

2011.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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

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

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>中面哲也</u>	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	戸田剛太郎 ほか	消化器疾患の最新医療 (先端医療シリーズ42)	先端医療技術研究所	東京	2011	164-167
<u>木庭幸子</u>	悪性黒色腫：進行期悪性黒色腫の治療 3) 免疫療法	<u>斎田俊明</u> 編	1冊でわかる皮膚がん (皮膚科サブスペシャリティーシリーズ)	文光堂	東京	2011	251-253
<u>木庭幸子</u>	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	<u>斎田俊明</u> 編	1冊でわかる皮膚がん (皮膚科サブスペシャリティーシリーズ)	文光堂	東京	2011	255-257

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, <u>Nakatsura T.</u>	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)	918-925	2011
Suzuki S, Yoshikawa T, Hirose T, Shibata K, <u>Kikkawa E</u> , Akatsuka Y, <u>Nakatsura T.</u>	Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma.	Cancer Sci.	102(9)	1622-1629	2011
Nobuoka D, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Kuronuma T, Takahashi M, Nakachi K, <u>Ishii H</u> , <u>Furuse J</u> , Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, <u>Konishi M</u> , <u>Kinoshita T</u> , Komori H, Baba H, Fujiwara T, <u>Nakatsura T.</u>	Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma induces glypican-3 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes.	Int J Oncol.	40(1)	63-70	2012

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)	2117-2127	2011
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)	770-775	2011
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)	328-333	2011
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
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
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—	臨床雑誌「外科」	73(10)	1062-1068	2011
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	腫瘍内科	8(5)	417-424	2011
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

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
池田公史	肝癌の分子標的治療 ソラフェニブの副作用対策 (手足症候群・下痢・高血圧など)	医学のあゆみ	236(7)	711-715	2011
福島 聡, 尹 浩信, 西村泰治, 千住 寛	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	113-120	2011
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

V. 研究成果の刊行物・別刷

4. ペプチドワクチン療法

4.1 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がん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。あるいは、再発予防や予防法としての期待も高まっている。免疫療法はがんの第4の治療法と言われて久しいが、残念ながら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。適切な臨床試験と基礎研究の繰り返しによる科学的根拠に基づいたがん免疫療法の開発の必要がある。本稿では、特にペプチドワクチン療法についての現状について、我々の経験を中心に述べる。

4.2 がんの免疫療法について

がんの免疫療法の概念は既に19世紀からあった。医師たちはがん患者が細菌に感染すると、がんが小さくなる場合があることに気づいていた。そこから生まれたColey's vaccine (toxin)は、時にはがんの完全退縮を得たが、広くは受け入れられなかった。また、がんにはまれではあるが、自然退縮が起こる。これにはおそらく免疫も関与している。1967年ごろには、がん細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られたがん組織からがん細胞をばらばらにして、1万

個、10万個、100万個、1,000万個、1億個とその患者の皮下に移植した結果、進行がんの患者でも1万個は完全に拒絶され、10万個では時に移植が成立し、1億個ではほとんど移植が成立することがわかった。これらの研究結果は、がんに対する免疫の確かな存在と、一方ではその限界も示していると言える。

1991年にBoonらにより、ヒトの免疫系ががんを異物として認識し、排除しうることによって科学的な根拠が与えられた。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、これらに由来するペプチドが、HLAクラスI分子に結合して細胞の表面に発現し、CD8⁺細胞傷害性T細胞（キラーT細胞、CTL）がこれらを識別して活性化され、がん細胞を破壊するというメカニズムが存在する。現在までに、様々ながん拒絶抗原およびペプチドが同定され、世界中で臨床試験が進められている。前立腺がんに対して「Provence」という樹状細胞療法がFDAに承認され話題になったが、その他にもいくつかの第3相臨床試験での有効性も報告されている。一方では、最近子宮頸がんの予防ワクチンが話題であるが、免疫療法がより有効であるのはがんの再発予防や予防であると考えられ、免疫療法を用いた根治治療後の再発予防法やがん発症予防法の開発も必要である。近い将来、ペプチドワクチンで

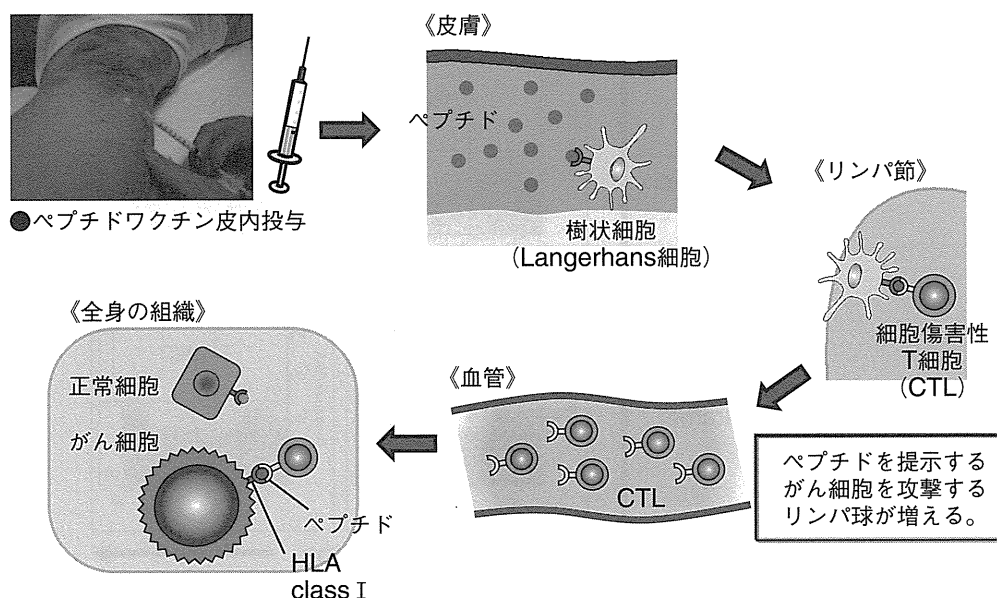


図1 ペプチドワクチン療法のメカニズムの概略

がんを予防する時代が来ることに期待したい。

4.2.1 ペプチドワクチン療法の proof of concept (POC)

ペプチドワクチン療法によりがん細胞を傷害するメカニズムを考えてみると、ペプチドをワクチンとして患者の皮内に注射すると、皮内のランゲルハンス細胞（樹状細胞）表面の HLA にペプチドが載り、その後リンパ節に移動して、リンパ節でペプチドを載せた樹状細胞によって刺激を受けたキラー T 細胞 (CTL) が活性化し、増え、血流に乗ってペプチドを HLA 表面に提示しているがん細胞を攻撃するが、ペプチドを提示していない正常細胞は傷害しないという目で見ることのできない複雑な生体反応である (図 1)。逆に言うと、ペプチドワクチンにより、血液中にペプチド特異的 CTL が増加して、その CTL が実際がんの組織の中に浸潤しない限りはがん細胞の傷害、すなわち臨床効果は起こりようがない。即ち、ペプチドワクチン投与後に血液中にペプチド特異的 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を証明することこそが、本療法の “proof of concept (POC)” であり、それすら起こっていないならば臨床効果は起こるはずがない。

4.2.2 Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の概要

我々は進行肝細胞がん 33 例を対象に臨床第 I 相試験を実施した。1 回の投与量を 0.3, 1, 3, 10, 30mg の 5 段階とし、2 週間おきに 3 回、左右の腋窩部、腹部および鼠径部の皮内に IFA と混ぜたエマルジョン製剤を、安全性を確認しながら用量を増して投与した。

33 例中、注射時のその日のうちに消失する一過性の潮紅は 27 例 (82%) に認められ、うち 2 例には一過性の異所性の皮疹、1 例には一過性の広範の潮紅を認めた。発熱は 37.5℃ 以上が 8 例で、うち 38℃ 以上が 4 例にみられたがいずれも一過性で、解熱剤の使用を要しなかった。注射部の紅斑は 33 例全例に見られ、うち 6 例には軽度の搔痒があり、クロタミトン (オイ

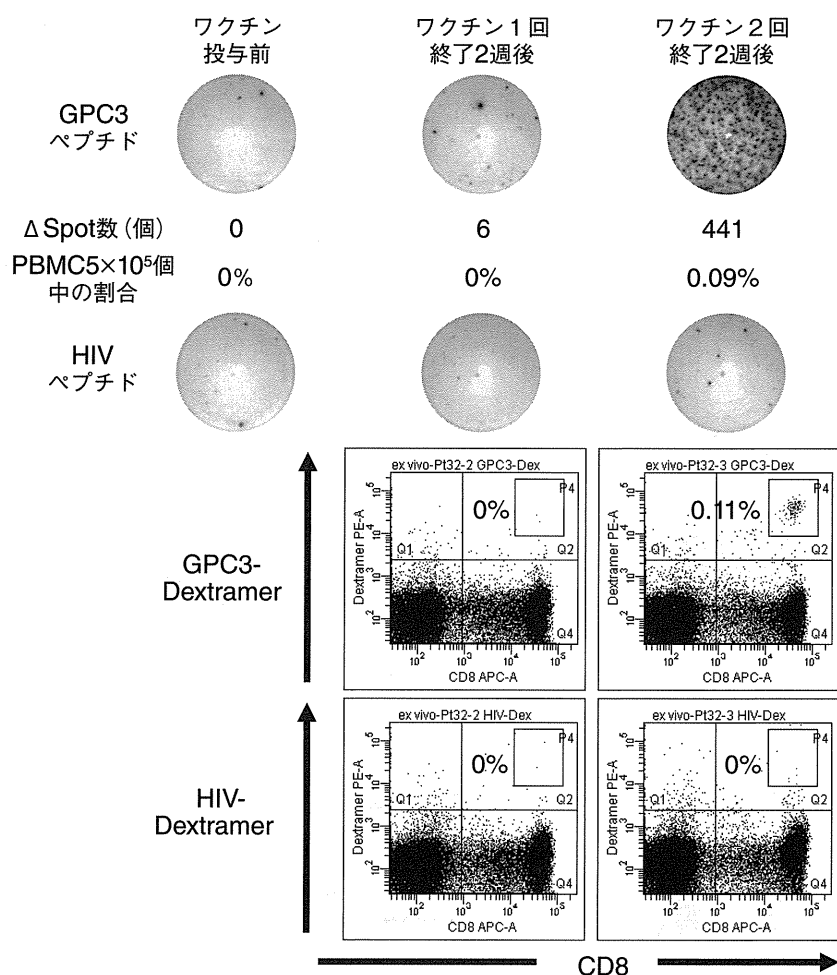


図 2 ペプチドワクチン投与前後の末梢血中ペプチド特異的 CTL の検出
わずか 2 回のペプチドワクチンで 10⁹ もの GPC3 ペプチド特異的 CTL が誘導された計算になる。

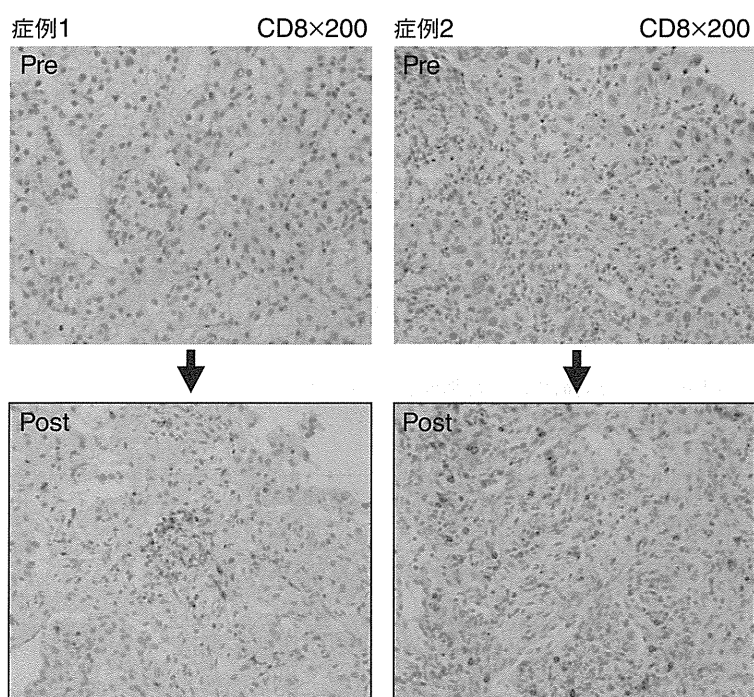


図3 ペプチドワクチン後の腫瘍内に CD8 陽性のキラー T 細胞が多数浸潤 (口絵参照)

ラックス) クリームを処方した。炎症反応を伴う疼痛や腫脹は認められなかった。また、Grade 3 の肝機能障害 (AST、ALT、T-Bil) を 4 例に認めたが、いずれもがんの増悪によるものと判断された。以上、安全性においては問題ないと考えられた。

33 例中 30 例 (91%) に末梢血中ペプチド特異的 CTL の頻度の増加が検出され (図 2)、その頻度は投与量依存性に増加しており、免疫学的反応も確認された¹⁾。7 例ではワクチン後の腫瘍の生検を行い、うち 5 例でワクチン前の腫瘍内には浸潤していなかった CD8 陽性のキラー T 細胞がワクチン後の腫瘍内に多数浸潤している像も観察できた (図 3)。本ペプチドワクチン療法の POC は得られたと考えている。

臨床効果については、3 回のワクチン投与後 1 ヶ月後の CT の RECIST version 1.0 での評価では、33 例中 1 例が PR、18 例が SD (SD 以上 59.4%) で 13 例は PD、1 例は NE (評価できず) であり、5 例には腫瘍内の壊死、一部腫瘍の縮小などの所見も認められた。TTP 中央値は 3.4 ヶ月、全生存期間 OS 中央値は 9 ヶ月であった。

全 33 例の GPC3 ペプチド特異的 CTL 活性と OS の分布図を検討すると、両者に有意な相関 ($p=0.031$) を認めた。さらに OS 中央値では、GPC3 ペプチド特異的 CTL 活性 50 以上群は 12.2 ヶ月、50 未満群は 8.4 ヶ月と有意な差 ($p=0.033$) を認めた。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、GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の最大頻度 50 以上は OS に対する有意かつ独立した予後因子と考えられた。

4.2.3 日本国内の様々な施設からのがんに対するペプチドワクチンの有効例の報告

米国 NCI の Rosenberg SA らは、2004 年の *Nature Medicine* にがんワクチンの Review として、440 例中 CR、PR の response rate はわずか 2.6% であったと報告した²⁾ が、そのことは 2009 年の米国癌学会でも議論になり、ペプチドワクチン単独では進行がんには劇的な効果はないかもしれないが、生存期間や無増悪期間の延長等の可能性はあり、再発予防にも有効な可能性はある、また様々な免疫抑制分子に対する抗体との併用などに期待が持てるとの意見も多かった。一方、最近日本国内の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も散見され、今後が期待されている。概要を表 1 に示す。

4.3 おわりに

がん特異抗原を標的とした免疫療法は、理論上重篤な有害事象は起こりえず、有効性さえ証明できれば標準的な治療法や補助療法となりうる可能性がある。また将来的にこれらペプチドワクチン等の免疫療法に

表1 がんペプチドワクチン療法臨床試験の臨床効果の報告

報告施設	がんワクチンの種類	臨床効果	文献
NCI	がんワクチンの Review	440 例中の奏効率はわずか 2.6%	2
大阪大	WT1 ペプチド	骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、乳がん、肺がん、脳腫瘍などで有効例、GEM と併用で膀胱がんにも有効	3
札幌医大	サバイビン 2B ペプチド	進行大腸直腸がん奏効例	4
久留米大	テーラーメードがんペプチド	子宮頸がん、大腸がん、脳腫瘍、膀胱がん、前立腺がんでも有効	5
近畿大	CA9 ペプチド	腎がん複数奏効例	6
山口大	KOC1、RNF43、TOMM34、VEGFR1、VEGFR2 の 5 種類のペプチド	大腸がん奏効例	7
山梨医大	TTK、LY6K (URLC10)、IMP-3 (KOC1) の 3 種類のペプチド	食道がん奏効例	8
岩手医大	MPHOSPH1、DEPDC1 のペプチド	膀胱がんでの抗腫瘍効果	9
和歌山医大	VEGFR2 ペプチド	GEM との併用で切除不能進行膀胱がん生存期間延長の期待	10
当院	GPC3 ペプチド	進行肝細胞がん奏効例	1

よりがんの予防法が確立できれば、国内がん患者数の減少に寄与することができ、国民の健康維持に大いに貢献できるものと考えられる。ペプチドワクチンはより安価に提供でき、一般の医療施設でもできる治療である。今後示される有効性によっては、抗がん剤治療に頼ってきたがん治療を大きく変える可能性があり、患者の QOL の改善にとっても大きな役割を果たすものと考えられる。まだまだ越えなければいけないハードルは多いが、今後次々とがんペプチドワクチン療法が薬として承認されることを期待したい。

文献

- 1) Yoshikawa T, et al: Cancer Sci **102**: 918-925, 2011
- 2) Rosenberg SA, et al: Nat Med. **10**: 909-15, 2004
- 3) Oka Y, et al: Curr Opin Immunol **20**: 211-20, 2008
- 4) Tsuruma T, et al: J Translational Med, 2004
<http://www.translational-medicine.com/content/2/1/19>
- 5) Yajima N, et al: Clin Cancer Res **11**: 5900-11, 2005
- 6) Uemura H, et al: Clin Cancer Res **12**: 1768-75, 2006
- 7) 裕 彰一ほか: Biotherapy **23** (2): 160-164, 2009
- 8) Kono K, et al: Cancer Sci **100**: 1502-1509, 2009
- 9) 小原 航ほか: 膀胱がん 新規腫瘍抗原を利用したワクチン療法、中村 祐輔 編: がんペプチドワクチン療法。中山書店、東京、p63-70, 2009
- 10) Miyazawa M, et al: Cancer Sci **101**: 433-439, 2009

(中面哲也)

Mガンマナイフは1968年にカロリンスカ大学の脳神経外科医レクセルにより開発された。半球状のドーム内に201個のコバルト60線源を配置させ、細いビームを多方向から集中させることで周囲正常組織への線量を抑えて病巣部を照射する。ヘルメットには201個のコバルト線源に対応する穴(4~18mm)があり、コバルト線源から発生するガンマ線を病巣部に集中的に大線量が照射される。開頭術を行うことなく低侵襲の治療が可能であり、通常は一回照射で治療が完了する。治療精度を保つ(誤差:0.5mm以下)ために定位ヘッドフレームを頭蓋骨にピン固定し、このフレームをヘルメットに固定し治療する。一つの焦点だけであれば球状の、また複数個の焦点を設定すると八頭状の不整形の線量分布を作ることが可能である。高い精度で照射をすることが重要であり、フレームを頭蓋骨に観血的にピン固定し治療誤差を最小限にとどめる。また、正確な病変の把握のために、CTやMRI画像などを組み合わせて慎重に標的を決めていく。

3cm以下の転移性腫瘍や良性腫瘍、血管性病変(脳動脈奇形)などが適応となる。多数の脳転移病巣を有する症例でも技術的に治療は可能であるが臨床的意義は限られており適応決定には慎重な態度が必要である。本治療法は放射線を集中的に照射することであり、浸潤傾向の強い悪性星細胞腫などには不向きである。機械の構造上の制限から体幹部には応用できない。ガンマナイフは頭蓋内のさまざまな疾患に適応可能であるが、わが国では治療件数の約半数が転移性病変で占められている。

現在では、同様の原理を用いて通常の放射線治療器と専用の治具を組み合わせたシステムや、リニアック装置をロボットアームに搭載させ追尾システムと組み合わせたサイバーナイフなどのシステムでも定位放射線療法を行うことが可能となった。

(鹿間直人)

3) 免疫療法

悪性黒色腫 malignant melanoma (MM) は、免疫原性の高い腫瘍であるため、効率よく抗腫瘍免疫応答を誘導することにより腫瘍拒絶を期待できる(図39)。生体内での腫瘍拒絶に重要な免疫系細胞はCD8陽性の細胞傷害性T細胞(CTL)のほか、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラーT細胞などがあり、CTLの標的となる腫瘍抗原が数多く同定されている。免疫療法は、能動免疫療法と受動免疫療法に分けられる(表13)。

a) 能動免疫療法

サイトカインや免疫賦活剤による免疫増強法や、腫瘍抗原を用いたワクチン、樹状細胞療法、腫瘍破壊によるワクチン療法などを行う。

(1) サイトカイン療法(生物療法)

MMは、インターフェロンなどのサイトカインに感受性がある。わが国で標準治療として行われているIFN-βについては、術後補助療法の項(245頁)などを参照されたい。

免疫を増強する目的で、単独あるいは抗原特異的免疫療法や細胞移入などと併用してインターロイキン(IL)やGM-CSFが有用である。米国国立癌研究所(NCI)では、IL-2の大量投与(72万IU/kg, 8時間毎)が行われている。進行期MMに対する本療法の奏効率は13%である¹⁾。このほか、IL-7, IL-12, IL-15, IL-21などのサイトカイン、あるいはサイトカイン遺伝子投与が試験的に行われてきた。わが国ではこれらのサイトカインは保険適用ではなく、非常に高価であるため、標準治療が難しい。IL-2投与と化学療法を連続して行う生物化学療法のレジメンも存在する。

(2) 抗原特異的免疫療法

MM患者から同定された腫瘍抗原として、gp-100やMART-1に代表されるメラノサイト特異的蛋白²⁾や、MAGEやNY-ESO-1などの癌精巢抗原のほか、過剰発現蛋白、癌特異的変異蛋白などが同定されており、これらの蛋白やペプチド、あるいは遺伝子を用いて、*in vivo*あるいは*in vitro*で抗原特異的免疫応答を誘導することによって、腫瘍拒絶をもたらす。腫瘍抗原の多くは、正常組織での発現が限られているため、副作用が少な

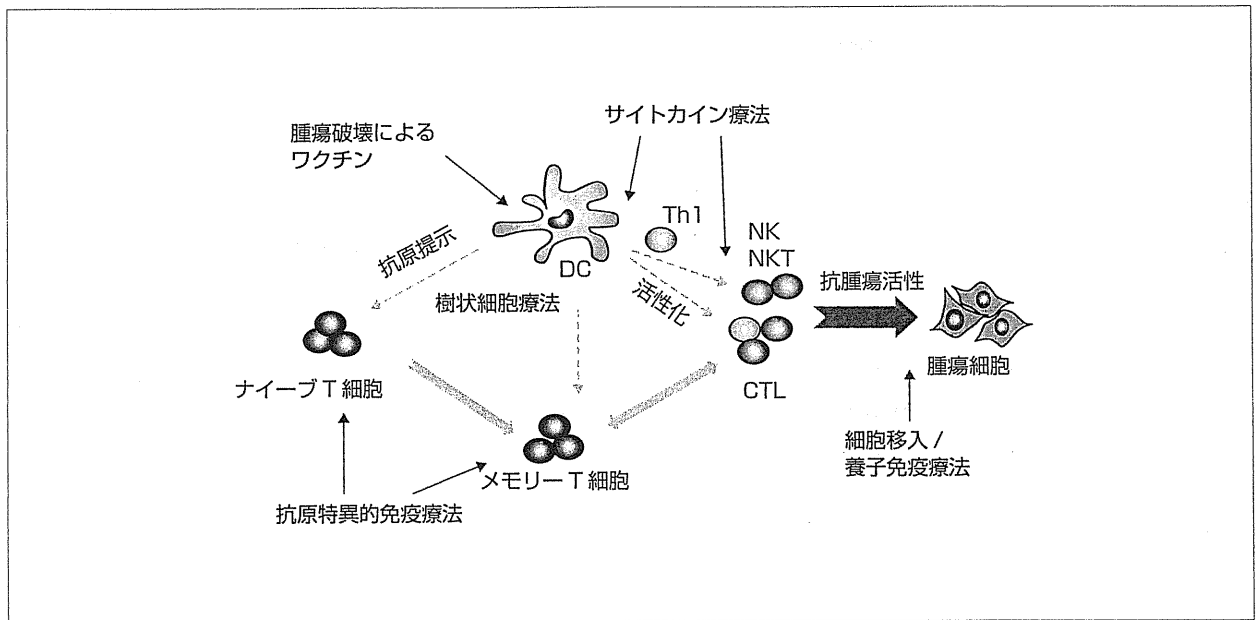


図 39 抗腫瘍免疫応答と免疫療法

DC : dendritic cell, Th1 : T helper 1, NK : natural killer, NKT : natural killer T, CTL : cytotoxic T lymphocyte

表 13 悪性黒色腫に対する免疫療法

能動免疫法

サイトカイン療法/生物療法

抗原特異的免疫療法

抗原ペプチド, 蛋白, DNA

樹状細胞療法

樹状細胞+抗原ペプチド, 蛋白, DNA

樹状細胞+自己腫瘍溶解物

腫瘍破壊によるワクチン療法

放射線, 温熱, 凍結, PDT (光線力学的療法)

など

修飾癌細胞ワクチン

免疫増強法

アジュバント

熱ショック蛋白

受動免疫法

細胞移入/養子免疫療法

腫瘍浸潤リンパ球

活性化リンパ球

TCR遺伝子導入リンパ球

ミニ移植

く、一般的な化学療法に比べて、患者の QOL を保つのに適している。しかし、ペプチドの場合、MHC 拘束性のため、患者の HLA によっては適応にならない症例も存在する。これまでに、MHC 親和性を高めた改変ペプチドも開発されて

いる。ペプチドは供給が簡便で安価であることや、誘導された免疫応答を確認する免疫モニタリングが容易であることが利点としてあげられるが、これまでの多数の臨床成績を総合すると、ペプチド投与単独では、*in vivo* で誘導される抗原特異的 T 細胞による免疫応答が比較的に弱い、腫瘍拒絶に至らないケースが多い。

わが国では、浜松医大において、表皮 Langerhans 細胞を抗原提示細胞として利用する経皮的ペプチド投与が臨床試験として行われた。この臨床試験においては、25 例の進行期 MM 患者に対して、HLA-A*0201 の MART-1 と、A*2402 の MAGE-2, -3, gp100, tyrosinase の抗原ペプチドで経皮感作を行ったところ、一部の症例で腫瘍縮小および新規病変の抑制などの臨床効果が認められ、モニタリングでも CTL の誘導が確認でき、今後の展開が期待される³⁾。

抗原特異的免疫療法の課題としては、腫瘍細胞における抗原発現低下や MHC 分子発現低下のほかに、抗原刺激による制御性 T 細胞の誘導があげられる。こうした問題を克服すべく、新たな標的抗原の探索にも力が注がれている。

(3) 樹状細胞療法

最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞を用いて抗腫瘍免疫を誘導する。末梢血単球由来の樹状細胞を調製し、*in vitro*で黒色腫抗原やペプチドをパルスして、アジュバントなどとともに、リンパ節や皮内～皮下に投与する。樹状細胞の調製は、プラスチック接着細胞やCD14細胞からIL-4やGM-CSFなどのサイトカイン存在下で行う。樹状細胞による抗原蛋白の取り込みや抗原ペプチドのプライミング、および樹状細胞の投与経路も詳細に検討され、最適化がなされている。およそ 10^7 個の樹状細胞を投与し、2～3週間ごとに繰り返す(コラム「樹状細胞療法の実際」参照)。これまで世界中で行われた626例の樹状細胞療法の治療成績のまとめによると、CR+PRは約9%、SDを含めると約30%であり、投与経路はリンパ節内投与と皮内、皮下投与の治療成績が静脈内投与のそれよりも優れており、ヘルパー抗原を併用をした群が併用しない群よりも優れていた。また免疫モニタリングでは、遅延型過敏反応よりもIFN- γ 産生細胞の数の上昇が臨床効果と相関していた⁴⁾。

(4) 腫瘍破壊によるワクチン療法

MMは皮膚・皮下転移が多い。皮膚転移巣など経皮的にアプローチしやすい病変に対して、放射線照射や凍結凝固、温熱負荷などの操作、光線力学的療法、ウイルスによる腫瘍溶解といった非侵襲的な腫瘍破壊により、腫瘍細胞内から腫瘍抗原の遊離を起こす。これらの操作単独、あるいは、これらの操作に加えて同部位に樹状細胞を注入することによって、*in vivo*腫瘍細胞由来蛋白を樹状細胞に取り込ませ、全身的な抗腫瘍免疫の誘導を目指して、わが国においても臨床試験が続いている。

b) 受動免疫療法

養子免疫療法(adoptive cell transfer: ACT)やミニ移植、リンパ球輸注などを行う。細胞移入/養子免疫療法(adoptive cell transfer: ACT)

MMに対し1980年代から行われている手法であるが、近年、大きな展開をみせている。ACT

は、患者からアフエレーシスで取り出した末梢血リンパ球や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を、IL-2などのサイトカイン存在下で培養、あるいは*in vitro*で抗原刺激を加えることにより、誘導される活性化リンパ球を患者体内に戻す。米国NCIでは、転移性黒色腫患者に対して、MART-1 A2ペプチド拘束性およびgp100 A2ペプチド拘束性T細胞レセプターを遺伝子導入した末梢血リンパ球を用いたACTを行っており、それぞれの奏効率は30%と19%である⁵⁾。

抗腫瘍免疫応答を抑制する免疫担当細胞の一つである制御性T細胞を減少させる目的で、Tregの前駆細胞となるリンパ球除去を行う方法が開発されており、ACTに併用できる。シクロホスファミドとフルダラビンなどの骨髄非破壊性免疫抑制前処置やdenileukin diftitox(ONTAK[®])の投与、あるいは全身放射線などの前処置を行ったうえで、大量のIL-2とともにTILを移入するACTにより再発MMに対し、49～79%というきわめて高い奏効率がえられている⁶⁾(コラム「免疫制御機構と克服への取り組み」参照)。

(木庭幸子)

(P257「4)分子異常と分子標的治療」へ続く)



樹状細胞療法の実際

信州大学医学部附属病院輸血部 下平滋隆

進行期あるいは再発、予後不良のがん、肉腫、造血器悪性腫瘍に対する樹状細胞療法は、手術、抗がん薬、放射線療法に加え第4の治療として期待され、集学的ながん治療戦略として臨床研究がなされている。悪性黒色腫は免疫療法が有効な疾患であり、歴史的に最も研究が行われてきた。

樹状細胞療法には、1)自己がん組織パルス樹状細胞療法、2)人工抗原パルス樹状細胞療法、3)局所樹状細胞療法があり、①自己腫瘍組織の有無、②人工抗原のマッチング、③局所投与可能

マイコプラズマの検定およびFACS分析による成熟樹状細胞の表面形質を確認する。

⑤人工抗原ペプチドパルス樹状細胞療法

凍結した腫瘍組織が保管されていない場合、HLA-DNAタイピングの結果により、WT1 (Wilms' tumor1, HLA-A*2402あるいはHLA-A*0201) ペプチドをパルスした樹状細胞療法を検討する。

2. 作製樹状細胞の投与と評価

- ① 原則、1コース5~7回として、2週毎に1×10⁷個/回の樹状細胞を皮内接種する。この際、補助薬としてその近傍に1~5KEのOK-432を投与する。
- ② 免疫学的な効果・効能は、(WT1ペプチドを用いた患者では) WT1テトラマー解析、インターフェロンγ産成能のELISpot解析、Th1/Th2バランスを投与前・後の比較により行う。
- ③ 治療効果としては、治療前・後の測定可能病変をCT, MRI, PETなど各種画像検査を用いてRECISTガイドラインに従い評価する。
- ④ 安全性の評価としては、有害反応評価基準(NCI-CTCAE-JCOG)/JSCOG和訳版に従うが、樹状細胞接種の局所では80%以上の例で発赤や硬結、2重発赤を認め、OK-432による発熱も半数にみられる。悪性黒色腫では皮膚の白斑が誘導される症例がある。

3. 樹状細胞療法の課題

悪性黒色腫における樹状細胞療法の有効性は30%と報告されているが、本療法による延命効果、QOLの改善について検討する必要がある⁴⁾。樹状細胞の作製法や投与方法、併用療法はさまざまであり標準化が望まれる。WT1ペプチドの他、MAGE-A4/Survivinヘルパーペプチドを用いた樹状細胞療法の成果が期待される⁵⁾。

文献

- 1) Nagayama H et al : Results of a phase I clinical study using autologous tumour lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell

vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Research* 13 : 521-530, 2003

- 2) Okamoto M et al : Mechanism of anticancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signaling. *J Immunother* 29 : 78-86, 2006
- 3) Figdor CG et al : Dendritic cell immunotherapy : mapping the way. *Nat Med* 10 : 475-480, 2004
- 4) Engell-Noerregaard L et al : Review of clinical studies on dendritic cell-based vaccination of patients with malignant melanoma : assessment of correlation between clinical response and vaccine parameters. *Cancer Immunol Immunother* 58 : 1-14, 2009
- 5) Cheever MA et al : The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res* 15 : 5323-5337, 2009



免疫制御機構と克服への取り組み

信州大学皮膚科 木庭幸子

がんの微小環境においては、がん細胞、間質細胞、免疫系細胞などが、単独あるいは相互作用によって、免疫抑制状態をつくりだすとともに、増殖因子や生理活性物質などを介して、発がん機転および腫瘍の増殖・転移に深くかかわる。なかでも、腫瘍特異的T細胞や樹状細胞の増殖・機能抑制の原因として、制御性T細胞(Treg)などの抑制的免疫細胞群による免疫制御が注目されている。Tregのほかに、免疫寛容誘導樹状細胞、骨髄由来抑制性細胞、腫瘍関連マクロファージなどが知られており、分子機序の解明が待たれる。

1. 制御性T細胞

CD4 + CD25^{high} foxP3 + のTregは、末梢免疫寛容に深くかかわり、自己免疫性疾患の発症においても主要な役割を果たす。GITR+, CTLA4+などのフェノタイプを示し、悪性黒色腫(MM)においても、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の中に検出される¹⁾。また、抗原特異的免疫療法によって誘導されることも報告されている。

Tregは、腫瘍特異的T細胞の増殖・活性化を抑制し腫瘍拒絶を妨げるほか、抗原提示細胞の成熟化を阻害して抗原提示能を抑制し、ナイーブT細胞のアナジーを誘導するなどして、腫瘍局所あるいは全身における免疫回避をつかさどる。

2. 免疫寛容誘導樹状細胞

最も強力な抗原提示細胞として知られている樹状細胞は、さまざまな環境下で抑制的な機能をも発揮し、免疫寛容誘導樹状細胞 (tolerogenic dendritic cell : TDC) と呼ばれる。TDCは、サイトカインやCTLA-4, LFA-1などを介した免疫抑制機能を示し、抗原特異的T細胞の除去や、ナイーブT細胞のアナジーの誘導、Tregの誘導・増殖にかかわる。MMにおいては、センチネルリンパ節でplasmacytoid DCが高率に検出されることが報告されており、TDCとして機能している可能性がある²⁾。

3. 骨髄由来抑制性細胞

骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cell : MDSC) は、TNF α や TGF β , IL-6などにより、Immature myeloid cell (ImC) から誘導される。CD14 + Lin-HLA-DR-を示し、arginase, ROS, ONOO-, NOといった活性酸素を産生し、シグナル伝達阻害 (JAK3, STAT5) やMHC class-II発現抑制、リンパ球のアポトーシス誘導、抗原特異的T細胞抑制など抑制的な機能を示すことから、抗腫瘍免疫応答をも妨げていると推察される。

4. 腫瘍関連マクロファージ

腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) は、腫瘍中に浸潤しているマクロファージのうち、腫瘍細胞やストローマが産生するM-CSF, CCL2, CCL5や、IL-6, IL-10によってリクルートされ維持されるM2タイプマクロファージである。TAMは、成長因子産生や血管増生の促進により、腫瘍の進展を助ける³⁾。現時点では、TAMに特異的な分子マーカーは存在しないが、MM組織中にも多数のCD68

陽性細胞が見出されることから、MMにおいてもTAMが局所的免疫抑制に関与している可能性が推察される。TAMは免疫系に対して、IL-10を介したT2 polarization, ナイーブT細胞アナジー誘導を行うほか、DCの成熟および活性化を抑制する。

5. 抑制的免疫細胞の制御

前述のような抑制的免疫細胞を制御することは、免疫療法のみならずMMの治療全体を考えるうえでもきわめて重要である。以下のような方法が報告されている。

1) リンパ球除去

Tregを減少させる目的で、Tregの前駆細胞となるリンパ球除去が行われる。骨髄非破壊性免疫抑制前処置やdenileukin diftitox (ONTAK[®]) の投与、あるいは全身放射線などの前処置と大量IL-2投与を組み合わせる養子免疫療法 (ACT) が開発されており、米国NCIにおいては、再発MMに対し、シクロホスファミドとフルダラビンによる前処置と高用量IL-2併用ACTを実施し、43例中4例のCRを含む21例 (49%) に奏効した。これに、200 cGyの全身放射線照射 (TBI) の前処置を組み合わせることにより、TBI併用により25例中2例のCRを含む13例 (52%)、1,200 cGyのTBI併用により25例中7例のCRを含む18例 (72%) に奏効し、しかもCRの13例のうち12例ではCR持続期間が18から75ヵ月、かつCRは現在進行形と、きわめて優れた効果を上げている⁴⁾

2) CTLA-4抗体療法

免疫寛容の誘導にかかわるCTLA-4をブロックするモノクローナル抗体 (ipilimumab) 療法の臨床試験が進められている。このうち、米国NCIでは、IV期のMMに対して、ipilimumabとgp100ペプチドのコンビネーションで12.5%、ipilimumabと高用量IL-2の併用で22%の奏効率が得られた⁵⁾。同じくtremelimumabを用いたCTLA-4抗体療法がテキサス大学MD Anderson癌センターやカリフォルニア大学などで行われて10~25%に奏効し、その効果は2年以上

持続していると報告されている^{6,7)}。

3) 今後の展望

抑制性免疫細胞群の分子機序の解明に合わせて、分子標的治療やRNA干渉による制御が可能になると期待される。化学療法薬や分子標的治療薬のなかには、スニチニブのようにTregやMDSCを抑制してTh1タイプの反応を増強する薬剤^{8,9)}や、ゲムシタビンのようにMDSCの増加を抑制する¹⁰⁾など、抑制的免疫細胞を制御する機能を持つ薬剤が報告されている。

文献

- 1) Wang HY et al : Tumor-specific human CD4 + regulatory T cells and their ligands : implications for immunotherapy. *Immunity* 20 : 107-118, 2004
- 2) Gerlini G et al : Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin Immunol* 125 : 184-193, 2007
- 3) Coffelt SB et al : Tumor-associated macrophages : effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796 : 11-18, 2009
- 4) Rosenberg SA et al : Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21 : 233-240, 2009
- 5) Ribas A : Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma. *Update Cancer Ther* 2 : 133-139, 2007
- 6) Camacho LH et al : Phase I / II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27 : 1075-1081, 2009
- 7) Ribas A, et al : Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 15 : 6267-6276, 2009
- 8) Ko JS et al : Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 15 : 2148-2157, 2009
- 9) Finke JH et al : Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 14 : 6674-6682, 2008
- 10) Suzuki E et al : Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1 + /CD11b + myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11 ; 6713-6721, 2005

5 進行期悪性黒色腫の治療

4) 分子異常と分子標的治療

a) 悪性黒色腫の分子異常 (図40)

悪性黒色腫では癌遺伝子の NRAS, BRAF, KIT の変異や、癌抑制遺伝子 CDKN2A, PTEN の不活性化が認められ、また、cyclin D1, CDK4 などの細胞増殖に関与する遺伝子の増幅がみられる¹⁾。これらの変異のパターンは悪性黒色腫の病型により異なる。NRAS変異はすべての病型の悪性黒色腫の10~20%に認められる。BRAF遺伝子変異は表在拡大型黒色腫や結節型黒色腫の2/3程度と高頻度に見出され、これらの病型の黒色腫の特徴的な遺伝子異常である。BRAF変異の90%はコドン600のグルタミン酸をヴァリンに変えるV600E変異であり、Raf蛋白を恒常的に活性化してその下流のMEKおよびERKを活性化する。ERKは細胞質内で多くの標的分子をリン酸化するとともに、cyclin D1など細胞増殖を促進する蛋白の転写を活性化する。一方、肢端黒色腫、粘膜黒色腫、悪性黒子型黒色腫ではBRAF変異の頻度はむしろ少なく、KITの変異やcyclin D1, CDK4遺伝子の増幅がしばしば見出される。また、眼のぶどう膜に生じる悪性黒色腫にはグアニン結合蛋白αサブユニットqクラス(GNAQ)の変異が多いことが最近報告されている²⁾。なお、癌抑制遺伝子CDKN2A, PTENの不活性化に関しては、とくに悪性黒色腫の病型による差異は知られていない。このように、悪性黒色腫の分子異常はその病型により異なるので、それを考慮して分子標的治療の戦略を考える必要がある。

b) 悪性黒色腫の分子標的治療

(1) 海外における臨床試験の現況³⁾

現在、世界中でさまざまな分子標的薬が開発され臨床試験が行われているが、悪性黒色腫の治療薬として正式に認可されたものは未だない。腎癌や肝細胞癌にすでに用いられているraf阻害作用を有するソラフェニブは、最初にその効果が期待されて臨床試験が行われたが有効性が乏しく、その後に行われたカルボプラチンやパクリタキセルなどの抗がん薬との併用療法による第3相試験でも期待された効果は得られていない。その他に

HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells

Toshiaki Yoshikawa,^{1,2} Munehide Nakatsugawa,¹ Shiro Suzuki,¹ Hirofumi Shirakawa,¹ Daisuke Nobuoka,¹ Noriko Sakemura,¹ Yutaka Motomura,¹ Yukie Tanaka,³ Shin-Ichi Hayashi² and Tetsuya Nakatsura^{1,4}

¹Section for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa; ²Division of Immunology, Department of Molecular and Cellular Biology, School of Life Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago; ³Division of Hematology, Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan

(Received December 6, 2010/Revised January 13, 2011/Accepted January 13, 2011/Accepted manuscript online February 1, 2011/Article first published online March 4, 2011)

Glypican-3 (GPC3) is an onco-fetal antigen that is overexpressed in human hepatocellular carcinoma (HCC), and is only expressed in the placenta and embryonic liver among normal tissues. Previously, we identified an HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) peptide that can induce GPC3-reactive CTLs without inducing autoimmunity in HLA-A2 transgenic mice. In this study, we carried out a phase I clinical trial of HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide vaccine in 14 patients with advanced HCC. Immunological responses were analyzed by *ex vivo* γ -interferon enzyme-linked immunospot assay. The frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination (mean, 96; range, 5–441) was significantly larger than that before vaccination (mean, 6.5; range, 0–43) ($P < 0.01$). An increase in the GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTL frequency was observed in 12 (86%) of 14 patients after vaccination. Additionally, there was a significant correlation between the maximum value of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination and the dose of the peptide injected ($P = 0.0166$, $r = 0.665$). Moreover, we established several GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTL clones from PBMCs of patients vaccinated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide by single cell sorting using Dextramer and CD107a antibody. These CTL clones had high avidity (the recognition efficiency showing 50% cytotoxicity was 10^{-10} or 10^{-11} M) and could recognize HCC cell lines expressing GPC3 in an HLA-class I-restricted manner. These results suggest that GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide vaccine can induce high avidity CTLs capable of killing HCC cells expressing GPC3. This trial was registered with University Hospital Medical Information Network number 000001395. (*Cancer Sci* 2011; 102: 918–925)

In peptide-based vaccine trials, occasional marked clinical regressions of melanoma have been observed after peptide vaccination; however, tumor regressions have not correlated well with T cell responses measured in peripheral blood lymphocytes.^(1–3) This may be because the clinical response to a vaccine was unrelated to the immune response to that vaccine or due to inadequate immune response monitoring. Moreover, vaccination with synthetic peptides has occasionally induced ineffective CTL responses due to various mechanisms.^(4–9) When evaluating T cell response to peptide vaccines, it is important to confirm that the peptide is presented naturally on cancer cells and that responding CTLs lyse human cancer cells.

Glypican-3 (GPC3) is specifically overexpressed in human hepatocellular carcinoma (HCC).⁽¹⁰⁾ The expression of GPC3 was correlated with a poor prognosis in HCC patients.⁽¹¹⁾ Moreover, GPC3 is useful not only as a novel tumor marker, but also as a target antigen for immunotherapy in several studies with

mice.^(12–14) We identified HLA-A*24:02-restricted GPC3_{298–306} (EYILSLEEL) and HLA-A*02:01-restricted GPC3_{144–152} (FVG-EFFTDV) peptides, both of which can induce GPC3-reactive CTLs without inducing autoimmunity,⁽¹⁵⁾ and reported a preclinical study using a mouse model with a view to designing an optimal schedule for the clinical trials of a GPC3-derived peptide vaccine and showed dose-dependency in the immunizing effect of the peptide vaccine.⁽¹⁶⁾

In this study, we completed the phase I clinical trial of a GPC3-derived peptide vaccine for 30 patients with advanced HCC (manuscript in preparation). Among them, 16 patients had the *HLA-A24* gene and 14 had the *HLA-A2* gene. Here, we describe the immunological evaluation of HLA-A2-restricted GPC3_{144–152} peptide vaccine in a phase I trial involving 14 patients. We highlight three important points: (i) HLA-A2-restricted GPC3_{144–152} peptide is immunogenic in advanced HCC patients; (ii) dose-dependent effects of GPC3_{144–152} peptide vaccine; and (iii) establishment of CTL clones showing not only high avidity but also natural antigen-specific killing activity against HCC cells.

Materials and Methods

Patients. Fourteen patients with advanced HCC were injected with HLA-A2-restricted GPC3_{144–152} (FVGEFFTDV) peptide vaccine at the National Cancer Center Hospital East (Kashiwa, Japan). *HLA-A2* gene-positive status was determined by genomic DNA typing tests (Mitsubishi Chemical Medience, Tokyo, Japan). All patients gave written informed consent before entering the study. The profiles of the 14 patients are summarized in Table 1. This study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Center, and conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Treatment protocol. Vaccinations with GMP grade peptide, GPC3_{144–152} (FVGEFFTDV) (American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA) emulsified with incomplete Freund's adjuvant (Montanide ISA-51 VG; Seppic, Paris, France) were carried out intradermally three times at 14-day intervals. Five incremental dose levels at 0.3, 1, 3, 10, and 30 mg/body were planned for the peptide administration.

Preparation of PBMCs. Peripheral blood (30 mL) was obtained from each patient at times designated in the protocol (before the first vaccination and 2 weeks after each vaccination) and centrifuged using a Ficoll-Paque gradient.

⁴To whom correspondence should be addressed.
E-mail: tnakatsu@east.ncc.go.jp

Table 1. Summary of profiles of 14 patients with advanced human hepatocellular carcinoma who participated in this study, with their clinical and immunological responses before and after vaccination with HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide

Pt.	HLA	Age (years)	Sex	Stage	Dose of peptide (mg)	Clinical response†	GPC3-specific CTLs‡		
							Pre	Post	Change
A2-1	A*02:06/A*02:07	67	M	IV	0.3	SD	43	40	-
A2-2	A*02:01	62	M	IIIA	0.3	PD	0	18	+
A2-3	A*02:01	55	M	IIIA	0.3	SD	1	10	+
A2-4	A*02:01	68	F	IIIC	1.0	SD	16	15	-
A2-5	A*02:01	72	M	IIIA	1.0	SD	16	101	+
A2-6	A*02:01/A*02:06	62	M	II	1.0	PD	0	23	+
A2-7	A*02:01	67	F	IV	3.0	SD	0	23	+
A2-8	A*02:01	58	M	IIIA	3.0	SD	0	101	+
A2-9	A*02:01	52	M	IV	10.0	SD	1	100	+
A2-10	A*02:01	70	M	IV	10.0	PD	0	5	+
A2-11	A*02:01	68	M	II	10.0	PD	1	125	+
A2-12	A*02:07	75	F	IV	30.0	PR	11	196	+
A2-13	A*02:06	52	M	IV	30.0	PD	2	151	+
A2-14	A*02:01	67	M	IV	30.0	PD	0	441	+

†The clinical response was evaluated according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) guidelines. ‡Peripheral blood was taken from each patient before and after vaccination, and glypican-3 (GPC3)-specific CTLs were measured by *ex vivo* γ -interferon enzyme-linked immunospot assay. F, female; M, male; PD, progressive disease; PR, partial response; Pt., patient; SD, stable disease; +, increase; -, decrease.

Ex vivo interferon (IFN)- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) analysis. ELISPOT assay for the detection of antigen-specific IFN- γ producing T cells was carried out using the BD ELISPOT kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. In brief, non-cultured PBMCs (5×10^5 cells/well) were added to plates in the presence of 10 μ g/mL peptide antigens and incubated for 20 h at 37°C, 5% CO₂. The GPC3 antigen was HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) peptide. The PBMCs with HLA-A2-restricted HIV₁₉₋₂₇ (TLNAWVKVV) peptide were used as a negative control. The spots were automatically counted using the Eliphoto system (Minerva Tech, Tokyo, Japan).

Cell lines. The human liver cancer cell line HepG2 (GPC3⁺, HLA-A*02:01/A*24:02), SK-Hep-1 (GPC3⁻, HLA-A*02:01/A*24:02), the human melanoma cell line 526mel (GPC3⁺, HLA-A*02:01), and the human colon cancer cell line SW620 (GPC3⁻, HLA-A*02:01/A*24:02) were used as target cells. T2 (HLA-A*02:01, TAP⁻) was pulsed with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide or HIV₁₉₋₂₇ peptide at room temperature for 1 h. They were conserved in our laboratory.

Induction of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs from PBMCs. The PBMCs were cultured (2×10^6 cells/well) with 10 μ g/mL GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide in AIM-V medium supplemented with 10% human AB serum, recombinant human interleukin (IL)-2 for 14 days.

Dextramer staining and flow cytometry analysis. The PBMCs were stained with HLA-A*02:01 Dextramer-RPE (GPC3₁₄₄₋₁₅₂ [FVGEFFTDV], HIV₁₉₋₂₇ [TLNAWVKVV]; Immudex, Copenhagen, Denmark) for 10 min at room temperature and anti-CD8-FITC (ProImmune, Oxford, UK) for 20 min at 4°C. Flow cytometry analysis was carried out using FACSaria cell sorter (BD Bioscience).

CD107a staining and flow cytometry analysis. CD8⁺ T cells were isolated using human CD8 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from PBMCs stimulated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide for 14 days. CD8⁺ T cells were incubated with T2 pulsed with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ or HIV₁₉₋₂₇ peptide and HepG2 at a 2:1 ratio for 3.5 h at 37°C. CD107a-specific antibodies (BD Bioscience) were included during the incubation period.

Generation of CTL clones. CD8⁺ GPC3 Dextramer⁺ or CD107a⁺ cells were sorted using a FACSaria cell sorter and seeded in a 96-well plate (1 cell/well) and stimulated by the addition of irradiated (100 Gy) allogeneic PBMCs (8×10^4 cells/well) as

feeder cells, in AIM-V medium supplemented with 10% human AB serum, IL-2 (200 U/mL), and phytohemagglutinin-P (PHA) (5 μ g/mL) for 14–21 days.

Response of CTL clones against cancer cell lines. The CTL clones were cocultured with each cancer cell line as a target cell at the indicated effector/target (E/T) ratio, and cytotoxicity assay or IFN- γ ELISPOT assay was carried out. Blocking of HLA-class I or HLA-A2 was carried out as previously described.⁽¹⁵⁾

Cytotoxicity assay. Cytotoxic activity against target cells was analyzed using the Terascan VPC system (Minerva Tech). Target cells were labeled with calcein AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) solution for 30 min at 37°C. The labeled cells were then incubated with effector cells for 4–6 h. Fluorescence intensity was measured before and after the 4–6 h culture, and specific cytotoxic activity was calculated using the following formula: % cytotoxicity = $\{1 - [(average fluorescence of the sample wells - average fluorescence of the maximal release control wells) / (average fluorescence of the minimal release control wells - average fluorescence of the maximal release control wells)]\} \times 100\%$.

Determination of recognition efficiency. Calcein AM-labeled T2 target cells were pulsed with a range of peptide concentrations, starting at 10⁻⁶ M and decreasing by log steps to 10⁻¹⁴ M. The CTL clones were incubated with T2 target cells at a 10:1 E/T ratio for 4 h. For each CTL clone, % cytotoxicity was plotted against each peptide concentration. The peptide concentration at which the curve crossed 50% cytotoxicity was defined as the recognition efficiency of that clone.

Cold inhibition assay. Calcein AM-labeled target cells were cultured with effector cells in a 96-well plate with cold target cells. T2 target cells, which were prepulsed with either HIV₁₉₋₂₇ peptide or GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide, were used as cold target cells.

RNA interference. Small interfering RNAs specific for human GPC3 were chemically synthesized double-strand RNAs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A non-silencing siRNA, AllStras Neg. Control siRNA, was obtained from Qiagen (Valencia, CA, USA). The GPC3-specific siRNA sequence used in this study was: 5'-GGAGGCUCUGGUGAUGGAAUGAUAA-3'. Synthetic siRNA duplexes were transfected using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols.

Statistical analysis. Student's *t*-test was used to determine statistically significant differences between the two groups.

Correlation between the frequency of GPC3-specific CTLs and the dose of the peptide injected was analyzed using Spearman's rank correlation coefficient. Data from the ELISPOT assay using siRNA were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance was set as $P < 0.05$.

Results

Analysis of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs in PBMCs of vaccinated patients. To analyze immune responses in the 14 patients vaccinated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide, we evaluated the GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific immune responses by *ex vivo* IFN- γ ELISPOT assay. The representative data of patient A2-12 on changes in the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs before and after vaccination are shown in Figure 1(a). The frequencies of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs were 11 and 196 of 5×10^5 PBMCs at pre- and post-vaccination, respectively. The results of the comparison of the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs before vaccination and after vaccination in all patients are shown in Table 1 and Figure 1(b). GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs were clearly detected in four and 14 of the 14 patients at pre- and post-vaccination, respectively. The frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination (mean, 96; range, 5–441) was significantly larger than that before vaccination (mean, 6.5; range, 0–43) ($P < 0.01$). An increase in GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs was found in 12 (86%) of the 14 patients, except in two cases (patients A2-1 and A2-4). These results suggest that GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide vaccination can induce an increase in GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs in HCC patients. Moreover, we compared the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination for each dose of peptide injected. We found that the maximum value of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination was significantly correlated with the dose of the peptide injected ($P = 0.0166$, $r = 0.665$) (Fig. 1c).

Establishment of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTL clones by three different methods. To further investigate the ability of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs induced by peptide vaccination to recognize an antigen, we established CTL clones from PBMCs of three vaccinated patients (patients A2-8, A2-9, and A2-14) by three different methods (Fig. 2). A representative clone from each patient is shown. In patient A2-9 (Fig. 2a), the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs was 50 of 5×10^5 PBMCs 1 month after the third vaccination, as determined by *ex vivo* ELISPOT assay, and 14 days after the *in vitro* stimulation with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide. Dexramer assay was carried out. The population of CD8⁺ GPC3 Dexramer⁺ cells was 2.6% of all stimulated cells. These cells were sorted to a single cell in each well of a 96-well plate. Twenty-one days after cell sorting, peptide specificity was examined by Dexramer assay. The established CTL clone was CD8⁺ GPC3 Dexramer⁺ cells (99.7%) which did not react with HIV-Dexramer as a negative control (Fig. 2a).

We next attempted to sort from small populations of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs without *in vitro* culture. In patient A2-14 (Fig. 2b), the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs was 329 of 5×10^5 PBMCs 2 weeks after the third vaccination, as determined by *ex vivo* ELISPOT assay; CD8⁺ GPC3 Dexramer⁺ cells could be clearly detected in 0.1% of PBMCs. CD8⁺ GPC3 Dexramer⁺ cells were directly sorted to a single cell from PBMCs without *in vitro* stimulation. The established CTL clone was CD8⁺ GPC3 Dexramer⁺ cells (99.9%) which did not react with HIV-Dexramer (Fig. 2b).

Finally, to establish high avidity and tumor-reactive CTLs from a heterogeneous population, we attempted to sort the population of CD8⁺ T cells which mobilized CD107a in response to naturally GPC3-expressing HepG2 cells. In the PBMCs from

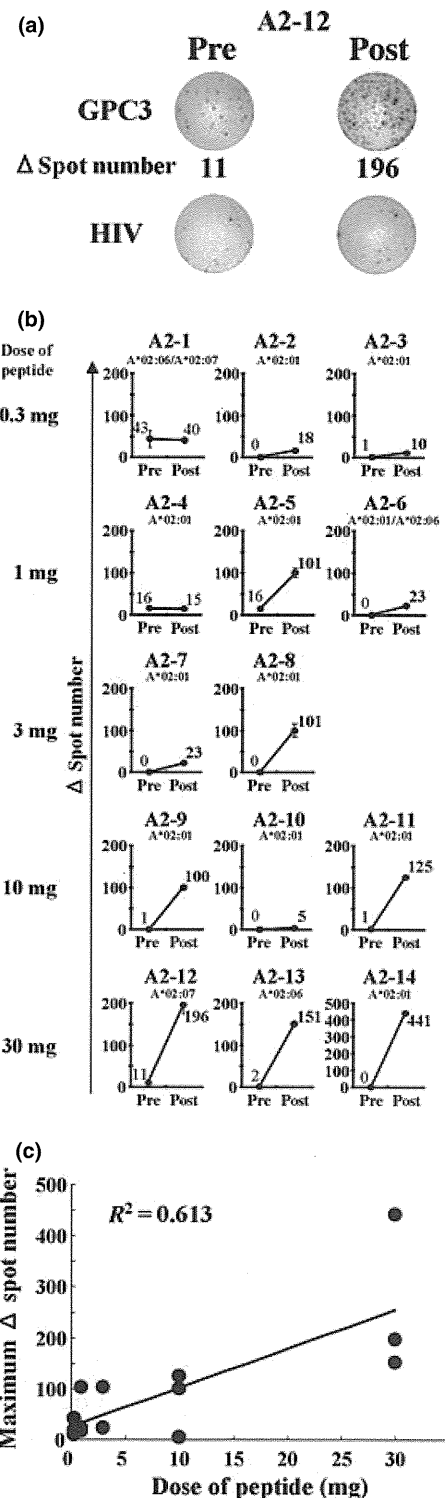


Fig. 1. Changes in the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs before and after vaccination. Direct *ex vivo* γ -interferon enzyme-linked immunospot assay of PBMCs (5×10^5) was carried out. The Δ spot number indicates the number of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs calculated by subtracting the spot number in a well of HIV₁₉₋₂₇ peptide. (a) Representative result showing the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs pre- and post-vaccination. (b) Changes in the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs before and after vaccination in all patients (A2-1–14). An increase in GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs was observed in 12 (86%) of 14 patients. (c) The maximum number of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs after vaccination was significantly correlated with the dose of the peptide injected ($P = 0.0166$, $r = 0.665$).

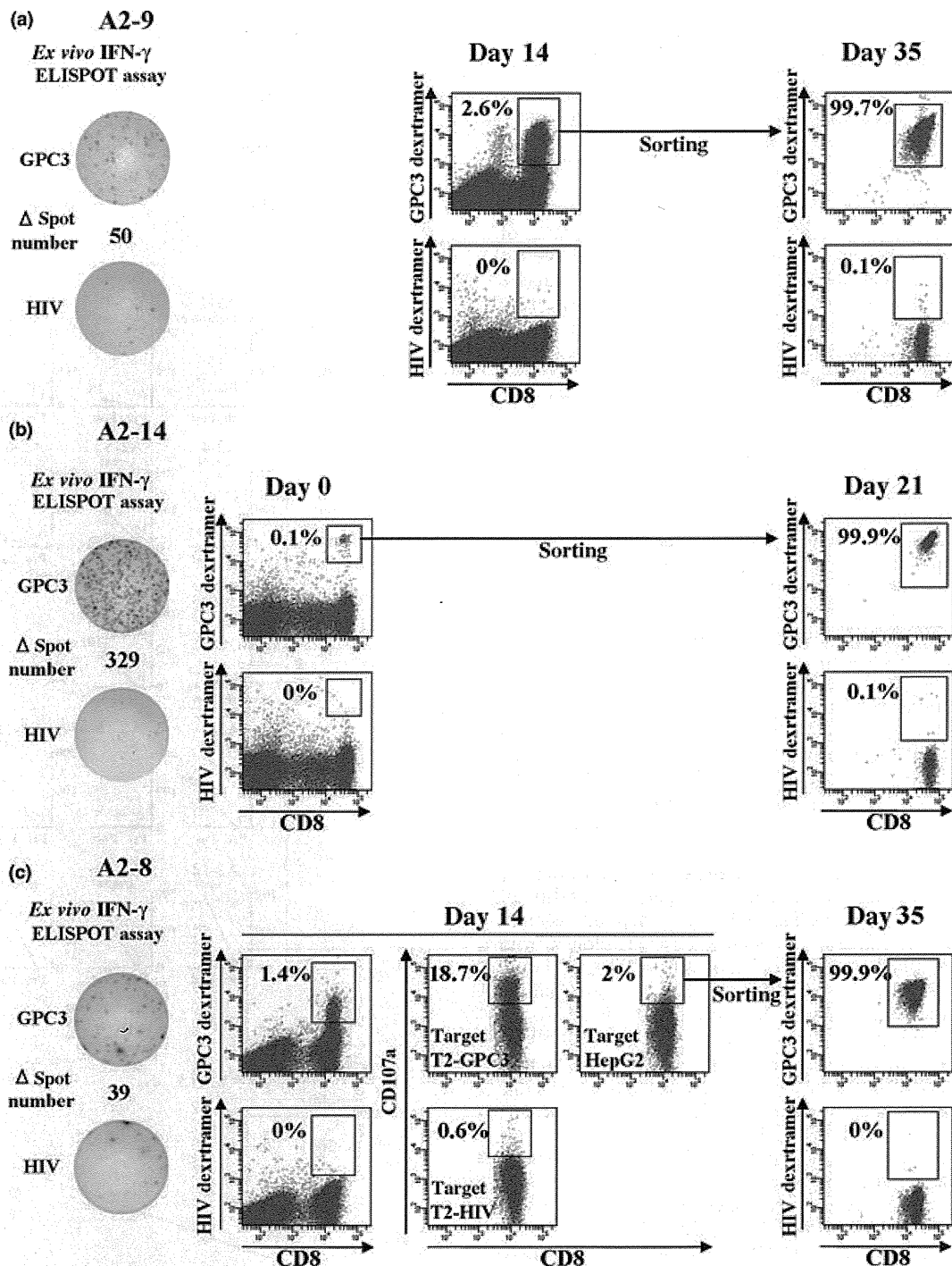


Fig. 2. Establishment of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTL clones by three different methods. Left panels show the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs in the PBMCs used, as established by *ex vivo* interferon (IFN)- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. (a) The PBMCs of patient A2-9 were stimulated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide *in vitro* for 14 days. The population of CD8⁺ GPC3 Dextramer⁺ cells was sorted to a single cell. (b) CD8⁺ GPC3 Dextramer⁺ cells were directly sorted to a single cell from PBMCs of patient A2-14 without *in vitro* stimulation. (c) The PBMCs of patient A2-8 were stimulated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide *in vitro* for 14 days. CD8⁺ CD107a⁺ cells that reacted against HepG2 were sorted to a single cell. Right panels show Dextramer analysis of the established clones 21 days after cell sorting.

patient A2-8 (Fig. 2c), the frequency of GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide-specific CTLs was 39 of 5×10^5 PBMCs 1.5 months after the third vaccination, as determined by *ex vivo* ELISPOT assay, which were stimulated with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide *in vitro*. After 14 days, the population of CD8⁺ GPC3 Dextramer⁺ cells was 1.4% of all stimulated cells. We incubated CD8⁺ T cells with T2

pulsed with GPC3₁₄₄₋₁₅₂, HIV₁₉₋₂₇ peptide, or HepG2. Approximately 2% and 18.7% of CD8⁺ T cells mobilized CD107a in response to HepG2 and T2 pulsed with GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide, respectively, but not in response to T2 pulsed with HIV₁₉₋₂₇ peptide. CD107a⁺ CD8⁺ cells that reacted against HepG2 were sorted to a single cell. The established clone was CD8⁺ GPC3