

HLA-A2 (*A\*0201*) は約 20% が所有する, ありふれた対立遺伝子である. そこでヒトとマウスの GPC3 に保存されたアミノ酸配列をもつペプチドで, HLA-A2 (*A\*0201*) に結合すると推定される GPC3 由来の 9~10 個のアミノ酸からなるペプチドを 9 種類選択した. これらのペプチドを HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) に免疫した後に, ELISPOT アッセイにより最も強く GPC3 特異的 CTL を誘導出来るエピトープペプチドを探索することにより, ペプチド A2-3; GPC3<sub>144-152</sub> を同定した. さらに, この GPC3 A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した HLA-A2 Tgm では, 重要臓器 (脳, 皮膚, 心, 肺, 肝, 腎) において自己免疫反応は生じておらず, その安全性が示唆された.

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3<sub>144-152</sub> と, H-2K<sup>d</sup> (≡HLA-A24) 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3<sub>298-306</sub> を用いて, HLA-

A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激して, ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた. その結果, GPC3<sub>144-152</sub> ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 10 名中 5 名の PBMC より, また, GPC3<sub>298-306</sub> ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 12 名中 6 名の PBMC より, 各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた<sup>8)</sup> (表 1).

さらに, 重症混合型免疫不全をもつことより, ヒトの細胞を拒絶できない NOD/SCID マウスに GPC3 遺伝子を強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下移植して生着させた. その後に, HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3<sub>144-152</sub> あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3<sub>298-306</sub> で刺激することにより, HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト GPC3 特異的 CTL 株を静脈注射により養子免疫した. GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL 株を投与した

表 1 HLA-A2 あるいは-A24 陽性 HCC 患者 (それぞれ Pt-A2, Pt-A24) の約 50% において, GPC3 特異的な CTL が誘導された.

患者	年齢	性別	癌の進行度 <sup>1)</sup>	GPC3 の発現 <sup>2)</sup>	HLA の発現 <sup>3)</sup>	CTL の誘導 <sup>4)</sup>
Pt-A2-1	80	F	IIIa	+	+	+
Pt-A2-2	72	M	II	+	+	+
Pt-A2-3	67	F	II	ND	ND	+
Pt-A2-4	54	M	I	+	+	+
Pt-A2-5	57	M	I	ND	ND	-
Pt-A2-6	66	M	I	-	-	-
Pt-A2-7	54	M	IIIa	+	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	ND	+
Pt-A2-9	68	F	IIIa	+	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	-
患者	年齢	性別	癌の進行度 <sup>1)</sup>	GPC3 の発現 <sup>2)</sup>	HLA の発現 <sup>3)</sup>	CTL の誘導 <sup>4)</sup>
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	ND	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIIa	+	+	+

1) TNM 分類を用いた.

2) 免疫染色を用いて, 腫瘍周囲の正常組織と比較して発現を確認した.

3) 免疫染色により膜が染色された場合に, 発現ありと判断した.

4) GPC3 発現 HCC 細胞株 HepG2 に対する細胞傷害活性が, E/T 比 20 で 20% 以上観察された場合に, CTL を誘導できたと判断した.

NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水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観察された<sup>8)</sup> (図 2)。

現在、国立癌センター東病院にて HLA-A2 あるいは -A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床第 1 相試験を展開中である。

#### V. 樹状細胞ワクチンを作製するための材料としての ES 細胞の有用性

現在、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法には、アフレーシス (成分採血) により分離した末梢血白血球中の単球を GM-CSF 等のサイトカインを加えて培養し、分化誘導することにより作製された樹状細胞が用いられている。しかしながら、この方法には、アフレーシス操作に伴う患者への負担、さらに、末梢血白血球から分離される単球の数や単球が

ら樹状細胞への分化誘導効率に個人差があるため、樹状細胞の収量が不安定であることなど、医療技術として広く普及するにはいくつかの問題がある。

筆者らは、ES 細胞を材料にして細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製することを考え、数年前に研究を開始した。ES 細胞は、適切な条件の下で培養することにより、未分化な状態を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、樹状細胞の材料として ES 細胞を用いることが可能になれば、材料をいくらかでも増やすことができることになり、細胞ドナーへ新たな負担をかけることなく大量の樹状細胞を作製できる。また、ES 細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション等により、ウイルスベクターを使用することなく、遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES 細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原分子あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々に修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

#### VI. マウス ES 細胞からの樹状細胞の作製法

筆者らは、まず、マウスの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。そして、OP9 細胞 (正常な M-CSF 遺伝子を欠損した *op/op* マウスに由来する骨髓ストローマ細胞株) と共培養することにより、マウス ES 細胞から血液細胞への分化誘導を行う仲野らの方法<sup>9)</sup>を参考にして、マウス ES 細胞から樹状細胞を作製する培養プロトコルを確立した<sup>10)</sup>。

まず、ES 細胞の中胚葉性細胞への分化を促すために、ES 細胞を単層培養している OP9 細胞とともに 5-6 日間培養する。この結果、ほとんどの ES 細胞が、中胚葉系細胞へ分化する。次に、分化した細胞をトリプシン/EDTA を用いて培養プレートから回収し、新たに準備した OP9 細胞上で GM-CSF の存在下で 5-6 日間培養する。この結果誘導される ES 細胞由来のミエロイド系の細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらに GM-CSF の存在下で培養を続けると 7-10 日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、マウスの骨髓細胞から GM-CSF を用いて分化

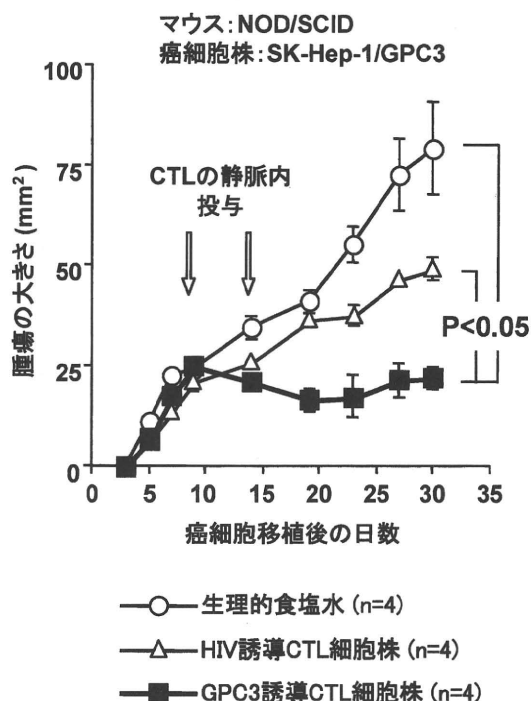


図 2 免疫不全マウスに移植した GPC3 発現ヒト HCC 細胞株に対するヒト CTL 養子免疫療法の有効性

NOD/SCID マウスの背部の皮下に、ヒト HCC 細胞株 SK-Hep-1 に GPC3 遺伝子を強制発現させた SK-Hep-1/GPC3 を  $1 \times 10^7$  個移植し、移植後 9 日目に  $5 \times 5$  mm の大きさになった時点と、その 5 日後 (移植後 14 日目) に CTL を  $8 \times 10^7$  個、計 2 回静脈内に投与した。HCC 患者の PBMC を GPC3 エピトープペプチドで刺激して誘導した CTL 投与群 (■) と、コントロールとして HIV エピトープペプチドで誘導した CTL 投与群 (△)、生理食塩水のみを投与した群 (○) の間で比較すると、GPC3 特異的 CTL 投与群ではコントロール群に比べ、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。

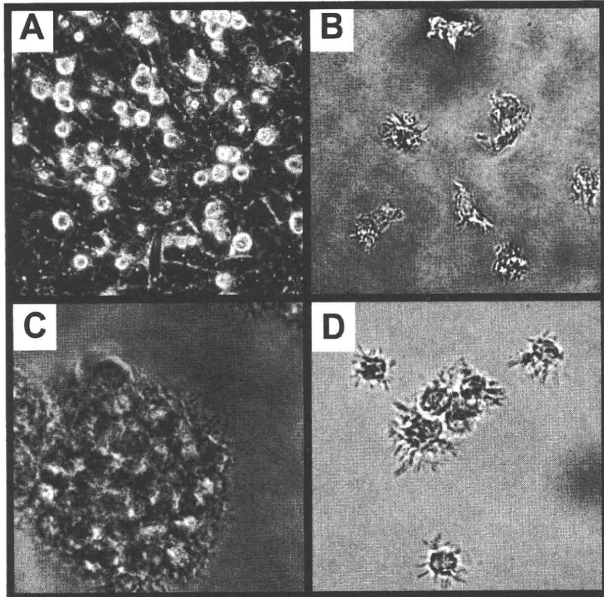


図3 マウス ES-DC の分化にともなう細胞形態の変化  
A : OP9 細胞上で ES 細胞から分化した血球系細胞, B : 分化細胞をペトリディッシュへ植え継いだ後に出現した ES-DC, C : IL-4, TNF- $\alpha$ , 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC, D : IL-4, LPS, 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC.

誘導した樹状細胞と同等の抗原提示機能と T 細胞刺激活性を有しており, また, 形態および表面マーカー等から, ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる. これをさらに TNF- $\alpha$ , IL-4, 抗 CD40 抗体, LPS 等で刺激すると, 著明な樹状突起を有し, より強力な T 細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞が誘導される. この ES 細胞由来の樹状細胞を, ES-DC と名付けた. 図3に OP9 細胞の上に出現した ES 細胞由来の浮遊細胞から ES-DC への分化に伴う細胞形態の変化を示す.

#### VII. GPC3 遺伝子を強制発現させたマウス ES-DC による抗腫瘍免疫の誘導

筆者らは, 図4に示す遺伝子導入 ES-DC を作製する手順により, モデル腫瘍抗原として OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現する ES-DC を作製した. この OVA 発現 ES-DC をマウス個体に移入することにより, OVA 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞を感作することができた. また, この ES-DC を *in vitro* でマウスの脾臓由来の T 細胞と共培養して刺激した場合も, OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化することができた. さらに, この樹状細胞を投与することにより OVA 抗原に対して感作したマウスは, OVA を発現するマウス腫瘍細胞 (MO4) を移植した場合に, これを拒絶することが

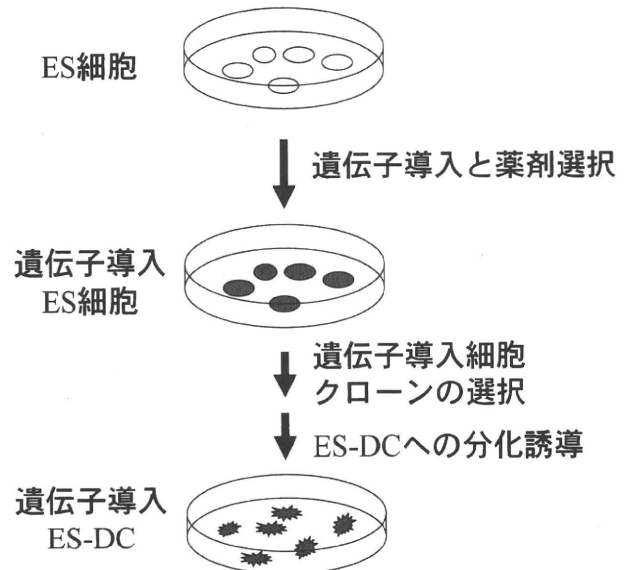


図4 遺伝子導入 ES-DC の作製手順

まず, リポフェクションあるいは電気穿孔法により, 未分化状態にある ES 細胞へ, 抗原あるいは免疫制御分子等の遺伝子発現ベクターを導入する. ベクターに付加している薬剤耐性遺伝子に合わせて G418 あるいはピューロマイシン等の薬剤を加えて培養すると, ベクターが導入された ES 細胞のクローンがコロニーとして出現する. 複数の ES 細胞クローンを単離し, その中から適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択して増殖させる. 樹立した遺伝子導入 ES 細胞クローンを ES-DC に分化誘導することにより, 遺伝子導入 ES-DC をいくらかでも作製することができる.

できた<sup>11)</sup>.

ES-DC による免疫療法では, モデル抗原である OVA を用いた場合だけでなく, 腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である. Glypican-3 は, 筆者らがヒトの肝細胞がんおよびメラノーマに発現する新規癌胎児性抗原として同定したものである. 前述の方法を用いて ES-DC に Glypican-3 を強制発現させたものをマウス個体に予防的に投与することにより, 図5に示すようにマウスの皮下に移植された, Glypican-3 を自然に発現するマウスメラノーマ細胞 B16-F10 の増殖を著明に抑制し, さらにマウスの生存期間を延長することが可能であった<sup>12)</sup>.

#### VIII. 抗原とケモカインを同時に発現するマウス ES-DC を用いた抗腫瘍免疫応答の誘導

筆者らは, ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより, 生体移入した ES-DC がリンパ性臓器へ遊走できなくても, ES-DC が存在する場所へ T 細胞が集まり, その場所で ES-DC から T 細胞へ抗原刺激が伝えられ, 抗原特異的な T 細胞を活性化する効果を高めることがで

皮下移植されたB16-F10メラノーマ細胞株を用いた予防実験

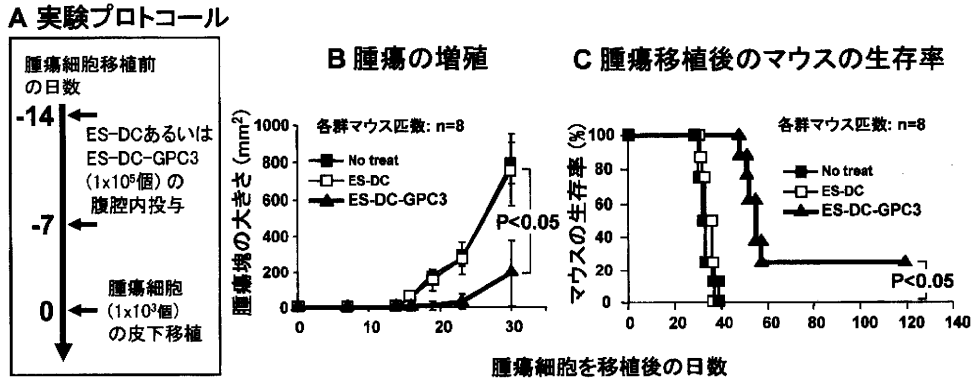


図5 肝細胞癌の新規癌胎児性抗原 Glypican-3 を発現する ES-DC による抗腫瘍効果の誘導

マウス ES 細胞にマウス GPC3 遺伝子を導入して発現させ、ES-DC (ES-DC-GPC3) を分化誘導した。A；遺伝子改変を加える前の ES-DC (□)，あるいは ES-DC-GPC3 (▲) をマウスの腹腔内に7日間隔で2回投与した。そして、2回目の投与から7日後に、これらのマウスと未処置対照群マウス (■) の皮下に、GPC3 遺伝子を自然に発現するメラノーマ細胞 (B16-F10) を移植し、B；その後の腫瘍の大きさの変化と、C；マウスの生存期間を観察した。

皮下移植されたMO4メラノーマ細胞株を用いた予防実験

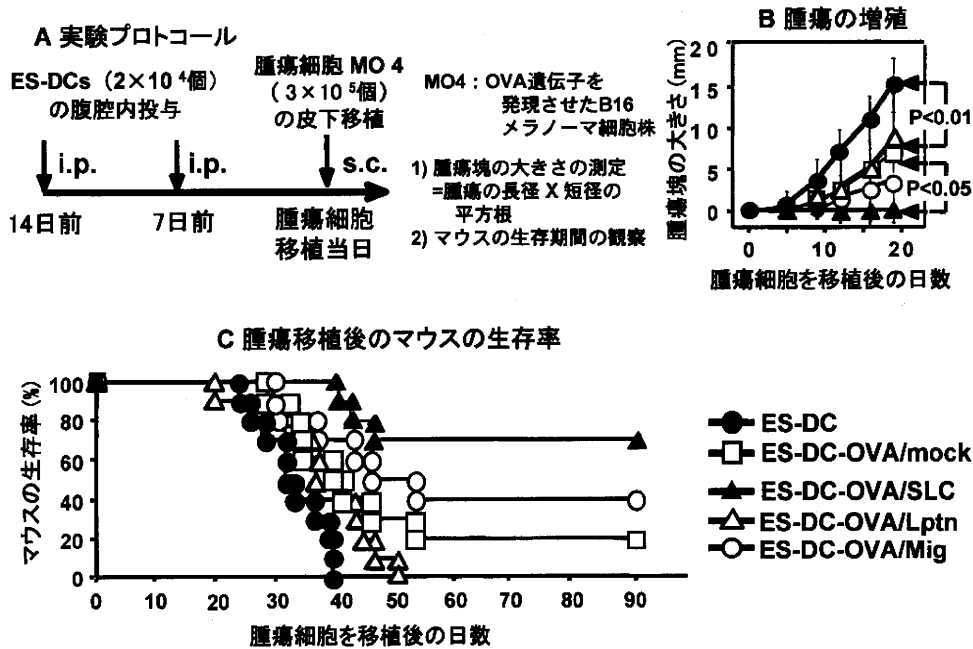


図6 導入遺伝子由来のケモカインとモデル腫瘍抗原 OVA を同時に発現する ES-DC による抗腫瘍効果の増強

マウス ES 細胞への遺伝子導入とクローンの選択を2回繰り返すことにより、モデル腫瘍抗原として OVA 抗原と、T 細胞の遊走を誘導するケモカイン (SLC, Lymphotactin, あるいは Mig) の遺伝子を同時に発現する ES-DC (それぞれ ES-DC-OVA/SLC ▲, ES-DC-OVA/Lptn △, ES-DC-OVA/Mig ○) を作製した。A；これらの遺伝的改変 ES-DC (▲, △, ○)，遺伝子改変を加える前の ES-DC (●)，あるいは OVA のみを発現する ES-DC (ES-DC-OVA/mock □) をマウス腹腔内に7日間隔で2回投与した。そして、2回目の投与から7日後に、OVA 遺伝子を強制発現させた腫瘍細胞 (MO4) を皮下に移植し、B；その後の腫瘍の大きさの変化と、C；マウスの生存期間を観察した。

きるのではないかと考えた。

これを検証するために、前述した OVA 遺伝子を導入したマウス ES 細胞に、さらに、T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、この ES 細胞から OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC を作製した。T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在する樹状

細胞からは産生されない、SLC (CCL21), Mig (CXCL9), および Lymphotactin (XCL1) の遺伝子をそれぞれ導入し、各々の効果を比較した。その結果、この3種類のケモカインのいずれについても、OVA を単独で発現する ES-DC よりも、OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC の方が、より効果的に T 細胞を活性化することがわかった<sup>11)</sup>。さ

らに, SLC あるいは Mig を OVA と同時に発現する ES-DC は, OVA 単独発現の ES-DC よりも, 抗腫瘍効果の誘導においても優れていた (図 6). 特に SLC の共発現により, 最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた.

#### IX. アロマウス ES-DC を利用した腫瘍免疫の誘導および ES-DC の自己免疫疾患予防への応用

ES-DC を臨床応用しようとする場合, ES 細胞ドナーとレシピエントの間の HLA を初めとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある. しかしながら, マウスを用いた実験では, ES 細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも, MHC のアリルを一部共有していれば, 共有された MHC クラス I 分子に提示された抗原により, 抗原特異的な T 細胞を活性化し, 抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している<sup>13)</sup>. 筆者らは, ES-DC 技術の応用として, 抗腫瘍免疫療法だけでなく, 免疫抑制分子と自己免疫疾患の標的となる自己抗原を同時に強制発現させた ES-DC による, 自己免疫疾患の予防にも成功している<sup>14,15)</sup>.

#### X. ヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製

筆者らは, ES-DC の臨床応用をめざして, ヒトの ES 細胞から ES-DC を分化誘導する方法を開発した. ヒトの ES 細胞は, マウスの ES 細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが, マウスの場合と同様に OP9 細胞をフィーダー細胞として用いることにより, 血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった<sup>16)</sup>. 筆者らのヒトの ES-DC 分化誘導法では, 培養系へ GM-CSF, M-CSF, および IL-4 を添加することにより効率良い分化誘導が可能であった. ヒト ES-DC もマウス ES-DC と同様に, タンパク質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性や, アロ MLR 刺激活性など, 樹状細胞としての機能を備えていた. また, マウス ES-DC の場合と同様の手法で, ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった.

#### おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは, HCC の免疫療法のあらたなターゲットとして, その臨床試験の結果が期待される. 癌の免疫逃避に対抗するためには, 多様な癌拒絶抗原のレパートリーを確立することが望まれる. GPC3 がその 1 つとして, HCC の

再発および発症防止に寄与することを期待したい.

最近, ES 細胞で発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの線維芽細胞等の体細胞に導入することにより, ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を作製できることが報告された<sup>17,18)</sup>. iPS 細胞の作製には, ES 細胞の場合とは異なり, ヒト胚の滅失を必要としないという利点がある. さらに, iPS 細胞は, 皮膚線維芽細胞など, 比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため, 治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である. ES 細胞から樹状細胞を作製する技術を iPS 細胞へ適用できれば, 倫理的問題を回避し, かつ, 患者本人への負担を大幅に軽減しつつ治療に必要な樹状細胞を作製することが可能となる. 著者らは, 現在 iPS 細胞から樹状細胞を作製する研究も開始している.

#### 文 献

- 1) Butterfield, L. H. : Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **127** : S232-241, 2004.
- 2) Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., et al. : Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*. **61** : 2129-2137, 2001.
- 3) Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., et al. : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **306** : 16-25, 2003.
- 4) Veugelers, M., De Cat B., Ceulemans, H., et al. : Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem*. **274** : 26968-26977, 1999.
- 5) Gonzalez, A. D., Kaya, M., Shi, W., et al. : OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell. Biol*. **141** : 1407-1414, 1998.
- 6) Capurro, M. I., Xiang, Y. Y., Lobe, C. et al. : Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. **65** : 6245-6254, 2005.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Nakano, T., Kodama, H., Honjo, T. : Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265** : 1098-1101, 1994.
- 10) Senju, S., Hirata, S., Matsuyoshi, H., et al. : Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* **101** : 3501-3508, 2003.
- 11) Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., et al. : Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein. *J. Immunol.* **172** : 776-786, 2004.
- 12) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., et al. : Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* **66** : 2414-2422, 2006.
- 13) Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Hirata, S., et al. : Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335** : 5-13, 2005.
- 14) Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., et al. : Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* **174** : 1888-1897, 2005.
- 15) Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., et al. : Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol.* **178** : 918-925, 2007.
- 16) Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., et al. : Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* **25** : 2720-2729, 2007.
- 17) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 1-12, 2007.
- 18) Yu, J., Vodyanik, MA., Smuga-Otto, K., et al. : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** : 1917-1920, 2007.

# 肝細胞癌に対するGlypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの 臨床第 I 相試験

国立がん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

中面 哲也

## Phase I clinical trial of glypican-3 peptide vaccine in patients with hepatocellular carcinoma

Tetsuya Nakatsura

Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center  
for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East,  
Kashiwa 277-8577, Japan

Key words : HCC, glypican-3, peptide vaccine, Phase I, CTL

はじめに

もう治療法がないと言われ、積極的治療が受けられなくなった進行癌患者、いわゆる「癌難民」の増加が問題化している。そのような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。免疫療法は癌の第4の治療法として期待されているが、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。我々の研究は、治療法のない「癌難民」患者に有効な治療法として提供できる、科学的根拠に基づいた癌免疫療法の開発を目的としている。また一方で、免疫療法がより有効であるのは、癌の発症予防や再発予防であると考えられることから、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法や癌発症予防法の開発を目指している。

最近、日本国内の様々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が相次いでいるが、現在、我々も国立がんセンター東病院において、進行肝細胞癌患者を対象に、肝細胞癌特異抗原glypican-3 (GPC3) のペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施している。計20例の結果からワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認しており、約60%の患者で最低2ヶ月間は腫瘍を増悪させない効果が見られた。さらに、腫瘍マーカーの減少や腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの臨床的な効果も認められている。

また今回の肝細胞癌の臨床試験では、事前のマウスでの研究結果と同様に、ワクチン効果に投与量依存性が発見されたため、さらにワクチン投与量を増やす臨床試験を開始したところである。このようなワクチン療法は、もう他に治療法がない進行肝細胞癌患者にとって有用な選択肢となる可能性があるばかりでなく、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や、肝硬変患者に対する肝細胞癌発症予防に対しても有効であると考えており、今後はそれらに対する第 II 相試験も実施する。

現在、補助療法としての抗癌剤治療は、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なくない。有害事象のないワクチンの補助療法としての有効性が証明できれば、標準的補助療法として確立することができ、抗癌剤治療に頼ってきた癌治療を大きく変え、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ている。また、将来的にワクチンによる癌の発症予防法や再発予防法が確立できれば、癌患者数の減少に大いに貢献できるものと考えている。

### 1. cDNAマイクロアレイ解析データより同定した 肝細胞癌特異抗原GPC3

癌抗原の免疫療法への応用を考える場合には、発現頻度 (汎用性)、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、

抗原消失性、自己免疫などの副作用などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的な腫瘍拒絶抗原が備えているべき性質として、癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原であることはもちろんであるが、発現の組織特異性が優れた抗原であるということは極めて重要な要素となる。

即ち、癌細胞での発現は強いが、正常組織にはほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないものとして、例えば、胎生期組織および癌細胞のみに発現する癌胎児性抗原や、癌細胞と免疫系から隔離された組織のみに発現する癌精巣抗原 (Cancer-Testis抗原) などが有望である。

我々は東大医科研・ヒトゲノムセンター (中村祐輔教授) との共同研究により、cDNAマイクロアレイのデータを用いて、HCCにおける理想的な癌抗原としてふさわしいGlypican-3 (GPC3) の同定に成功した<sup>9)</sup>。まずHCC20例の癌部と非癌部における23,040種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、多くの症例で癌部/非癌部の発現の比が5以上のものを選び、次に29臓器 (胎生期の4臓器を含む) の正常臓器における23,040種類の遺伝子の発現プロフィールを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を選んだ。我々が同定したGPC3は、HCC20例中16例で癌部/非癌部の発現の比が5以上 (平均14.4) で、胎盤および胎生期の肝臓、腎臓、肺に発現する以外はほとんどの正常臓器に発現を認めなかった。既に、GPC3がHCCで高発現することが報告されており、さらに我々も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見られないことを実際に確認した。

新しい癌胎児性抗原GPC3は580アミノ酸からなる60kDの膜蛋白質で、HSPGs (ヘパラン硫酸プロテオグリカン) ファミリーに属する糖鎖修飾が強いGPIアンカー蛋白質であり、X染色体 (Xq26) 連鎖疾患で、巨人症、嚢胞腎、口蓋裂ほかの症状を呈するSimpson-Golabi-Behmel 症候群 (SGBS) の患者において遺伝子変異を認める<sup>2), 3)</sup>。また、GPC3遺伝子の標的破壊マウスは、SGBSと同様に巨大化し種々の奇形を発現する<sup>4)</sup>。HCCにおける機能についてはまだよくわかっていない。GPC3は膜蛋白で分泌され、既知の $\alpha$ フェトプロテイン (AFP) およびPIVKA-IIIにつぐHCCの第3の腫瘍マーカーとしての有用性も示された<sup>5)</sup>。また、我々はGPC3がメラノーマの腫瘍マーカーとしても有用であること

も報告している<sup>6)-7)</sup>。

このようにGPC3の発現は腫瘍組織特異性が優れていることから、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に結合しうるGPC3由来のペプチドを合成し、これらをBALB/cマウスあるいはHLA-A24 transgenic mouse (Tgm) に免疫して解析し、HLA-A24結合性CTLエピトープペプチドEYILSLEELを同定した<sup>8)</sup>。このペプチドEYILSLEELを用いて、ヒトのHLA-A24陽性のHCC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<sup>9)</sup>。また、日本人の40%が陽性であるHLA-A2に結合しうるペプチドを合成し、これらをHLA-A2Tgm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HCC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<sup>9)</sup>。これらのCTLはGPC3発現癌細胞を傷害し、免疫不全マウスの皮下に移植したGPC3発現ヒト肝癌細胞株の増殖を抑制した。また、非常に重要な点であるが、マウスを用いた以上のいずれの実験においても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誘導されなかった<sup>9)-10)</sup>。

## 2. 前臨床試験の概要

最善のプロトコール作成のため、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なった<sup>11)</sup>。BALB/cマウスを用いて、ペプチド単独群、不完全フロイントアジュバント (IFA) との併用群、CpG併用群、 $\alpha$ -GalCel併用群、アルミニウム併用群の5群で比較したところ、IFAとの併用投与群においてのみ、GPC3特異的なキラーT細胞 (CTL) が誘導された。ペプチド単独では無効で、不完全フロイントアジュバント (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。BALB/cマウスにHLA-A24結合性ペプチドをIFAとともに0, 5, 10, 20, 50 $\mu$ g投与し比較した。その結果、CTLの誘導能はペプチド投与量に依存し、50 $\mu$ 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。ペプチド投与量を1.67, 5, 16.7, 50 $\mu$ gの4群にわけ、それぞれの投与量において1回から4回、1週間毎に免疫した。その結果、2回



以上の免疫で投与量が16.7 $\mu$ g以上で、抗原特異的な免疫応答が観察された。一方で少量の投与量においては、免疫回数を増やしても同様の免疫反応は観察されなかった。さらに、HLA-A2に結合するペプチドに関してHLA-A2 Tgmを用いて検討を行ったところ、CTL誘導能は同様にペプチド投与量に依存することが観察された。

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。しかしながら今回の我々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 $\mu$ 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100ヶ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。今回の第I相臨床試験では、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、投与回数を決める方針にした。

### 3. 国立がんセンター倫理審査委員会の承認およびプロトコルの概要

動物を使った毒性試験を第三者機関に依託し、GPC3ペプチドのマウスを用いた単回皮下投与毒性試験を実施して安全性を確認した後に、進行癌患者を対象とする第I相試験を計画し、国立がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。平成19年2月8日、「進行肝細胞がん患者を対象としたHLA-A24および-A2結合性Glypican-3 (GPC3) 由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験」をスタートした。

プロトコルの概要を以下に示す。

#### 1) 目的

肝細胞癌には切除術をはじめとする様々な局所治療法や抗癌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無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。本研究は、局所療法または抗癌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-A2陽性の肝

細胞癌患者を対象とした、HLA-A24あるいは-A2結合性GPC3由来ペプチドワクチンを用いた免疫療法の臨床第I相試験である。本研究は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。

#### 2) 対象

局所療法または抗癌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癌患者で、HLAタイピング検査によりHLA-A24あるいは-A2陽性であることが確認された患者。

#### 3) 治療

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

#### 4) 免疫学的モニタリング

①IFN- $\gamma$  ELISPOT解析とHLA-GPC3ペプチド複合体ペンタマーを用いて、末梢血中のGPC3ペプチド特異的T細胞の増加程度を観察する。

②遅延型過敏症 (DTH) 反応を観察する。

#### 5) 主要評価項目

①HLA-A24結合性GPC3由来ペプチド (EYILSLEEL) ワクチンおよびHLA-A2結合性GPC3由来ペプチド (FVGEFFTDV) ワクチンによる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

##### ①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ヶ月後に画像診断を行い、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) に従って1回目の判定をし、SD, PR, CRの症例に関しては、さらにその4週間後以降に同様の検査を行い、評価する。

##### ②腫瘍マーカーの推移

同様に3回目のワクチン終了1ヶ月後およびその4週間後以降に3種類の腫瘍マーカー (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も評価する。

#### 4. 臨床第 I 相試験の現時点での結果のまとめ

- 1) 進行肝細胞癌患者を対象に、肝細胞癌特異抗原 Glypican-3 (GPC3) を標的とするペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を実施している。
- 2) 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た。計 20 例全例に DLT は発現せず、安全性に問題はないと判断された。(うち 2 例は明らかな病態の増悪により、ワクチン投与 2 回で中止し、外部委員 3 名からなる効果・安全性評価委員会で承認された)
- 3) 免疫学的解析が終了した 20 例中 19 例 (95.0%) に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され、免疫学的有効性も確認された。
- 4) 3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の RECIST 基準に基づく臨床効果の評価では 18 人中 11 人 (61.1%) が SD で 7 人は 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%) が SD であり、3.0mg 投与の 6 人中 3 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。
- 5) ワクチン投与後に腫瘍マーカーの低下が見られた症例は、0.3mg の 6 人中 0 人 (0%)、1.0mg では 6 人中 3 人 (50%)、3.0mg では 5 人中 5 人 (100%) と、我々のマウスでの研究結果と同様、臨床効果には投与量依存性も示唆された。
- 6) 次相の至適投与量を決定するため、10.0mg, 30.0mg 3 回投与を 3 例ずつ行うこととし、倫理審査委員会に承認され、現在 3 例に 10.0mg を 3 回投与した。
- 7) また、本臨床試験終了後生存中の患者のほとんどは、3 回のペプチドワクチン投与による免疫学的効果あるいは臨床効果が認められていながら、患者の強い希望があっても、プロトコールのためにワクチンを追加投与できない状況にあった。安全性が確立した投与量で継続投与できるようプロトコールを改訂し、倫理審査委員会の承認を受け、4 例に 4 回目として 3.0mg のワクチンを投与した。うち 3 例は現在も継続中である。

#### 5. 今後の計画

臨床第 I 相試験を終了し、GPC3 由来ペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認し、次相以降の至適投与量、投与回数を決定する。GPC3 を標的とするペプチドワクチンは、他に治療法がない進行肝細胞癌

患者にとって有用な選択肢になる可能性もあり、今後は第 II 相試験を計画、実施する。

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効果を発揮すると考えられ、手術や RFA などの肝細胞癌根治的治療後の再発予防や、肝硬変患者に対する肝細胞癌発症予防にこそ活かされるべきであり、それらにおける第 II 相試験も計画、実施する。

#### おわりに

癌免疫療法の多くの臨床応用の結果は、我々に失望を与えたかに見えていたが、様々な臨床試験の結果、生体の中で確かに抗腫瘍免疫応答は起きていることが証明されてきており、今回我々もまだ途中経過ではあるが、最小投与量 0.3mg のペプチドワクチン投与でも末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の増加を誘導できることが確認でき、それなりの臨床効果も観察できた。今後は再発予防や発癌予防に対するペプチドワクチンの効果を検証していくとともに、他の治療法と免疫療法との併用により有効な治療法を開発していきたいと考えている。

免疫療法はまだ標準治療にはなっていないが、副作用のないがん特異的免疫療法が、がんの治療・再発予防・予防法として標準化される時代はきっと来ると信じている。しかし、本当に有効な癌免疫療法を見つけるためには、膨大なスクリーニング、即ち多数の臨床試験が必要であり、様々な癌に対してどのような免疫療法がどのような対象に有効であるのか、多くの施設で様々な臨床試験を積み重ねていくことで、着実に結果を出していく必要がある。その中から本当に有効な免疫療法が開発され、標準治療の仲間入りができるよう、我々はさらに努力を積み重ねなければならない。

#### 文 献

- 1) Nakatsura T, Yoshitake Y et al: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Comm*, 306 : 16-25, 2003.
- 2) Pilia G, Hughes-Benzie RM et al: Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet*, 12 : 241-247, 1996.
- 3) Neri G, Gurrieri F et al: Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet*, 79 : 279-283, 1998.
- 4) Cano-Gauci DF, Song HH et al: Glypican-3-deficient

- mice exhibit the overgrowth and renal abnormalities typical of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol*, 146 : 255-264, 1999.
- 5) Nakatsura T, Kageshita T et al: Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res*, 10 : 6612-6621, 2004.
  - 6) Nakatsura T, Nishimura Y: Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs*, 19 : 71-77, 2005. (review)
  - 7) Ikuta Y, Nakatsura T et al: Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum SPARC and Glypican-3 levels. *Clin Cancer Res*, 11 : 8079-8088, 2005.
  - 8) Nakatsura T, Komori H 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.
  - 9) Komori H, Nakatsura T 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*, 12 : 2689-2697, 2006.
  - 10) Motomura Y, Senju S et al: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res*, 66 : 2414-2422, 2006.
  - 11) Motomura Y, Ikuta Y et al: HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int J Oncol*, 32 : 985-990, 2008.

トピックス  
分子標的治療

Targeted therapy for hepatocellular carcinoma

古瀬 純司\* 仲地 耕平\*\* 鈴木英一郎\*\* 清水 怜\*\* 光永 修一\*\*

Junji Furuse

Kohei Nakachi

Eiichiro Suzuki

Satoshi Shimizu

Shuichi Mitsunaga

●要旨●肝細胞癌における治療戦略上、これまで化学療法はほとんど考慮されてこなかった。上皮成長因子などの細胞シグナル伝達経路や血管内皮増殖因子など、癌の増殖、転移に関する分子生物学的特性に基づく分子標的薬の開発が進み、化学療法の環境も変化してきた。肝細胞癌では従来の殺細胞性抗癌剤は併用療法により高い奏効率が得られるものの、生存期間の延長にはつながらず、標準的化学療法は確立していなかった。2007年、マルチキナーゼ阻害薬 sorafenib は無作為化比較試験により奏効率は2~4%と低いものの、placebo群に比べ無増悪生存期間と全生存期間の延長が報告された。sorafenib は肝細胞癌の標準的化学療法と位置付けられるものと期待されている。さらに今後、新しい分子標的薬や併用療法などの試み、局所治療の補助療法など肝細胞癌の治療戦略に大きな変化がもたらされるものと考えられる。

● key words : 肝細胞癌, 上皮成長因子受容体, 血管内皮細胞増殖因子受容体, 全身化学療法

## はじめに

肝細胞癌の治療は一般に癌進行度と肝障害度に応じて治療選択が行われ、肝切除などの局所療法から化学療法までその治療法は多岐にわたる。肝細胞癌に対する治療選択については日本では『肝癌診療ガイドライン』による肝細胞癌治療アルゴリズムが公表されている<sup>1)</sup>。また Barcelona group による Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) staging classification<sup>2)</sup>は進行度と全身状態 (performance status ; PS) や肝障害度から治療選択を示し、ヨーロッパを中心に用いられている。これらの治療選択のガイドラインにおいて、肝切除やラジオ波 (RFA) など局所壊死療法、肝移植、肝動脈塞栓化学療法 (TACE) は適切な症例選択の下に標準治療として確立している。一方、化学療法はこれまで多くのレジメンが臨床試験として試みられてきたが、生存期間の延長が確認された標準治療もその位置付けも確立していない。最近、癌の進展、増殖にかかわるさまざまな分子生物学的特徴が明らかにな

り、それらを標的とした分子標的薬の開発が急速に進歩してきた。肝細胞癌においても従来の化学療法に代わって多くの分子標的薬が試みられてきている。本稿では肝細胞癌の化学療法と分子標的薬の臨床試験について概説する。

## 肝細胞癌に対する化学療法

肝細胞癌に対する化学療法は、肝動脈から注入する経動脈性化学療法 (動注化学療法) と経静脈あるいは経口による全身化学療法に分けられる。肝細胞癌に対する化学療法は、肝切除、局所壊死療法、肝動脈塞栓 (化学塞栓) 療法の局所治療が無効あるいは適応困難な例 (高度門脈腫瘍栓など) および遠隔転移例が適応となる。また肝細胞癌では肝硬変など慢性肝障害を背景にもつ例が多いことから、肝障害を助長するリスクも大きく、肝障害度 C (Child-Pugh C) の肝機能不良例では化学療法は禁忌である。

わが国では肝動脈からの動注化学療法が盛んに行われている。現在、動注化学療法剤として epirubicin, mitomycin C, 5-FU が主に用いられてきたが、2004年7月、cisplatin (アイエーコール®) の保険適応が承認された。最近では5-FU+cisplatin や5-FU+in-

\* 杏林大学医学部腫瘍内科教授

\*\* 国立がんセンター東病院肝胆膵内科

表 1 切除不能肝細胞癌における doxorubicin と無治療との無作為化比較試験<sup>5)</sup>

	doxorubicin	best supportive care	
N	60	46	
response	2 (3.3%)	-	
median OS	10.6 weeks	7.5 weeks	$p=0.036$
fetal complication	15 (25%)		
cause of death			
tumor progression with cachexia	60.0%	76.1%	
side effects of therapy	25.0%	0	
GI bleeding	6.6%	8.7%	
rupture of tumor	3.3%	6.5%	
hypoglycemia	5.0%	4.3%	
subarachnoid hemorrhage	0	2.3%	
suicide	0	2.3%	

表 2 切除不能肝細胞癌における doxorubicin と PIAF 併用療法との無作為化第Ⅲ相試験<sup>12)</sup>

	doxorubicin	PIAF	p-value
N	94	94	
response	10.5%	20.9%	0.058
median overall survival	6.83 months	8.67 months	0.83
treatment-related mortality	3%	9%	0.194
major toxicity*			
neutropenia	63%	82%	0.003
thrombocytopenia	24%	57%	<0.001
vomiting	4%	12%	0.058
hypokalemia	0%	7%	0.007
hyponatremia	1%	6%	0.054

\*Grade 3 or above

terferon (IFN) で高い奏効率が報告されているが、いずれも前向きな臨床試験による検証は行われていない<sup>34)</sup>。

全身化学療法では、これまで肝細胞癌における無作為化比較試験として doxorubicin (DXR), tamoxifen, interferon などいくつか行われてきた<sup>9)~9)</sup>。DXR では無治療群に比べ有意に生存期間の延長が得られたが、25%の症例で致命的な合併症が認められている(表 1)<sup>9)</sup>。tamoxifen や IFN- $\alpha$  では生存期間の改善は認められていない<sup>7)~9)</sup>。最近では多剤併用療法が試みられ、5-FU/mitoxantrone/cisplatin (FMP), cisplatin/doxorubicin/5-FU/IFN- $\alpha$  (PIAF) など25%を超える高い奏効率が報告された<sup>10)11)</sup>。これらのなかで DXR を control arm とした PIAF regimen の第Ⅲ相試験が行われたが、有意な生存期間の改善は示せ

ず(表 2)<sup>12)</sup>。既存の抗癌剤による化学療法は悲観的に考えられていた。

### 上皮成長因子 (epidermal growth factor)

細胞の増殖は、epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  などさまざまな成長因子が receptor と結合して生じるシグナル伝達経路を介して制御されている。肝細胞癌でもこれらの receptor の高発現が報告されており、EGF receptor (EGFR) を阻害することにより、癌の増殖、転移、浸潤など進行を止め、アポトーシスを誘導する効果が期待されている<sup>13)</sup>。

ヒト EGFR は 4 種類 (human epidermal growth factor receptor ; HER1~4) に分けられ、EGFR/

表3 肝細胞癌に対する上皮成長因子受容体阻害薬の主な第I, II相臨床試験

	class of anti-EGF agent	targets	study design	n	response rate	disease control rate	median PFS	median OS	author	year
erlotinib	tyrosine-kinase inhibitor	HER1/EGFR	Phase II	38	9%	59%	3.2mo	13.0mo	Phillip	2005 <sup>14)</sup>
erlotinib			Phase II	40	0	43%	3.1mo	6.3mo	Thomas	2007 <sup>15)</sup>
lapatinib			Phase II	40	5%	38%	2.3mo	6.2mo	Ramanathan	2006 <sup>16)</sup>
cetuximab	antibody	HER1/EGFR	Phase II	32	0	44%	8wk	-	Gruenwald	2007 <sup>17)</sup>
cetuximab			Phase II	30	0	17%	1.4mo	9.6mo	Zhu	2007 <sup>18)</sup>
GEMOX/ cetuximab			Phase II	45	24%	65%	4.5mo	9.2mo	Louafi	2007 <sup>19)</sup>

GEMOX ; gemcitabine + oxaliplatin, response ; complete response + partial response, disease control ; complete response + partial response + stable disease, PFS ; progression-free survival, OS ; overall survival

HER1とHER2阻害薬が臨床応用されている。receptorの細胞外のドメインを阻害する抗体薬と細胞内のドメインである tyrosine kinase を直接阻害する阻害薬が開発されている(表3)。これらの薬剤(いわゆる分子標的薬)を用いた臨床試験が多く行われ、肝細胞癌においてもEGFR/HER1の高発現は52~71%と高率に認められている。

erlotinibは tyrosine kinase 阻害薬であり、わが国でも肺癌ですでに保険適応の承認が得られている。肝細胞癌での第II相試験では奏効率0~9%、無増悪生存期間(PFS)中央値3カ月程度と単独での開発は難しい印象がある<sup>14)15)</sup>。cetuximabはIgG1サブクラスのヒト・マウスキメラ化モノクローナル抗体であり、EGFRと結合してその働きを阻害する。これまで単独あるいはgemcitabine+oxaliplatin(GEMOX)との併用が試みられているが、単独では奏効率0%、PFS中央値2カ月未満と期待された効果は得られていない<sup>16)~19)</sup>。今後、これらのEGFR阻害薬は従来の抗癌剤との併用や後述する血管新生阻害薬との併用などの試みが期待されている。

### 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)

肝細胞癌は血管新生の豊富な腫瘍の代表であり、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)との関係が強いと考えられている。Poonらは肝細胞癌の進行や予後に対するVEGFの関与を報告している<sup>20)</sup>。肝細胞癌患者と健常人で血清VEGF値を比較すると、肝細胞癌患者245pg/ml、健

常者180pg/mlと患者群で有意に上昇していた( $p=0.042$ )。また肝細胞癌の進行度と血清VEGF値を比較すると、サイズ、Edmondson grade、血管浸潤の有無、微小サテライト病変の有無、TNM分類では進行した群で血清VEGF値が高値であった。VEGF値と予後との関連では、高VEGF群で予後不良であった( $p=0.012$ )。VEGFの阻害は腫瘍血管の減少、血管の蛇行・ねじれの改善から間質圧の減弱と血管の正常化をもたらすとされる。その結果、癌のアポトーシスを促すことに加え、抗癌剤のデリバリーを高める。このようにVEGFは肝細胞癌の進行度や予後、化学療法の効果増強などと大きく関連しており、VEGF阻害薬は肝細胞癌の治療適応に期待されている。

VEGF阻害薬として、VEGFを中和する抗体薬bevacizumabとVEGF receptor(VEGFR)を中心とした複数の標的を阻害するマルチキナーゼ阻害薬、VEGFRをより選択的に阻害するVEGFR阻害薬などが開発されている(表4)。bevacizumabはVEGFと特異的に結合する遺伝子組換え型ヒト化モノクローナル抗体であり、単独、抗癌剤との併用、erlotinibとの併用が試みられている<sup>21)~23)</sup>。とくにbevacizumabとerlotinib併用療法では奏効率21%、PFS中央値9.0カ月、全生存期間(OS)中央値19.0カ月と良好な成績が得られており、今後、第III相試験の実施が注目される<sup>23)</sup>。

分子標的治療としては、癌細胞自体の増殖因子であるEGFシグナル伝達路と血管内皮増殖の両方の阻害が理想的である。その観点から複数の分子標的を阻害するマルチキナーゼ阻害薬が開発されてきた。sorafenibはEGFRの下流であるRAFキナーゼと

表 4 肝細胞癌に対する血管内皮増殖因子阻害薬の主な第 I, II 相臨床試験

class of anti-VEGF agent	targets	study design	n	response rate	disease control rate	median PFS	median OS	author	year	
bevacizumab		Phase II	30	10%	80%	6.5mo	-	Schwartz	2006 <sup>21)</sup>	
GEMOX/ bevacizumab	antibody	VEGF	Phase II	33	20%	47%	5.3mo	9.6mo	Zhu	2006 <sup>22)</sup>
bevacizumab/ erlotinib		Phase II	34	21%	79%	9.0mo	19.0mo	Thomas	2007 <sup>23)</sup>	
sorafenib	small-molecule inhibitor	Raf/VEGFR-2, 3/ PDGFR	Phase II	137	2%	42%	4.2mo	9.2mo	Abou-Alfa	2006 <sup>26)</sup>
		VEGFR-2/ PDGFR/c-Kit	Phase I	25	4%	80%	4.9mo	15.6mo	Furuse	2008 <sup>27)</sup>
sunitinib		Phase II	26	4%	42%	4.1mo	11.6mo	Zhu	2007 <sup>28)</sup>	
		Phase II	37	3%	38%	4.8mo	10.4mo	Faivre	2007 <sup>29)</sup>	

GEMOX ; gemcitabine + oxaliplatin, cape ; capecitabine, ox ; oxaliplatin, response ; complete response + partial response, disease control ; complete response + partial response + stable disease, PFS ; progression-free survival, OS ; overall survival

表 5 進行肝細胞癌患者における sorafenib と placebo の無作為化第 III 相試験の試験デザイン<sup>30)</sup>

主要評価項目	overall survival time to symptomatic progression
副次評価項目	time to progression
デザイン	国際多施設共同 二重盲検化プラセボ対照ランダム化第 III 相試験 (sorafenib 群 vs. placebo 群)
割付因子	門脈腫瘍栓 and/or 肝外転移 ECOG PS 地域
仮説	median survival time を 7 カ月から 9.7 カ月 (40%) に改善 検出力 90%, $\alpha = 0.02$ (片側), 予定症例数 560 例, 死亡数 424 例

VEGFR-1-3, PDGFR- $\beta$ などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬である。肝細胞癌においても Raf キナーゼの高発現が認められ, RAF/MEK/ERK シグナル伝達経路が肝細胞癌発症に関与しているとの報告がある<sup>24)</sup>。また sorafenib の第 I 相試験では肝細胞癌例で PR が得られていた<sup>25)</sup>。以上の背景から, 米国やヨーロッパなどで sorafenib 400mg, 1 日 2 回経口投与により進行肝細胞癌に対する有効性と安全性を確認する第 II 相試験が行われた<sup>26)</sup>。その結果, 奏効率は 2% と低率であったが, 十分な忍容性が確認され, 無増悪期間 (TTP) 中央値 4.2 カ月, OS 中央値 9.2 カ月と有効性も期待される結果であった (表 3)。わが国では日本人肝細胞癌患者での薬物動態, 安全性, 推奨用量などを明らかにする目的で第 I 相試験が行われた<sup>27)</sup>。その結果, 他癌腫, 米国・ヨーロッパと同様の薬物動態および忍容性が確認され, 推奨用量も 400mg, 1

日 2 回と決定された (表 3)。同試験では症例数は少ないものの, 有効性も同等であった。一方, sunitinib は VEGFR-2, PDGFR, c-Kit を主な標的とした sorafenib に類似のマルチキナーゼ阻害薬である。日本では肝細胞癌に対する臨床試験は行われていないが, 米国とヨーロッパを中心に二つの第 II 相試験が行われた。その結果, 奏効率が 3~4%, PFS 中央値 4.1~4.8 カ月, OS 中央値 10.4~11.6 カ月と sorafenib とほぼ同等の成績が報告され<sup>28)29)</sup>, 今後の開発が期待されている。

### sorafenib によるプラセボコントロール 無作為化比較試験

上述の sorafenib の肝細胞癌に対する前臨床データおよび第 I, II 相試験の結果をもとに, プラセボコン

表6 進行肝細胞癌患者における sorafenib と placebo の無作為化第Ⅲ相試験の患者背景<sup>30)</sup>

	sorafenib	placebo
N	299	303
median age	67歳	68歳
male	87%	87%
region europe	88%	87%
etiology HCV/HBV/alcohol/other	29/19/26/26%	27/18/26/29%
ECOG PS 0	54%	54%
Child-Pugh A	95%	98%
BCLC stage C	82%	83%

BCLC stage ; Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification

表7 進行肝細胞癌患者における sorafenib と placebo の無作為化第Ⅲ相試験の結果<sup>30)</sup>

	sorafenib	placebo	HR (sorafenib/placebo)	p-value
N	299	303		
median overall survival	10.7mo	7.9mo	0.69	0.0006
time to progression	5.5mo	2.8mo	0.58	0.000007
overall response				
PR	2.3%	0.7%		
SD	71%	67%		
PD	18%	24%		
progression-free rate at 4 month	62%	42%		
serious adverse event (SAE)	52%	54%		
drug-related treatment emergent SAE	13%	9%		

トロールによる無作為化比較試験 SHARP (sorafenib HCC assessment randomized protocol) trialが実施された<sup>30)</sup>。本試験の試験デザインを表5にまとめた。主な患者選択基準は、組織学的な肝細胞癌の確認、進行肝細胞癌、ECOG PS 0~2、Child-Pugh A、全身化学療法歴なし、などである。

2005年3月~2006年4月までに sorafenib 群299例、placebo 群303例が登録された。治療は sorafenib 400mg/回、1日2回内服、あるいは placebo 1日2回内服に割り振られ、両群の患者背景に有意な差はみられなかった(表6)。

主要評価項目である OS は sorafenib 群10.7カ月、placebo 群7.9カ月であり、ハザード比0.69 (95% CI : 0.55~0.87 ; p=0.0006) と両者間に明らかな統計学的有意差を認めた。もうひとつの主要評価項目である症状増悪までの期間では差は認められなかった。副次評価項目である TTP は sorafenib 群5.5カ月、placebo 群2.8カ月であり、ハザード比0.58 (95% CI : 0.45~0.74 ; p=0.000007) と両者間に明らかな統計学的有意差を認めた(表7)。有害事象について

は両群に差はなく、主な Grade 3/4の有害事象は下痢 (sorafenib vs. placebo : 11% vs. 2%)、手足皮膚反応 (8% vs. 1%)、疲労感 (10% vs. 15%)、出血 (6% vs. 9%)であった。sorafenib は十分な忍容性があり、進行肝細胞癌患者の生存期間を延長した初めての治療薬である。これらは臨床的に意義のある結果であり、sorafenib は進行肝細胞癌に対する第一選択の治療法になり得るものと報告された。本試験の評価において、患者背景でヨーロッパからの登録が90%近くと偏っていることが問題点としてあげられる。この結果をわが国にそのまま導入してよいかという点について、肝細胞癌の病因がC型肝炎関連30%弱と少なく、70%程度がC型肝炎感染陽性の日本と差がみられることも指摘されている。

肝細胞癌の全身化学療法は、一定の抗腫瘍効果が得られても肝障害や静脈瘤出血などの有害事象により生存期間の改善につながらないことが多い。今回の SHARP 試験でも重篤な有害事象は sorafenib 群 52%、placebo 群54%と高頻度に認められたが、治療



関連と考えられる有害事象はそれぞれ13%と9%と低く、差も認められていない。肝細胞癌患者では全身化学療法実施時の有害事象が肝細胞癌や肝硬変など原病の関与がきわめて大きいものと考えられる。sorafenibは2007年すでに欧米で肝細胞癌への適応が承認されており、今後わが国でも保険適応承認が期待されている。肝細胞癌での適応においては、sorafenibは高い忍容性が確認されている一方で、特徴的な薬物有害反応やさまざまな合併症に対応する必要がある。

## おわりに

肝細胞癌においても分子標的薬の適応により初めて生存期間の延長に寄与する化学療法が確立した。今後、新しい分子標的薬や併用治療などの開発や補助療法など適応の拡大が期待されるなど、肝細胞癌における治療戦略も大きく変わっていくものと考えられる。また一方、実地医療において分子標的治療の適切な適応と副作用対策などの実施が必要である。

## 文 献

- 科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン作成に関する研究班：科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン、2005年版、金原出版、東京、2005。
- Bruix, J. and Llovet, J. M. : Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 35 : 519~524, 2002.
- Ando, E., Tanaka, M., Yamashita, F., Kuromatsu, R., Yutani, S., Fukumori, K., Sumie, S., Yano, Y., Okuda, K. and Sata, M. : Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis : Analysis of 48 cases. *Cancer*, 95 : 588~595, 2002.
- 左近賢人, 永野浩昭, 山本為義, 太田英夫, 中村将人, 丸橋繁, 堂野恵三, 中森正二, 梅下浩司, 門田守人 : 肝細胞癌の動注化学療法 : リザーバーによる動注化学療法 : インターフェロン併用動注化学療法, 肝胆膵癌の化学療法, 肝胆膵, 46 : 583~589, 2003.
- Lai, C. L., Wu, P. C., Chan, G. C., Lok, A. S. and Lin, H. J. : Doxorubicin versus no antitumor therapy in inoperable hepatocellular carcinoma : A prospective randomized trial. *Cancer*, 62 : 479~483, 1988.
- Chow, P. K., Tai, B. C., Tan, C. K., Machin, D., Win, K. M., Johnson, P. J., Soo, K. C. : Asian-Pacific Hepatocellular Carcinoma Trials Group : High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma : A multicenter randomized controlled trial. *Hepatology*, 36 : 1221~1226, 2002.
- Barbare, J. C., Bouché, O., Bonnetain, F., Raoul, J. L., Rougier, P., Abergel, A., Boige, V., Denis, B., Bianchi, A., Pariente, A., Milan, C. and Bedenne, L. : Randomized controlled trial of tamoxifen in advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 4338~4346, 2005.
- Lai, C. L., Wu, P. C., Lok, A. S., Lin, H. J., Ngan, H., Lau, J. Y., Chung, H. T., Ng, M. M., Yeoh, E. K. and Arnold, M. : Recombinant alpha 2 interferon is superior to doxorubicin for inoperable hepatocellular carcinoma : A prospective randomised trial. *Br. J. Cancer*, 60 : 928~933, 1989.
- Llovet, J. M., Sala, M., Castells, L., Suarez, Y., Vilana, R., Bianchi, L., Ayuso, C., Vargas, V., Rodés, J. and Bruix, J. : Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 31 : 54~58, 2000.
- Leung, T. W., Patt, Y. Z., Lau, W. Y., Ho, S. K., Yu, S. C., Chan, A. T., Mok, T. S., Yeo, W., Liew, C. T., Leung, N. W., Tang, A. M. and Johnson, P. J. : Complete pathological remission is possible with systemic combination chemotherapy for inoperable hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 5 : 1676~1681, 1999.
- Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., Takezako, Y. and Morizane, C. : A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone, and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103 : 756~762, 2005.
- Yeo, W., Mok, T. S., Zee, B., Leung, T. W., Lai, P. B., Lau, W. Y., Koh, J., Mo, F. K., Yu, S. C., Chan, A. T., Hui, P., Ma, B., Lam, K. C., Ho, W. M., Wong, H. T., Tang, A. and Johnson, P. J. : A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 97 : 1532~1538, 2005.
- Ito, Y., Sasaki, Y., Horimoto, M., Wada, S., Tanaka, Y., Kasahara, A., Ueki, T., Hirano, T., Yamamoto, H., Fujimoto, J., Okamoto, E., Hayashi, N. and Hori, M. : Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 27 : 951~958, 1998.
- Philip, P. A., Mahoney, M. R., Allmer, C., Thomas, J., Pitot, H. C., Kim, G., Donehower, R. C., Fitch, T., Picus, J. and Erlichman, C. : Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 6657~6663, 2005.
- Thomas, M. B., Chadha, R., Glover, K., Wang, X., Morris, J., Brown, T., Rashid, A., Dancey, J. and Abbruzzese, J. L. : Phase 2 study of erlotinib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 110 : 1059~1067, 2007.
- Ramanathan, R. K., Belani, C. P., Singh, D. A., Tanaka, M., Lenz, H. J., Yen, Y., Kindler, H. L., Iqbal, S., Longmate, J. and Gandara, D. R. : Phase II study of lapatinib, a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase 1 and 2 (Her2/Neu) in patients (pts) with advanced biliary tree cancer (BTC) or hepatocellular cancer (HCC). A

- California Consortium (CCC-P) Trial. *J. Clin. Oncol.*, 2006 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 24 : 181s, (abstr 4010), 2006.
- 17) Gruenewald, V., Wilkens, L., Gebel, M., Greten, T. F., Kubicka, S., Ganser, A., Manns, M. P. and Malek, N. P. : A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma : Final results. *J. Clin. Oncol.*, 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 222s, (abstr 4598), 2007.
- 18) Zhu, A. X., Stuart, K., Blaszkowsky, L. S., Muzikansky, A., Reitberg, D. P., Clark, J. W., Enzinger, P. C., Bhargava, P., Meyerhardt, J. A., Horgan, K., Fuchs, C. S. and Ryan, D. P. : Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 110 : 581~589, 2007.
- 19) Louafi, S., Heber, M., Rosmorduc, O., Tesmoingt, C., Asnacios, A., Romano, O., Fartoux, L., Artru, P., Poynard, T. and Taieb, J. : Gemcitabine, oxaliplatin (GEMOX) and cetuximab for treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) : Results of the phase II study ERGO. *J. Clin. Oncol.*, 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 221s, (abstr 4594), 2007.
- 20) Poon, R. T., Ho, J. W., Tong, C. S., Lau, C., Ng, I. O. and Fan, S. T. : Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Surg.*, 91 : 1354~1360, 2004.
- 21) Schwartz, J. D., Schwartz, M., Lehrer, D., Cohen, E., Sung, M., Kinkhabwala, M., Siegel, A., Holloway, S., Ocean, A. and Wadler, S. : Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) for patients without metastasis and without invasion of the portal vein. *J. Clin. Oncol.*, 2006 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 24 : 213s (abstr 4144), 2006.
- 22) Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Ryan, D. P., Clark, J. W., Muzikansky, A., Horgan, K., Sheehan, S., Hale, K. E., Enzinger, P. C., Bhargava, P. and Stuart, K. : Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24 : 1898~1903, 2006.
- 23) Thomas, M. B., Chadha, R., Iwasaki, M., Glover, K. and Abbruzzese, J. L. : The combination of bevacizumab (B) and erlotinib (E) shows significant biological activity in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 214s (abstr 4567), 2007.
- 24) Huynh, H., Nguyen, T. T., Chow, K. H., Tan, P. H., Soo, K. C. and Tran, E. : Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma : Its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol.*, 3 : 19, 2003.
- 25) Strumberg, D., Richly, H., Hilger, R. A., Schleucher, N., Korfee, S., Tewes, M., Faghii, M., Brendel, E., Voliotis, D., Haase, C. G., Schwartz, B., Awada, A., Voigtmann, R., Scheulen, M. E. and Seeber, S. : Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 23 : 965~972, 2005.
- 26) Abou-Alfa, G. K., Schwartz, L., Ricci, S., Amadori, D., Santoro, A., Figier, A., De Greve, J., Douillard, J. Y., Lathia, C., Schwartz, B., Taylor, I., Moscovici, M. and Saltz, L. B. : Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24 : 4293~4300, 2006.
- 27) Furuse, J., Ishii, H., Nakachi, K., Suzuki, E., Shimizu, S. and Nakajima, K. : Phase I study of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, 99 : 159~165, 2008.
- 28) Zhu, A. X., Sahani, D. V., di Tomaso, E., Duda, D., Sindhvani, V., Yoon, S. S., Blaszkowsky, L. S., Clark, J. W., Ryan, D. P. and Jain, R. K. : A phase II study of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 231s (abstr 4637), 2007.
- 29) Faivre, S. J., Raymond, E., Douillard, J., Boucher, E., Lim, H. Y., Kim, J. S., Lanzalone, S., Lechuga, M. J., Sherman, L. and Cheng, A. : Assessment of safety and drug-induced tumor necrosis with sunitinib in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 149s (abstr 3546), 2007.
- 30) Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Raoul, J., Zeuzem, S., Poulin-Costello, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J., For the SHARP Investigators Study Group : Randomized phase III trial of sorafenib versus placebo in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J. Clin. Oncol.* 2007 Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 25 : 962s (abstr LBA1), 2007.

## ● 総 説 ●

# [シリーズ: 疾患と組織適合性]

## 第 1 回

### HLA 分子による癌特異抗原の提示を 利用した癌免疫療法の開発

千住 覚, 西村 泰治

熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野

キーワード: 癌特異抗原, Glypican-3 (GPC3), 肝細胞癌 (HCC), 癌免疫療法, ペプチドワクチン, 腫瘍マーカー, ES 細胞, 樹状細胞, ES-DC, 細胞ワクチン

## はじめに

癌細胞にのみ発現する抗原を免疫することにより、癌細胞を攻撃して破壊する T 細胞を誘導する免疫療法を確立するために、様々な癌抗原ワクチンの開発が試みられている。従来、正常組織に発現を認めず癌細胞に特異的に高発現する癌抗原を同定することは困難であったが、cDNA マイクロアレイ解析による癌組織と正常組織におけるゲノムワイドの遺伝子発現プロファイル解析により、癌特異抗原の同定が飛躍的に進んだ。我々は、この手法を用いて多数の癌特異抗原を同定し、これを用いた癌免疫療法の臨床試験を開始している。本稿では、肝細胞癌に高発現する新規癌胎児性抗原である Glypican-3 (GPC3) の発見と、GPC3 由来の HLA-A2 および HLA-A24 により細胞傷害性(キラー) T 細胞に提示されるペプチドを用いた、癌免疫療法の開発について紹介する。

樹状細胞は、T 細胞の活性化において必須の役割を果たしているプロフェッショナル抗原提示細胞である。そこで、生体外で培養した樹状細胞に何らかの方法で腫瘍抗原を負荷し生体に移入する細胞ワクチン療法が、抗腫瘍免疫応答を効果的に誘導する手

段として期待されている。筆者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞の供給源として胚性幹 (ES) 細胞に着目し、ES 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の開発に関する基礎研究を行っている。本稿では、マウスの腫瘍モデルを用いた、ES 細胞から分化誘導した樹状細胞 (ES-DC) による効率良い腫瘍免疫の誘導に関する研究成果、ならびに、最近開発したヒトの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する培養法について紹介する。

このような癌免疫療法の臨床応用において、どの癌抗原ペプチドあるいは、どの ES 細胞から誘導した ES-DC を、どの患者に投与するのかについて、癌患者および ES 細胞の HLA タイピングが重要であることは言うまでもない。

## 1. 肝細胞癌 (HCC) に対する免疫療法の現況

HCC の患者数は、欧米およびアジア諸国において依然として増加している。HCC は治療後も高頻度に再発を繰り返すため予後不良な癌であり、B 型および C 型肝炎と、それに引き続いて発症する肝硬変から発生する、ごく初期の癌に対する早期治療法や、

代表者連絡先 〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1  
熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野  
西村 泰治

T E L 096-373-5310  
F A X 096-373-5314  
E-mail mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれている。

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や、HCC 術後における術後化学療法は、いまだ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代より lymphokine-activated killer (LAK) cells, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いた養子免疫療法、DC ワクチン療法、 $\alpha$  フェト蛋白質由来のペプチドワクチン療法などが試みられている。また HCC において高発現する癌特異的抗原も複数報

告されており、各施設でその有用性が検討されている<sup>1)</sup>。

## 2. 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) の発見

### 1) cDNA マイクロアレイ解析による HCC 特異的な癌胎児性抗原の発見

我々は、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔博士らとの共同研究により、癌部と非癌部における cDNA マイクロアレイ解析データ<sup>2)</sup>を用いて、HCC 特異的に高発現する遺伝子として GPC3 を同定した<sup>3)</sup> (図 1A)。図に示すように、

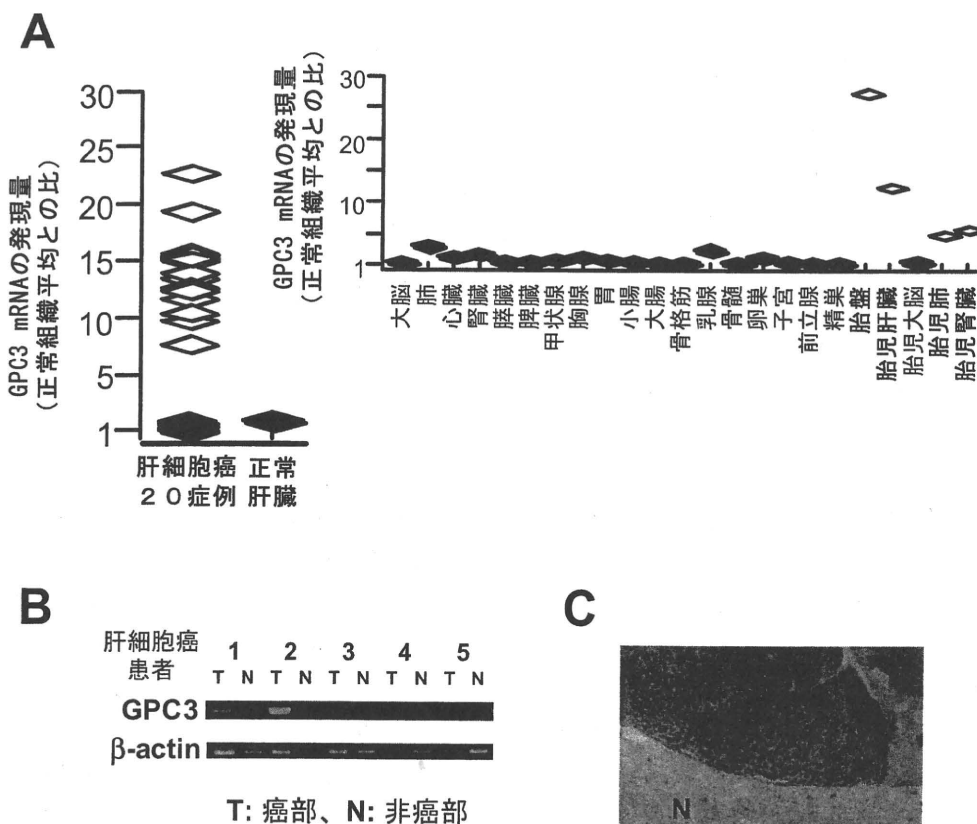


図 1 HCC20 例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ<sup>2)</sup> と HCC 組織における GPC3 mRNA および蛋白質の発現

A: HCC 患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、さらに胎生期の 4 臓器を含む 23 臓器の正常組織において、各遺伝子の発現プロフィールを解析した。GPC3 は、肝臓癌患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上(平均 396.2)で、胎盤や胎生期の肝臓および腎臓に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器に発現を認めない、癌胎児性抗原をコードする遺伝子であった。B: HCC 組織の癌部 (T) と非癌部 (N) における GPC3 mRNA の発現の有無を RT-PCR 法にて検討したところ、癌部においてのみ GPC3 の発現を認めた。C: HCC 組織切片における GPC3 蛋白質の発現を、抗 GPC3 抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。