

20114023A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチド
ワクチン療法のエビデンス創出のための臨床試験
に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中面 哲也

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 研究班構成員名簿	1
II. 平成 23 年度総括研究報告	
創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法のエビデンス創出 のための臨床試験	3
III. 分担研究報告	
1. Glypican-3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験における免疫学的および予後解析	13
2. 肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する glypican-3 ペプチドワクチンの 臨床第 II 相試験	16
3. 進行肝細胞がん患者を対象とした glypican-3 由来ペプチドワクチン療法の 免疫学的有効性を評価する臨床試験	19
4. Glypican-3 由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来 PBMC を用いたペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞クローンの樹立と解析	22
5. GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞移入療法の開発	24
6. H2-K ^b または H2-D ^b 拘束性 glypican-3 由来 CTL エピトープペプチドの同定	26
7. ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入	28
8. 卵巣明細胞腺がんに対する HLA-A24 および-A2 結合性 GPC3 由来ペプチドワクチン 療法の臨床第 II 相試験	30
9. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発	33
10. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発	35
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
V. 研究成果の刊行物・別刷	43

I. 研究班構成員名簿

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法の
エビデンス創出のための臨床試験に関する研究班（平成 23 年度）

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	国立がん研究センター東病院 臨床開発センター がん治療開発部 機能再生室	室長
研究分担者	木下 平	国立がん研究センター東病院	院長
	小菅 智男	国立がん研究センター中央病院	副院長
	小西 大	国立がん研究センター東病院	副院長
	池田 公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科	副科長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科	教授
	國土 典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科	教授
	石井 浩	がん研究会有明病院 消化器内科	副部長
	建石 良介	東京大学医学部附属病院 消化器内科	助教
	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座	教授
	河島 光彦	国立がん研究センター東病院 放射線治療科 放射線治療室	室長
	斎田 俊明	信州大学医学部 皮膚科	特任教授
	木庭 幸子	信州大学医学部附属病院 皮膚科	講師
	山崎 直也	国立がん研究センター中央病院 皮膚腫瘍科	科長
	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野	教授
	中川原 章	千葉県がんセンター	センター長
	原 純一	大阪市立総合医療センター	副院長
	真部 淳	聖路加国際病院 小児科	医長
	塩田 曜子	国立成育医療研究センター 腫瘍科	医員
	金森 豊	国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態外科部	医長
	木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科分野	准教授
	孝橋 賢一	九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学	助教
	細野 亜古	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科	医長
	吉川 史隆	名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科	教授
永井 完治	国立がん研究センター東病院 呼吸器腫瘍科	科長	
佐藤 昇志	札幌医科大学医学部 病理学第一講座	教授	
吉村 健一	京都大学医学部附属病院 探索医療センター検証部	特定助教	
研究協力者	松下 茂人	鹿児島大学大学院 皮膚科	講師
	福島 聡	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野	助教

Ⅱ. 平成 23 年度総括研究報告

創薬化を目指した glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法の
エビデンス創出のための臨床試験

研究代表者 中面 哲也 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長

研究要旨

本研究は、80%以上に glypican-3 (GPC3) が高発現している肝細胞がんを中心として、GPC3 を発現するがんを対象に GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を検証する様々な臨床試験を実施し、科学的エビデンスを創出することを目的とし、製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指して実施した結果、製薬企業への導出が実現した。

肝細胞がんを対象とした3種類の臨床試験、卵巣明細胞腺がんを対象とした臨床試験では十分な成果が得られ、また、小児がんを対象とした臨床試験もスタートすることができた。基礎研究から臨床試験へ、そしてまた基礎研究へという繰り返しが大切であるが、本研究では臨床試験の結果に基づいた基礎研究も多数実施して成果を得た。一方、陽子線治療との併用、予防ワクチンの開発を見据えたペプチド溶液のみワクチン、ソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価するランダム化比較第Ⅱ相試験、肺扁平上皮がん、悪性黒色腫を対象とした臨床試験については、実施に至らなかった。

GPC3 ペプチドワクチン臨床第Ⅰ相試験における免疫学のおよび予後解析を行い、本療法が生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠を示すことができた。肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験は、順調に症例登録が進んでおり、早急な登録完了を目指す。進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験を開始し、現在症例登録中である。

GPC3 ペプチドワクチン投与により著明な臨床効果がみられた患者末梢血中には、さまざまな functional avidity を持つ GPC3 特異的 CTL の存在が確認され、これらの CTL の中には、GPC3 を発現するがん細胞を傷害できる GPC3 特異的 CTL も存在することが明らかとなった。新規 CTL 誘導法により、多くの患者に適応できる CTL 療法が開発可能となる見込みを得た。H2-K^b または H2-D^b 拘束性 GPC3 由来エピトープペプチドとして mGPC3-1₁₂₇₋₁₃₆ (AMFKNNYPSL) を同定した。ペプチド腫瘍内注入は、将来的にペプチド特異的免疫療法の効果を増強する治療オプションとなる可能性を秘めた新戦略と考えられる。

卵巣明細胞腺がん患者においてもほぼ全例において免疫学的モニタリングにてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認でき、安全性についても確認できつつある。1 症例のみで短期間ではあるがワクチン投与中に臨床効果が得られた進行群症例が出現した。

小児がん領域での GPC3 ペプチドワクチン療法第Ⅰ相試験を開始した。今後強力な患者リクルートにより出来るだけ早期に試験を終了する。本試験の結果が期待される。

今後は、進行期の悪性黒色腫に対して KIF20A をターゲットとしたペプチドワクチンの臨床試験へとつなげていきたいと考えている。試験デザインを設定するために有用なヒストリカルデータを構築することができた。

本研究班の強力な研究体制での質の高い臨床試験の遂行による科学的エビデンスの創出により、GPC3 ペプチドワクチンの製薬企業への導出が実現した。今後創薬化が実現すれば、がん難民の減少、がん患者の生活の質 (QOL) ・予後の改善、医療費の削減など保健医療への貢献につながることが期待される。

研究分担者

木下 平	国立がん研究センター東病院 院長	池田 公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 副科長
小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 教授
小西 大	国立がん研究センター東病院 副院長	國土 典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 教授
		石井 浩	がん研究会有明病院 消化器内科 副部長

建石 良介	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教
若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
河島 光彦	国立がん研究センター東病院 放射線治療科放射線治療室 室長
齋田 俊明	信州大学医学部 皮膚科 特任教授
木庭 幸子	信州大学医学部附属病院 皮膚科 講師
山崎 直也	国立がん研究センター中央病院 皮膚腫瘍科 科長
尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 教授
中川原 章	千葉県がんセンター センター長
原 純一	大阪市立総合医療センター 副院長
真部 淳	聖路加国際病院 小児科 医長
塩田 曜子	国立成育医療研究センター 腫瘍科 医員
金森 豊	国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態外科部 医長
木下 義晶	九州大学大学院医学研究院 小児外科分野 准教授
孝橋 賢一	九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 助教
細野 亜古	国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科 医長
吉川 史隆	名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 教授
永井 完治	国立がん研究センター東病院 呼吸器腫瘍科 科長
佐藤 昇志	札幌医科大学医学部 病理学第一講座 教授
吉村 健一	京都大学医学部附属病院 探索医療センター検証部 特定助教

研究協力者

松下 茂人	鹿児島大学大学院 皮膚科 講師
福島 聡	熊本大学大学院生命科学研究部 皮膚病態治療再建学分野 助教

A. 研究目的

本研究は、80%以上に GPC3 が高発現している肝細胞がんを中心として GPC3 を発現するがんを対象に、GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を検証する様々な臨床試験を実施し、科学的エビデンスを創出することを目的としており、製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指してきたが、ついに製薬企業への導出が実現した。ペプチドワクチンは、がんの再発予防や予防においてより有効であると見込まれ、既に、肝細胞がんの根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験の症例登録が進んでおり、早期の登録完了を目指す。進行肝細胞がんを

対象とした腫瘍局所の免疫学的効果を評価する臨床試験も開始した。進行肝細胞がんを対象としたソラフェニブとペプチドワクチン療法併用の有効性を評価するランダム化比較第Ⅱ相試験は倫理審査委員会において高度医療評価制度承認が条件となったため、すぐに実施することが困難となった。

卵巣がんの第Ⅱ相試験は登録の加速化を目指す。小児がんの第Ⅰ相試験も高度医療評価制度に申請して実施することになった。肺扁平上皮がんにおいては審査が厳しい結果となり計画を練り直す。これらの様々な臨床試験を実施して GPC3 ペプチドワクチンの創薬化の実現を目指す。悪性黒色腫に関しては GPC3 以外の他の抗原での臨床試験も考える。

その一方で、ペプチドワクチン療法単独では進行がんへの効果は限定的であり、さらに強力な免疫療法あるいは様々な治療法との併用なども基礎研究で開発し、臨床応用を目指す。GPC3 ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験の結果は、がん治療薬としての可能性を十分に期待させるものであり、これらの様々な臨床試験を実施して GPC3 ペプチドワクチンの創薬化の実現を目指す。

B. 研究方法

I. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験 (中面、木下、古瀬、池田、小西、小菅、石井、國土、建石、若林、河島、佐藤、吉村)

- (1) 臨床第Ⅰ相試験の免疫学的および予後解析
- (2) 肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験の実施
- (3) 進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験の実施
- (4) 進行肝細胞がんを対象としたソラフェニブとの併用の有効性を評価するランダム化第Ⅱ相試験
- (5) 陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験

II. ペプチドワクチン療法の効果をさらに高めるための基礎研究 (中面)

- (1) GPC3 由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来 PBMC を用いたペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞クローンの樹立と解析
- (2) GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞移入療法の開発
- (3) H2-K^b または H2-D^b 拘束性 glypican-3 由来 CTL エピトープペプチドの同定
- (4) ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入

III. 卵巣明細胞腺がんに対する臨床第Ⅱ相試験 (吉川、中面)

卵巣明細胞腺がんに対する HLA-A24 および-A2 結

合性 GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験と免疫学的モニタリングの実施

IV. 各種小児がんに対する臨床試験 (中面、中川原、原、真部、塩田、木下、孝橋、金森、細野、吉村)

各種小児がんに対する HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3 (GPC3) 由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅰ相試験の実施

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発 (中面、永井)

肺の扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験のプロトコールを作成したが、倫理審査委員会で厳しい結果となったため、計画を練り直し、適切な計画書を作成して倫理審査委員会承認後に開始する。

VI. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発 (中面、斎田、木庭、山崎、尹、松下、福島)

新たな腫瘍抗原としてすでに膵癌に対するペプチドワクチンとして実績のある KIF20A に着目し、KIF20A の悪性黒色腫における発現解析を行ない、ペプチドワクチンとして有望であるかどうかを検討した。また今後実際に臨床試験を行っていく上で、難治性希少疾患である悪性黒色腫には、対照とする本邦におけるヒストリカルデータとして十分なものが存在しないことが問題となるため、進行期悪性黒色腫に対する現在の標準治療でのヒストリカルデータを作成した。

[倫理面への配慮]

本研究において、臨床試験や臨床検体を用いた研究は国立がん研究センターならびに関連する施設の倫理審査委員会に申請し承認を得た後に実施し、研究担当者は、ヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。患者に対しては倫理審査委員会で承認された説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認している。また、患者のプライバシー保護には最大の努力を払っている。

さらに動物実験に際しては、各施設の動物実験指針を遵守し、動物愛護にも留意して研究を遂行するよう努めている。

C. 研究結果

I. 肝細胞がんに対するGlypican-3ペプチドワクチンの臨床試験

(1) 臨床第Ⅰ相試験の免疫学的および予後解析

GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 以上 (N=15) または 50 未満 (N=18) の 2 群に分けて検討したところ、臨床背景因子に関しては、2 群間に有意差を認めるものはなく、ワクチン使用量 ($\geq 1\text{mg}$

vs $< 1\text{mg}$) のみで有意な差 ($p=0.004$) を認めた。さらに生存期間中央値では、GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 以上群は 12.2 ヶ月、50 未満群は 8.5 ヶ月と有意な差 ($p=0.033$) を認めた。これらは、ワクチンにより CTL が誘導された患者は、生存期間の延長が期待できるという結果であった。

(2) 肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験の実施

順調に症例登録が進んでおり、本年度中に登録予定症例の 40 例の登録完了が見込まれる。

参考値として、ワクチン投与後 1 年経過した 22 例の 1 年再発率は 22.7%、コントロール設定とした国立がん研究センター東病院初回切除症例 80 例の 1 年再発率は 42.2%となっている。

(3) 進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験の実施

顕著な抗腫瘍効果をきたした肝細胞がんの 1 症例を経験した。高度進行症例にも関わらず、わずか 2 回のワクチン投与により肝内の多発病変のほとんどが壊死に陥った。しかし、顕著な抗腫瘍効果とともに急性炎症反応、肝機能障害をきたしており、その後肝機能は改善したものの 2 回目のワクチン投与から 1 カ月後に死亡されたため、病理解剖を施行した。その結果、肝内のほとんどの腫瘍は壊死に陥った一方、下大静脈内腫瘍栓は著明に増大し、腫瘍栓の増大による循環不全死と診断された。

(4) 進行肝細胞がんを対象としたソラフェニブとの併用の有効性を評価するランダム化第Ⅱ相試験

倫理審査委員会において、高度医療評価制度に承認されるまで実施してはいけないとの判断を下されたため、企業も含めて研究者間で実施について再検討を行った結果、本臨床試験は実施しないことになった。

(5) 陽子線治療と GPC3 ペプチドワクチン併用の再発予防効果を検討する臨床第Ⅱ相試験

同じく、倫理審査委員会において、高度医療評価制度に承認されるまで実施してはいけないとの判断を下されたため、研究者間で実施について再検討を行った結果、本臨床試験の実施は保留となった。

II. ペプチドワクチン療法の効果をさらに高めるための基礎研究

(1) GPC3 由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来 PBMC を用いたペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞クローンの樹立と解析

GPC3 ペプチドワクチン投与により著明な臨床効果がみられた HLA-A*02:07 の患者末梢血単核球から GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立した。さまざまな functional avidity を持つ GPC3 特異的 CTL の存在が確認され、これらの CTL の中には、GPC3

を発現するがん細胞を傷害できる GPC3 特異的 CTL も存在することが明らかとなった。

(2) GPC3 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞移入療法の開発

GPC3 ペプチドワクチン投与患者 7 名 11 検体の少量の PBMC (2×10^6 個) から GPC3 ペプチド特異的 CTL が誘導可能である (1.8×10^5 個 $\sim 6.1 \times 10^7$ 個, 増加率: 490 倍 $\sim 170,000$ 倍) ことが確認された。健康人 PBMC を使用し、CMV ペプチド特異的 CTL の誘導に関して条件検討を行った結果、本培養法に CD2/CD3/CD28 マイクロビーズの刺激を加えることで、CMV ペプチド特異的 CTL 数はこれまでより 2 倍以上増加し、さらに分化段階の若いナイーブやセントラルメモリーの細胞が多く誘導された。また、Day7 で CD8⁺細胞を単離して培養を続けることで、培地使用量は約 4 分の 1 でこれまでと同数の CMV ペプチド特異的 CTL が誘導された。

(3) H2-K^b または H2-D^b 拘束性 glypican-3 由来 CTL エピトープペプチドの同定

H2-K^b または H2-D^b 拘束性 GPC3 由来エピトープペプチドとして mGPC3-₁₁₂₇₋₁₃₆ (AMFKNNYPSL) を同定した。

(4) ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入

免疫不全マウスに接種したがん細胞株の皮下腫瘍に GPC3 あるいは CMV ペプチド溶液の腫瘍内注入を行い、その後摘出して採取した腫瘍細胞をターゲットに ELISPOT 法を行い、腫瘍を穿刺して内部に注入したペプチドががん細胞表面上の HLA class I 上に載ることが確認され、ペプチド注入後に CTL も注入することで腫瘍増殖抑制効果が確認された。

C57BL/6 マウスを用いたペプチドワクチンモデルおよび CTL 移入療法モデルでは、ペプチド腫瘍内注入群の腫瘍増殖抑制効果と生存延長効果が示された。さらに、治療したものは別の腫瘍に対する抗原 spreading の効果も観察された。

III. 卵巣明細胞腺がんに対する臨床第 II 相試験

ペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者における Ex vivo IFN γ ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにて、17 症例中 16 症例 (寛解群 11 例、化学療法併用群 1 例および進行群 4 例) において、ワクチン投与前に比べワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認できた。寛解群 (ワクチン投与計 10 回のプロトコール終了 7 例およびワクチン投与中 6 例) の平均観察期間は 7.6 か月とまだ短いものの、全例において再発は認められていない。進行群 5 例中 1 例で、治療開始 3 か月時点で PR の臨床効果 (肝転移、傍大動脈および右外腸骨リンパ節転移の縮小あり、新規病変なし) を認めた。また、この症例を

含み進行群 5 例中 3 例で、ワクチン投与前に比べ腫瘍マーカーの低下がみられた。

HLA-A*24:02 陽性であった進行群患者 2 名のワクチン投与後 PBMC から、GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンがそれぞれ 12 個および 10 個樹立された。

IV. 各種小児がんに対する臨床試験

国立がん研究センターの他に大阪市立総合医療センター、聖路加国際病院の倫理審査委員会で承認され、今年度、試験を開始した。現在は臨床試験参加希望者の腫瘍末染色標本に対して GPC3 免疫染色を施行し適格患者リクルートを行っている。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

術後再発肺扁平上皮がん患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験の研究計画書を作成し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請したが、厳しい結果となったため、計画を練り直し、適切な計画書を作成する必要がある。今後は、術後再発予防効果を期待する肺扁平上皮がん切除患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第 II 相試験の計画を検討している。

VI. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

解析したすべての悪性黒色腫の細胞株において KIF20A の mRNA 並びにタンパク質の発現を確認できた。患者検体を用いた免疫染色による解析では、悪性黒色腫は 24/38 (63%)、転移性悪性黒色腫 6/9 (67%) にて陽性であったのに対し色素性母斑では 3/26 (12%) であった。なお、stage 別、病型別いずれにおいても同じような割合で KIF20A の発現が確認された。

2000 年から 2007 年の間に当研究班の施設に受診した時点ですでに stage IV だった患者は 26 人 (男性 14 人、女性 12 人) で、初診時は stage III 以下で、標準治療を受けるも、再発転移を来し stage IV となった患者は 16 人 (男性 6 人、女性 10 人) であった。両患者群の年齢性別に有意差はなかった。初診時 stage IV だった患者の全生存期間は 335 日 ± 397 日、無増悪生存期間は、190 日 ± 214 日であった。一方、標準治療後に stage IV となった患者の全生存期間は 439 日 ± 367 日、無増悪再発期間は 216 日 ± 317 日であり、両群に有意差は認めなかった。

D. 考察

I. 肝細胞がんに対する Glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験

第 I 相試験において、末梢血中 GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度が、有意な生命予後因子であることを示したことは、ペプチドワクチン療法が、安全性

だけでなく生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠となりうる。再発予防を目指した第Ⅱ相試験においては、早期登録完了を目指す。進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験においては、貴重な症例を経験した。早急に症例登録を完了し、本臨床試験での免疫学的エビデンスを得ることを目指す。GPC3 ペプチドは、製薬企業の導出が実現され、今後企業治験での実施も見込まれる。

Ⅱ. ペプチドワクチン療法の効果をさらに高めるための基礎研究

ペプチドワクチンによって腫瘍内に浸潤した CD8 陽性細胞が GPC3 特異的 CTL であるかの確認が今後の課題である。

これまで *in vitro* での GPC3 ペプチド特異的 CTL の誘導は困難であったが、今回用いたワクチン投与後の患者 PBMC からは、比較的容易に誘導可能であり、GPC3 ペプチドワクチンと CTL 療法を組み合わせた治療により、多くの患者に適応可能になると考えられた。

C57BL/6 マウスと同じバックグラウンドを持つ肝がん自然発症モデルマウスを用いれば、肝がんの発症予防効果に対する前臨床研究が実施できる。また、C57BL/6 マウスを用いた、GPC3 を標的とする免疫療法と他の療法(化学療法、放射線療法等)の併用効果を検証する研究も今後実施してみたい。

ペプチドを腫瘍内に注入することで、がん細胞表面上の HLA class I 上に提示されるペプチドの密度が増加し、がん細胞がペプチド特異的 CTL に殺傷されやすくなることが示された。さらに、ペプチド腫瘍内注入により全身の免疫反応が活性化され、ペプチドを注入しない腫瘍に対しても抗原 spreading に伴う抗腫瘍効果が生じることが確認された。

Ⅲ. 卵巣明細胞腺がんに対する臨床第Ⅱ相試験

卵巣明細胞腺がん患者においても安全性および免疫学的有効性が確認できつつある。1 例のみではあるが、卵巣がんの標準的化学療法レジメンである TC 療法と GPC3 ワクチン療法との併用症例においても GPC3 特異的 CTL が誘導された結果が確認できており、他のレジメンを含めさらなる症例の蓄積および検証が望まれる。基礎研究では、軽度の増殖抑制はおこすもののアポトーシスはきたさない程度の subtoxic な用量であっても、抗がん剤による前治療を併用することで CTL による細胞傷害効果の上乗せがみられる細胞傷害性試験の結果を得ていることから、臨床試験を通して併用によって有効性が期待できる抗がん剤の種類やその機序を解析していきたい。

Ⅳ. 各種小児がんに対する臨床試験

小児がんにおける多施設 GPC3 ペプチドワクチン

療法の臨床試験の実施体制を整え、参加施設における倫理委員会の承認を得られたため、試験を開始することが出来た。しかし、GPC3 は肝芽腫、胚細胞性腫瘍などの一部の小児がんには免疫染色の陽性率は高いものの、全体の小児がんでは陽性率は低く、本臨床試験への適格症例は限られている。今後参加施設以外の小児がん治療施設への周知、患者会への情報提供を通し、強力な患者リクルートが必要である。

Ⅴ. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

今後、肺扁平上皮がん切除患者の再発予防効果を検討する GPC3 由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験を計画したいと考えている。

Ⅵ. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

GPC3 ペプチド特異的 CTL は GPC3 発現量の少ない悪性黒色腫細胞株に対しても弱いながらも反応することが示されたが、これまでの検討結果では積極的に GPC3 ペプチドワクチン単独での臨床試験への展開には進みにくいと考えてきた。今回の結果に基づき、KIF20A を標的としたペプチドワクチン療法の臨床試験を今後検討してみたいと考えている。その際に、今回解析したヒストリカル・コントロールのデータは参考になると考えられる。

Ⅶ. 結論

GPC3 ペプチドワクチン臨床第Ⅰ相試験における免疫学的および予後解析を行い、本療法が生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠を示すことができた。肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験は、順調に症例登録が進んでおり、早急な登録完了を目指す。進行肝細胞がん患者を対象とした腫瘍局所での免疫学的有効性を評価する臨床試験を開始し、現在症例登録中である。

GPC3 ペプチドワクチン投与により著明な臨床効果がみられた患者末梢血中には、さまざまな functional avidity を持つ GPC3 特異的 CTL の存在が確認され、これらの CTL の中には、GPC3 を発現するがん細胞を傷害できる GPC3 特異的 CTL も存在することが明らかとなった。新規 CTL 誘導法により、多くの患者に適応できる CTL 療法が開発可能となる見込みを得た。H2-K^b または H2-D^b 拘束性 GPC3 由来エピトープペプチドとして mGPC3-1₁₂₇₋₁₃₆ (AMFKNNYPSL) を同定した。ペプチド腫瘍内注入は、将来的にペプチド特異的免疫療法の効果を増強する治療オプションとなる可能性を秘めた新戦略と考えられる。

卵巣明細胞腺がん患者においてもほぼ全例にお

いて免疫学的モニタリングにてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認でき、安全性についても確認できつつある。1 症例のみで短期間ではあるがワクチン投与中に臨床効果が得られた進行群症例が出現した。

小児がん領域での GPC3 ペプチドワクチン療法第 I 相試験を開始した。今後強力な患者リクルートにより出来るだけ早期に試験を終了する。本試験の結果が期待される。

今後は、進行期の悪性黒色腫に対して KIF20A をターゲットとしたペプチドワクチンの臨床試験へとつなげていきたいと考えている。試験デザインを設定するために有用なヒストリカルデータを構築することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* 102(5):918-25, 2011.
- 2) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirosawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102(9):1622-1629, 2011.
- 3) Nakatsugawa M, Horie K, Yoshikawa T, Shimomura M, Kikuchi Y, Sakemura N, Suzuki S, Nobuoka D, Hirohashi Y, Torigoe T, Harada K, Takasu H, Sato N, Nakatsura T. Identification of an HLA-A *0201-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from the lung carcinoma antigen, Lengsin. *Int J Oncol.* 39(4):1041-1049, 2011.
- 4) Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, Ishii H, Furuse J, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Komori H, Baba H, Fujiwara T, Nakatsura T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol.* 40(1):63-70, 2012.
- 5) Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shirakawa H, Kuronuma T, Motomura Y, Mizuno S, Ishii H, Nakachi K, Konishi M, Nakagori T, Takahashi S, Gotoda N, Takayama T, Yamao K, Uesaka K, Furuse J, Kinoshita T, Nakatsura T. Phase I trial of glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma showed immunological evidence and potential for improving overall survival. *Clin. Cancer Res.* in press, 2012.
- 6) Kudo M, Imanaka K, Chida N, Nakachi K, Tak WY, Takayama T, Yoon JH, Hori T, Kumada H, Hayashi N, Kaneko S, Tsubouchi H, Suh DJ, Furuse J, Okusaka T, Tanaka K, Matsui O, Wada M, Yamaguchi I, Ohya T, Meinhardt G, Okita K. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer.* 47(14):2117-27, 2011.
- 7) Iwasa S, Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Nakachi K, Mitsunaga S, Kondo S, Hagihara A, Shimizu S, Satake M, Arai Y. Transcatheter Arterial Infusion Chemotherapy with a Fine-powder Formulation of Cisplatin for Advanced Hepatocellular Carcinoma Refractory to Transcatheter Arterial Chemoembolization. *Jpn J Clin Oncol.* 41(6):770-5, 2011.
- 8) Suzuki E, Furuse J, Ikeda M, Ishii H, Okusaka T, Nakachi K, Mitsunaga S, Ueno H, Morizane C. A Phase I/II Study of Combined Chemotherapy with Mitoxantrone and Uracil/Tegafur for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 41(3):328-33, 2011.
- 9) Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M, Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, Honda M, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K. A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs.* (Epub ahead of print)
- 10) Kawashima M, Kohno R, Nakachi K, Nishio T, Mitsunaga S, Ikeda M, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Arahira S, Zenda S, Ogino T, Kinoshita T. Dose-volume histogram analysis of the safety of proton beam therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 79(5):1479-1486, 2011.
- 11) Kajiyama H, Shibata K, Mizuno M, Nawa A, Mizuno K, Matsuzawa K, Kawai M, Hosono S, Nagasaka T, Kikkawa F. Fertility-sparing surgery

- in young women with mucinous adenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol.* 122(2):334-338, 2011.
- 12) Hirose T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8⁺ cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.* 102(7):1281-1286, 2011.
- 13) Higashi M, Kajiyama H, Shibata K, Mizuno M, Mizuno K, Hosono S, Kawai M, Nakanishi T, Nagasaka T, Kikkawa F. Survival impact of capsule rupture in stage I clear cell carcinoma of the ovary in comparison with other histological types. *Gynecol Oncol.* 123(3):474-478, 2011.
- 14) Kajiyama H, Shibata S, Suzuki S, Ino K, Kawai M, Nagasaka T, Nawa A, Kikkawa F. Survival impact of adjuvant paclitaxel and carboplatin for early stage ovarian clear-cell carcinoma with complete surgical staging. *Gynecol Obstet Invest.* 72(4):252-6, 2011.
- 15) Hosono S, Kajiyama H, Mizuno K, Sakakibara K, Matsuzawa K, Takeda A, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Comparison between serous and non-serous ovarian cancer as a prognostic factor in advanced epithelial ovarian carcinoma after primary debulking surgery. *Int J Clin Oncol.* 16(5):524-32, 2011.
- 16) Sekiya, R, Kajiyama, H, Sakai K, Umezumi T, Mizuno M, Shibata K, Yamamoto E, Fujiwara S, Nagasaka N, Kikkawa F. Expression of CXCR4 Indicates Poor Prognosis in Patients with Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Hum Pathol.* (Epub ahead of print)
- 17) Kajiyama H, Shibata K, Mizuno M, Umezumi T, Suzuki S, Nawa A, Kawai M, Nagasaka T, Kikkawa F. Long-term survival of young women receiving fertility-sparing surgery for ovarian cancer in comparison with those undergoing radical surgery. *Brit J Cancer.* 105(9):1288-1294, 2011.
- 18) Kajiyama H, Shibata K, Mizuno M, Hosono S, Kawai K, Nagasaka T, Kikkawa F. Fertility-sparing surgery in patients with clear-cell carcinoma of the ovary: is it possible? *Hum Reprod.* 26(12):3297-302, 2011.
- 19) Mitsui H, Shibata K, Suzuki S, Umezumi T, Mizuno M, Kajiyama H, Kikkawa F. Functional interaction between peritoneal mesothelial cells and stem cells of ovarian yolk sac tumor in peritoneal dissemination. *Gynecol Oncol.* 124(2):303-10, 2011.
- 20) Maeda O, Shibata K, Hosono S, Fujiwara S, Kajiyama H, Ino K, Nawa A, Tamakoshi K, Kikkawa F. Spectrin α II and β II tetramers contribute to platinum anticancer drug resistance in ovarian serous adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 130(1):113-121, 2012.
- 21) 中面哲也, 国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み (第7回DIA日本年会 グローバル開発における日本の役割・日本の貢献 大学・研究機関・企業での臨床試験の実際)、*臨床医薬* 27(5):313-321, 2011.
- 22) 中面哲也, 澤田雄、水野正一、肝臓の個別化医療—ワクチン・免疫療法を中心に— (特集: 癌個別化医療はどこまですすんだのか)、*臨床雑誌「外科」* 73(10):1062-1068, 2011.
- 23) 澤田雄、中面哲也、ペプチドワクチンを用いた免疫療法 glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン療法 (特集: 進化するがん免疫療法 (ワクチン療法、細胞療法、抗体療法))、*腫瘍内科* 8(5):417-424, 2011.
- 24) 中面哲也、第9章 がん治療の新たな展開 治療法・治療装置の進歩 4. ペプチドワクチン療法、(先端医療シリーズ42) 消化器疾患の最新医療、先端医療技術研究所、p164-167, 2011.
- 25) 古瀬純司、北村浩、廣川智、高須充子、長島文夫、肝細胞がんに対する分子標的治療の現況、*最新医学* 66(8):89-94, 2011.
- 26) 古瀬純司、北村浩、廣川智、高須充子、長島文夫、肝細胞癌の全身化学療法の進歩と治療成績—殺細胞性薬剤を中心に、*肝胆膵画像* 13(6):587-592, 2011.
- 27) 池田公史、肝臓の分子標的治療 ソラフェニブの副作用対策 (手足症候群・下痢・高血圧)、*医学のあゆみ* 236(7):711-715, 2011.
- 28) 木庭幸子、悪性黒色腫: 進行期悪性黒色腫の治療 3) 免疫療法、一冊でわかる皮膚がん (齋田俊明編) 文光堂、p251-253, 2011.
- 29) 木庭幸子、悪性黒色腫: 進行期悪性黒色腫の治療 コラム) 免疫制御機構と克服への取り組み、一冊でわかる皮膚がん (齋田俊明編) 文光堂、p255-257, 2011.

- 30) 山崎直也、分子標的治療に伴う皮膚症状に対する治療、がん看護 16:28-32, 2011.
- 31) 福島聡、尹浩信、西村泰治、千住覚、多能性幹細胞から誘導した樹状細胞によるがん免疫療法、日本臨床免疫学会会誌 34(3):113-120, 2011.
- 32) 本多教稔、青井淳、伊良波真子、原田美穂、福島聡、井上雄二、尹浩信、末端黒子型balloon cell melanomaの1例、臨床皮膚科 66(1):57-61, 2012.
- 33) 宮下梓、増口信一、福島聡、井上雄二、石原剛、松尾敦子、城野昌義、尹浩信、巨大有茎性amelanotic melanomaの1例、臨床皮膚科 65(10):811-815, 2011.
- ## 2. 学会発表
- 1) Establishment of high avidity CTL clones induced by HLA-A2 restricted glypican-3 (GPC3) peptide vaccine. Yoshikawa Toshiwaki, Suzuki Shiro, Nakatsugawa Munehide, Shirakawa Hirofumi, Nobuoka Daisuke, Sakemura Noriko, Motomura Yutaka, Nakatsura Tetsuya. AACR 102nd Annual Meeting 2011 (Orlando), Apr.2-6,2011.
- 2) GPC3ペプチドワクチンに誘導された末梢血単核球50万個中のGPC3ペプチド特異的T細胞の最大頻度50以上は有意な生命予後因子である、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第15回日本がん免疫学会総会(大阪)、2011年6月30日～7月1日
- 3) ゴレドロン酸を使用したペプチド特異的CTLの大量培養法の検討、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、多田好孝、岩間達章、藤浪紀洋、小林裕太、本吉正、増田昌子、須貝詩織、贅田美江、前川隆司、中面哲也 第15回日本がん免疫学会総会(大阪)、2011年6月30日～7月1日
- 4) 抗原特異的免疫療法の効果増強を目指した基礎研究：ペプチド腫瘍内注入、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、岩間達章、堀江和峰、下村真菜美、鈴木史朗、酒村智子、中津川宗秀、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也 第15回日本がん免疫学会総会(大阪)、2011年6月30日～7月1日
- 5) 卵巣明細胞腺がんにおけるGlypican-3ペプチドワクチン療法の基礎的検討、鈴木史朗、柴田清住、山田英里、関谷龍一郎、松村寛子、堀尾麻衣子、梅津朋和、水野美香、梶山広明、那波明宏、吉川聡明、中面哲也、吉川史隆 第50回日本婦人科腫瘍学会学術講演会(札幌)、2011年7月22日～24日
- 6) The increase of Glypican-3 peptide-specific CTLs after vaccination as a prognostic factor for clinical trial of glypican-3-derived peptide vaccine. 澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、齊藤桂吾、水野正一、中面哲也 東京理科大学がん基盤科学技術研究センター国際会議(東京)、2011年9月1日～2日
- 7) Large scale expansion of Glypican-3 (GPC3) peptide specific Cytotoxic T Lymphocytes for adoptive immunotherapy. 吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贅田美江、前川隆司、中面哲也 東京理科大学がん基盤科学技術研究センター国際会議(東京)、2011年9月1日～2日
- 8) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立、多田好孝、吉川聡明、下村真菜美、白川博文、信岡大輔、澤田雄、中面哲也 第39回日本臨床免疫学会総会(東京)、2011年9月15日～17日
- 9) Glypican-3ペプチド特異的CTLの大量培養法の検討、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贅田美江、前川隆司、中面哲也 第39回日本臨床免疫学会総会(東京)、2011年9月15日～17日
- 10) プロテオミクス解析による肝細胞がん細胞表面に高頻度に存在するペプチド同定、齊藤桂吾、信岡大輔、下村真菜美、吉川聡明、澤田雄、水野正一、中面哲也 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会(名古屋)、2011年10月2日
- 11) 進行肝細胞がんにおけるGlypican-3由来ペプチドワクチン療法の予後因子-末梢血中GPC3ペプチド特異的T細胞頻度-、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会(名古屋)、2011年10月2日
- 12) ゴレドロン酸を使用したペプチド特異的CTLの大量培養法の検討、吉川聡明、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、前川隆司、中面哲也 第70回日本癌学会学術総会(名古屋)、2011年10月3日～5日
- 13) 卵巣明細胞腺がんに対するGPC3由来ペプチドワクチン療法の可能性、鈴木史朗、吉川聡明、廣澤友也、柴田清住、吉川史隆、中面哲也 第70回日本癌学会学術総会(名古屋)、2011年10月3日～5日
- 14) ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入、信岡大輔、吉川聡明、

高橋真理、岩間達章、堀江和峰、下村真菜美、鈴木史朗、酒村智子、中津川宗秀、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）、2011年10月3日～5日

- 15) 婦人科癌に対する特異的癌免疫療法—明細胞腺癌を対象としたGPC3特異的ペプチドワクチン療法の第I, II相臨床試験、柴田清住、鈴木史朗、廣澤友也、梶山広明、梅津朋和、中面哲也、吉川史隆 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）、2011年10月3日～5日
- 16) HLA多型に基づく、がん免疫療法・個別化医療の臨床応用、西村泰治、中面哲也、富田雄介、中村祐輔、千住覚 第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会共同大会（千葉）、2011年11月9日～12日
- 17) T細胞移入療法を目指したGlypican-3ペプチド特異的CTLの大量培養法の検討、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贄田美江、前川隆司、中面哲也 第40回日本免疫学会学術集会（千葉）、2011年11月27日～29日
- 18) Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来PBMCを用いたペプチド特異的細胞傷害性T細胞クローンの樹立、多田好孝、吉川聡明、下村真菜美、白川博文、信岡大輔、澤田雄、中面哲也 第40回日本免疫学会学術集会（千葉）、2011年11月27日～29日
- 19) Identification of H2-K^b or -D^b restricted and glypican-3-derived CTL epitope peptide、岩間達章、堀江和峰、吉川聡明、信岡大輔、下村真菜美、中面哲也 第40回日本免疫学会学術集会（千葉）、2011年11月27日～29日
- 20) glypican-3由来がんペプチドワクチン療法における多施設共同研究の現状と展望、中面哲也、吉川聡明、澤田雄、信岡大輔、水野正一、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人、光永修一、池田公史、鈴木史朗、柴田清住、吉川史隆、細野亜古、原純一、真部淳、塩田曜子、木下義晶、孝橋賢一 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（和歌山）、2011年12月1日～2日
- 21) ペプチド特異的免疫療法の効果増強を目指したペプチド腫瘍内注入、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、岩間達章、堀江和峰、下村真菜美、鈴木史朗、酒村智子、中津川宗秀、澤田雄、八木孝仁、藤原俊義、中面哲也 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（和歌山）、2011年12月1日～2日
- 22) 細胞療法の実現化に向けたゾレドロン酸を使

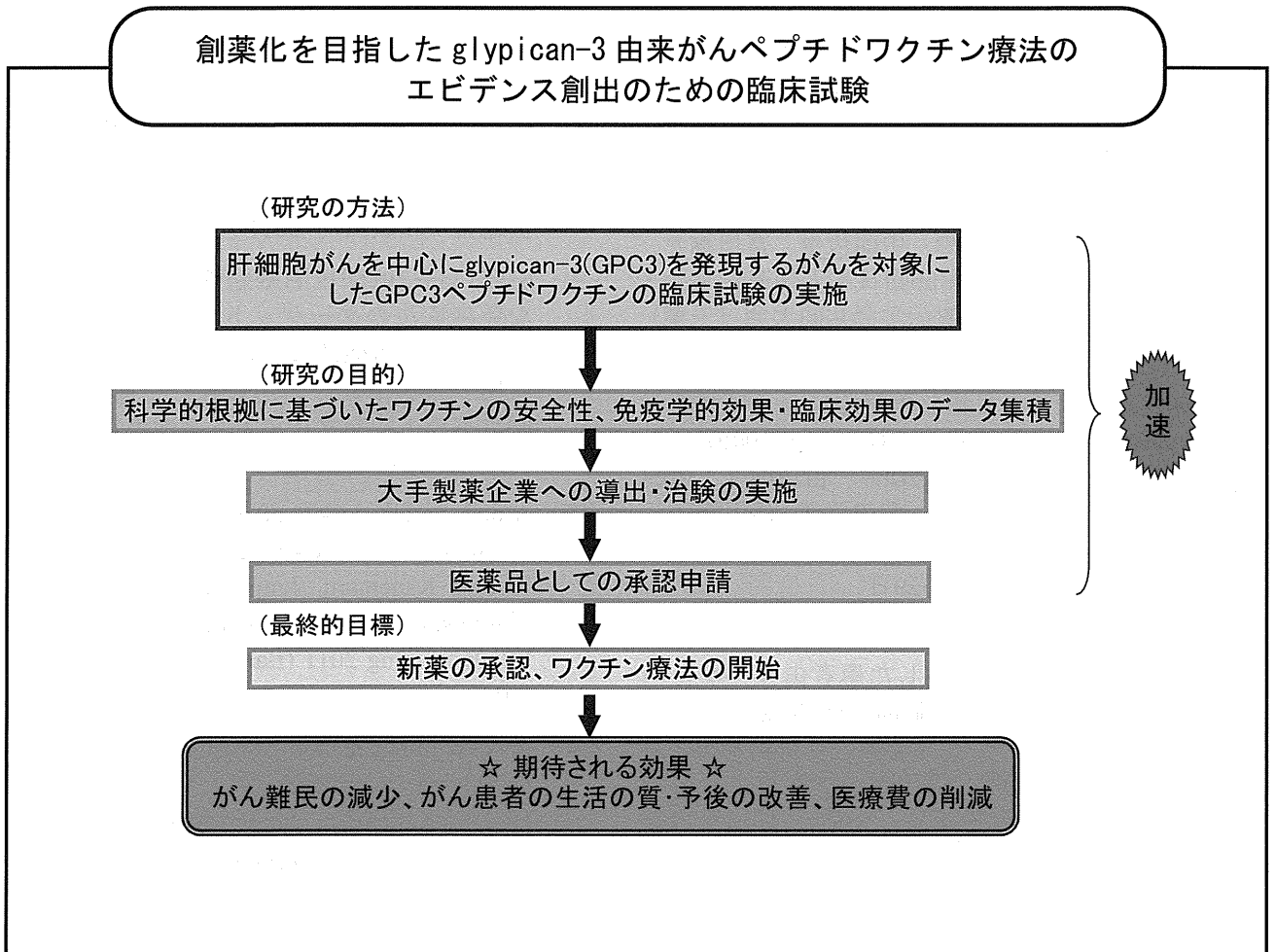
用したGlypican-3(GPC3)ペプチド特異的CTLの大量培養法の開発、吉川聡明、高原将司、富山舞、黒田あゆみ、白川博文、信岡大輔、澤田雄、酒村智子、贄田美江、前川隆司、中面哲也 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（和歌山）、2011年12月1日～2日

- 23) GPC3ペプチドワクチン投与後、顕著な抗腫瘍効果とともに急性炎症反応、肝機能障害をきたした肝細胞がんの1例、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（和歌山）、2011年12月1日～2日
- 24) Glypican-3は卵巣明細胞腺がんに対して有効な免疫療法のターゲットとなりうる～抗癌剤併用療法の可能性について～、鈴木史朗、吉川聡明、柴田清住、吉川史隆、中面哲也 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会（和歌山）、2011年12月1日～2日
- 25) A new tumor marker of malignant melanoma, the circulating microRNA-221. Satoshi Fukushima, Hisashi Kanemaru, Junji Yamashita, Yuji Inoue, Masatoshi Jinnin, Hironobu Ihn. 41st Annual ESDR meeting 2011 (Barcelona, Spain), Sep.7-10, 2011.
- 26) A novel tumor marker of malignant melanoma, the circulating microRNA-221. Satoshi Fukushima, Hisashi Kanemaru, Junji Yamashita, Yuji Inoue, Masatoshi Jinnin, Hironobu Ihn. The 36th Annual meeting of the JSID 2011 (Kyoto), Dec.9-11, 2011.
- 27) 悪性黒色腫の新規血清マーカーとしてのmicroRNA-221、福島聡、金丸央、神人正寿、増口信一、井上雄二、尹浩信 第27回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会（東京）、2011年6月3～4日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究の概要図



Ⅲ. 分担研究報告

Glypican-3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験における免疫学のおよび予後解析

研究代表者 中面 哲也 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長
研究分担者 木下 平 国立がん研究センター東病院 院長
小西 大 国立がん研究センター東病院 副院長
古瀬 純司 杏林大学医学部 腫瘍内科 教授
石井 浩 がん研究会有明病院 消化器内科 副部長
河島 光彦 国立がん研究センター東病院 放射線治療科放射線治療室 室長

研究要旨

我々は国立がん研究センター東病院において、進行肝細胞がんを対象とした glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を実施し、その安全性と臨床効果を報告してきた。今回、臨床第 I 相試験における全登録患者の免疫学的解析および予後調査を施行し、免疫学的効果と生存期間についての統計学的な解析を行った。GPC3 ペプチドワクチンの投与後、33 例中 30 例 (91%) において末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 cytotoxic T-lymphocyte (CTL) の検出が、*Ex vivo* IFN- γ ELISPOT 解析で可能であった。腫瘍生検組織の免疫組織化学的染色により、7 例中 5 例で、腫瘍に浸潤する CD8 陽性 T 細胞が、ワクチン投与後に増加していることを確認した。また末梢血中 GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度と生存期間について統計学的な解析を行い、GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度が本療法の有意な生命予後因子であることを示した。末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度で患者を 2 群に分けて検討したところ、臨床背景因子に 2 群間に有意差を認めるものではなく、GPC3 ペプチド特異的 CTL 高頻度群で有意に生存期間が延長していた。これらは、ワクチンにより CTL が誘導された患者は、生存期間の延長が期待できるという結果であった。現在 GPC3 ペプチドは製薬企業への導出が実現され、今後は企業治験での実施も見込まれる。

A. 研究目的

我々は肝細胞がんのがん胎児性抗原 GPC3 を同定しその有用性を報告してきた。基礎研究の成果を基に、国立がん研究センター東病院において進行肝細胞がん患者を対象にした GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施し、その安全性と臨床効果を報告してきた。今回、臨床第 I 相試験における登録患者の免疫学的解析および予後調査を施行し、本療法が、安全性や RECIST 判定による抗腫瘍効果だけでなく、免疫学的効果、生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠を示すことを目的とした。本療法の proof of concept (POC) であるペプチドワクチン投与後に血液中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が増えるかどうか、さらにその CTL が実際がんの組織の中に浸潤するかどうかに関して、免疫学的な解析を施行する。またこれらの免疫学的効果と生存期間についての解析結果を示すことにより、製薬企業への導出、企業治験の実施、医薬品としての承認申請までの道のりを一気に短縮することを目指している。

B. 研究方法

臨床第 I 相試験の免疫学のおよび予後解析

対象は GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験においてペプチドワクチンを投与された全患者 33 例とした。免疫学的有効性の評価の指標としては、ワクチン投与前後での *Ex vivo* IFN- γ ELISPOT 解析により得られた末梢血単核球 50 万個中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度を用いた。また十分なインフォームドコンセントのもと 7 名の患者に、ワクチン投与後の治療効果の評価目的に腫瘍生検を実施されたが、免疫組織化学的染色によって CD8 陽性 T 細胞の浸潤を評価した。

また末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の生命予後に対する効果を検討するため、*Ex vivo* IFN- γ ELISPOT 解析により得られた末梢血単核球 50 万個中の GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度と全生存期間との関連について、統計学的な解析を行った。

[倫理面への配慮]

本研究において、臨床試験や臨床検体を用いた研究は国立がん研究センターならびに関連する施設の倫理審査委員会に申請し承認を得た後に実施し、研究担当者は、ヘルシンキ宣言に従い臨床研究を実施している。患者に対しては倫理審査委員会で承認された説明文書を用いて説明し、自筆の同意書にて同意を確認している。また、患者のプ

ライバシー保護には最大の努力を払っている。

C. 研究結果

本臨床試験参加 33 例の全生存期間中央値は 9.0 ヶ月であった。Ex vivo IFN- γ ELISPOT 解析では、GPC3 ペプチドワクチンの投与後 33 例中 30 例 (91%) において GPC3 ペプチド特異的 CTL の検出が可能であり、ペプチドの用量依存的に増加した。

生検を施行した 7 例中 5 例で、腫瘍に浸潤する CD8 陽性 T 細胞が、ワクチン投与後に増加していることを確認した。

全生存期間の予後因子は、単変量解析では遠隔転移無し、脈管浸潤有り、AFP100ng/ml 以上、RECIST 腫瘍径 10cm 以上、GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 未満であった。また多変量解析では、AFP100ng/ml 以上 ($p=0.004$, HR=4.66)、RECIST 腫瘍径 10cm 以上 ($p=0.005$, HR=4.36)、GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 未満 ($p=0.032$, HR=2.71) であり、GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度が本療法の有意な生命予後因子であることを示した。

GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 以上 (N=15) または 50 未満 (N=18) の 2 群に分けて検討したところ、臨床背景因子に関しては、2 群間に有意差を認めるものはなく、ワクチン使用量 ($\geq 1\text{mg}$ vs $< 1\text{mg}$) のみで有意な差 ($p=0.004$) を認めた。さらに生存期間中央値では、GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度 50 以上群は 12.2 ヶ月、50 未満群は 8.5 ヶ月と有意な差 ($p=0.033$) を認めた。これらは、ワクチンにより CTL が誘導された患者は、生存期間の延長が期待できるという結果であった。

D. 考察

末梢血中 GPC3 ペプチド特異的 CTL の頻度が、有意な生命予後因子であることを示したことは、ペプチドワクチン療法が、安全性だけでなく生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠となりうる。GPC3 ペプチドは、製薬企業の導出が実現され、今後企業治験での実施が見込まれる。

E. 結論

GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験における免疫学的および予後解析を行い、本療法が生存期間の延長においても、今後十分期待できるものである根拠を示すことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura

Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T. HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Sci.* 102(5):918-25, 2011.

- 2) Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, Ishii H, Furuse J, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kinoshita T, Komori H, Baba H, Fujiwara T, Nakatsura T. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol.* 40(1):63-70, 2012.
- 3) Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shirakawa H, Kuronuma T, Motomura Y, Mizuno S, Ishii H, Nakachi K, Konishi M, Nakagori T, Takahashi S, Gotoda N, Takayama T, Yamao K, Uesaka K, Furuse J, Kinoshita T, Nakatsura T. Phase I trial of glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma showed immunological evidence and potential for improving overall survival. *Clin. Cancer Res.* in press, 2012.
- 4) 中面哲也、国立がん研究センター東病院でのがんペプチドワクチン療法臨床試験の取り組み (第7回DIA日本年会 グローバル開発における日本の役割・日本の貢献 大学・研究機関・企業での臨床試験の実際)、臨床医薬 27(5):313-321, 2011.
- 5) 中面哲也、澤田雄、水野正一、肝癌の個別化医療—ワクチン・免疫療法を中心に— (特集: 癌個別化医療はどこまですすんだのか)、臨床雑誌「外科」73(10):1062-1068, 2011.
- 6) 澤田雄、中面哲也、ペプチドワクチンを用いた免疫療法 glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチン療法 (特集: 進化するがん免疫療法 (ワクチン療法、細胞療法、抗体療法))、腫瘍内科 8(5): 417-424, 2011.
- 7) 中面哲也、第9章 がん治療の新たなる展開 治療法・治療装置の進歩 4. ペプチドワクチン療法、(先端医療シリーズ42) 消化器疾患の最新医療、先端医療技術研究所、p164-167, 2011.

2. 学会発表

- 1) glypican-3 由来がんペプチドワクチン療法における多施設共同研究の現状と展望、中面哲也、吉川聡明、澤田雄、信岡大輔、水野正一、木下平、小西大、高橋進一郎、後藤田直人、光永修一、池田公史、鈴木史朗、柴田清住、吉川史隆、

細野亜古、原純一、真部淳、塩田曜子、木下義晶、孝橋賢一 第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (和歌山)、2011 年 12 月 1 日～2 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

- 2) GPC3 ペプチドワクチンに誘導された末梢血単核球 50 万個中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の最大頻度 50 以上は有意な生命予後因子である、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第 15 回日本がん免疫学会総会 (大阪)、2011 年 6 月 30 日～7 月 1 日
- 3) 進行肝細胞がんにおける glypican-3 由来ペプチドワクチン療法の子後因子-末梢血中 GPC3 ペプチド特異的 T 細胞頻度-、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第 31 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (名古屋)、2011 年 10 月 2 日
- 4) The increase of Glypican-3 peptide-specific CTLs after vaccination as a prognostic factor for clinical trial of glypican-3-derived peptide vaccine. 澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、下村真菜美、齊藤桂吾、水野正一、中面哲也 東京理科大学がん基盤科学技術研究センター国際会議 (東京)、2011 年 9 月 1 日～2 日
- 5) Glypican-3(GPC3) 由来ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した患者由来 PBMC を用いたペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞クローンの樹立、多田好孝、吉川聡明、下村真菜美、白川博文、信岡大輔、澤田雄、中面哲也 第 39 回日本臨床免疫学会総会 (東京)、2011 年 9 月 15 日～17 日
- 6) HLA 多型に基づく、がん免疫療法・個別化医療の臨床応用、西村泰治、中面哲也、富田雄介、中村祐輔、千住寛 第 56 回日本人類遺伝学会・第 11 回東アジア人類遺伝学会共同大会 (千葉)、2011 年 11 月 9 日～12 日
- 7) GPC3 ペプチドワクチン投与後、顕著な抗腫瘍効果とともに急性炎症反応、肝機能障害をきたした肝細胞がんの 1 例、澤田雄、信岡大輔、吉川聡明、高橋真理、下村真菜美、水野正一、中面哲也 第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 (和歌山)、2011 年 12 月 1 日～2 日
- 8) Identification of H2-K^b or -D^b restricted and glypican-3-derived CTL epitope peptide. 岩間達章、堀江和峰、吉川聡明、信岡大輔、下村真菜美、中面哲也 第 40 回日本免疫学会学術集会 (千葉)、2011 年 11 月 27 日～29 日

肝細胞がん根治的治療後の再発予防効果を検証する glypican-3 ペプチドワクチンの 臨床第Ⅱ相試験

研究代表者	中面 哲也	国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能再生室 室長
研究分担者	木下 平	国立がん研究センター東病院 院長
	小菅 智男	国立がん研究センター中央病院 副院長
	小西 大	国立がん研究センター東病院 副院長
	池田 公史	国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 副科長
	古瀬 純司	杏林大学医学部 腫瘍内科 教授
	国土 典宏	東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 教授
	石井 浩	がん研究会有明病院 消化器内科 副部長
	建石 良介	東京大学医学部附属病院 消化器内科 助教
	若林 剛	岩手医科大学 外科学講座 教授
	永井 完治	国立がん研究センター東病院 呼吸器腫瘍科 科長
	佐藤 昇志	札幌医科大学医学部 病理学第一講座 教授
	吉村 健一	京都大学医学部附属病院 探索医療センター検証部 特定助教

研究要旨

進行肝細胞がんを対象とした glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験の結果を踏まえ、肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験を施行している。現在、順調に症例登録が進んでおり、今年度中に予定登録症例 40 例の登録完了が見込まれる。中間解析は来年度施行予定であるが、参考値として、現在までのワクチン投与後 1 年経過した 22 例の 1 年再発率は 22.7%、コントロール設定とした国立がん研究センター東病院初回切除症例 80 例の 1 年再発率は 42.2%となっている。またワクチン投与後に再発した 2 名の患者が、国立がん研究センター東病院で再発病変の切除を受けており、十分なインフォームド Consentのもと、再発病変の切除検体に関して免疫学的な解析を行っている。ペプチドワクチン療法はがんの再発予防においてより有効であると見込まれるが、GPC3 に限らずペプチドワクチン療法の再発予防効果に関してのエビデンスは乏しい。本臨床試験は、がんワクチン療法に関して重要なエビデンスの 1 つを創出する可能性があると考えられる。

A. 研究目的

我々は、進行肝細胞がんを対象とした glypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験の結果を踏まえ、肝細胞がんの手術・ラジオ波焼灼療法での根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験を開始し、順調に症例登録が進んでいる。ペプチドワクチンは、がんの再発予防においてより有効であると見込まれ、初回病変の肝細胞がん患者で、肝切除あるいはラジオ波焼灼療法により根治的治療を施行された患者を対象とした。本研究は、肝細胞がんを対象に、GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を検証し、科学的エビデンスを創出することを目的としている。現在 GPC3 ペプチドは、製薬企業の導出が実現され、今後は企業治験での実施が見込まれる。しかし、GPC3 に限らず、ペプチドワクチン療法の再発予防効果に関してのエビデンスは乏しく、本臨床試験は、がんワクチン療法に関して重要なエビデンスを創出する可能性があると考えられる。

B. 研究方法

肝切除あるいはラジオ波焼灼療法による根治的治療後の再発予防を目指した第Ⅱ相試験

・対象と治療

初回病変の肝細胞がん患者で、肝切除あるいはラジオ波焼灼療法により根治的治療が施行されたと判断され、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 40 例。

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。

根治的治療後 4 週間以降 6 週間以内に、本登録時適格規準を満たしていることを確認し、本登録する。根治的治療後 1 年間の経過観察期間中に、2 週間に 1 回を計 6 回投与、その後は 2 ヶ月に 1 回を計 4 回投与し、全 10 回の投与を行う。再発が明らかになった時点で投与は中止する。

・主要評価項目

①再発抑制効果としての 1 年および 2 年再発率。