

201030002A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と  
発症予防ワクチンの開発に関する研究

平成 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	
癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発	3
中面哲也	
III. 分担研究報告	
1. 肝細胞がんの超早期診断法の検証「AFP/DCP/AFP-L3/ $\beta$ 2-ミクログロブリン」	15
中面哲也、野村和弘、藤山重俊、本間 定、小井戸薫雄、豊田秀徳、熊田 卓、児島辰也	
2. 肝細胞がんの超早期診断法の検証「GPC3、抗 GPC3-IgG 抗体」	17
中面哲也、野村和弘、藤山重俊、本間 定、小井戸薫雄、豊田秀徳、熊田 卓、児島辰也	
3. 腫瘍マーカーAFP・高感度 AFP-L3%・PIVKA-II による肝細胞癌の発癌予測	20
豊田秀徳、熊田 卓	
4. 肝細胞がんにおける血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討	23
中面哲也、野村和弘、藤山重俊、本間 定、小井戸薫雄、豊田秀徳、熊田 卓、児島辰也	
5. 肝細胞がんの放射線治療(陽子線含む)と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験	25
河島光彦	
6. 新規癌関連抗原 CDC45L を標的とした癌免疫療法の開発	26
西村泰治	
7. GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の基礎研究ならびに <i>in vivo</i> 試験	30
中面哲也	
8. iPS 細胞由来の免疫細胞による癌治療	32
千住 覚	
9. iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法	34
本間 定	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
V. 研究成果の刊行物・別刷	39

## I. 研究班構成員名簿

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と  
発症予防ワクチンの開発に関する研究班（平成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	野村 和弘	東京労災病院	院長
	藤山 重俊	NTT 西日本九州病院	院長
	西村 泰治	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	教授
	千住 覚	熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野	准教授
	本間 定	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	准教授
	小井戸 薫雄	東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科	准教授
	河島 光彦	国立がん研究センター東病院 放射線部	医長
	豊田 秀徳	大垣市民病院 消化器科	医長
研究協力者	熊田 卓	大垣市民病院 消化器科	部長
	児島 辰也	東京労災病院 消化器内科	部長

## Ⅱ. 平成 22 年度総括研究報告

## 癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発

研究代表者 中面 哲也 国立がん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

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

(1)肝細胞がんの術後再発、および慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの超早期診断を目指して前向きの検体収集を行い、AFP、AFP-L3 分画、DCP、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体について経時的変化を解析した。現在までの解析例は経過観察期間が短い中で再発、発がんを来した症例群であり、マーカー挙動につき論じるには不適切な症例が多く含まれたが、その中でも再発例 15 例中 2 例に DCP の経時的変化が再発の早期診断に有用な可能性が示された。一方、後ろ向きの大量検体を用いた検討では、AFP・PIVKA-II による肝細胞癌診断 1 年前の発癌予測は困難であったが、高感度化 AFP-L3% では診断 1 年前の上昇により肝細胞癌の発癌予測の可能性が示唆された。(2)肝細胞がんにおいて、ウイルスを使用した血中循環がん細胞検出技術が適用可能であることが示された。これを受け、今後、①肝細胞がんの術後再発、および②慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの早期診断を目指し、前向きな検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。(3)最近の陽子線治療症例 22 例を対象に、ICG R15%と V30%を用いた適応判断と消化管有害事象の予防目的でのスパーサー挿入の安全性について適時的に検討した。最終追跡時点で重篤な有害事象は発生しておらず、適応判断とスパーサー挿入の妥当性が支持された。適格症例での再発予防のための GPC3 の併用効果を確認する臨床試験プロトコルを作成し、倫理審査委員会に提出した。(4)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。(5) iPS 細胞は、がんに対する免疫療法を行うための樹状細胞のソースとしてのみならず、がんに対して直接的に抑制効果を発揮するマクロファージを作成するための細胞ソースとしても有用であることが示された。iPS 細胞由来血管内皮細胞を免疫原とした樹状細胞療法は、腫瘍血管を標的とした有効な免疫療法となりうる可能性が示された。

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

### 研究分担者

野村 和弘 東京労災病院 院長  
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長  
西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部  
免疫識別学分野 教授  
千住 覚 熊本大学大学院生命科学研究部  
免疫識別学分野 准教授  
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所  
准教授  
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 准教授  
慈恵医大附属柏病院消化器・肝臓内科  
河島 光彦 国立がん研究センター東病院  
放射線部 医長  
豊田 秀徳 大垣市民病院 消化器科 医長

### 研究協力者

熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長  
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長

### A. 研究目的

肝炎研究 7 ヶ年戦略にあるように、肝がんは依然として予後不良であり、肝がんの治療成績を上げるためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法に加えて予防法の開発、確立が急務である。本研究は肝細胞がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発を主な目的とし、肝細胞がんの新規免疫細胞療法の開発も目指す。具体的には、(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発、(2)肝細胞がんのワクチンの開発、(3)CTL 療法の開発、(4)ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発の 4 つの研究テーマを掲

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

## B. 研究方法

### (1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

2008 年 5 月から 2010 年 12 月までに、国立がん研究センター東病院において 50 例の HCC 根治手術予定患者を術前に登録した。同患者について、術前、術後 1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、以後 3 ヶ月ごとを目安に、画像検査にて再発が確認されるまで血清および血漿の検体採取を行った。

#### ② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーの探索

2009 年 9 月より症例集積を開始し、2010 年 12 月までの間に、東京労災病院および NTT 西日本九州病院において、HBV あるいは HCV 感染を有する CH・LC 患者を登録した。同患者について、外来受診ごとに血清および血漿の検体採取を行い、これを画像検査にて HCC 発がんが確認されるまで継続した。

#### ③ 腫瘍マーカー AFP・高感度 AFP-L3%・PIVKA-II による肝細胞癌の発症予測に関する研究

2001 年 1 月～2009 年 12 月の 9 年間に大垣市民病院で診断された初発 HCC のうち B 型肝炎ウイルス (HBV) または C 型肝炎ウイルス (HCV) に感染しており、かつ診断時の腫瘍が 3cm 以下・3 個以下であり、診断 3 年以上前から当院にて follow-up されていた 114 例中、HCC の診断から 1 年前・2 年前・3 年前および HCC 診断日の血清検体が保存されていた HCC 症例 104 例を対象とした。コントロール症例 (非 HCC 症例) としては、2001 年 1 月～2009 年 12 月の 9 年間に大垣市民病院で経験した HBV または HCV 感染症例 2830 例中、3 年以上経過観察して HCC の発生がみられなかった 1100 例からプロペンシティブ・スコアにより 104 例を選抜し、最終観察日より 1 年前・2 年前・3 年前の血清検体を用いた。AFP・AFP-L3%・PIVKA-II の測定は、全自動蛍光免疫測定装置 ミュータスワコー i30 を使用した。

### (2) 肝細胞がんにおける血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討

国立がん研究センター東病院を受診した肝細胞がん未治療の 21 症例を登録し、専用採血管に採取した末梢血 7.5ml 中の CTC 検出を行った。検体採取は 1 回のみとし、治療前の CTC 検出率を解析した。

### (3) 肝細胞がんの陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

陽子線治療前の ICG R15 と非癌部の V30%を指標

とした適応判断の妥当性と、消化管有害事象の軽減のためのスパーサー挿入の安全性を遡及的に検討した。

### (4) GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の基礎研究ならびに *in vivo* 試験

GPC3 ワクチン投与患者末梢血単核球 (PBMC) を使用し、新規 CTL 誘導法により GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導した。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 (a11)、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。

### (5) iPS 細胞由来の免疫細胞療法の開発

#### ① ヒト iPS 細胞由来マクロファージ (iPS-MP) 療法の開発

ヒト iPS 細胞に電気穿孔法を用いて、ヒトの CD20 分子に対する単鎖抗体の発現ベクターを導入した後に分画誘導して、CD20 分子に対する単鎖抗体を細胞表面上に発現する iPS-MP を作成した。この iPS-MP による、CD20 分子を発現するヒト B リンパ球性白血病細胞株 BALL-1 に対する抑制効果を検討した。

#### ② iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発

iPS 細胞を腫瘍血管内皮細胞に類似した性格を示す細胞に分化させ、この細胞ライゼートを取り込ませた樹状細胞で免疫療法を行うことにより腫瘍血管の内皮細胞に対し免疫反応による傷害を誘導して抗腫瘍効果を得ることができると検討した。

#### [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。

#### ヒト ES 細胞および iPS 細胞の作製あるいは使用を伴う研究について

研究分担者の千住らが実施しているヒト ES 細胞の使用を伴う研究については、熊本大学医学薬学研

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

## C. 研究結果

### (1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

登録 50 症例中 15 例に HCC 再発を認めた。これら 15 例の再発までの期間は中央値 5.0 ヶ月、範囲 1.4-24.5 ヶ月であった。再発までの採血回数は中央値で 4 回、範囲 3-8 回であった。術後初回の画像検査で再発を認めた症例が 15 例中 7 例であった。

AFP、DCP、AFP-L3、 $\beta$ 2-MG の中では、我々が仮説として想定した「理想的なマーカー挙動」を確認できたのは DCP の 15 例中 2 例のみであった。 $\beta$ 2-MG は経過中の変動が小さく、術前や再発時に上昇していない症例が多かった。今回検討した術後再発 15 例の GPC3 値は再発前後を通じて低かったが、測定値の変動に着目すると、術後から再発にかけて上昇傾向のある症例が 9 例認められた。抗 GPC3 IgG 抗体は、手術対象となるような病期の術前担がん状態での陽性率は低く (50 例中 4 例、8%)、術後経過中にあまり変動がみられない症例 (5 例) および術後一過性に上昇する症例 (5 例) を認めた。

#### ② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーの探索

2010 年 12 月までの経過観察にて、東京労災病院にて 3 例、NTT 西日本九州病院にて 5 例の HCC 発がんを認めた。研究全体としての採血回数は中央値で 3 回、範囲 1-6 回であったが、発がんまでの採血回数は中央値で 2 回、範囲 1-3 回であった。登録前 1 ヶ月以内の画像検査がない症例や、登録時から既に HCC を確認している症例も含まれていた。限られた症例数、条件ではあるものの発癌時 GPC3 陽性率は 28.6% (7 例中 2 例) および抗 GPC3-IgG 抗体陽性率は 42.9% (7 例中 3 例) であった。

#### ③ 腫瘍マーカー AFP・高感度 AFP-L3%・PIVKA-II による肝細胞癌の発癌予測に関する研究

HCC 症例 104 例において AFP と PIVKA-II の HCC 診断日の値は、その 1 年前の値から有意に上昇しており ( $p=0.0062$  および  $p=0.015$ )、一方 AFP と PIVKA-II の 1 年前の値は 2 年前・3 年前の値と有意差を認めなかった ( $p=0.5615$  および  $p=0.3652$ )。すなわち AFP や PIVKA-II では 1 年以上前で HCC の発癌予測は困難であると考えられた。高感度 AFP-L3% の値は診断日と 1 年前の値とで有意差がみられなかったが ( $p=0.072$ )、診断日および 1 年前の AFP-L3%

の値は 2 年前・3 年前の値からは有意に上昇していた (診断日 vs. 2 年前:  $p=0.0022$ 、診断日 vs. 3 年前:  $p=0.0031$ 、1 年前 vs. 2 年前:  $p=0.0227$ 、1 年前 vs. 3 年前:  $p=0.039$ )。すなわち HCC の診断の 1 年前の時点で高感度 AFP-L3% はすでに上昇しており、1 年前の時点での HCC 発癌予測が可能であることが示唆された。

### (2) 肝細胞がんにおける血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討

肝細胞がん 21 例の CTC を検討した。CTC の定義に死細胞染色陽性細胞も含めれば、CTC 検出率は 79% (59/75) であった。肝細胞がんでは、死細胞を含めないと 33% (7/21)、死細胞を含めると 86% (18/21) に CTC を検出した。

### (3) 肝細胞がんの陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

22 例中 2 例で標的体積が消化管に近接していたためスパーサー挿入を行った。スパーサーの材料は大綱 1 例、ゴアテックスシート 1 例であった。全例で治療に関連する重篤な有害事象なく治療が完遂できた。

### (4) GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の基礎研究ならびに *in vivo* 試験

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 が誘導可能であった ( $1.8 \times 10^5$  個  $\sim 6.1 \times 10^7$  個、増加率: 490 倍  $\sim 170,000$  倍)。さらに細胞ソーティングにより GPC3CTL クローンを作製し、細胞傷害活性等の機能評価を行った。*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できた。また培養前の *ex vivo* ELISPOT アッセイによる IFN $\gamma$  産生細胞数あるいは  $\gamma \delta$ T 細胞率から Day14 の Dextramer 陽性細胞率の予測が可能であることが示唆された。

### (5) iPS 細胞由来の免疫細胞療法の開発

#### ① ヒト iPS 細胞由来マクロファージ (iPS-MP) 療法の開発

BALL-1 と iPS-MP の共培養を行う実験により、CD20 分子に対する抗体を発現する iPS-MP が BALL-1 を貪食する活性を有していることが判明した。そして、3 日間の iPS-MP との共培養により、BALL-1 細胞数が 1/100 以下に減少することを観察した。さらに、Scid マウスの腹腔内に BALL-1 細胞を移植する実験においても、抗 CD20 抗体を発現する iPS-MP により BALL-1 細胞の生着を阻害できることを観察した。

#### ② iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発



血管内皮細胞に分化させた iPS 細胞を取り込ませた樹状細胞でマウスを免疫すると、免疫マウスは線維肉腫 CMS4 細胞の移植を強く拒絶した。この抗腫瘍効果は CMS4 細胞を免疫原として樹状細胞に取り込ませた場合よりも強力で、また、未熟な状態の iPS 細胞を免疫原とするより、血管内皮細胞に分化させた iPS 細胞を免疫原としたほうが明らかに効果的であった。免疫マウスの CD8+T 細胞は血管内皮に分化させた iPS 細胞に反応することが IFN  $\gamma$  ELISPOT assay により示された。免疫マウスに形成された小さな腫瘍は潰瘍形成傾向を示し、組織学的に腫瘍血管の形成が著しく不良であることが示された。また、この抗腫瘍効果は腫瘍血管に富む CMS4 では強く、一方、腫瘍血管に乏しい C26 における効果は弱かった。

## D. 考察

### (1) 肝細胞がんの超早期診断法の検証

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

今回解析した 15 例は手術から再発までの期間が短く、多くが早期再発をきたした症例群であり、術後初回の画像検査で再発が確認された症例が多く含まれることを考えても、ミクロレベルにおいて、手術で完全切除が得られていなかった症例が多く含まれる可能性が高く、「理想的なマーカー挙動」を論じるには不適切な対象であったと言わざるを得ない。 $\beta$ 2-MG は、今回の検討ではモニタリングにおける臨床的有用性は確認できなかった。

今回の血清 GPC3 測定では全体的に Cut-off 値以下であったが、今回検討した再発 15 例は早期再発をきたした症例が多く含まれていることに加え、再発へ向けて GPC3 値が上昇する傾向のある症例を認めたこともあり、今後も再発症例を集めての再検討が必要と考えられた。抗 GPC3 IgG 抗体は、今回の検討では担がん状態においても陽性率が低かったことから、今後再発症例に限らず、カットオフ値の評価を併せて検討が必要と考えられた。

#### ② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーの探索

今回解析した 8 例はいずれも登録から発癌までの期間、および発癌前採血回数が十分とは言えず、腫瘍マーカーの time course を論じるのは困難であった。すでに登録された未発がん症例については今後も検体採取と解析を継続する予定である。

#### ③ 腫瘍マーカー AFP・高感度 AFP-L3%・PIVKA-II による肝細胞癌の発癌予測に関する研究

今回の検討では、診断 1 年前の高感度 AFP-L3% の上昇により腫瘍径が平均  $1.9 \pm 0.6$  cm と微小な HCC104 症例において HCC 発癌予測が可能であると考えられた。さらに AFP 濃度が 10 ng/mL 未満の症例においても、AFP-L3% の高感度測定法により診

断の 1 年前から高率にその上昇が認められた。画像診断において HCC の存在が確認されなくても、AFP-L3% の上昇が認められた症例は近い将来に HCC 発癌が疑われるため、発癌の超高危険群として慎重な観察が望まれるものと考えられた。しかしながら、特異度は高いもののその感度は高いとはいえず、腫瘍マーカーによるより正確な発癌予測のためには、AFP-L3% と AFP もしくは PIVKA-II との組み合わせや新規腫瘍マーカーの開発を含めた更なる検討が必要であると考えられた。また診断前の AFP-L3% 値の上昇が、画像で捉えられないごく微小な肝細胞癌からの産生によるのかなど、その上昇のメカニズムについても今後解明が必要であると考えられる。

### (2) 肝細胞がんにおける血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討

今回の結果を受けて、CTC が肝細胞がんの早期診断に寄与するか否かを検証する研究として、①肝細胞がんの術後再発、および②慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの早期診断を目指し、前向きな検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。

### (3) 肝細胞がんの陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験に関する研究

現在経動脈的（化学）塞栓術が標準と考えられる本症例群において、ICG R15% と V30% を用いた症例選択と消化管有害事象を避けるためのスパーサー挿入は妥当であることが示唆された。これによりきわめて良好な局所制御率が期待できる陽子線治療と、GPC3 ペプチドワクチンによる再発予防との相乗効果が期待できるような臨床試験の対象が明らかとなり、プロトコールを作成して国立がん研究センター倫理審査委員会に提出中である。

### (4) GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の基礎研究ならびに *in vivo* 試験

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は、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。

## (5) iPS 細胞由来の免疫細胞療法の開発

### ① ヒト iPS 細胞由来マクロファージ(iPS-MP)療法の開発

腫瘍細胞表面抗原に対する単鎖抗体を発現する iPS-MP による抗腫瘍効果が、*in vitro* および *in vivo* の実験により示された。がん治療に用いるためのマクロファージのソースとして iPS 細胞を用いることには、ドナーの負担なく大量の細胞を調整できることに加えて、遺伝的改変により、このようにながんと特異的に攻撃するマクロファージを作製できるという利点があると考えられる。

### ② iPS 細胞ワクチンを用いた腫瘍血管標的免疫療法の開発

iPS/ET を用いて腫瘍血管を標的とした免疫反応が誘導できれば、iPS 細胞を癌治療に使用する新たな方向性が期待できる。特に本研究で免疫原として用いた iPS/ET は lysate として用いられ DC に取り込まれているため、安全性の高い臨床応用が期待される。

## E. 結論

肝細胞がんの術後再発、および慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの超早期診断を目指して前向きな検体収集を行い、AFP、AFP-L3 分画、DCP、 $\beta$ 2-ミクログロブリン、GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体について経時的変化を解析した。現在までの解析例は経過観察期間が短い中で再発、発がんを来した症例群であり、マーカー挙動につき論じるには不適切な症例が多く含まれたが、その中にも再発例 15 例中 2 例に DCP の経時的変化が再発の早期診断に有用な可能性が示された。一方、大垣市民病院での後ろ向き的大量検体を用いた研究では、肝細胞癌の診断 1 年前の時点において高感度 AFP-L3% の上昇が認められた。高感度 AFP-L3% 値が上昇している症例は肝発癌の超高危険群として慎重な観察が望まれるものと考えられた。

肝細胞がんにおいて、ウイルスを使用した血中循環がん細胞検出技術が適用可能であることが示された。これを受け、今後、①肝細胞がんの術後再発、および②慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの早期診断を目指し、prospective な検体収集による 2 つの研究を計画し、近日中に開始予定である。CTC は肝細胞がんの早期診断に寄与する可能性があり、今後の研究の成果が期待される。

ICG R15% と V30% は、HCC に対する陽子線治療の適応判断に有用であると考えられる。適格症例での再発予防のための GPC3 ペプチドワクチンの併用効果を確認する臨床試験プロトコールを作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会に提出した。

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。

iPS 細胞は、癌に対する免疫療法を行うための樹状細胞のソースとしてのみならず、癌に対して直接的に抑制効果を発揮するマクロファージを作成するための細胞ソースとしても有用であることが示された。また iPS 細胞由来血管内皮細胞を免疫原とした樹状細胞療法は、腫瘍血管を標的とした有効な免疫療法となりうる可能性が示された。

## 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) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of  $\beta$ 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 23(5): 1325-1330, 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.
- 4) Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Atsumi H, Takagi M, Arakawa T, Fujimori M. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection who have normal alanine aminotransferase values. *J. Med. Virol.* 82(4):539-545, 2010.
- 5) Yasuda E, Kumada T, Toyoda H, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Yoshimi N, Kozawa O. Evaluation for clinical utility of GPC3, measured

by a commercially available ELISA kit with Glypican-3 (GPC3) antibody, as a serological and histological markers for hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Res.* 40(5): 477-485, 2010.

- 6) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol. Int.* 60(5): 351-357, 2010.
- 7) Kudo M, Hatanaka K, Kumada T, Toyoda H, Tada T. Double-contrast ultrasound: a novel surveillance tool for hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 106(2): 368-370, 2011.
- 8) Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* in press.
- 9) Toyoda H, Kumada T, Tada T, Kaneoka Y, Maeda A, Kanke F, Satomura S. Clinical utility of highly sensitive Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with alpha-fetoprotein <20 ng/mL. *Cancer. Sci.* in press.
- 10) Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, Maeda A. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are associated with post-operative recurrence and survival of patients with HCV genotype 1b-associated hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* in press.
- 11) Kumada T, Toyoda H, Arakawa T, Sone Y, Fujimori M, Ogawa S, Ishikawa T. Evolution of hypointense hepatocellular nodules observed only in the hepatobiliary phase using Gd-EOB-DTPA enhanced magnetic resonance imaging. *Am. J. Roentgenol.* In press.
- 12) Kawashima M, Kohno R, Nakachi K, Nishio T, Mitsunaga S, Ikeda M, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Arahira S, Zenda S, Ogino T, Kinoshita T. Dose-volume histogram analysis of the safety of proton beam therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.* in press.
- 13) Tomita Y, Imai K, Senju S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Shiraishi K, Mori T, Daigo Y, Tsunoda T, Ito T, Nomori H, Nakamura Y, Kohrogi H, Nishimura Y. A novel tumor-associated antigen, cell division cycle 45-like can induce cytotoxic T lymphocytes reactive to tumor cells. *Cancer Sci.* in press.
- 14) Imai K, Hirata S, Irie A, Senju S, Ikuta Y, Yokomine K, Harao M, Inoue M, Tomita Y, Tsunoda T, Nakagawa H, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* in press.
- 15) Tomita Y, Harao M, Senju S, Imai K, Hirata S, Irie A, Inoue M, Hayashida Y, Yoshimoto K, Shiraishi K, Mori T, Nomori H, Kohrogi H, Nishimura Y. Peptides derive from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. *Cancer Sci.* 102: 71-78, 2011.
- 16) Inoue M, Senju S, Hirata S, Ikuta Y, Hayashida Y, Irie A, Harao M, Imai K, Tomita Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Ito T, Nakamura Y, Baba H, Nishimura Y. Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *Int J Cancer.* 127: 1393-403, 2010.
- 17) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, and Nishimura Y. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Therapy*, in press.
- 18) Ikeda T, Hirata S, Fukushima S, Matsunaga Y, Ito T, Uchino M, Nishimura Y, Senju S. Dual effects of TRAIL in suppression of autoimmunity: the inhibition of Th1 cells and the promotion of regulatory T cells. *J. Immunol.* 185(9):5259-5267, 2010.
- 19) Senju S, Matsunaga Y, Fukushima S, Hirata S, Matsuyoshi H, Nishimura Y. Pluripotent stem cells-derived dendritic cells for immunotherapy. *Front Biosci.* 2: 1520-1527, 2010.
- 20) Chen YZ, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 23(1): 165-177, 2010.
- 21) Senju S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Fukushima S, Matsuyoshi H,

- Nishimura Y. Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int. J. Hematol.* 91(3): 392-400, 2010.
- 22) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. The Forkhead Box M1 Transcription Factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer*, 126(9):2153-2163, 2010.
- 23) Ito M, Suzuki H, Sagawa Y, Homma S. The identification of a novel Paneth cell-associated antigen in a familial adenomatous polyposis mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400(4):548-553, 2010.
- 24) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Takahara A, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Regulation of Tumor Immunity by Tumor/Dendritic Cell Fusions, *Clin. Develop. Immunol.* Volume 2010 (2010), Article ID 516768, 14 pages
- 25) Koido S, Hara E, Homma S, Namiki Y, Komita H, Takahara A, Nagasaki E, Ito M, Sagawa Y, Mitsunaga M, Uchiyama K, Satoh K, Arihiro S, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Dendritic/pancreatic carcinoma fusions for clinical use: comparative functional analysis of healthy- versus patient-derived fusions. *Clin. Immunol.* 135(3): 384-400, 2010.
- 26) Koido S, Homma S, Hara E, Namiki Y, Okusa T, Gong J, Tajiri H. Antigen-specific polyclonal cytotoxic T lymphocytes induced by fusions of dendritic cells and tumor cells. *J. Biomed. Biotech.* Volume 2010 (2010), Article ID 752381, 12 pages doi:10.1155/2010/752381
- 27) Saeki C, Nakano M, Takahashi H, Saito S, Homma S, Tajiri H, Zeniya M. Accumulation of functional regulatory T cells in a actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation. *Clin. Immunol.* 135(1):156-166, 2010.
- 28) Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK-cell mediated antitumor activity via tumor necrosis factor-alpha pathway. *J. Immunother.* 33(5): 467-474, 2010.
- 29) 中面哲也 第5章がんワクチン 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.
- 30) 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 (特集: がん免疫療法の進歩と問題点—ペプチドワクチン療法、抗体療法、細胞療法—)、月刊Mebio 2010年12月号 (vol. 27 No. 12)、メジカルビュー社、p49-55, 2010.
- 31) 中面哲也 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、東京理科大学、p32-35, 2010.
- 32) 小森宏之、中面哲也、別府 透、馬場秀夫、西村泰治 VIII. 腫瘍マーカーGPC3(Glypican-3)、*日本臨牀* 68:833-836, 2010.
- 33) 熊田 卓、豊田秀徳 第5章 肝臓の診断 A. 腫瘍マーカー、肝臓診療マニュアル第2版、日本肝臓学会、医学書院、p32-35, 2010.
- 34) 熊田 卓、豊田秀徳 第7章 肝臓の治療効果判定の仕方 D. 腫瘍マーカーによる効果判定、肝臓診療マニュアル第2版、日本肝臓学会、医学書院、p136-138, 2010.
- 35) 多田俊史、熊田 卓、桐山勢生、豊田秀徳 生存分析からみた進行肝細胞癌に対するソラフェニブ投与例の検討 *肝臓* 51(11):684-685, 2010.
- 36) 小川定信、川地俊明、船坂佳正、石川照芳、熊田 卓、豊田秀徳、曾根康博 【肝臓の EOB・プリモビスト造影 MRI 本検査を有効に活用するための理解すべき課題】 肝細胞癌 肝細胞造影相で hypointensity を呈する乏血性結節 (非濃染結節) のリスクについて *日独医報* 55(2):151-158, 2010.
- 37) 前田敦行、磯谷正敏、金岡祐次、高橋 祐、熊田 卓、豊田秀徳、内山 良 【肝臓治療と DPC】 診断群包括評価 (DPC) 時代の肝細胞癌 肝切除 *消化器内科* 51(3):292-297, 2010.
- 38) 多田俊史、熊田 卓、豊田秀徳、桐山勢生、竹島賢治、小川定信、乙部克彦、中野雅行 肝細胞癌の診断における perfluorobutane 造影超音波と Gd-EOB-DTPA 造影 MRI の有用性に関する検討 *肝臓* 51(3):99-106, 2010.
- 39) 多田俊史、熊田 卓、豊田秀徳、桐山勢生、谷川 誠、久永康宏 【肝臓診療のアルゴリズム 2010】 肝臓の診断 肝臓スクリーニングにおける腫瘍マーカー *臨床消化器内科* 25(4): 437-442, 2010.
- 40) 豊田秀徳、熊田 卓、多田俊史、桐山勢生、谷川 誠、久永康宏、金森 明、藤森将志 【早

期肝細胞癌の診断ストラテジー】 AFP 正常肝細胞癌症例における高感度 AFP レクチン分画による早期肝細胞癌の診断と予後の分別 消化器内科 51(5):511-517, 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) 肝細胞癌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
- 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) 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回国際免疫学会議) (神戸)、2010年8月22～25日
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) C型肝炎に起因する肝細胞癌は最近どう変化したか？ 田中達也、豊田秀徳、他 【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 14) 肝細胞癌の治療前後における高感度化AFP-L3%測定の臨床的有用性の検討 川勝章司、豊田秀徳、他 【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 15) 肝細胞癌における高感度化AFP-L3%測定の臨床的検討 山本健太、豊田秀徳、他 【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 16) 超音波所見により肝細胞癌の肉眼分類の推定は可能か？ 多田俊史、豊田秀徳、他 【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 17) B型肝炎に起因する肝細胞癌の最近の特徴 山本健太、豊田秀徳、他 【一般演題】第46回日本肝臓学会総会（山形）、2010年5月27～28日
- 18) 肝特異性造影剤出現による肝細胞癌の治療戦略の変化 熊田卓、豊田秀徳、他 【シンポジウム】第14回日本肝臓学会大会（横浜）、2010

年10月13～14日

- 19) C型肝硬変における高感度AFP-L3測定による肝細胞癌発生の予知 安田 諭、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会(横浜)、2010年10月13～14日
- 20) Gd-EOB-DTPA-MRIによる肝細胞癌治療後の多中心性発生の診断と治療戦略 藤森将志、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会(横浜)、2010年10月13～14日
- 21) C型肝炎に起因する肝細胞癌の変遷とサーベイランスの注意点 安東直人、豊田秀徳、他【ワークショップ】第14回日本肝臓学会大会(横浜)、2010年10月13～14日
- 22) 生存分析からみた進行肝細胞癌に対するソラフェニブ投与例の検討 多田俊史、豊田秀徳、他【ワークショップ】第38回日本肝臓学会東部会(東京)、2010年12月2～3日
- 23) Gd-EOB-DTPA造影MRIにおける非濃染結節の血管造影下CTにおける評価 三浦絵美梨、豊田秀徳、他【一般演題】第38回日本肝臓学会東部会(東京)、2010年12月2～3日
- 24) 肝細胞癌に対する陽子線治療の適症的検討、河島光彦、第48回日本癌治療学会(京都)、2010年10月26日
- 25) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原CDC45Lの同定、西村泰治(他12名)第55回人類遺伝学会(埼玉)、2010年10月27～30日
- 26) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介(他13名) 西村泰治 第69回日本癌学会学術総会(大阪)、2010年9月22～24日
- 27) 肺癌の免疫療法に有用な新規癌関連抗原CDC45Lの同定、富田雄介(他11名) 西村泰治 第19回日本組織適合学会(東京)、2010年9月17～19日
- 28) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介(他13名) 西村泰治 14th international congress of immunology(神戸)、2010年8月22～27日
- 29) Identification of a novel tumor-associated antigen, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), as a target for immunotherapy of gastric, colorectal, and pancreatic cancers. 林田裕希(他12名) 西村泰治 14th international congress of immunology(神戸)、2010年8月22～27日
- 30) Identification of a novel tumor-associated antigen CDC45L, as a candidate of target for immunotherapy of lung cancer. 富田雄介(他13名) 西村泰治 第14回日本がん免疫学会総会(熊本)、2010年7月22～23日
- 31) 理想的ながん抗原を標的とするがん免疫療法の開発 西村泰治 第14回日本がん免疫学会総会 総会長講演(熊本)、2010年7月22～23日
- 32) がん免疫療法：基礎から臨床への橋渡し研究 西村泰治 第29回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 教育講演(熊本)、2011年1月27～28日
- 33) iPS細胞を用いた免疫細胞療法、千住 覚、春田美和、松村桂子、松永雄亮、福島 聡、入江 厚、西村泰治、第14回日本がん免疫学会総会シンポジウム(熊本)、7月22～23日
- 34) iPS細胞を用いた免疫細胞療法の開発、千住 覚、平田真哉、松吉秀武、松永雄亮、福島 聡、池田徳典、入江 厚、西村泰治、第19回日本組織適合性学会大会シンポジウム(東京)、9月17～19日
- 35) iPS細胞を用いた免疫細胞療法の開発、千住 覚、京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成22年度学術講演会(京都)、12月17日
- 36) Senju S, Haruta M, Matsumura K, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takamatsu K, Irie A, Nishimura Y, Generation of dendritic cells and macrophages from human iPS cells aiming at application to cell therapy, 14th International Congress of Immunology (ICI2010), Kobe, August 22～27, 2010
- 37) 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビンの併用効果のメカニズム、本間定、高原映崇、小井戸薫雄 ワークショップ【消化器がんにおけるがんワクチン療法に臨床的エビデンスはあるのか】、第96回日本消化器病学会総会(新潟)、2010年4月22～24日
- 38) 進行膵癌に対する WT1 ペプチドワクチンと塩酸ゲムシタビンの併用効果のメカニズム、本間定、高原映崇、小井戸薫雄 シンポジウム【癌免疫療法の最前線】、第19回日本癌病態治療研究会(東京)、2010年6月30日～7月1日
- 39) 抗腫瘍免疫反応により産生されるインターフェロンガンマはゲムシタビン活性化酵素の発現を上昇させる、本間 定、佐川由紀子、高原映崇、永崎栄次郎、込田英夫、伊藤正紀、小井戸薫雄、第69回日本癌学会学術総会(大阪)、

2010年9月22～24日

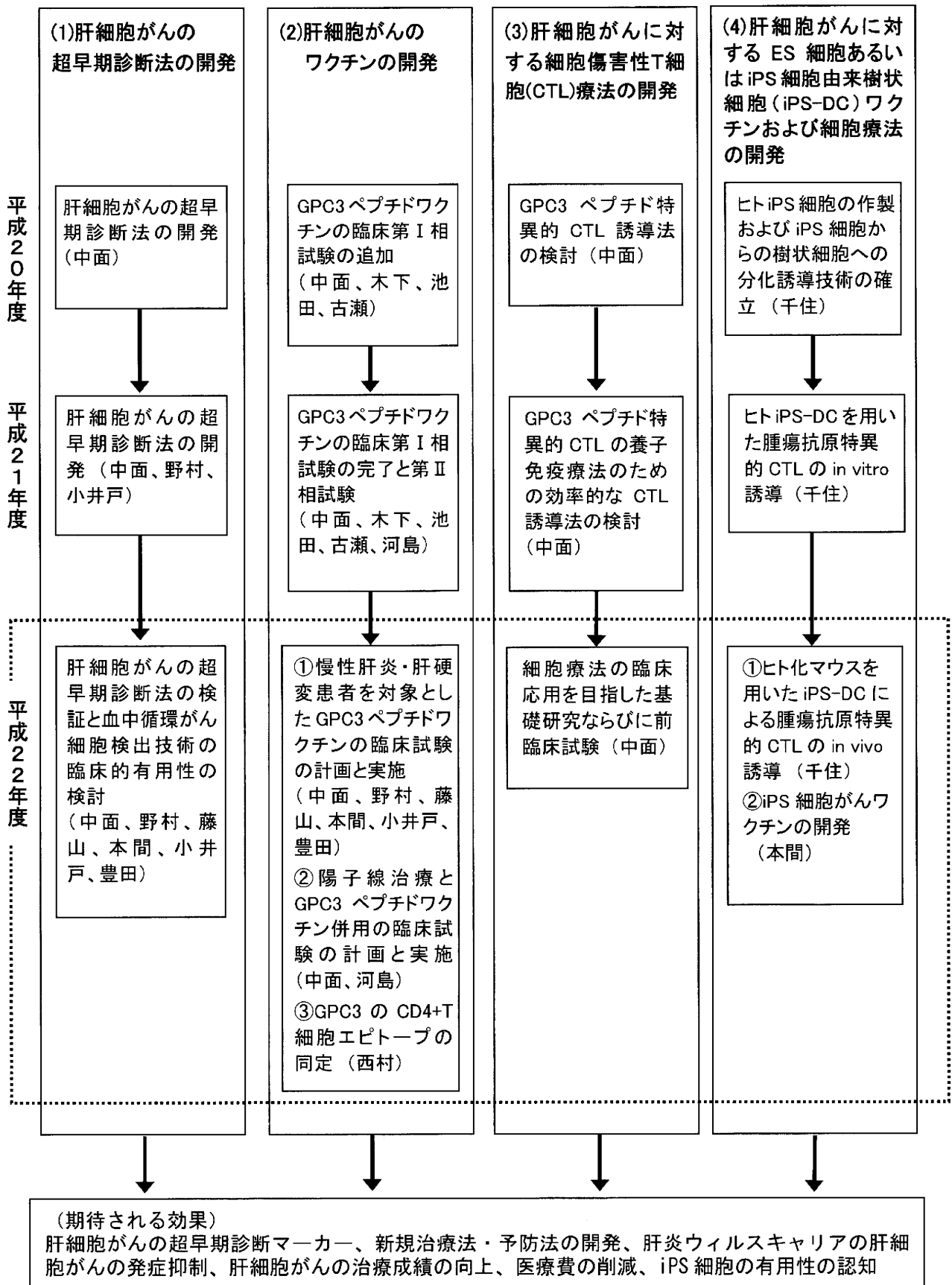
- 40) 臨床応用に向けた樹状細胞と膵癌細胞との融合膵癌ワクチン、小井戸薫雄、本間 定、込田英夫、高原映崇、大草敏史、田尻久雄、第69回日本癌学会学術総会(大阪)、2010年9月22～24日
- 41) 切除不能・再発進行膵臓癌に対するゲムシタピン併用 WT1 ペプチドワクチン療法 第1相臨床試験、西田純幸、武田 裕、小井戸薫雄、岡芳弘、込田英夫、本間 定、大草敏史、森 正樹、土岐祐一郎、川瀬一郎、田尻久雄、杉山治夫、第69回日本癌学会学術総会(大阪)、2010年9月22～24日
- 42) 膵癌に対する WT1 ペプチド免疫療法、本間 定、小井戸薫雄、込田英夫、高原映崇、大草敏史、西田純幸、武田 裕、岡 芳弘、伊藤壽記、坪井昭博、杉山治夫 パネルディスカッション【WT1ペプチドがん免疫療法の現状と将来】、第48回日本癌治療学会学術集会(京都)、2010年10月28～30日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## 研究成果の概要図

### 癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発





### Ⅲ. 分担研究報告

## 肝細胞がんの超早期診断法の検証「AFP/DCP/AFP-L3/ $\beta$ 2-ミクログロブリン」

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 野村 和弘 東京労災病院 院長  
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長  
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授  
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科 准教授  
豊田 秀徳 大垣市民病院 消化器科 医長  
研究協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長  
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長

### 研究要旨

本研究は、肝細胞がんの治療成績向上のために、肝細胞がんの超早期診断法の開発を目指すものである。今回、肝細胞がんの術後再発、および慢性肝炎・肝硬変患者からの発がんの超早期診断を目指して前向きに検体収集を行い、AFP、AFP-L3 分画、DCP、 $\beta$ 2-ミクログロブリンについて経時的変化を解析した。現在までの解析例は経過観察期間が短い中で再発、発がんを来した症例群であり、マーカー挙動につき論じるには不適切な症例が多く含まれたが、その中にも再発例 15 例中 2 例に DCP の経時的変化が再発の早期診断に有用な可能性が示された。

登録例の検体採取と解析については現在も継続中である。

### A. 研究目的

現在、肝細胞がん(HCC)の腫瘍マーカーとしてはAFP(alpha-fetoprotein)、AFP-L3 分画(レンズマメ結合性 AFP)、および DCP(des- $\gamma$ -carboxy prothrombin)の3種類が代表的であり、本邦においても保険適応となっている。さらに、我々はこれまで、Glypican-3(GPC3)、抗 GPC3-IgG 抗体、 $\beta$ 2-ミクログロブリン( $\beta$ 2-MG)が HCC の新規腫瘍マーカーとして有用である可能性を報告してきた。

今回、①HCC の術後再発、および②慢性肝炎(CH)・肝硬変(LC)患者からの発がんの超早期診断を目指し、prospective な検体収集による2つの研究を行った。

### B. 研究方法

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

2008年5月から2010年12月までに、国立がん研究センター東病院において50例のHCC根治手術予定患者を術前に登録した。同患者について、術前、術後1週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、以後3ヶ月ごとを目安に、画像検査にて再発が確認されるまで血清および血漿の検体採取を行った。

#### ② CH・LC患者からのHCC発がんにおける早期診断マーカーの探索

2009年9月より症例集積を開始し、2010年12月までの間に、東京労災病院およびNTT西日本九州

病院において、HBVあるいはHCV感染を有するCH・LC患者を登録した。同患者について、外来受診ごとに血清および血漿の検体採取を行い、これを画像検査にてHCC発がんが確認されるまで継続した。

#### [倫理面への配慮]

本研究は臨床検体を用いた研究であり、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ており、本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針に従って本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

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーの探索

登録50症例全てが肉眼的および組織学的に根治切除であった。その後、2010年12月までの経過観察にて、このうち15例にHCC再発を認めた。これら15例の再発までの期間は中央値5.0ヶ月、範囲1.4-24.5ヶ月であった。再発までの採血回数は中央値で4回、範囲3-8回であった。術後初回の画像検査で再発を認めた症例が15例中7例であった。

AFP、DCP、AFP-L3、 $\beta$ 2-MGの中では、我々が仮説として想定した「理想的なマーカー挙動」を確認

できたのはDCPの15例中2例のみであった。 $\beta$ 2-MGは経過中の変動が小さく、術前や再発時に上昇していない症例が多かった。

## ② CH・LC患者からのHCC発がんにおける早期診断マーカーの探索

2010年12月までの経過観察にて、東京労災病院にて3例、NTT西日本九州病院にて5例のHCC発がんを認めた。研究全体としての採血回数は中央値で3回、範囲1-6回であったが、発がんまでの採血回数は中央値で2回、範囲1-3回であった。登録前1ヶ月以内の画像検査がない症例や、登録時から既にHCCを確認している症例も含まれていた。

## D. 考察

### ① HCC術後再発における早期診断マーカーの探索

今回解析した15例は手術から再発までの期間が短く、多くが早期再発をきたした症例群であり、術後初回の画像検査で再発が確認された症例が多く含まれることを考えても、マイクロレベルにおいて、手術で完全切除が得られていなかった症例が多く含まれる可能性が高く、「理想的なマーカー挙動」を論じるには不適切な対象であったと言わざるを得ない。 $\beta$ 2-MGは、今回の検討ではモニタリングにおける臨床的有用性は確認できなかった。

### ② CH・LC患者からのHCC発がんにおける早期診断マーカーの探索

今回解析した8例はいずれも登録から発癌までの期間、および発癌前採血回数が十分とは言えず、腫瘍マーカーのtime courseを論じるのは困難であった。

## E. 結論

今回の解析対象患者①15例と②8例は短い経過観察期間における再発例、あるいは発がん例であり、十分な解析ができているとは言えない状況であった。しかしながら、その中でもDCPが有用性を示す症例が2例みられた。

今後、新規症例登録は行わず、登録例の検体採取と解析を継続する予定である。

## 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) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y,

Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of  $\beta$ 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 23(5): 1325-1330, 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), April17-21, 2010.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 肝細胞がんの超早期診断法の検証「GPC3、抗 GPC3-IgG 抗体」

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 野村 和弘 東京労災病院 院長  
藤山 重俊 NTT 西日本九州病院 院長  
本間 定 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所 准教授  
小井戸薫雄 東京慈恵会医科大学 慈恵医大附属柏病院 消化器・肝臓内科 准教授  
豊田 秀徳 大垣市民病院 消化器科 医長  
研究協力者 熊田 卓 大垣市民病院 消化器科 部長  
児島 辰也 東京労災病院 消化器内科 部長

### 研究要旨

本研究では、肝細胞がんの治療成績向上を目指し、超早期診断マーカー候補である GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体の有用性を検証した。多施設から prospective に患者検体を収集し、血清中の GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体の陽性率および測定値の推移を比較検討したが、研究開始からの経過観察期間が十分でなく症例数に限りがあり大規模な検証とはならず、両腫瘍マーカーの有用性について言及できなかったことから、既登録症例について今後も解析を行うことで評価したい。

### A. 研究目的

現在、肝細胞がん(HCC)の腫瘍マーカーとしては AFP、AFP-L3 分画、および DCP の 3 種類が代表的であり、本邦においても保険適応となっている。しかし、いずれも小さな HCC においては陽性率が低く、これらの腫瘍マーカーが HCC の早期診断に寄与することは少ないのが現状である。我々はこれまで、Glypican-3(GPC3)、抗 GPC3-IgG 抗体が HCC の新規腫瘍マーカーとして有用である可能性を報告してきた。今回、prospective に検体を収集することにより①HCC の術後再発、および②慢性肝炎(CH)・肝硬変(LC)患者からの発がんの超早期診断における GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体の有用性につき検討を行った。

### B. 研究方法

コントロール(健常人ボランティア)として GPC3 については 199 例(平均年齢 62.4 歳)、抗 GPC3-IgG 抗体については 15 例(平均年齢 32.1 歳)を対象とした。抗 GPC3-IgG 抗体測定に際し、陽性コントロールとしてあらかじめ同一 HCC 患者血清サンプルの 6400 倍希釈を 1unit/L と設定しておき、抗体価を算出した。ELISA 法を用いて血清中の GPC3 および抗 GPC3-IgG 抗体を測定した。Cut-off 値(Ave+SD)をそれぞれ GPC3: 1.98 ng/ml (特異度 96.0%)、抗 GPC3-IgG 抗体: 373.4units/L (特異度 86.7%)とした場合の、各腫瘍マーカー陽性率および測定値の推移を比較検討した。検体収集方法は下記のとおりで

ある。

#### ① HCC 術後再発における早期診断マーカーとしての検討

2008 年 5 月から症例集積を開始し、国立がん研究センター東病院において 50 例の HCC 根治手術予定患者を登録した。同患者について、術前、術後 1 週間後、1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、以後 3 ヶ月ごとを目安に、画像検査にて再発が確認されるまで血清の検体採取を行った。

#### ② CH・LC 患者からの HCC 発がんにおける早期診断マーカーとしての検討

2009 年 9 月より症例集積を開始し、東京労災病院および NTT 西日本九州病院において、HBV あるいは HCV 感染を有する CH・LC 患者を登録した。同患者について、外来受診ごとに血清の検体採取を行った。

#### [倫理面への配慮]

本研究は臨床検体を用いた研究であり、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ており、本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針に従って本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。