

- ③ペプチド特異的CTLは、がん細胞の表面にあるがんの目印(GPC3ペプチド)をみつけてがん細胞を攻撃する。正常細胞の表面にはGPC3ペプチドがないため、攻撃されない。

2 方法

第 I 相臨床試験研究の概要を図2に示す。

1. 目的

肝細胞がんに対しては、切除術をはじめとするさまざまな局所治療法や、抗がん剤を用いた動注あるいは全身化学療法が行われているが、これらの治療に抵抗性あるいはその適応のない患者も決して少なくない。このような病状に対する適当な治療法はなく、症状緩和など支持療法が行われているのが現状である。本試験は、局所療法または抗がん剤による化学療法が無効あるいはその適応のない、HLA-A24あるいはHLA-A2陽性の進行肝細胞がん患者を対象とした、HLA-A24あるいはHLA-A2拘束性GPC3由来ペプチドワクチンを用いた免疫療法の第 I 相臨床試験である。本試験はGPC3由来ペプチドワクチンの安全性を評価するとともに、本ペプチドワクチンの投与量の違いにより、末梢血中のGPC3ペプチド特異的CTLが増加するかを評価し、至適投与量を決定することを目的とする。

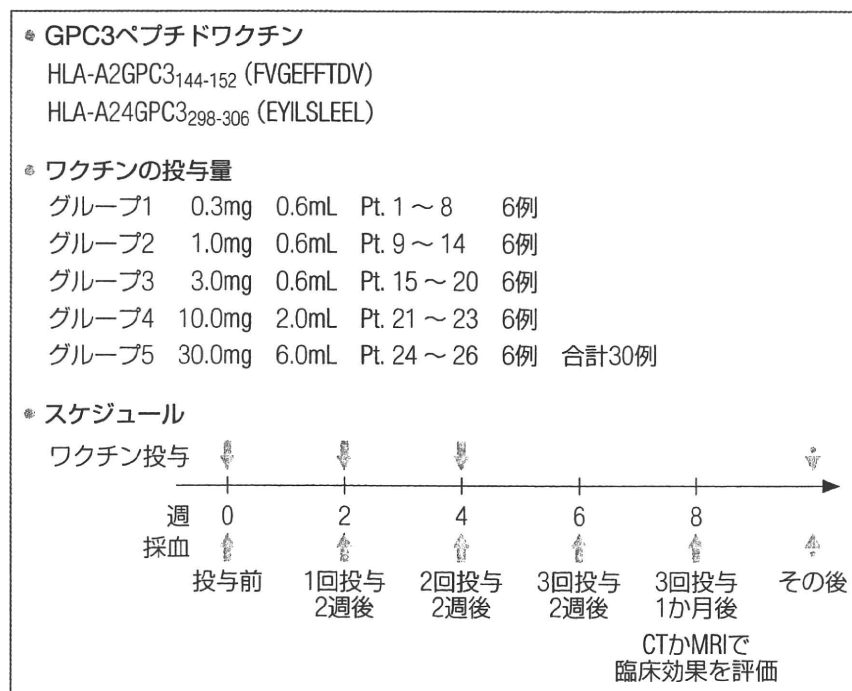


図2 進行肝細胞がんを対象としたGPC3ペプチドワクチン第 I 相臨床試験

■ 2. 対象

対象は、局所療法または抗がん剤による化学療法が無効あるいはその適応がないと判断された肝細胞がん患者で、HLAタイピング検査によりHLA-A24あるいはHLA-A2陽性であることが確認された患者である。

■ 3. 治療

HLAのタイプにより、HLA-A24拘束性GPC3由来ペプチド(EYILSLEEL)またはHLA-A2拘束性GPC3由来ペプチド(FVGEFFTDV)を用いた。2週間に1回、計3回投与する。

■ 4. 免疫学的モニタリング

IFN- γ ELISPOT解析とHLA-GPC3ペプチド複合体マルチマーを用いたフローサイトメトリー解析により、末梢血中のGPC3ペプチド特異的CTLの増加程度を観察する。

■ 5. 主要評価項目

- ①有害事象の種類と発現割合。
- ②免疫学的モニタリングによる特異的免疫反応の誘導の観察。

■ 6. 副次評価項目

奏効割合

奏効割合の解析対象集団を対象として、3回目のワクチン終了1か月後にCTあるいはMRIの画像診断を行い、RECIST (response evaluation criteria in solid tumors) に従って判定し、評価する。

腫瘍マーカーの推移

肝細胞がんの腫瘍マーカー (AFP, PIVKA-II, GPC3) を測定して記録し、ペプチドワクチンの効果を腫瘍マーカーの値の推移によって評価する。

3 治療成績・現在の結果 (副作用を含む)

■ 1. 安全性

1回0.3mg投与から30mg投与まで、26例全例に痒みや痛みを伴わない投与局所の発赤や硬結を認めた。それ以外では、2例に一過性の異所性の発疹、3例に一過性の38℃までの発熱を認めたが、計26例の安全性に問題はなかった。

■ 2. CTLの誘導

ほぼ全例で、末梢血中にGPC3ペプチド特異的CTLの頻度の増加が検出された。筆者らのマウスでの研究結果と同様、その頻度には投与量依存性が示唆された。実際、

ワクチン後のがん組織内に、CD8陽性CTLが多数浸潤していることが、複数の患者で証明できた。

■ 3. 抗腫瘍効果

約60%の症例において、初回ワクチン投与後2か月で腫瘍マーカー PIVKA-II の低下を認めた。その頻度にも投与量依存性が示唆された。

また3.0mg投与の6例には、腫瘍マーカーの減少に加え、腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの臨床効果も認められた。ワクチン効果に投与量依存性が示唆されたため、当初は投与量は3.0mgまでの予定であったが、さらに投与量を増やし、10mg投与の3例、30mg投与の3例の計6例を第Ⅰ相臨床試験に追加して実施した。

初回ワクチン投与2か月後の画像診断での評価 (RECIST) では、約60%の症例がSDであった。また、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が出現した。

4 今後の課題・考察

本試験により、GPC3ペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果が示され、ほかに治療法がない進行肝細胞がん患者にとっても有用であると考えられた。

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が出現したが、投与局所の反応が3.0mg投与よりも強いことや、1例だけに認められた効果ということもあり、効果・安全性評価委員会では進行肝細胞がんに対する次相の推奨投与量を決定できず、さらに10mg、30mg投与を3ないし6例ずつ追加して最終決定する方針にした。現在、次相の推奨投与量を決定するために試験を継続中である。

またこのようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、あるいはCTで観察でき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、手術やRFAなどの肝細胞がん根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相臨床試験も研究計画書を作成して、国立がんセンター倫理審査委員会に申請し、承認されたところである(図3)。その際の1回投与量は3.0mgに決定している。がんワクチン療法標準化へ向けては、第Ⅱ相臨床試験のデザインこそが大事だと考えており、誰もが納得するかたちでペプチドワクチンの有効性を証明したい。

GPC3は、肝細胞がんのみならず、悪性黒色腫(メラノーマ)、小児がん(肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫)、卵巣明細胞がん、卵黄嚢腫瘍、絨毛がん、肺扁平上皮がんにも発現しており、それらのがんに対しての応用も期待される。メラノーマ、卵巣がんについては、有効性を確認する第Ⅱ相臨床試験の実施体制を整えている。小児がんについては、推奨投与量を定めるために第Ⅰ相臨床試験から計画する予定である。

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、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

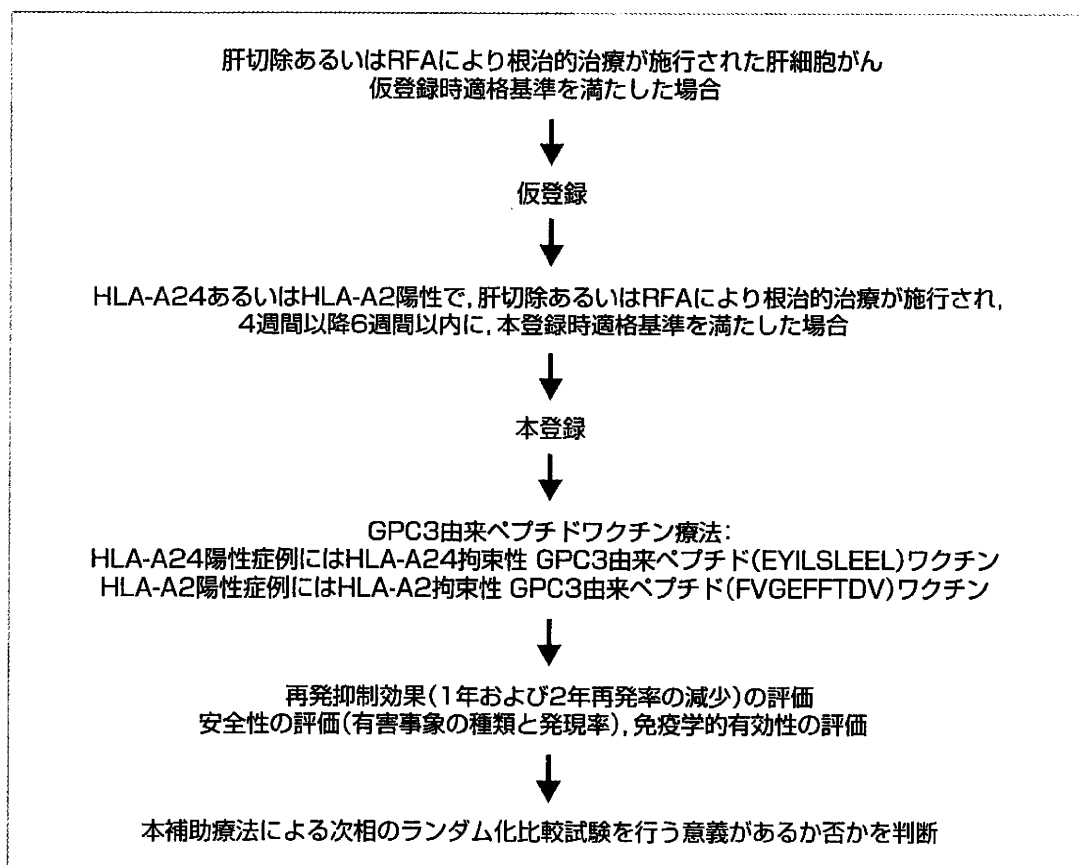


図3 GPC3由来ペプチドワクチンを用いた肝細胞がん根治的治療後補助療法の第Ⅱ相臨床試験 (シエーマ)

なくない。また、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。さらに、まだ元気であっても、「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。筆者ら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もある。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、国民の健康維持におおいに貢献できるものと考える。ワクチンは、従来の抗がん剤より安価に提供でき、ワクチン療法は開業医など、どこの医療施設でもできる治療である。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いる。

- 1) 日本肝癌研究会追跡調査委員会. 第17回全国原発性肝癌追跡調査報告(2002-2003). 肝臓 2007 ; 48 : 117-140.
- 2) Okuda K et al. Hepatobiliary disease. Primary Malignant Tumors of the Liver. London : Blackwell Science Ltd. 2001. pp. 343-389.
- 3) Yamamoto J et al. Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma : comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection. Hepatology 2001 ; 34 : 707-713.
- 4) Ryu M et al. Therapeutic results of resection, transcatheter arterial embolization and percutaneous transhepatic ethanol injection in 3225 patients with hepatocellular carcinoma : a retrospective multicenter study. Jpn J Clin Oncol 1997 ; 27 : 251-257.
- 5) Nakatsura T et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. Biochem Biophys Res Comm 2003 ; 306 : 16-25.
- 6) Nakatsura 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 : 8630-8640.
- 7) Komori H et al. Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 2006 ; 12 : 2689-2697.
- 8) Motomura Y et al. HLA-A2 and -A24- restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs : Preclinical study using mice. Int J Oncol 2008 ; 32 : 985-990.

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¹⁾, 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, 各種がんにも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, ① cancer-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

表1 ヒト腫瘍抗原の同定方法

1) がん細胞に特異的に反応する T 細胞株 (クローン) を利用した, がん細胞由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニング (cDNA 発現クローニング法) (MAGE ほか)
2) がんを高発現する既知のがん関連抗原因由来のペプチドを合成してそれに対する CD8 陽性キラー T 細胞の反応を検討する手法 (リバース免疫学法)
3) がん患者血清中の抗腫瘍抗原 IgG を利用した, がん細胞由来の cDNA 発現ライブラリーのスクリーニング (SEREX 法) (NY-ESO-1, HSP105 ほか)
4) cDNA マイクロアレイ解析による, 遺伝子発現の組織特異性が抗腫瘍免疫の誘導に適したがん抗原候補の同定と, その抗原性の解析 (GPC3 ほか)

特異抗原, ③変異ペプチド抗原, ④がん遺伝子・がん抑制遺伝子産物, ⑤がん胎児性蛋白質, ⑥がん細胞で発現が増強している蛋白質, などが挙げられるが, その同定方法として表 1 に示す 4 つが挙げられる。CT 抗原と総称される抗原は, 名前が示すとおり to 種々のがん組織および正常組織では免疫系から隔離された testis (精巣, 睪丸), 卵巣, 胎盤のみに発現する抗原群で, ヒトのメラノーマで同定された最初の癌抗原 MAGE, SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) で同定された NY-ESO-1 が代表的な CT 抗原である。

2.4 T 細胞により認識されるがん拒絶抗原ペプチドの同定方法と HLA 多型を考慮したがんの免疫療法

以上のような方法で同定されたがん抗原が, がん拒絶抗原と認められるためには, その抗原因由来のペプチドで誘導した CTL が, がん細胞上の HLA クラス I 分子に結合する同ペプチドを認識してがん細胞を傷害することを証明しなければならない。HLA クラス I 分子に結合するペプチドは通常 9 ないし 10 個のアミノ酸からなり, HLA の多型性に対応して変化する。それぞれのクラス I 分子に結合するペプチドの結合モチーフはほぼわかっており, われわれはインターネット上でサイトにアクセスして抗原のアミノ酸配列を入力するだけで簡易に目的の HLA クラス I 分子に結合するペプチドを予測することができる (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)。実際本当に結合するかどうかは, T2 細胞や RMA-S 細胞を用いたアッセイで確認できる²⁾。

欧米白人では HLA-A2 の頻度が高いこと, メラノーマの患者が多いことなどの理由により, がん拒絶抗原ペプチドとして, 現在までにメラノーマ由来の HLA-A2 拘束性のものが圧倒的に多く同定されている。日本人でも HLA-A2 の抗原頻度は 40% と比較的高いが, HLA-A 分子の中で日本人に最も頻度が高いのは 60% を占める HLA-A24 である。どちらも持っていない日本人は 15% しかいない。したがって, われわれが同定したような, ほとんどのがん患者のがんに

において高発現しているがん抗原に関して、HLA-A24あるいは-A2拘束性のがん拒絶抗原ペプチドを同定することにより、多くの日本人がん患者を対象としたペプチドワクチンや樹状細胞(DC)ワクチン、さらにはCTLの養子免疫療法などの免疫療法が可能となると考えられる。

2.5 がん特異的抗原 Glypican-3 (GPC3) と HSP105 の同定

2.5.1 cDNA マイクロアレイ解析による肝細胞がん拒絶抗原, 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(HCC)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HCC特異的な新規がん胎児性抗原としてGPC3を同定した³⁾。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^{4, 5)}。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⁶⁾。

2.5.2 膵がんのSEREX法により同定したHSP105

がん細胞由来のcDNAライブラリーを大腸菌に発現させ、その蛋白質を患者の血清中の抗がん抗原IgG抗体でスクリーニングするSEREX法により数多くのがん抗原の候補が同定されている。HSP105はわれわれが同定した極めて汎用性の高いがん特異的抗原であり、ほとんどの大腸がん、乳がん、膵がんをはじめ、食道がん、子宮がん、卵巣がん、膀胱がん、メラノーマなど様々ながんで高発現している。正常組織で高発現しているのは免疫系の攻撃から守られている精巣のみであり、理論上HSP105を標的とした免疫療法は有害事象を起こすことなくがんだけを拒絶できる⁷⁾。HSP105はがん細胞のアポトーシスの抑制に関わっており、siRNAでHSP105の発現を落とすと様々ながん細胞がアポトーシスに陥ることを発見した⁸⁾。

2.6 マウスモデルを用いたこれらの抗原を標的とした免疫療法の安全性と有効性の解析

HSP105に関しては、HSP105-DNAや蛋白を用いたワクチンの有効性もすでにマウスモデルを用いて証明しているが、これらはペプチドワクチンと異なり患者のHLAに関係なく使え、CTLのみでなくCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)も誘導できる⁹⁻¹¹⁾。

精巣や胎盤は免疫学的に攻撃されないように隔離された臓器であり、したがって、GPC3やHSP105を標的とする免疫療法を開発すれば、有害事象のないがんの予防・治療法が可能になってくる。われわれはGPC3とHSP105について、ヒトのHLA-A24あるいは、-A2遺伝子導入マウスを用いてのCTLエピートペプチドの同定に成功しており、マウスを用いた*in vivo*腫瘍免疫の実験系において、これらのがん抗原に対する免疫応答が、自己免疫現象を伴うことなく抗腫瘍免疫を誘導できることを証明している。

2.6.1 マウスを用いた GPC3 ペプチドワクチンの安全性と有効性の証明

最善のプロトコール作成のため、マウスを用いて、臨床試験で用いる2種類の GPC3 ペプチドと共に投与する至適アジュバントの検討を行った¹²⁾。不完全フロイントアジュバント (IFA) との併用投与群においてのみ、GPC3 特異的な CTL が誘導された。ペプチド単独では無効で、IFA と混合すると有効になることを証明し、臨床試験ではペプチドと IFA の混合物を投与することとした。次に、ペプチド投与量によって免疫応答の誘導能に相違が見られるかを検討した結果、CTL の誘導能はペプチド投与量に依存し、最大投与量 50 μ g の投与群で最も多くの CTL が誘導された。次に投与回数について検討した。2 回以上の免疫で、抗原特異的な免疫応答が観察された。ペプチドワクチンに用いるアジュバントとして、少なくとも IFA は必須であると考えられた。その他のアジュバントの併用による免疫増強効果に関しては今後の検討課題である。また、ペプチドワクチンにおけるペプチド投与量についてのこれまでのコンセンサスとして、免疫応答の強弱はペプチド量には依存しないと考えられている。しかしながらわれわれが行ったマウスの実験では、ペプチド投与量に依存して強い免疫を誘導できるとの結果に至った。ただ、単純に体重換算すると、マウスでの 50 μ g はヒトでの 100mg に相当し、コストも膨大となるばかりか、その溶液を皮内注射するとなれば 1 回に数十カ所も注射しなければならない量であり、現実的には不可能である。臨床第 I 相試験では、投与回数を 3 回、投与量を 0.3, 1.0, 3.0mg の 3 段階とし、安全性を確認しながら容量を増やしていく設定にし、免疫学的モニタリングにより次相の至適投与量を定める方針にした。

2.7 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、われわれが、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 相試験を実施している。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 カ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 カ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。GPC3 ペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果も示された。もう他に治療法がない進行肝細胞がん患者にとっても有用であると考えられた。現在、次相の推奨投与量を決定するために試験を継続中である。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、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相試験を実施する。GPC3は肝細胞がんだけでなく、悪性黒色腫、小児がん（肝芽腫、神経芽腫、腎芽腫）、卵巣明細胞がん、卵黄嚢腫瘍、絨毛がん、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。

2.8 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（NCI）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¹³⁾。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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹³⁾。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。すなわちわれわれは、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う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。われわれも、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。

2.9 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。われわれ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する。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する。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いる。

文 献

- 1) van der Bruggen P *et al.* *Science*, **254**, 1643 (1991)
- 2) 中面哲也ほか, *実験医学*, **22** (5) (増刊;免疫研究のフロンティア), 215 (2004)
- 3) Nakatsura T *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **306**, 16 (2003)
- 4) Nakatsura T *et al.*, *Clin. Cancer Res*, **10**, 8630 (2004)
- 5) Motomura Y *et al.*, *Cancer Res*, **66**, 2414 (2006)
- 6) Komori H *et al.*, *Clin. Cancer Res*, **12**, 2689 (2006)
- 7) Nakatsura T *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **281**, 936 (2001)
- 8) Hosaka S *et al.*, *Cancer Sci*, **97**, 623 (2006)
- 9) Yokomine K *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **343**, 269 (2006)
- 10) Miyazaki M *et al.*, *Cancer Sci*, **96**, 695 (2005)
- 11) Yokomine, K *et al.*, *Cancer Sci*, **98**, 1930 (2007)
- 12) Motomura Y *et al.*, *Int. J. Oncol*, **32**, 985 (2008)
- 13) Dudley ME *et al.*, *Science*, **298**, 850 (2002)
- 14) Dudley ME *et al.*, *J Clin Oncol*, **26**, 5233 (2008)

肝癌の診断

A 腫瘍マーカー

Consensus statement

- ・肝細胞癌のサーベイランスにおいては、2種類以上の腫瘍マーカーを測定することが推奨される。
- ・腫瘍マーカー高値を認めた場合、超音波検査で腫瘍が検出できなくてもdynamic CTあるいはdynamic MRIを撮像することを考慮する。

a. 総論

肝細胞癌の代表的腫瘍マーカーにはAFP(α -fetoprotein)¹⁾、AFP-L3分画(レンズマメ結合性AFP)^{1,2)}およびPIVKA-II(protein induced by vitamine K absence or antagonist-II)^{3,4)}の3種類がある。2008年4月から、保険制度上、AFPとPIVKA-II両者の同時測定が可能となり、肝細胞癌の補助診断として広く使用されている。一方、最近高感度AFP-L3分画の測定系が開発され、AFP-L3%のAFP低値例(20 ng/ml未満)での測定が可能となったが、評価の方法は基本的には変わらない⁵⁾。AFP-L3分画の測定は、現行保険上は肝細胞癌の可能性が強く疑われるときのみ算定される。

腫瘍マーカーに求められるのは①存在診断〔早期診断、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。これらをすべて満たす腫瘍マーカーは現在のところ存在しない。しかし、3種類の腫瘍マーカーを効果的に組み合わせることによ

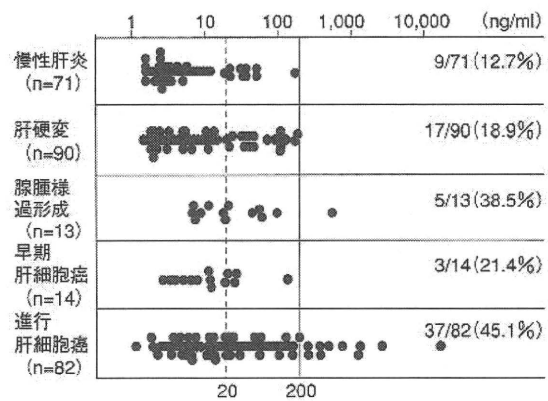


図 5-1 慢性肝疾患における AFP

りその診断率は向上する。

1) AFP

AFPの問題点は慢性肝疾患においても上昇し特異性に欠けることである¹⁾。カットオフ値を20 ng/mlとすると(図5-1)、慢性肝炎、肝硬変、腺腫様過形成(AH)、早期肝細胞癌(高分化型肝細胞癌)および進行肝細胞癌(最大径3 cm以下、中・低分化型肝細胞癌)の陽性率はそれぞれ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41.6%、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、AH、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%)となり、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低下した。こ

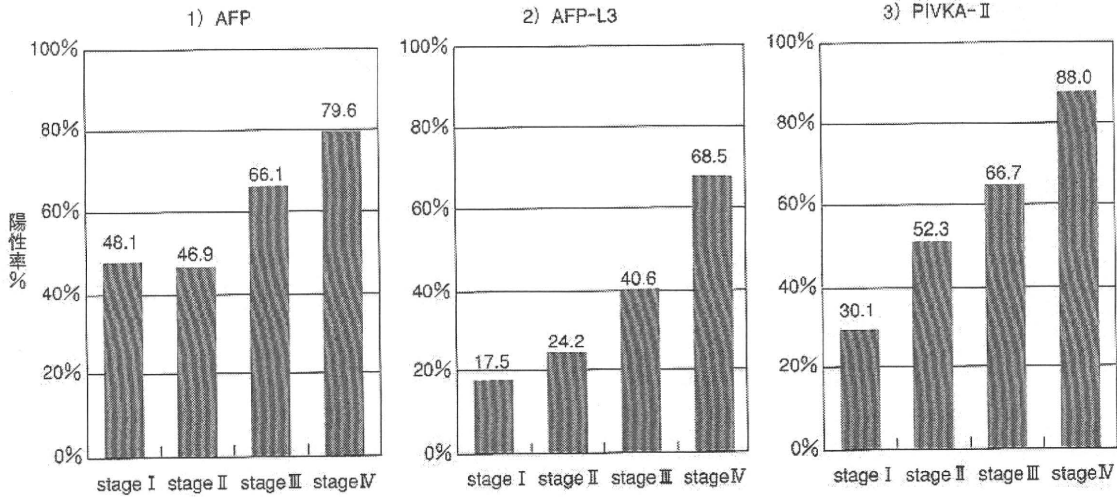


図 5-2 肝細胞癌の進行度と陽性率 (n = 712)

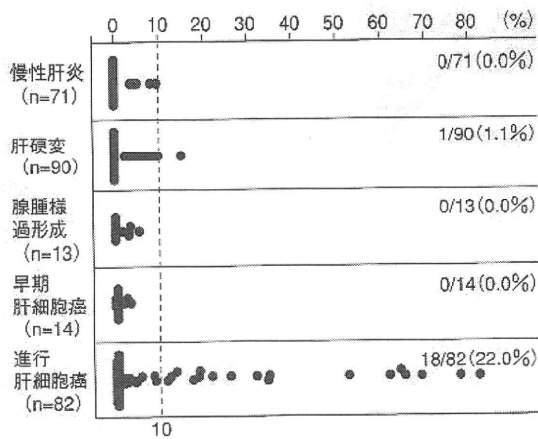


図 5-3 慢性肝疾患における AFP-L3 分画

のように AFP は種々の状態で増加するために軽度の上昇の場合には肝細胞癌との鑑別には他の血清学的検査の動態および画像診断等を参考とする必要がある¹⁾。図 5-2 に進行度別の AFP の陽性率を示した。

2) AFP-L3 分画

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 1 つをとらえたものである。カットオフ値は当初 15% に設定されていたが⁶⁾、その後の検討から 10% を採用することが多い⁷⁾。慢性肝炎、肝硬変、

AH、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 5-3)。特異度は高いものの感度は低く小さな肝細胞癌の発見は単独では限界がある。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⁸⁾。なお、AFP-L3 分画は肝不全時に上昇することがありその解釈には注意する¹⁾。図 5-2 に肝細胞癌の進行度別の AFP-L3 分画の陽性率を示した。

3) PIVKA-II

PIVKA-II は des-γ-carboxy prothrombin (DCP) と呼ばれ、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、AH、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 5-4)。単独での陽性率は 3 つの腫瘍マーカーの中で最も高く特異性も優れていた。やはり早期肝細胞癌での陽性率は低い。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) やビタミン 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

表 5-1 各種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 ¹⁾	67.8%	70.7%	78.9%	68.1%	74.8%	80.0%
感度 ²⁾	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

1) overall accuracy: TP+TN/TP+FP+TN+FN, 2) 感度: TP/TP+FN, 3) 特異度: TN/FP+TN, 4) positive predictive value (PPV): TP/TP+FP, negative predictive value (NPV): TN/FN+TN

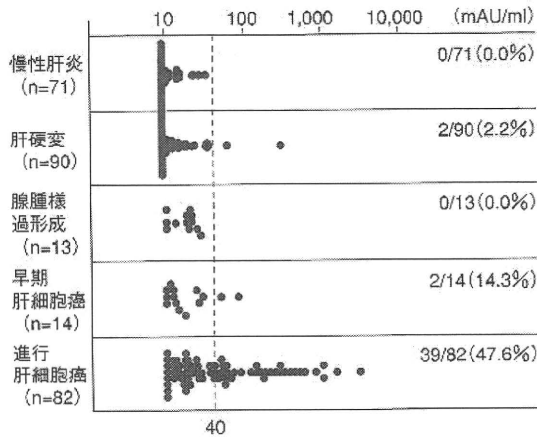


図 5-4 慢性肝疾患における PIVKA-II

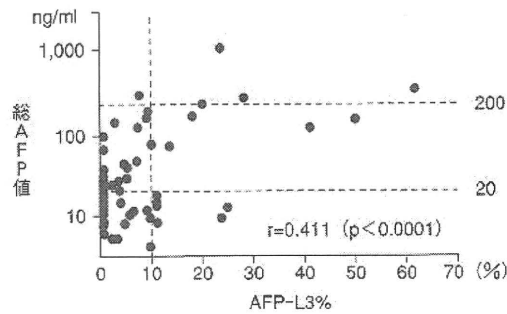


図 5-5 小肝細胞癌における AFP と AFP-L3 分画

た時に上昇することがあり、その解釈には注意する。図 5-2 に肝細胞癌の進行度別の PIVKA-II の陽性率を示した。

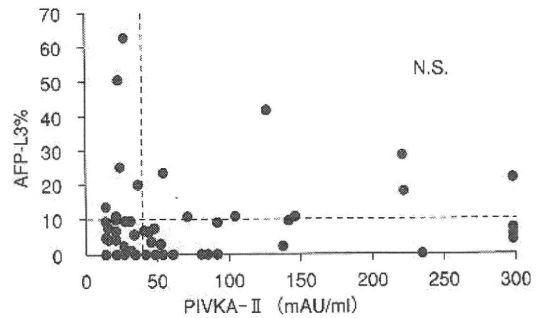


図 5-6 小肝細胞癌における PIVKA-II と AFP-L3 分画

b. 組み合わせ診断の仕方

今まで述べてきたように単独での腫瘍マーカーの陽性率には限界がある。前述したように AFP と PIVKA-II の同時測定が最近可能となった。各々の腫瘍マーカーの相関は弱い(図 5-5)か認められない(図 5-6)ため組み合わせでの測定が勧められる^{8,9)}。3 cm 以下の肝細胞癌での組み合わせ診断の結果を表 5-1 に示す。AFP と PIVKA-II もしくは AFP-L3 分画と PIVKA-II の組み合わせ測定が感度、特異度、positive predictive value (PPV)、negative predictive value (NPV)の面から勧められる。

c. 悪性度評価

腫瘍マーカーは肝細胞癌の生物学的悪性度(発育速度および浸潤・転移能)の評価に適している。組織学的には分化度が、画像的には血流動態(肝動脈血優位、門脈血欠損)が悪性度評価に使用されることが多い。図 5-7 に腫瘍の血流動態、組織

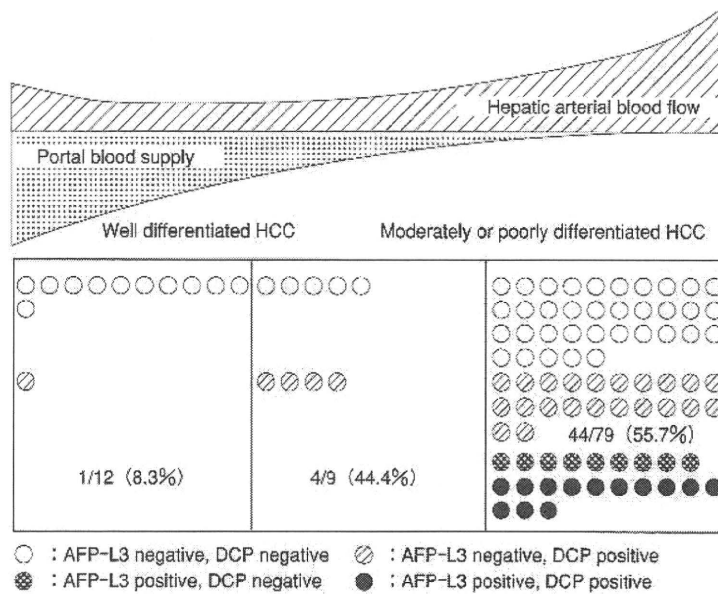


図 5-7 腫瘍の分化度と腫瘍マーカー (n = 100)

型の評価および AFP-L3 と PIVKA-II (DCP) を同時測定した最大径 2 cm 以下の肝細胞癌 100 例での陽性率を示す。高分化型肝細胞癌でも門脈血の減少がない時期では AFP-L3 と PIVKA-II も陽性とはならず、門脈血が減少すると PIVKA-II 陽性例が出現し、動脈血が増加し門脈血が欠損すると AFP-L3 もしくは両者が陽性となる。言い換えれば腫瘍マーカーが陽性となる時期の肝細胞癌はそのサイズにかかわらず進行肝細胞癌(中・低分化)であり、予後も不良となる¹⁰⁾。

【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 HA, Furie BC, Tong MJ, et al: Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 310: 1427-1431, 1984
- 4) Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O, et al: Plasma abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. Cancer 61: 1621-1628, 1988
- 5) Kagebayashi C, Yamaguchi I, Akinaga A, et al: Automated immunoassay system for AFP-L3% using on-chip electrokinetic reaction and separation by affinity electrophoresis. Anal Biochem 388: 306-311, 2009
- 6) Taketa K, Endo Y, Sekiya C, et al: A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive α -fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. Cancer Res 53: 5419-5423, 1993
- 7) 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
- 8) Kumada T, Nakano S, Takeda I, et al: Clinical utility of *Lens culinaris* agglutinin-reactive α -fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: special reference to imaging diagnosis. J Hepatol 30: 125-130, 1999
- 9) Sassa T, Kumada T, Nakano S, et al: Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des- γ -carboxy prothrombin and *Lens culinaris* agglutinin A-reactive α -fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol 11: 1387-1392, 1999
- 10) Mita Y, Aoyagi Y, Yanagi M, et al: The usefulness of determining des- γ -carboxyl prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer 82: 1643-1642, 1998

(熊田 卓, 豊田秀徳)

D 腫瘍マーカーによる効果判定

Consensus statement

- ・ 治療前の腫瘍マーカーの陽性数が多い症例の予後は不良である。
- ・ 治療後の腫瘍マーカーの陽性数が多い症例は予後不良であり、治療前よりその傾向は顕著である。
- ・ 治療後の腫瘍マーカーが陽性例では、画像診断上腫瘍が捉えられなくても未治療の病変の存在が示唆され慎重な対応が必要である。

a. 治療前の腫瘍マーカーと予後

腫瘍マーカーが陽性か陰性かにより予後を検討すると AFP(カットオフ値 20 ng/ml), AFP-L3 分画(カットオフ値 10%), PIVKA-II(カットオフ値 40 mAU/ml)のいずれも陰性例が陽性例に比して有意に長期間生存していた ($p < 0.0001$) (図 7-2)。さらに治療前の腫瘍マーカーの陽性数と予後をみたものが図 7-3 である。陽性数が 0 個, 1 個, 2 個, 3 個と増加するにつれ予後は悪化した¹⁾。

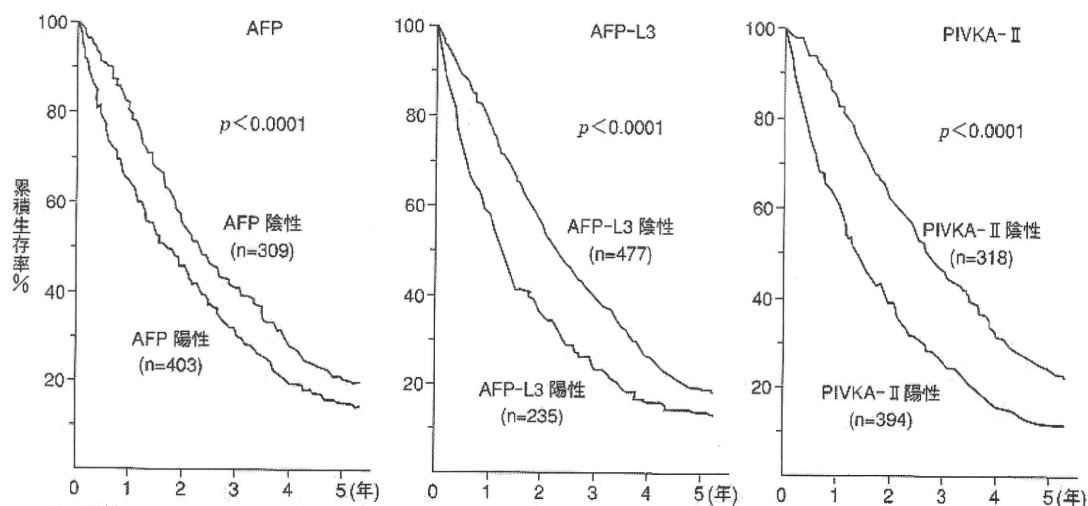


図 7-2 腫瘍マーカーの陽性の有無と予後

b. 治療後の腫瘍マーカーと予後

AFP, AFP-L3 分画および PIVKA-II の治療前後の腫瘍マーカーの動態と予後を解析したのが図 7-4 である。いずれの腫瘍マーカーも治療前陽性で陰性化した群(陰性化群), 治療前陰性で治療後も陰性が持続している群(持続陰性群), 治療前陰性で治療後陽性化した群(陽性化群), および治療前も治療後も陽性の群(持続陽性群)の 4 群に分類した^{1,2)}。なお治療後の腫瘍マーカーの測定は治療後 1~3 か月のものを採用した。AFP, AFP-

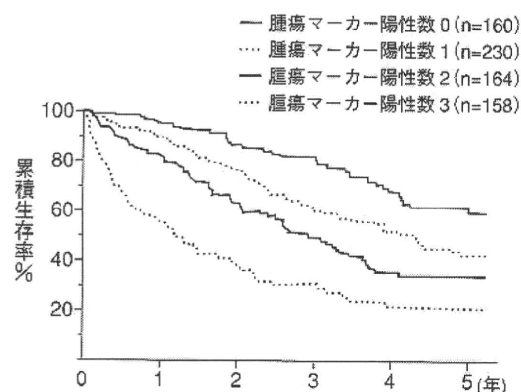


図 7-3 治療前の腫瘍マーカーの陽性数と予後

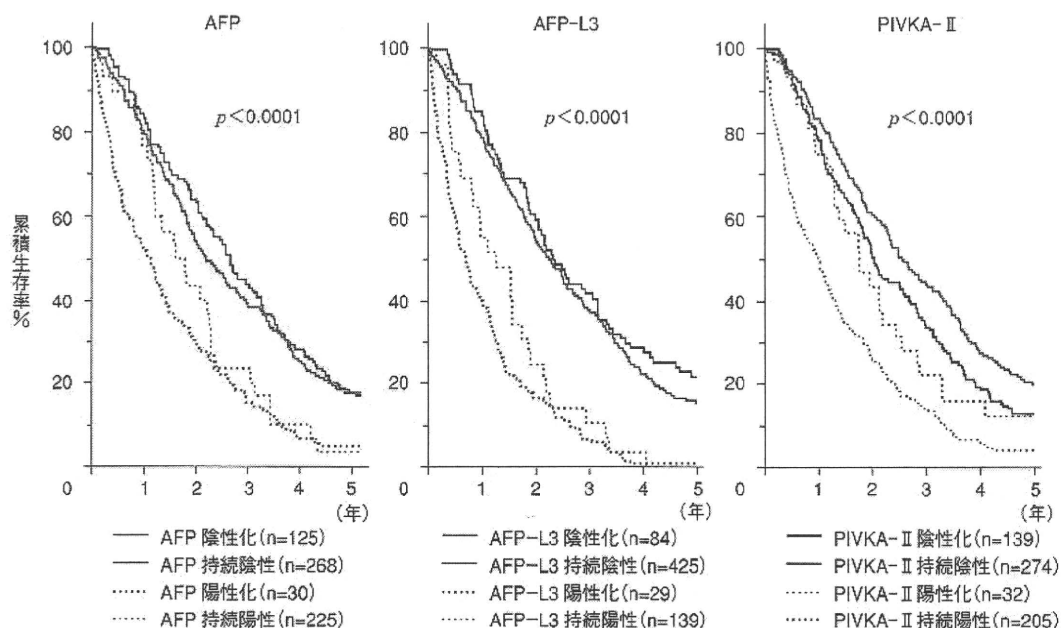


図 7-4 治療前後の腫瘍マーカーの動態と予後

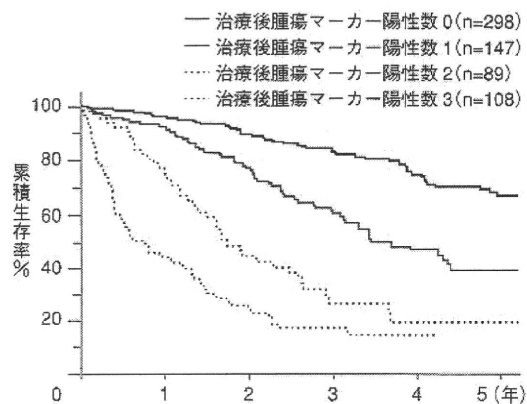


図 7-5 治療後も陰性化しない腫瘍マーカーの個数と生存率

L3 分画および PIVKA-II とともに陰性化群と持続陰性群の間には差を認めず、陽性化群と持続陽性群の間にも差を認めなかった。しかし陰性化群・持続陰性群と陽性化群または持続陽性群の間にはいずれの群間でも差を認め、特に AFP-L3 で顕著であった ($p < 0.0001$)。一方、治療後の腫瘍マーカーの陽性数と予後を見たものが図 7-5 である。陽性数が増加するにつれて予後は悪化し、その傾

向は術前の腫瘍マーカー陽性数(図 7-3)よりも顕著であった。

C. 治療効果判定のための腫瘍マーカーの意義

肝切除、局所治療、肝動脈塞栓術などの治療効果の判定は治療終了の可否、すなわち追加治療の要不要を判断する重要なものである³⁾。現状では画像診断による判定が主であることはいうまでもないが、画像診断法の進歩した現在においてもその検出には当然限界がある。画像上検出可能なすべての腫瘍が治療されれば治療は終了となるが、術前に陽性であった腫瘍マーカーが治療後も陽性を保持している場合、未治療肝細胞癌残存の可能性が示唆される。画像診断上描出されないものを治療することは困難であるので、より慎重な経過観察、さらに評価は定まっていないが術後の補助化学療法の追加などを考慮する必要がある。

【文献】

- 1) Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, et al: Impact of surveillance on survival of patients with initial

- hepatocellular carcinoma : a study from Japan. Clin Gastroenterol Hepatol 4 : 1170-1176, 2006
- 2) Hayashi K, Kumada T, Nakano S, et al : Usefulness of measurement of *Lens culinaris* agglutinin-reactive fraction of α -fetoprotein as a marker of prognosis and recurrence of small hepatocellular carcinoma. Am J Gastroenterol 94 : 3028-3033, 1999
- 3) Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, et al : Prognostic value of pretreatment levels of tumor markers for hepatocellular carcinoma on survival after curative treatment of patients with HCC. J Hepatol 49 : 223-232, 2008

(熊田 卓, 豊田秀徳)

HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: Preclinical study using mice

YUTAKA MOTOMURA¹, YOSHIKI IKUTA^{3,4}, TOSHIMITSU KURONUMA¹, HIROYUKI KOMORI^{3,4}, MASAOKI ITO², MASAMI TSUCHIHARA¹, YOSHIYUKI TSUNODA², HIROFUMI SHIRAKAWA^{1,2}, HIDEO BABA³, YASUHARU NISHIMURA³, TAIRA KINOSHITA² and TETSUYA NAKATSURA¹

¹Cancer Immunotherapy Project, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, and ²Surgery Division, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8577; Departments of ³Immunogenetics, ⁴Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto 860-8556, Japan

Received December 10, 2007; Accepted January 28, 2008

Abstract. We previously reported that glypican-3 (GPC3) is uniquely overexpressed in human hepatocellular carcinoma and melanoma and that it is an ideal tumor antigen for immunotherapy in mouse models. We recently identified both HLA-A24 (A*2402) and H-2K^d-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) and HLA-A2 (A*0201)-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV), both of which can induce GPC3-reactive cytotoxic T cells (CTLs). The present study was a preclinical study in a mouse model that was conducted in order to design an optimal schedule for clinical trial of GPC3-derived peptide vaccine. When BALB/c mice were intradermally vaccinated at the base of the tail with K^d-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ peptide mixed with incomplete Freund's adjuvant (IFA), the peptide-specific CTLs were induced. But the peptide alone could not induce peptide-specific CD8⁺ T cells. Furthermore, proteomic analyses showed that IFA protected the peptide against degradation in the human serum. Peptide-reactive CTLs were induced by peptide vaccine in a dose-dependent manner. In addition, at least two vaccinations with a single dose >10 µg were needed for the induction of GPC3₂₉₈₋₃₀₆-specific CTLs. But repeated vaccination with a lower dose of GPC3₂₉₈₋₃₀₆ did not induce peptide-specific CTLs. Similarly, induction of an Ag-specific immune response by HLA-A2

GPC3₁₄₄₋₁₅₂ depended on the dose administered. The results of this study suggested that IFA is one of the indispensable adjuvants for peptide-based immunotherapy, and that the immunological effect of peptide vaccines depends on the dose of peptide injected.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common tumors worldwide, especially in Asian and Western countries (1). Despite advances in diagnosis and treatment, the overall survival of patients with HCC has not significantly improved in the last two decades (2). The effective treatments currently available are only indicated in a relatively small proportion of early stage cases. When patients presents with clinical manifestations of HCC, the tumor is usually advanced, and there are few treatment options. Many HCC patients have type B or C hepatitis or cirrhosis, so patients treated surgically or by other therapies are also at high risk for recurrence. Furthermore, the liver function of such patients is often very poor, so treatment for recurrence is often restricted. As a result, the prognosis of HCC remains poor and new therapies for cancer development and recurrence, i.e., adjuvant therapy, are urgently needed.

We previously reported that glypican-3 (GPC3), glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein, is specifically overexpressed in human HCC and melanoma, and that among normal tissues it is slightly expressed in placenta and embryonic liver (3). We found that GPC3 is useful not only as a novel tumor marker, but also as a target antigen for immunotherapy in several studies with mice (4,5). In addition, we identified CTL epitope peptides: HLA-A24-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) and HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) (6). To design the schedule for the phase I clinical study of these GPC3-derived peptide vaccines, many factors need to be taken into consideration: the adjuvant, dosage, number of doses, vaccination interval, etc. Many investigators have reported various vaccination schedules (7,8). There is no world-wide consensus concerning the schedule to use for administration of peptide

Correspondence to: Dr Tetsuya Nakatsura, Cancer Immunotherapy Project, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa 277-8577, Japan
E-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

Abbreviations: BM-DC, bone marrow-derived dendritic cell; mAb, monoclonal antibody; M/W, molecular/weight

Key words: cancer immunotherapy, GPC3, peptide vaccine, hepatocellular carcinoma

vaccines. In this study, we attempted to identify a more effective vaccine regimen that would induce a strong cell-mediated immune response. Ten years ago Salgaller *et al* reported that they did not observe any dose dependency between 1 and 10 mg in the capacity of gp100 peptide to enhance immunogenicity in humans (9). The results of our present study, however, showed dose-dependency in the immunizing effect of a peptide vaccine.

Materials and methods

Mice. Female BALB/c mice at 6-8 weeks of age were obtained from Japan SLC (Hamamatsu, Japan) or Charles River Laboratories. *HLA-A2.1* (HHD) Tgm; *H-2D^{b/-}h2m^{-/-}* double knockout mice transfected with a human h2m-*HLA-A2.1* (a1 a2)-*H-2D^b* (a3 transmembrane cytoplasmic) (HHD) monochain construct gene were prepared in the Department SIDA-Retrovirus, Unité d'Immunité Cellulaire Antivirale, Institut Pasteur, France (10), and kindly provided by Dr F.A. Lemonnier. The mice were maintained under specific-pathogen-free conditions. The mouse experiments were approved by the Animal Research Committee of the National Cancer Center Hospital East.

Cells lines. A subline of BALB/c-derived colorectal adenocarcinoma cell line Colon 26, C26 (C20) (11) was provided by Dr Kyoichi Shimomura (Astellas Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan). Colon 26/GPC3 (C26/GPC3) is an established stable GPC3-expressing cell line (4). RMA-HHD cells were kindly provided by Dr Masanori Matsui of Saitama Medical School, Saitama, Japan. A human β 2m-*HLA-A2.1* (α 1 α 2)-*H-2D^b* (α 3 transmembrane cytoplasmic) (HHD) monochain construct was transfected into RMA lymphoma cells [transporter associated with antigen presentation (TAP) positive] to establish RMA-HHD cells (10). The cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS. To obtain GPC3-expressing RMA-HHD (RMA-HHD-GPC3) cells, RMA-HHD cells were transfected with pCAGGS-GPC3-internal ribosomal entry site (IRES)-puromycin-resistant gene with Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), selected with puromycin, and then subjected to cloning by limiting dilution in drug-free medium in 96-well culture plates (12,13). Dendritic cells were obtained from bone marrow cells (BM-DCs) as described previously (4). Irradiated BM-DCs pulsed with peptide were used for *in vitro* CTL culture or as target cells for Elispot assays.

Vaccination. HLA-A24- and K^d-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) and HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) were dissolved in 7% NaHCO₃ and the solution was diluted with saline. For peptide vaccination, mice were intradermally injected at the base of the tail with peptide solution emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Different doses of peptide were administered at 7-day intervals, and mice were sacrificed to obtain inguinal lymphocytes and spleen cells seven days after the final vaccination.

IFN- γ Elispot assays. Female BALB/c mice were intradermally vaccinated with GPC3₂₉₈₋₃₀₆ or GPC3₁₄₄₋₁₅₂/IFA.

Their inguinal lymphocytes were stimulated with peptide-pulsed BM-DCs *in vitro* for five days. The proportion of cells producing IFN- γ against target cells (BM-DCs pulsed with or without GPC3 peptide) was assessed by an Elispot assay as described previously (14). The spots were automatically counted and subsequently analyzed with the Eliphoto system (Minerva Tech, Tokyo, Japan).

Analysis of peptide degradation. GPC3₂₉₈₋₃₀₆ was mixed with human serum, and the solution was applied to the surfaces of a Q10 (strong anion exchange) ProteinChip (Bio-Rad Laboratories, CA). We sequentially examined the solution with a SELDI-TOF mass spectrometer (Bio-Rad). Female BALB/c mice were intradermally vaccinated with GPC3₂₉₈₋₃₀₆/IFA at the base of the tail. A week later, we collected the residual peptide vaccine at the base of the tail into buffer in a tube, and the tube was centrifuged at 4°C at 10,000 rpm for 15 min. The supernatant was applied to a ProteinChip and the surface of the chip was examined with the spectrometer.

Induction of GPC3-specific CTLs and cytotoxicity assay. Mice were intradermally vaccinated twice with 50 μ g GPC3 peptide/IFA 7 days apart. Seven days after the second vaccination, inguinal lymph nodes were excised and the lymphocytes were cultured in 24-well culture plates (5x10⁶ per well) with GPC3 peptide-pulsed BM-DCs (1x10⁵ per well) in RPMI medium supplemented with 10% horse serum, recombinant human interleukin (IL)-2 (100 units/ml), and 2-mercaptoethanol (50 μ mol/l). After culture for 5 days, the cells were recovered and analyzed for their cytotoxic activity against target cells with the TERASCAN VPC system (Minerva Tech) as previously described (15). Briefly, C26, C26/GPC3, RMA-HHD and RMA-HHD-GPC3 cells were used as target cells and labeled with calcein-AM solution for 30 min at 37°C. The labeled cells were washed three times and distributed to the 96-well culture plate (1x10⁴ per well), and they were then incubated with effector cells for 5-6 h. Fluorescent intensity was measured before and after the 5-6-h culture, and Ag-specific cytotoxic activity was calculated by using this formula: cytotoxicity (%) = [(sample release) - (spontaneous release)] / [(maximum release) - (spontaneous release)] x 100. In some experiments, CD8⁺ T cells were isolated from effector cell preparations with a magnetic cell sorting system (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany). Positively selected CD8⁺ T cells were 95% pure as determined by flow cytometry.

Histologic and immunohistochemical analysis. Mice were injected twice with GPC3 peptide vaccine, and seven days later tumor cells were subcutaneously implanted in their shaved backs. Seven days after the tumor challenge, frozen sections of tumor tissue were prepared. The frozen tissue sections were immunohistochemically analyzed using monoclonal antibody (mAb) specific for CD4 (L3T4; BD Pharmingen, San Diego, CA) or CD8 (Ly-2; BD Pharmingen) as described previously (4).

Statistical analysis. The 2-tailed Student's t-test was used to determine the statistical significance of differences in the