

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られ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, Monji 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、各種がんの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、排除しようする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ビン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ー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、ゲムシタビ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相治療が進行中であり、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I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リ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、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ー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、開業医などどこ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) 鶴間 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)

XIII. 腫瘍マーカー

GPC3 (glypican-3)

Assessment of serum GPC3 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma and malignant melanoma

小森宏之¹ 中面哲也² 別府 透¹ 馬場秀夫¹ 西村泰治³

Key words : glypican-3(GPC3), 腫瘍マーカー, 肝細胞癌(HCC), 悪性黒色腫, 免疫療法

1. 概 説

ヒトの肝細胞癌(HCC)組織と正常組織におけるcDNAマイクロアレイ解析により, HCCに高発現する癌胎児性抗原の遺伝子としてglypican-3(GPC3)を同定した。GPC3はヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種で, 胎生期の細胞の増殖と分化において重要な役割を担っている。GPC3遺伝子はX染色体(Xq26)に存在し, その変異により巨人症の一つであるSimpson-Golabi-Behmel症候群を発症することが¹1996年Piliaらによって報告された¹。GPC3は, GPIアンカー膜蛋白質であり, 60kDaのコア蛋白質にヘパラン硫酸(HS)鎖が結合し, Wnt, FGF, IGFなどの増殖因子と結合することにより細胞増殖シグナルを調節している。GPC3が血清中に分泌される機序は不明であるが, コア蛋白質が分泌されるという報告と^{2,3}, 40kDaのN末端側が分泌される⁴という2つの説がある。近年, この可溶性GPC3がHCCや悪性黒色腫患者の血清中に検出され腫瘍マーカーとして有用であるとの報告²⁻⁵が, 著者らを含め複数の研究者からなされているので, 最近の知見も踏まえて報

告する。

2. 検査の目的

患者の血清検体を利用したHCCおよび悪性黒色腫の診断, 治療効果判定および再発の検出。

3. 試料の採取方法, 保存条件

採血により得た末梢静脈血から遠心分離して得た血漿あるいは血清を使用。保存は-80℃のdeep freezerによる冷凍保存が好ましい。

4. 測定法

サンドイッチELISA法を用いて測定。使用する抗GPC3抗体は複数の企業から発売されている。またBio Mosaic社からは血清GPC3測定キットが販売されており, 1プレート96穴で一度に41検体まで測定可能である。このGPC3測定キットを利用して, 45pg/mL以上のGPC3を検出できる。ただし, 現時点では, 測定は, まだ研究室レベルで実施されているにとどまり, 安定した測定キットの供給による検査室レベルでの測定までには普及していない。

XIII

¹Hiroyuki Komori, Toru Beppu, Hideo Baba: Department of Gastroenterological Surgery, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences 熊本大学大学院生命科学研究部 消化器外科学分野 ²Tetsuya Nakatsura: The Immunotherapy Section, Investigative Treatment Division, Center for Innovative Medicine, National Cancer Center East 国立がんセンター東病院 臨床開発センター 機能再生室 ³Yasuharu Nishimura: Department of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences 熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野

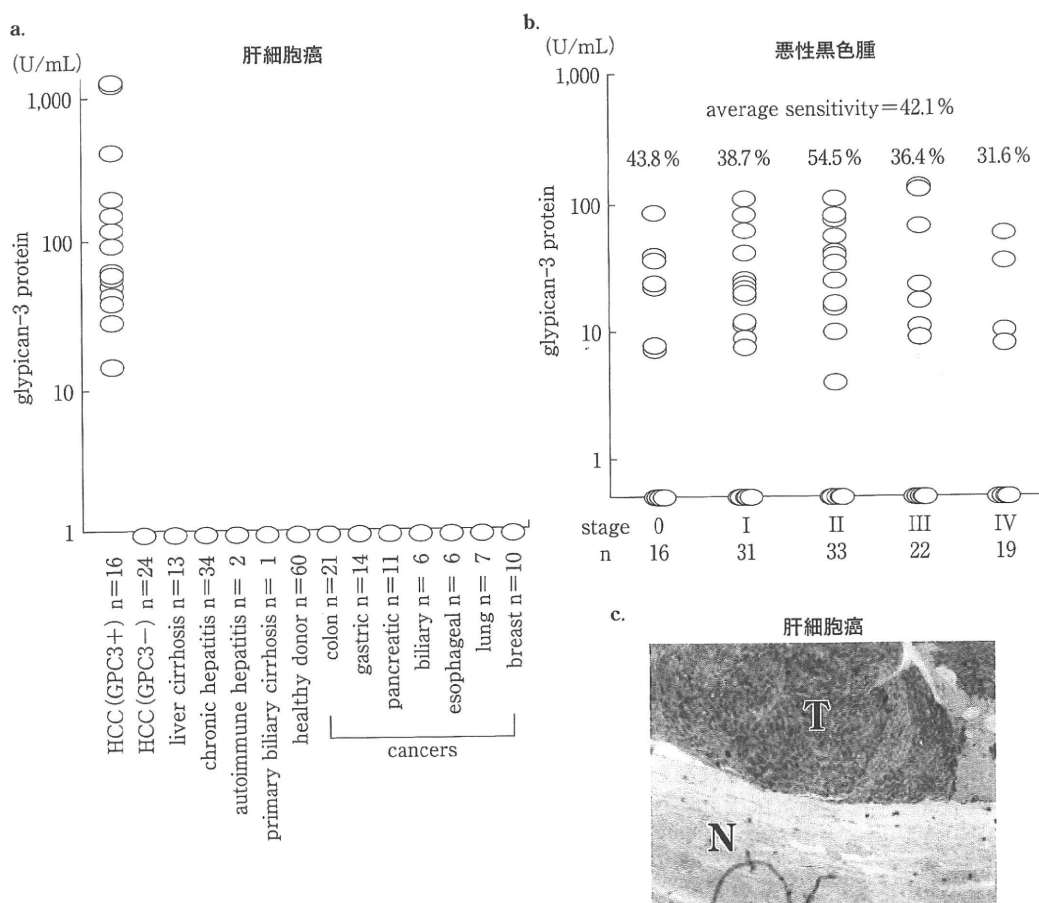


図1 HCCおよび悪性黒色腫患者の血清中におけるGPC3蛋白質の検出

a: ELISA法によるHCC患者血清中のGPC3蛋白質の検出。HCC患者40症例のうち16症例の血清中にGPC3蛋白質が検出された(検出感度40%)が、健康人、その他の肝疾患あるいは、その他の癌患者の血清中にはGPC3蛋白質は検出されなかった。可溶性GPC3蛋白質発見のきっかけとなった肝芽腫細胞株HepG2(1×10^6 個)を、10% FCS/RPMI培養液1mL中にて24時間培養し、その上清中に含まれるGPC3蛋白質量を1Uと定義し、10U/mL以上を陽性とした。

b: 悪性黒色腫患者血清中におけるGPC3蛋白質の検出。GPC3蛋白質は早期の患者血清中にも検出された。

c: HCC組織におけるGPC3蛋白質の発現。HCC組織切片を抗GPC3抗体を用いて、免疫組織化学的に解析した。T: HCC, N: 正常肝組織。

5. 基準値

HCCあるいは悪性黒色腫の患者血清以外では、ほとんど検出されない。健康人の血清GPC3値については、現在、統一したキットを用いた多数の検体の測定により、正常値が決定されつつある。

6. 生理的変動

GPC3は胎児期の肝臓、肺、腎組織に発現するが出生後発現しなくなり、約80%以上のHCC、悪性黒色腫において再び発現する^{2,5)}。血清GPC3値の生理的変動については、まだ情報が得られていない。

表1 種々の腫瘍組織における GPC3 発現率と患者血清中の GPC3 陽性率

腫瘍	著者・報告年	症例数	組織 GPC3 発現率	血清 GPC3 陽性率
肝細胞癌	Nakatsura ら (2003) ²⁾	40	86 %	40 %
	Capurro ら (2003) ³⁾	29	72 %	53 %
	Hippo ら (2004) ⁴⁾	69	51 %	51 %
悪性黒色腫 yolk sac tumor	Nakatsura ら (2004) ⁵⁾	91	81 %	40 %
	Ota ら (2006) ⁷⁾	25	100 %	ND
	Esheba ら (2008) ⁸⁾	32	97 %	ND
肝芽腫	Zynger ら (2008) ⁹⁾	65	100 %	ND
神経芽細胞腫	Saikali ら (2000) ¹⁰⁾	10*	70 %	ND
Wilms 腫瘍	Saikali ら (2000) ¹⁰⁾	10*	88 %	ND
	Toretsky ら (2001) ¹¹⁾	9	78 %	ND
	Aviel-R ら (2008) ¹²⁾	31	55 %	ND
AFP 産生胃癌	Hishinuma ら (2006) ¹³⁾	10	100 %	ND

*細胞株での検討, ND: 検討されていない。

7. 臨床的意義

GPC3 は HCC 患者の約 40 % の血清中に検出される新規癌胎児性抗原であり, AFP, PIVKA-II に次ぐ HCC の第 3 の腫瘍マーカーとして有用である (図 1-a)。健常人, 慢性肝炎, その他の肝疾患では全く検出されず, その HCC 特異性は AFP を上回る。AFP は感度が約 70 % と高い一方で, 肝炎などの良性疾患でも偽陽性となり特異性が低い。AFP (L3) 分画は特異性は高いが偽陰性症例が約 30 % に認められ, 高分化型では陽性率は低下する。PIVKA-II も特異性は高いが感度は約 50 % とやや低く, こちらも小さい HCC や高分化型 HCC では陽性率が低下する。GPC3 の感度は 44 % とやや低いものの, 以下のような点で有用である。① 早期症例でも検出可能である。② AFP や PIVKA-II との相関はなく, 両者がともに陰性の症例のうち約 10 % が GPC3 陽性であり, より多くの症例の検出が可能となる。③ 正常組織にはほとんど発現せず, 肝炎や肝硬変患者血清中には検出されず特異性が 99 % と高い。④ HCC 組織の免疫組織化学的解析では, 80 % 以上の患者で GPC3 が検出される (図 1-c)。

その後, 著者らは HCC のみならず, GPC3 の悪性黒色腫のマーカーとしての有用性を発見し

た。悪性黒色腫の既存の腫瘍マーカーとして MIA および 5-S-CD があるが, 進行癌患者では血清値が高値を示すものの, 早期症例の検出は困難である。一方 GPC3 の感度は約 40 % と低い, 早期より陽性となり悪性黒色腫の早期発見のマーカーとして有用である (図 1-b)⁵⁾。その後, 著者らは血清 SPARC を併用することにより, さらに早期の悪性黒色腫症例の検出感度が上がることを発見した⁶⁾。

8. 関連検査項目およびその他の有用性

血清中で検出可能な可溶性 GPC3 の報告はないものの, GPC3 の発現が免疫組織化学的に確認されている腫瘍として yolk sac tumor^{7,8)}, 肝芽腫⁹⁾, Wilms 腫瘍^{10,11)} などの胎児性癌, 肺扁平上皮癌¹²⁾ や AFP 産生胃癌¹³⁾ などがあり, これらの悪性腫瘍の病理診断において有用であると推測される (表 1)。

さらに, 癌免疫療法の標的としての有用性がある。GPC3 が癌胎児性抗原としての性格を有することから, 著者らは GPC3 が HCC を破壊する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導できるか否か検討した。その結果, 日本人の約 60 % が所有する HLA-A24, あるいは約 30 % が所有する HLA-A2 に結合して, HCC 細胞株を破壊する CTL を誘導できる, GPC3 由来のペプチドを同

定した。さらに、免疫不全(NOD/SCID)マウスにGPC3を発現するヒトHCC細胞株を皮下注射して生着させた後に、これらのHLA-A24あるいはHLA-A2結合性ペプチドで刺激することにより、HCC患者の末梢血リンパ球より誘導されたヒトCTL株を養子免疫すると、コントロールのT細胞株あるいは生理食塩液のみを投与した群と比較して、有意差をもって腫瘍の増殖抑制が認められた¹⁴⁾。現在、国立がんセンター東病院および熊本大学医学部附属病院を中心とした多施設において、これらのGPC3ペプチ

ドを用いたHCC患者を対象とする癌免疫療法の第I/II相臨床試験が実施されており、その結果が待たれる。

おわりに

血清中のGPC3はHCCおよび悪性黒色腫の血清腫瘍マーカーとして、特に早期診断において有用である。また、その癌胎児性抗原としての性質により、HCC患者を対象としたGPC3を標的とするCTL誘導免疫療法の臨床試験が進行中である。

■文献

- 1) Pilia G, et al: *Nat Genet* 12: 241-247, 1996.
- 2) Nakatsura T, et al: *Biochem Biophys Res Commun* 306: 16-25, 2003.
- 3) Capurro M, et al: *Gastroenterology* 125: 89-97, 2003.
- 4) Hippo Y, et al: *Cancer Res* 64: 2418-2423, 2004.
- 5) Nakatsura T, et al: *Clin Cancer Res* 10: 6612-6621, 2004.
- 6) Ikuta Y, et al: *Clin Cancer Res* 11: 8079-8088, 2005.
- 7) Ota S, et al: *Virchows Arch* 449: 308-314, 2006.
- 8) Esheba GE: *Am J Surg Pathol* 32: 600-607, 2008.
- 9) Zynger DL: *Hum Pathol* 39: 224-230, 2008.
- 10) Saikali Z, Sinnott D: *Int J Cancer* 89: 418-422, 2000.
- 11) Toretsky JA, et al: *J Pediatr Hematol Oncol* 23: 496-499, 2001.
- 12) Aviel-Ronen S, et al: *Mod Pathol* 21: 817-825, 2008.
- 13) Hishinuma M, et al: *Histopathology* 49: 479-486, 2006.
- 14) Komori H, et al: *Clin Cancer Res* 12: 2689-2697, 2006.

4

肝癌の診断

(2) 肝癌スクリーニングにおける腫瘍マーカー

多田 俊史* 熊田 卓* 豊田 秀徳*
桐山 勢生* 谷川 誠* 久永 康宏*

Key words: 肝細胞癌, AFP, AFP-L3 分画, PIVKA-II

要旨

肝細胞癌の代表的な腫瘍マーカーには、AFP、AFP-L3 分画および PIVKA-II の 3 種類がある。AFP は特異度が低い肝機能検査とリンクして評価すれば感度の高いマーカーとなり、AFP-L3 分画は陽性率が低いながらも特異性の高いマーカーである。また PIVKA-II は 3 者のなかでもっとも陽性率が高く、特異度も高いマーカーである。腫瘍マーカーは組み合わせによる評価が推奨され、とくに AFP-L3 分画と PIVKA-II の組み合わせが良好な結果であった。悪性度評価では各マーカーの陽性率は進行度とともに上昇し、さらに AFP-L3 分画および PIVKA-II と切除標本の病理学的検討でもそれぞれのマーカーは生物学的悪性度の評価に適していることが判明した。

進展度診断(Stage 分類)], ② 質的診断(鑑別診断, 悪性度診断), ③ 治療効果判定・再発診断の 3 点であるが、これらをすべて満たす腫瘍マーカーは存在しない。しかし、3 種類の腫瘍マーカーを組み合わせることによりその診断性は向上する。

本稿では、肝細胞癌のスクリーニングにおける 3 種類の腫瘍マーカーについてその臨床的意義について概説する。

I. AFP

この項のポイント

- AFP は特異度が低くカットオフ値をどこに設定しているかにもよるが、肝機能検査とリンクして評価すれば感度の高い腫瘍マーカーとなりうる。

はじめに

現在、肝細胞癌の代表的な腫瘍マーカーには AFP(α -fetoprotein)¹⁾、AFP-L3 分画(レンズ豆結合性 AFP)^{1),2)} および PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II)³⁾ の 3 種類がある。肝細胞癌の腫瘍マーカーに求められるのは、① 存在診断〔早期診断、

AFP は分子量約 7 万で 4% の糖を含む糖蛋白であり、胎生期には生理的に体内に存在する。組織学的に診断された慢性肝炎 71 例、肝硬変 90 例、異型結節 13 例、早期肝細胞癌(高分化型肝細胞癌)14 例、進行肝細胞癌(最大径 3 cm 以下、中・低分化型肝細胞癌)82 例を用いたわれわれの検討では(図 1)、カットオフ値を 20 ng/ml とすると、慢性肝炎、肝硬変、異型結節、早期肝細胞癌および進行肝細胞癌の陽性率はそれ

*大垣市民病院消化器科
(〒503-8502 岐阜県大垣市南瀬町 4-86)

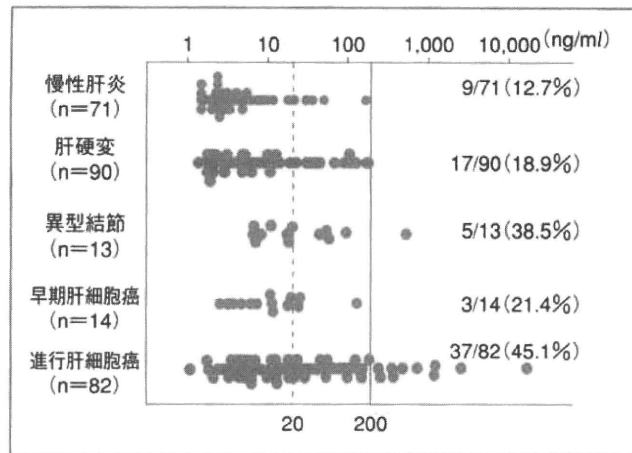


図1 慢性肝疾患における AFP

それぞれ 9/71 (12.7%), 17/90 (18.9%), 5/13 (38.5%), 3/14 (21.4%) および 37/82 (45.1%) で、感度 41.7%, 特異度 82.2% であった。一方、カットオフ値を 200 ng/ml とすると、慢性肝炎、肝硬変、異型結節、早期肝細胞癌および進行肝細胞癌の陽性率はそれぞれ 0/71 (0.0%), 0/90 (0.0%), 1/13 (7.7%) および 0/14 (0.0%), 10/82 (12.2%) で、感度 10.4%, 特異度 99.4% であった。カットオフ値を上げることによって特異度は増したが感度が著しく低下した。

このように AFP は慢性肝疾患など種々の状態で増加するため、軽度上昇の場合には、肝細胞癌との鑑別にはほかの血清学的検査の動態および画像診断などを参考とする必要があり、かつ経過を追うことが重要である¹⁾。

II. AFP-L3 分画

この項のポイント

- AFP-L3 分画は小肝細胞癌での陽性率は低いかわめて特異性の高いマーカーである。
- 最近、高感度 AFP-L3 分画の測定が可能となり、とくに AFP が低値例での有用性が期待される。

AFP-L3 分画は AFP の特異性を向上させることを目的として、AFP の複合型糖鎖の癌性

変化の一つをとらえたものである。カットオフ値は 10% を採用することが多く⁴⁾、慢性肝炎、肝硬変、異型結節、早期肝細胞癌および進行肝細胞癌の陽性率はそれぞれ 0/71 (0.0%), 1/90 (1.1%), 0/13 (0.0%), 0/14 (0.0%) および 18/82 (22.0%) で、感度 18.8%, 特異度 99.4% であった(図 2)。このように特異度は高いものの感度は低いため小さな肝細胞癌の発見は単独では限界があると考えられる。しかし、小さくても上昇例では進行肝細胞癌と診断できる⁵⁾。なお、AFP-L3 分画は肝不全時に上昇することがあり、解釈には注意が必要である¹⁾。

最近、高感度 AFP-L3 分画の測定が可能となった。従来法では AFP-L3 分画の測定が可能な AFP は 10 ng/ml 以上であったが、高感度法では 2 ng/ml 以上となった。高感度 AFP-L3 分画の測定はとくに AFP が低値例で威力を発揮すると考えられ、AFP が 20 ng/ml 未満で Child-Pugh A もしくは B の肝細胞癌 270 例の検討ではカットオフ値を 5% とした場合、感度 41.5%, 特異度 85.1%, 陽性的中率 65.5%, 陰性的中率 68.1% であった。さらに Stage 別の感度では Stage I (n=89): 34.8%, Stage II (n=127): 42.5% であった。

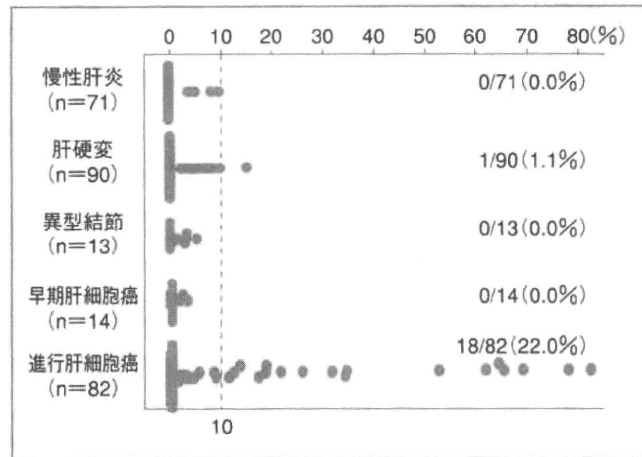


図2 慢性肝疾患における AFP-L3 分画

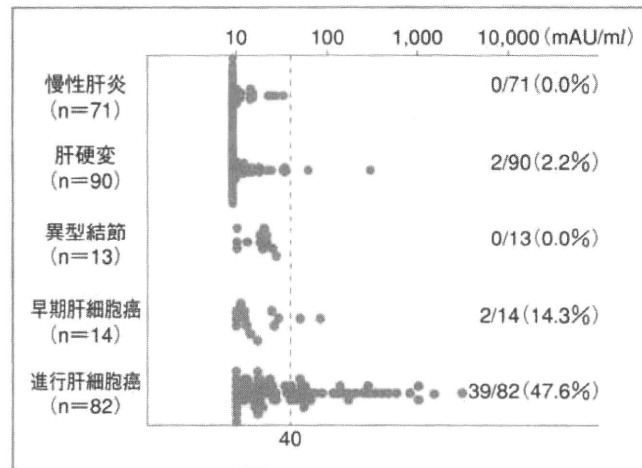


図3 慢性肝疾患における PIVKA-II

Ⅲ. PIVKA-II

この項のポイント

- PIVKA-IIは三つの腫瘍マーカーのなかでもっとも小肝細胞癌で陽性率が高く、特異度も高い。ただし、ワルファリンやセフェム系抗生物質を投与されたときに上昇することがあり、その解釈には注意を要する。

PIVKA-IIは des- γ -carboxy prothrombin (DCP)とも呼ばれ、凝固活性のない異常プロトロンビンである。カットオフ値は 40 mAU/ml

で、慢性肝炎、肝硬変、異型結節、早期肝細胞癌および進行肝細胞癌の陽性率はそれぞれ 0/71 (0.0%)、2/90 (2.2%)、0/13 (0.0%)、2/14 (14.3%) および 39/82 (47.6%) で、感度 42.7%、特異度 98.9% であった(図3)。単独の陽性率は三つの腫瘍マーカーのうちでもっとも高く、特異性も優れていた。しかし、早期肝細胞癌での陽性率は高いとはいえない。なお、PIVKA-IIは黄疸が長期続いてビタミン K 欠乏をきたしたとき(閉塞性黄疸、肝内胆汁うっ滞など)やピ

タミン K サイクルを阻害するワルファリンや広域スペクトラムの抗生物質(セフェム系)を投与されたときに上昇することがあり、その解釈には注意を要する。

IV. 腫瘍マーカーの組み合わせによる診断の有用性

この項のポイント

- 腫瘍マーカーは組み合わせによる評価が推奨される。

前述のように、単独での腫瘍マーカー測定での肝細胞癌診断には限界がある。各々の腫瘍マーカーの相関は弱いかもしくは認められないため、組み合わせでの測定が勧められる⁶⁾。3 cm 以下の肝細胞癌での組み合わせ診断の結果を表 1 に示す。AFP-L3 分画と PIVKA-II の組み合わせ測定が感度 46.9%、特異度 98.3%、陽性的中率 93.8%、陰性的中率 77.0% ともっとも良好であった。

なお前述の高感度 AFP-L3 分画では AFP が 20 ng/ml 未満で Child-Pugh A もしくは B の肝細胞癌 270 例の検討ではカットオフ値を 5% とした場合、PIVKA-II と組み合わせることにより感度 63.7%、特異度 77.3%、陽性的中率 65.6%、陰性的中率 75.7% であった。さらに

Stage 別の感度では Stage I (n=89) : 44.9%、Stage II (n=127) : 71.7% であった。

V. 悪性度評価

この項のポイント

- AFP での Stage I と II を除き、各腫瘍マーカーの陽性率は進行とともに上昇した。

図 4 に AFP, AFP-L3 分画, PIVKA-II の同時測定を行った肝細胞癌 712 例の進行度別の各腫瘍マーカーの陽性率を示した。AFP での Stage I と II を除き各腫瘍マーカーの陽性率は進行とともに上昇した。

腫瘍マーカーは肝細胞癌の生物学的悪性度の評価にも適している。肝切除例に対する病理学的検討では浸潤性発育、被膜浸潤、隔壁形成、門脈侵襲、肝静脈侵襲を有する例で有意に AFP-L3 分画陽性の癌が多く⁷⁾(表 2)、また被膜浸潤、隔壁形成、門脈侵襲、肝静脈侵襲、肝内転移を有する例で有意に PIVKA-II 高値の癌が多かった(表 3)。

表 1 各腫瘍マーカーの組み合わせによる陽性率(n=270)

	AFP のみ	AFP-L3 のみ	PIVKA-II のみ	AFP+ AFP-L3	AFP+ PIVKA-II	AFP-L3+ PIVKA-II
Overall accuracy*	67.8%	70.7%	78.9%	68.1%	74.8%	80.0%
感度**	41.7%	18.8%	42.7%	42.7%	63.5%	46.9%
特異度* ³	82.2%	99.4%	98.9%	82.2%	81.0%	98.3%
PPV* ⁴	46.3%	74.7%	95.3%	56.9%	64.9%	93.8%
NPV* ⁵	71.9%	69.5%	75.8%	72.2%	80.1%	77.0%

TP : true-positive, TN : true-negative, FP : false-positive, FN : false-negative

* : Overall accuracy : TP + TN / TP + FP + TN + FN, ** : Sensitivity : TP / TP + FN

*³ : Specificity : TN / FP + TN, *⁴ : Positive predictive value : TP / TP + FP

*⁵ : Negative predictive value : TN / FN + TN

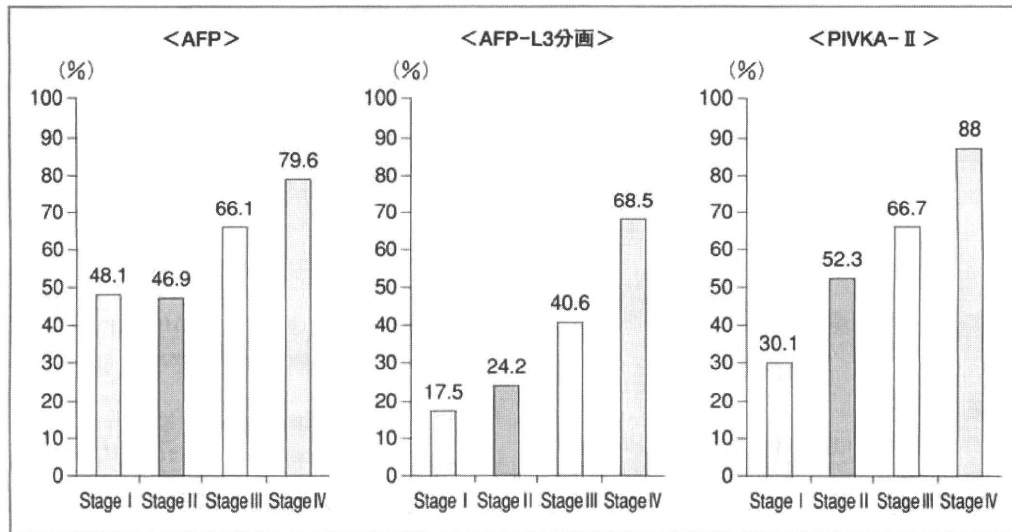


図4 肝細胞癌の進行度と陽性率(n=712)

表2 AFP-L3分画と組織学的所見(n=111)

	AFP-L3分画陽性(≥10%) (n=33)	AFP-L3分画陰性(<10%) (n=78)	p value
発育様式(膨張性/浸潤性)	27/6	76/2	0.0122
被膜形成(+/-)	16/17	43/35	NS*
被膜浸潤(+/-)	6/27	4/74	0.0295
隔壁形成(+/-)	18/15	25/53	0.0444
門脈侵襲(+/-)	6/27	3/75	0.0317
肝静脈侵襲(+/-)	4/29	1/77	0.0438
胆管侵襲(+/-)	1/32	0/78	NS*
肝内転移(+/-)	4/29	7/71	NS*
分化度(高/中・低)	6/27	23/55	NS*

* : NS : not significant

表3 PIVKA-IIと組織学的所見(n=134)

	PIVKA-II陽性(≥40 mAU/ml) (n=71)	PIVKA-II陰性(<40 mAU/ml) (n=63)	p value
発育様式(膨張性/浸潤性)	64/7	59/4	NS*
被膜形成(+/-)	44/27	37/26	NS*
被膜浸潤(+/-)	15/56	5/58	0.0403
隔壁形成(+/-)	37/34	20/43	0.0228
門脈侵襲(+/-)	19/52	3/60	0.0008
肝静脈侵襲(+/-)	8/63	1/62	0.0358
胆管侵襲(+/-)	3/68	0/63	NS*
肝内転移(+/-)	14/57	3/60	0.0099
分化度(高/中・低)	12/59	15/48	NS*

* : NS : not significant

おわりに

肝細胞癌スクリーニングにおける AFP, AFP-L3 分画および PIVKA-II につき概説した。3 種類のマーカーを単独の独立したマーカーとして用いず、複数測定しその組み合わせによって肝細胞癌の存在を考慮することが重要である。

文 献

- 1) Taketa, K. : α -Fetoprotein : reevaluation in hepatology. *Hepatology* 12 ; 1420-1432, 1990
- 2) Aoyagi, Y., Saitoh, A., Suzuki, Y., et al. : Fucosylation index of α -fetoprotein, a possible aid in early recognition of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology* 17 ; 50-52, 1993
- 3) Liebman, H. A., Furie, B. C., Tong, M. J., et al. : Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 310 ; 1427-1431, 1984
- 4) Shimizu, K., Katoh, H., Yamashita, F., et al. : Comparison of carbohydrate structures of serum α -fetoprotein by sequential glycosidase digestion and lectin affinity electrophoresis. *Clinica Chimica Acta* 254 ; 23-40, 1996
- 5) Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., et al. : Clinical utility of *lens culinaris* agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma : special reference to imaging diagnosis. *J. Hepatol.* 30 ; 125-130, 1999
- 6) Sassa, T., Kumada, T., Nakano, S., et al. : Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and *lens culinaris* agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11 ; 1387-1392, 1999

- 7) Tada, T., Kumada, T., Toyoda, H., et al. : Relationship between *lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein and pathologic features of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 25 ; 1-6, 2005

Summary

Clinical Utility of Tumor Markers for Screening of Hepatocellular Carcinoma

Toshifumi Tada*, Takashi Kumada*,
Hidenori Toyoda*, Seiki Kiriyama*,
Makoto Tanikawa* and Yasuhiro Hisanaga*

Three tumor markers, alpha-fetoprotein (AFP), *lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of AFP (AFP-L3), and des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) are currently used for the diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) in Japanese clinical practice. Despite its low specificity, AFP is highly sensitive for HCC when evaluated along with liver function test values. In contrast, AFP-L3 has a low degree of sensitivity but has a very high level of specificity for HCC. DCP has both high sensitivity and specificity for HCC. Recently, the combination of some of these tumor markers has been recommended for more accurate diagnosis of HCC. We found that the combination of AFP-L3 and DCP provided accurate diagnosis of HCC. Positive rates increased in association with the increase in HCC stage for all three tumor markers. The elevation of AFP-L3 or DCP strongly reflected several pathologic features of advanced HCC.

Key words : hepatocellular carcinoma, alpha-fetoprotein, *lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of alpha-fetoprotein, des-gamma-carboxy prothrombin

*Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, 4-86 Minaminokawa-cho, Ogaki-shi, Gifu 503-8502, Japan

