がんに対し、ゲムシタピンとの併用の臨床第I相試験を実施した¹⁰⁾。良好と思われる生存期間中央値が得られて、現在、PEGASUS-PCスタディと呼ばれる臨床第II/III相試験が進行中であり、結果が待たれるところである。

我々も国立がんセンター東病院において、進行肝細胞がん患者を対象に、肝細胞がん特異抗原glypican-3 (GPC3)のペプチドワクチン臨床第1相試験を完了した。詳細は後述するが、計30例の結果からワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認している。

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りにくい抗原の3つが重要である。

がん特異的抗原 glypican-3 (GPC3) の同定

我々は, 東大医科研・ヒトゲノムセンターの中村祐輔教授との共同研究により, cDNAマイクロアレイを利用した2万種類を超える遺伝子の肝細胞がんと正常組織における発現解析データを用いて, 上記の理想的ながん抗原としてふさわしい肝細胞がん特異的な新規がん胎児性抗原, GPC3を同定した¹¹⁾。マウスモデルでGPC3ががん拒絶抗原としても有用であることを証明し, マウスGPC3を導入したES細胞由来樹状細胞の抗腫瘍効果も証明した^{12), 13)}。さらに, ヒトHLA-A2, A24によりキラーT細胞に提示されるGPC3ペプチドを同定した¹⁴⁾。

GPC3ペプチドワクチンの 臨床第1相試験

肝細胞がんにおいては, 海外では目立った成績を示すがんワクチンは開発されていない。国内では, 我々が, HLA-A24, -A2陽性進行肝細胞がん患者を対象に, GPC3ペプチドワクチンの臨床第1相試験を完了した。安全性に問題はなく, ほぼ全例の血液中にペプチド特異的CTLの頻度の増加が検出され, その頻度はペプチド投与量が多いほど増えることが示唆された。また, CD8陽性CTLが, ペプチドワクチン後のがん組織内に多数浸潤してがん細胞を攻撃していることを, 複数の患者で証明できた。約60%の症例において初回ワクチン投与後2ヵ月の間に腫瘍マーカー

PIVKA-IIの低下を認めCTやMRIの画像検査での評価では約60%の症例で2ヵ月間がんの増悪なし(安定SD)であった。30mg, 3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果(部分奏効PR)が出現した。

今後は, もう他に治療法がない進行肝細胞がん患者にとって有用であるかを第2相試験で検証するとともに, このようなワクチン療法は元来, 腫瘍がない, あるいはCTで見えない腫瘍があったとしても腫瘍量が少ない状態でこそ威力を発揮すると考えられ, 現在, 手術やラジオ波焼灼療法(RFA)などの肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する第2相試験を実施中である。GPC3は肝細胞がんだけでなく, 小児がん(肝芽腫, 神経芽腫, 腎芽腫), 卵巣明細胞がん, 肺扁平上皮がんにも発現しており, それらのがん種に対しての応用も期待される。

Rosenberg SAらによるヒトがん に対する強力な免疫療法の報告

米国国立がん研究所のRosenberg SAらは, 体外で培養したCTLを戻す養子免疫療法Adoptive-Cell-Transfer therapyに, T細胞のHomeostatic Proliferationという考え方を組み合わせた免疫療法について発表した¹⁵⁾。Homeostatic Proliferationとは, 体内のリンパ球の数は一定に保たれており, その数を減らしてやると, 新たに移入されたリンパ球が生き延びて一定数に達するまで増殖するという現象である。あらかじめシクロホスファミドとフルダラビンの前投与により患者のリンパ球数を減らしておいて, そこへ大量に増やしておいた, がん細胞を傷害するCTLを移入すると, CTLが体内で長期にわたって生存し, ついには転移性メラノーマ約50%の例で劇的な腫瘍縮小をもたらし, 今までのがんの免疫療法では考えられないほどの抗腫瘍効果が観察された¹²⁾。最近では, 抗がん剤と全身放射線照射にて体内リンパ球除去前処置後, 体外で

大量培養した腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を体内へ戻すTIL養子免疫療法によって、奏効率70%という驚異的な結果を報告している¹⁶⁾。

一方、この治療で用いられたCTLは、MAR T-1, gp100といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドを用いて誘導したもので、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された¹²⁾。このことは、がんを拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、そのCTLを誘導するのに使われた抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。すなわち我々は、がん特異的に発現する、あるいは重要な正常臓器には発現しないがん拒絶抗原を同定しなければならない。免疫療法も、工夫したり他の治療と併用したりすることでペプチドワクチンよりもさらに有効な画期的治療法となり得る可能性を十分に秘めている。

日本ではメラノーマの患者は少ないが、日本人に多いがんを対象に、がん特異抗原を用いて培養したCTLの養子免疫療法を開発することで、日本人のがん治療に大きなブレイクスルーが起こることは十分期待できる。我々も、がん患者末梢血単核球 (PBMC) より、GPC3由来エピトープペプチドを用いて、抗原特異的CTLの増殖が可能な条件を検討し、ペプチド特異的CTLを効率よく誘導し増幅させる技術を確立して、GMPグレードの細胞培養施設Cell Processing Center (CPC) を利用したGPC3由来エピトープペプチド特異的CTLの養子免疫療法の実施を目指している。

おわりに

現在、がんの補助療法あるいは手術などの局所療法が無効ながんに対する治療法として主流の抗がん剤は、確かに有効な場合もあるが、無効で有害事象だけが生じる場合も少なくない。最近脚光をあびている分子標的治療薬は高額であることも問題である。まだ元気

なのに、「あなたにはもう治療法はありません」と宣告される患者も少なくない。我々が実施するがん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上、重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば、標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらワクチン等の免疫療法によりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考ええる。

ワクチンはより安価に提供でき、開業医などこの医療施設でもできる治療である。さらには、がん特異抗原を用いて抗腫瘍T細胞を大量に培養して投与する養子免疫療法の開発により、患者個々にオーダーメイドで有害事象のない画期的な治療が可能になれば、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者のQOLの改善にとっても大きな役割を果たすものと考ええる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、がん特異的免疫療法ががん治療を変える可能性は十分にあると信じて、日夜研究に励んでいる。

参考文献

- 1) van der Bruggen P *et al.* *Science* 254, 1643 (1991)
- 2) Rosenberg SA *et al.* *Nat Med* 10, 909 (2004)
- 3) 岡 芳弘, 他, *Biotherapy* 23, 170 (2009)
- 4) 鶴岡 哲弘, 他, *Biotherapy* 23, 178 (2009)
- 5) 峯 孝志, *Biotherapy* 23, 185 (2009)
- 6) Uemura H *et al.* *Clin Cancer Res* 2, 1768 (2006)
- 7) 裕 彰一, 他, *Biotherapy* 23, 160 (2009)
- 8) Kono K *et al.* *Cancer Sci* 100, 1502 (2009)
- 9) 小原 航, 他, *がんペプチドワクチン療法* 中村 祐輔 編 63 中山書店
- 10) Miyazawa M *et al.* *Cancer Sci* 101, 433 (2009)
- 11) Nakatsura T *et al.* *Biochem Biophys Res Comm* 306, 16 (2003)
- 12) Nakatsura T *et al.* *Clin Cancer Res* 10, 6612 (2004)
- 13) Nakatsura T *et al.* *Clin Cancer Res* 10, 8630 (2004)
- 14) Komori H *et al.* *Clin Cancer Res* 12, 2689 (2006)
- 15) Dudley ME *et al.* *Science* 298, 850 (2002)
- 16) Dudley ME *et al.* *J Clin Oncol* 26, 5233 (2008)

Current Organ Topics:

Melanoma and Non-Melanoma Skin Cancers
メラノーマ・皮膚癌

II. メラノーマの免疫療法

—最近の動向—

木庭 幸子 (信州大学医学部 皮膚科学教室)

[*Jpn J Cancer Chemother* 37(4): 629-633, April, 2010]

はじめに

生体内での腫瘍拒絶がおりやすいメラノーマに対して、T細胞認識抗原による特異的免疫療法は、動物モデルの結果などから大変期待されたが、ヒトにおいては特異的T細胞の誘導を確認できても、生体内で大きな腫瘍を拒絶するには十分とはいえず、2004年にRosenbergらがまとめた自験例440を含めた765例(うちメラノーマ661例)のメタアナリシスによればPR以上の有効率はわずか3.8%ときわめて低迷している¹⁾。近年、がん微小環境における抗腫瘍免疫を抑制する細胞群の存在が知られるようになり、より包括的な免疫制御の重要性が浮き彫りになった。

本稿では、メラノーマにおける抗腫瘍免疫応答について概説するとともに、メラノーマに対する免疫療法の問題点と最近の動向について述べる。

1. メラノーマに対する抗腫瘍免疫応答

1) 免疫系による癌細胞認識の分子機構: 腫瘍抗原

細胞傷害性T細胞(以下CTL)が認識する抗原として、メラノサイト特異的タンパクやがん精巢抗原、がん過剰発現タンパク、がん特異的変異タンパクなどに分類される腫瘍抗原が単離され、それぞれのT細胞エピトープが同定されている。マウスモデルでは、抗原特異的免

疫誘導により、十分に腫瘍を制御できることが証明されている。NK細胞やNKT細胞も樹状細胞からのシグナルによって抗腫瘍活性を示す。

2) メラノーマにおける微小環境と免疫回避機構

がんの微小環境においては、がん細胞、間質細胞、免疫系細胞、液性因子などが、単独あるいは相互作用によって、免疫抑制状態をつくりだすとともに、様々な増殖因子を介して、発がん機転および腫瘍の増殖や転移に深く関わる。とくに、腫瘍特異的T細胞や樹状細胞の増殖や機能抑制の原因として、制御性T細胞(Treg)などの抑制的免疫細胞群が注目されている。Tregのほかに、免疫寛容誘導樹状細胞、骨髄由来抑制性細胞、腫瘍関連マクロファージなどが知られており、分子機序の解明に力が注がれている(図1)。

① 制御性T細胞

CD4+ CD25^{high} foxP3+のTregは、細胞免疫寛容に深く関わり、自己免疫性疾患の発症においても重要な役割を果たす。GITR+, CTLA4+などのフェノタイプを示し、がんにおいてはメラノーマをはじめとする各種の悪性腫瘍において、腫瘍浸潤リンパ球の中にも検出される²⁾。また、後述のように抗原特異的免疫療法によって誘導されることも観察されている。

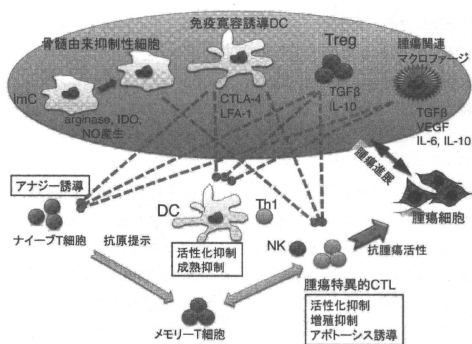


図1 抑制性免疫細胞群と抑制性因子

がん患者においては, Treg がリンパ球による腫瘍特異的な免疫応答を妨げ, 増殖を抑制するだけでなく, 抗原提示細胞の成熟化を阻害して抗原提示能を抑制するなどして, 腫瘍局所あるいは全身における免疫回避に深く関わる。natural occurring Treg のほか, IL-10 や TGF β によって誘導される Tr-1, CD8+ foxP3+ Treg も知られており, 誘導される条件やフェノタイプが微妙に異なることが知られている。

② 免疫寛容誘導樹状細胞

最も強力な抗原提示細胞として知られている樹状細胞は, 様々な環境下で抑制的な機能をも発揮し, 免疫寛容誘導樹状細胞 (tolerogenic dendritic cell: TDC) と呼ばれている。TDC は, サイトカインや CTLA-4, LFA-1 などを用いた免疫抑制機能を示し, 抗原特異的 T 細胞の除去や, ナイブ T 細胞のアナジの誘導, Treg の誘導・増殖に関わる。メラノーマにおいても, センチネルリンパ節で plasmacytoid DC が高率に検出され, TDC として機能している可能性が報告されている³⁾。

③ 骨髄由来抑制性細胞

骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) は, TNF α や TGF β , IL-6 などにより, immature myeloid cell (Imc) から誘導される。CD14+ Lin-, HLA-, DR-を示し, arginase, ROS, ONOO-, NOなどを産生し, シグナル伝達阻害 (JAK3, STAT5) や MHC class-II 発現抑制, リンパ球のアポトーシス誘導, 抗原特異的 T 細胞抑制といった抑制的な機能を示す。

④ 腫瘍関連マクロファージ

腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) は, 腫瘍中に浸潤しているマクロファージのうち, 腫瘍細胞やストローマが産生する M-CSF, CCL2, CCL5 や, IL-6, IL-10 によってリクルートされ維持される M2 タイプマクロファージである。TAM は, 血管増生を促し, 成長因子など分泌することにより, 腫瘍の進展を促進する⁴⁾。治療への展望として, TAM を標的とした血管新生阻害剤の可能性が注目されている。現時点では, TAM に特異的な分子マーカーは存在しないが, CD68 染色を行うと, メラノーマ組織にも多数の CD68 陽性細胞が見いだされることから, メラノーマの微小環境においても TAM が局所的免疫抑制に関与している可能性が推察される。TAM による免疫系への影響としては, IL-10 などを用いた, T2 polarization, ナイブ T 細胞アナジ誘導, DC の成熟抑制, 活性化抑制などが知られている。

表 1 がん免疫療法

能動免疫法	
抗原特異的免疫療法	抗原ペプチド, タンパク, DNA
樹状細胞ワクチン	樹状細胞+抗原ペプチド, タンパク, DNA
	樹状細胞+自己腫瘍溶解物
修飾がん細胞ワクチン	
非侵襲的腫瘍破壊	放射線, 温熱, 凍結など
免疫増強法	サイトカイン アジュバント 熱ショックタンパク
受動免疫法	細胞移入/養子免疫療法 腫瘍浸潤リンパ球 活性化リンパ球 TCR 遺伝子導入リンパ球 ミニ移植

2. メラノーマに対する特異的免疫療法の現状 (表 1)

1) 能動免疫法

① 抗原特異的免疫療法

メラノサイト特異的タンパクやがん精巢抗原などのタンパクやペプチド, あるいは遺伝子を用いて, *in vivo* あるいは *in vitro* で抗原特異的免疫応答を誘導することによって, 腫瘍拒絶をもたらす。とりわけペプチドを患者に投与する方法は, ペプチドの供給が簡便で安価であるため注目を集めたが, これまでの多数の臨床成績を総合すると, ペプチド投与単独では, *in vivo* で誘導される抗原特異的 T 細胞による免疫応答が比較的弱いため, 腫瘍拒絶に至らないケースが多い。

浜松医大で行われている経皮的ペプチドワクチンは, 角層を剝離した皮膚に抗原ペプチドを塗布し, 表皮ランゲルハンス細胞を抗原提示細胞として利用するユニークな治療法である。この臨床試験においては, 25 例の進行期メラノーマ患者に対して, HLA-A*0201 の MART-1 と, A*2402 の MAGE-2, -3, gp100, tyrosinase の抗原ペプチドで経皮感作を行ったところ, 腫瘍縮小および新規病変の抑制などの臨床効果が認められ, モニタリングでも CTL の誘導が確認できており, 今後の展開が期待される⁵⁾。

抗原特異的免疫療法の課題としては, 腫瘍細胞における抗原発現低下や MHC 分子発現低下のほかに, 抗原刺激による Treg の誘導があげられる。メラノーマでは DP4 拘束性 MAGE-A3 ペプチドワクチンによって抑制性 T 細胞の誘導が, メラノーマ以外でも HPV-E6, -E7 ペプチドワクチンによる Treg の誘導が確認されている^{6,7)}。その一方で, A2 と DQ6 に共通した拘束性の

MART-1₂₅₋₃₆ペプチドを用いたワクチンによって、ペプチド特異的 CD8+ CTL が誘導され、かつ特異的 foxP3+ CD4 T 細胞が減少したことが報告された⁶⁾。これらの研究結果から、ワクチンに用いるペプチドの選択には十分な検討が必要であることが示された。

最近では、改変した抗原ペプチドや患者腫瘍細胞由来の物質が薬剤として開発され、海外で既に承認されたものもある。このうち米国においてはメラノーマに対するランダム化比較試験 (RCT) として、患者腫瘍細胞より抽出した熱ショックタンパク質とペプチドの複合体: Oncophage[®] の第Ⅲ相試験、および、抗 CTLA-4 抗体 MDX-10 とメラノーマ抗原ペプチドワクチン MDX-1379 を組み合わせた第Ⅲ相 RCT が終了している。また、患者腫瘍細胞をハブタンパク質化した M-Vax と low dose IL-2 の第Ⅲ相 RCT が行われている。

② 樹状細胞療法

末梢血単球由来の樹状細胞を調製し、*in vitro* でメラノーマ抗原ペプチドをパルスして、アジュバンドなどとともに、リンパ節や皮下に投与する。樹状細胞の調製は、プラスチック接着細胞や CD14 細胞から IL-4 や GM-CSF などのサイトカイン存在下で行われる。樹状細胞による抗原タンパクの取り込みや抗原ペプチドのプリアミング、および樹状細胞の投与経路も詳細に検討され、最適化がなされている。これまで、世界中で行われた 626 例の樹状細胞療法の治療成績のまとめによると、CR+PR は約 9%、SD を含めると約 30% であり、投与経路はリンパ節内投与と皮下投与の治療成績が皮下投与や静脈内投与のそれよりも優れており、ヘルパー抗原の併用をした群が併用しない群よりも優れていた。また免疫モニタリングでは、遅延型過敏反応よりも IFN γ 産生細胞の数の上昇が臨床効果と相関していた⁹⁾。海外で 2009 年に行われた 3 種類のメラノーマ細胞株溶解液 TRIMEL を樹状細胞にパルスして投与する第Ⅱ相試験では、生存期間の中央値の大幅な延長が見られた¹⁰⁾。ドイツのグループは stage IV メラノーマに対して、ペプチドパルス樹状細胞ワクチンと標準的化学療法剤であるタカリバジン (DTIC) との第Ⅲ相 RCT を行い、DTIC 群 5.5% の奏効率に対して樹状細胞ワクチン群 3.8% と劣っていた¹¹⁾。

③ 腫瘍破壊によるワクチン療法

メラノーマは皮膚・皮下転移が多い。皮膚転移など経皮的にアプローチしやすい病巣に対しては、放射線照射や凍結凝固操作などを加えた後に、同部位に樹状細胞を注入することによって、*in vivo* で破壊された腫瘍細胞由来タンパクを樹状細胞に取り込ませ、腫瘍特異的免疫を誘導しようとする治療法も試みられている。我々は、

中部大学と共同し、マグネタイトをメラノーマ転移巣に集積させて交番磁場を照射し、腫瘍巣のみを選択的に発熱させる温熱免疫療法の臨床研究を行っており、将来的には樹状細胞投与の併用を計画中である。以上のいずれの治療法も症例数が少なく評価は難しいが、局所的効果は得られて、現時点では明らかな全身的抗腫瘍効果は認められていない。

④ 免疫増強法

非特異的免疫賦活操作により免疫を増強する方法として、単独あるいは抗原特異的免疫療法や細胞移入などと併用して行われる。サイトカイン療法としては、IL-2 の大量投与による治療が主として米国で使われているほか、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21 などのサイトカイン、あるいはサイトカイン遺伝子投与が行われるが、本邦ではこれらのサイトカインは高価であるために実現が難しい。また、メラノーマ細胞が IFN に感受性があることを利用して、我々は、名古屋大学が開発したヒト IFN β 遺伝子を組み込みプラスミドベクターを正電荷多量膜リポソームに包埋した製剤を用いて、2003 年から進行期メラノーマに対して臨床試験を行ったが、十分な全身的臨床効果は得られなかった。

以前より、ビシバニールなどの微生物由来成分を用いたアジュバント療法により抗腫瘍効果が得られることは有名であったが、近年、自然免疫系をつかさどる数多くの分子やシグナル伝達が解明されるにつれて、自然免疫の活性化が獲得免疫の引き金になることが明らかになった。樹状細胞に対する Toll 様受容体 (TLR) 刺激により、腫瘍特異的 CTL 活性の増強や NK 細胞活性の増強を介した抗腫瘍活性が確認されている。このうち、TLR 9 のアゴニストを用いた targeting therapy の臨床試験も進められ、stage III、IIIc、IV の 20 例について CR 2 例を含む 5 例の奏効例がみられている¹²⁾。また、CTL は、TLR のアダプターである MyD88 と TICAM-1 を発現しているため、これらのアダプターを利用する TLR2、3、4 の刺激により CTL の誘導効率の上昇が期待される。しかしながら、TLR はメラノーマ細胞にも発現しており、TLR4 刺激によりメラノーマ細胞そのものの増強が促進されることも報告されている¹³⁾ ため、これらの臨床応用には十分な検討を要する。また、TLR3、TICAM-1 経路によって、樹状細胞が NK 細胞の抗腫瘍活性を増強することから、アジュバントとしても期待できる¹⁰⁾。

2) 受動免疫法

① 細胞移入/養子免疫療法 (ACT)

患者からアフエーシスで取り出した末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を、IL-2 などのサイトカイン存在下で培養、あるいは *in vitro* で抗原刺激を加える