

20114023B

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 21～23 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
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	5
研究代表者 中面 哲也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

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 21 年度）

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	中面 哲也	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	室長
研究分担者	小西 大 小菅 智男 奥坂 拓志 國土 典宏 石井 浩 有賀 淳 斎田 俊明 高田 実 (H22年1月まで) 木庭 幸子 (H22年2月より) 尹 浩信 中川原 章 原 純一 熊谷 昌明 真部 淳 木下 義晶 吉川 史隆 永井 完治 佐藤 昇志	国立がんセンター東病院 上腹部外科 国立がんセンター中央病院 国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 胆・膵臓科 東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 癌研究会 有明病院 消化器内科 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 信州大学医学部 皮膚科 信州大学医学部 皮膚科 信州大学医学部 皮膚科 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 千葉県がんセンター 大阪市立総合医療センター 国立成育医療センター 固形腫瘍科 聖路加国際病院 小児科 九州大学大学病院 小児外科 名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 国立がんセンター東病院 呼吸器外科 札幌医科大学医学部 病理学第一講座	手術部長 副院長 医長 教授 副部長 教授 特任教授 准教授 助教 教授 センター長 副院長 医長 医長 助教 教授 内視鏡部長 教授
研究協力者	木下 平 古瀬 純司 池田 公史 若林 剛 山崎 直也 松下 茂人 福島 聡 孝橋 賢一 藤本純一郎 水野 正一	国立がんセンター東病院 杏林大学医学部 腫瘍内科 国立がんセンター東病院 肝胆膵内科 岩手医科大学 外科学講座 国立がんセンター中央病院 第二領域外来部 皮膚科 鹿児島大学大学院 皮膚科 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 九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 国立成育医療センター 研究所 国立健康・栄養研究所	副院長 教授 医長 教授 医長 講師 助教 医員 副所長 プロジェクト リーダー

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 22 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 小菅 智男 小西 大 池田 公史 古瀬 純司 國土 典宏 石井 浩 建石 良介 若林 剛 有賀 淳 斎田 俊明 木庭 幸子 山崎 直也 尹 浩信 中川原 章 原 純一 熊谷 昌明 (H22. 11 月まで) 塩田 曜子 (H22. 12 月から) 真部 淳 木下 義晶 孝橋 賢一 吉川 史隆 永井 完治 佐藤 昇志 水野 正一	国立がん研究センター東病院 国立がん研究センター中央病院 国立がん研究センター東病院 消化管腫瘍科 国立がん研究センター東病院 肝胆膵腫瘍科 杏林大学医学部 腫瘍内科 東京大学医学部附属病院 肝胆膵外科・人工臓器移植外科 癌研究会有明病院 消化器内科 東京大学医学部附属病院 消化器内科 岩手医科大学 外科学講座 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 信州大学医学部 皮膚科 信州大学医学部 皮膚科 国立がん研究センター中央病院 皮膚腫瘍科 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 千葉県がんセンター 大阪市立総合医療センター 国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 聖路加国際病院 小児科 九州大学大学院医学研究院 小児外科分野 九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学 名古屋大学大学院医学系研究科 産婦人科 国立がん研究センター東病院 呼吸器腫瘍科 札幌医科大学医学部 病理学第一講座 国立健康・栄養研究所	副院長 副院長 科長 副科長 教授 教授 副部長 助教 教授 教授 特任教授 助教 科長 教授 センター長 副院長 医長 医員 医長 准教授 助教 教授 科長 教授 プロジェクト リーダー
研究協力者	松下 茂人 福島 聡 藤本 純一郎	鹿児島大学大学院 皮膚科 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 国立成育医療研究センター 臨床研究センター	講師 助教 センター長

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. 総合研究報告

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

国立がんセンター東病院において進行肝細胞がん患者を対象に GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施して、ワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認してきた。現在までに様々ながん拒絶抗原ペプチドが同定され、国内外においてそれらを用いた様々な臨床試験が実施されているが、その有効性は未だ明らかでない。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が散見されるが、その中でも GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の結果は、十分がん治療薬としての可能性を期待させる。現時点ではがん治療薬として承認されている例は無く、本研究は、GPC3 ペプチドワクチンの創薬化を一気に加速するために、肝細胞がんを中心として GPC3 を発現する悪性黒色腫、小児がん、卵巣がん、肺扁平上皮がんを対象に GPC3 ペプチドワクチン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、GPC3 ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、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。その結果、本研究期間内に製薬企業への導出が実現した。

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。本研究期間内には、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は実施できなかったが、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。

その一方で、ペプチドワクチン療法単独ではまだ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の臨床応用を目指した基礎研究も実施した。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。

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、多くの患者に適應できる 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。

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を期待される。

研究分担者 (研究分担者時の所属、職名で記載)

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
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
奥坂 拓志	国立がんセンター中央病院 第一領域外来部 胆・膵臓科 医長
有賀 淳	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授
高田 実	信州大学医学部皮膚科 准教授
熊谷 昌明	国立成育医療研究センター 固形腫瘍科 医長
水野 正一	国立健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー

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
藤本純一郎	国立成育医療研究センター 臨床研究センター センター長

A. 研究目的

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 GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施して、ワクチンの安全性と免疫学的有効性ならびに臨床効果を確認してきた。

本研究は、肝細胞がんを中心として GPC3 を発現する悪性黒色腫、小児がん、卵巣がん、肺扁平上皮がんを対象に GPC3 ペプチドワクチン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、GPC3 ペプチドワクチンの大手製薬企業への導出、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する。

現在までに様々ながん拒絶抗原ペプチドが同定され、国内外においてそれらを用いた様々な臨床試験が実施されているが、その有効性は未だ明らかでない。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が散見されるが、その中でも GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の結果は、十分がん治療薬としての可能性を期待させる。現時点ではがん治療薬として承認されている例は無く、本研究により、GPC3 ペプチドワクチンの創薬化を一気に加速したい。

その一方で、ペプチドワクチン療法単独ではまだ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。

B. 研究方法

[平成 21 年度]

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

進行肝細胞がんを対象とした臨床第 I 相試験を完了させ、その結果を基に、進行がんを対象とした有効性を証明するための適切な第 II 相試験のプロトコルを皆で議論して作成する。

○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。

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。
- ・ 副次評価項目
①有害事象の種類と発現率。
②免疫学的モニタリングによる末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の頻度の増加の評価。

II. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、悪性黒色腫における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した。

III. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

小児がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床試験の意義を見出すことを目的に、様々な小児がんにおける GPC3 蛋白質の発現を検討した。

IV. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性卵巣腫瘍における GPC3 遺伝子および蛋白質がどの程度発現しているのかを基礎的および臨床的に検討した後、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て倫理委員会に申請する。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

GPC3 ペプチドワクチンを肺の扁平上皮がんへも臨床応用すべく、切除検体のパラフィンブロックを用い、肺扁平上皮がんにおける GPC3 発現を免疫組織学的に検証した。

また、札幌医大との共同研究で、HLA-A2 トランスジェニックマウスならびにヒトの末梢血単核球を用いて、新規肺がん抗原 Lengsin の HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定を試みた。

[平成 22 年度]

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 相試験の結果の解析
- (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
 - ・ 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。
 - ・ 副次評価項目
①有害事象の種類と発現率。

②免疫学的モニタリングによる末梢血中の GPC3 ペプチド特異的 T 細胞の頻度の増加の評価。

(3) 進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 II 相試験

完了した臨床第 I 相試験の結果をふまえ、有効性を証明するための適切なプロトコールを作成して、倫理審査委員会承認後に実施する。

(4) 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

現在進行中の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 相試験を参考にプロトコールを作成した。

II. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて、悪性黒色腫細胞株 (HLA-A0201 陽性 GPC3 陽性である CRL1579 および 526me1、GPC3 陽性 HLA-A0201 陰性である MM-LH に対して HLA-A0201 遺伝子を導入した MM-LH. A2 の 3 株) に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

悪性黒色腫 5 例を対象として、GPC3 の蛋白質発現を免疫組織染色 (パラフィン切片) で確認した。同時に、悪性黒色腫の抗原である gp100, Melan-A とマクロファージのマーカーである CD68, CD204、さらには我々が悪性黒色腫に発現するがん抗原として見出している HSP105, SPARC のタンパク質発現も免疫組織染色で確認した。

III. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて、腎芽腫細胞株 (G-401) および肝芽腫細胞株 (Huh-6) に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

また、国立がん研究センター中央病院が参画し、実施施設も増やして、データセンターに委託する方針に変更して研究計画書を改正して倫理審査委員会に出しなおした。

IV. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

卵巣明細胞腺がん患者を対象とした臨床第 II 相試験をスタートさせた。臨床試験にてペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者 4 症例 (進行群 2 例および寛解群 2 例) における免疫学的モニタリングを Ex vivo IFN- γ ELISPOT assay にて行

った。また、国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対する反応および細胞傷害性の検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

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。

また、札幌医大との共同研究で、HLA-A2 トランスジェニックマウスならびにヒトの末梢血単核球を用いて、新規肺がん抗原 Lengsin の HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定を試みた。

VI. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、Dextramer ソート、Ex vivo Dextramer ソート、CD107a ソートの 3 通りの方法から、FACSaria を使用したシングルセルソートにより CTL クローンを作製した。

新規 CTL 誘導法により GPC3 ペプチド特異的 CTL を誘導し、*in vitro*、*in vivo* のアッセイを実施した。

VII. 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

in vitro において、標的細胞にペプチドをパルスすることによりペプチド特異的 CTL の反応が高まることを IFN γ ELISPOT 法および細胞傷害性試験により確認した。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 上に載ることを確認するために、免疫不全マウスに接種したがん細胞株の皮下腫瘍内部にペプチド溶液を注入し、その後腫瘍を摘出、がん細胞を分散単離して IFN γ ELISPOT 法を行った。また、免疫不全マウスの皮下腫瘍にペプチドを注入し、その後ペプチド特異的 CTL を注入して腫瘍の増殖に与える影響について観察した。C57BL/6 マウスに ovalbumin (OVA) のペプチドワクチンを行って自己の OVA 特異的 CTL を体内に誘導したうえで、OVA 非発現がん細胞株の皮下腫瘍に対する OVA ペプチド腫瘍内注入の抗腫瘍効果と副作用につき観察した。

[平成 23 年度]

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

- (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

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

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

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、倫理審査委員会での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

新たな腫瘍抗原としてすでに膀胱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

[平成 21 年度]

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

進行肝細胞がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を完了した。GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたが、肝臓内の腫瘍量が多い症例にはペプチドワクチン療法が効きにくい傾向も見えてきた。手術・ラジオ波の根治的治療後の再発予防効果を検証する第 II 相試験は、国立がんセンター倫理審査委員会承認後に開始した。順調に症例登録が進んでいる。

II. 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 は悪性黒色腫にも発現はしていると考えられるが、その発現程度は肝細胞がん比べると低い可能性が示唆された。

III. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍での GPC3 蛋白質発現が再確認できた。神経芽腫やその他の小児がんの中でも GPC3 発現陽性のがんが存在する可能性が示唆された。

IV. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

これまでの悪性卵巣腫瘍における免疫染色による GPC3 発現の報告と比較しても同様な結果（胚細胞腫瘍では卵黄嚢腫瘍においてほぼ 100%発現、上皮性卵巣がんのうちでは明細胞腺がんが有意に発現頻度が高く、ほぼ半数で GPC3 発現）が得られた。

明細胞腺がんでは①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群（adjuvant 症例）、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とし、卵巣卵黄嚢腫瘍は再発・進行症例のみを対象として GPC3 ペプ

チドワクチン療法の臨床試験のプロトコールを作成して、名古屋大学医学部倫理審査委員会に申請した。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

文献同様、我々の検討でも、約半数の肺扁平上皮がんにおいて GPC3 蛋白の発現を認めた。札幌医大との共同研究で新規肺がん抗原 Lengsin の HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープを同定した。

[平成 22 年度]

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) 30mg、3回投与の1例に腫瘍の縮小や消失などの著明な臨床効果（PR）が出現したが、この症例では末梢血中のGPC3ペプチド特異的CTLの増加も顕著であり、免疫染色においてもGPC3とHLA class Iの発現も認めた。一方、最も末梢血中にGPC3ペプチド特異的CTLが検出された同じく30mg、3回投与の症例では短期での臨床効果が見出せずPDであったが、この症例は免疫染色でGPC3もHLA class Iの発現も認めなかった。
- (2) 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40例登録完了を目指す。
- (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を倫理審査委員会に申請し、承認され、スタートした。
- (4) 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多施設共同ランダム化比較試験を計画し、倫理審査委員会に申請した。近々承認予定で、承認後は東病院でスタートし、その他の施設では各施設のIRB承認後に体制が整い次第スタートする予定である。予定登録数：84例（各群42例）。主要評価項目は、全生存期間。データセンターに委託して臨床試験の質を確保した。
- (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相試験を計画し、倫理審査委員会に申請した。主要評価項目は、治療対象標的病変以外の新病変出現抑制効果としての2年再発率。

II. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは悪性黒色腫細胞株に対して IFN- γ ELISPOT assay において、GPC3 特異性および HLA-class I 拘束性を示した。また、HLA-A0201 陽性および GPC3 陽性である悪性黒色腫細胞株（CRL1579 および

526mel) に対して細胞傷害活性を示した。肝細胞がん細胞株を含む様々ながん細胞株での GPC3 発現量と GPC3 ペプチド特異的 CTL クロンの免疫応答についての検討では mRNA レベル、タンパクレベル共に GPC3 の発現量に左右される結果であった。

GPC3 免疫染色の結果 5 例とも、gp100, Melan-A 陽性の悪性黒色腫細胞には明らかな発現を認めず、悪性黒色腫の先進部の CD68, CD204 陽性のマクロファージ様細胞 (メラノファージ) に GPC3 の発現を認めた。HSP105, SPARC はメラノファージも陽性であったが、悪性黒色腫細胞にも発現を認めた。一方、メラノファージには Melan-A も発現していた。

III. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

G-401 および HuH-6 においても HLA class I の発現低下が認められたが、IFN- γ 刺激によってその発現は上昇がみられた。HLA class I 発現量の低下が認められるものの用いた HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クロンは G-401 および HuH-6 に対して IFN- γ ELISPOT assay において、GPC3 特異性および HLA-class I 拘束性を示した。また、G-401 に対して細胞傷害活性を示した。

各種小児がんに対する GPC3 由来 ペプチドワクチン療法の臨床第 I 相試験の研究計画書が近々国立がん研究センター倫理審査委員会承認される予定である。

IV. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

卵巣明細胞腺がん患者のうち、①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とした臨床第 II 相試験をスタートさせた。臨床試験にてペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者 4 症例 (進行群 2 例および寛解群 2 例) における免疫学的モニタリングを Ex vivo IFN- γ ELISPOT assay にて行った。また、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験に参加した HLA-A0201 陽性患者から国立がん研究センター東病院機能再生室で樹立した HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クロンの用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対する基礎的検討を IFN- γ ELISPOT assay および細胞傷害性試験により行った。

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、問題点を指摘され、現在研究

計画書を改定中である。

Lengsin 由来 HLA-A*0201 結合性ペプチドを 4 種類選択し、まず HLA-A*0201 トランスジェニック (HHD) マウスに免疫し、ペプチドの免疫原性を評価した。4 種類のうち、2 種類のペプチド (Lengsin(206-215), Lengsin(270-279)) で、ペプチド特異的 CTL が HHD マウスにて誘導された。2 種類のペプチド各々に対する特異的な CTL クローンが樹立された。Lengsin 遺伝子導入した HLA-A*0201 陽性細胞株や、内在性 Lengsin 陽性肺がん細胞株に HLA-A*0201 遺伝子導入した安定細胞株を標的細胞として認識するかどうか検討したところ、Lengsin(270-279) 特異的 CTL クローンのみ、標的細胞を認識し、細胞傷害性を発揮することが確認できた。以上の結果より、Lengsin(270-279) は、ヒト末梢血単核球で CTL が誘導可能であり、かつ肺がん細胞表面に内在性提示されるペプチドであることが示唆された。

VI. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

3 通りの方法で CTL クローンを樹立した。これらの CTL クローンは高親和性で HLA-A*02:01 陽性、GPC3 陽性肝癌細胞株に対して IFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。しかし、GPC3 弱陽性のメラノーマ細胞株 526mel に対しては、最も高親和性である A2-8 クローン (10-11 M) のみが IFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。さらに、CTL クローンの IFN- γ 産生及び細胞傷害性は、抗 HLA-A2 抗体、抗 HLA-class I 抗体により抑制された。また、GPC3-siRNA 導入により肝癌細胞株 HepG2 の GPC3 発現量を低下させることで CTL クローンの IFN- γ 産生は抑制された。

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~ 6.1×10^7 個、増加率:490 倍~170,000 倍) ことが確認された。in vivo 試験において、NOD/Scid マウスの系で CTL の抗腫瘍効果を評価した結果、GPC3 特異的 CTL と $\gamma \delta$ T 細胞、それぞれに起因する抗腫瘍効果が確認できた。また培養前の PBMC の情報から細胞の増え方の予測が可能となる因子の探索を行った。Day0 の ex vivo ELISPOT アッセイによる IFN γ 産生細胞数と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。また Day0 の $\gamma \delta$ T 細胞率と Day14 の Dextramer 陽性細胞率との間に相関性が確認された。

VII. 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

ELISPOT 法および細胞傷害性試験にて、GPC3 非発現がん細胞株に対しては GPC3 ペプチド特異的 CTL は反応を示さないが、がん細胞株にペプチドパルス

を行った後では強い CTL 反応が確認された。一方、GPC3 発現がん細胞株に対してはペプチドパルス前でもある程度の CTL 反応が確認されたものの、ペプチドパルス後にはそれが著明に増強した。この結果は CMV ペプチドと CMV ペプチド特異的 CTL クローンを用いても同様に観察された。

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た。

また、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、一方、副作用は確認されなかった。

[平成 23 年度]

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 相試験の免疫学のおよび予後解析

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。健常人 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未染色標本に対して 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 \pm 397 日、無増悪生存期間は、190 日 \pm 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 \pm 367 日、無増悪再発期間は 216 日 \pm 317 日であり、両群に有意差は認めなかった。

D. 考察

[平成 21 年度]

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

遠隔転移の 1 例に著明な腫瘍縮小効果を認めたものの、最も末梢血中に GPC3 ペプチド特異的 CTL が検出された症例では臨床効果が見出せなかった。なぜ効いたのか、なぜ効かなかったのかの解析も今後の課題として残された。現在計画中の進行肝細胞がんに対する臨床第 II 相試験において有効性を見出すためには、やはりプロトコールが重要であると考えられ、内科外科の先生方と議論を重ねているところである。ペプチドワクチン療法単独ではまだ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することも必要と考えられた。一方で、再発予防効果を検証する臨床第 II 相試験は順調に症例集積がなされており、結果が期待されるところである。

II. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫において、GPC3 mRNA 発現の陽性率は高いが、発現量としては肝細胞がんほど多くなく、蛋白質レベルでは明らかな強陽性の頻度が低く、全体的にみても発現量が低く、腫瘍組織中のごく一部の腫瘍細胞しか発現していない可能性も示唆された。この結果では、肝細胞がんと同様には GPC3 ペプチドワクチン療法の有効性を見出せない可能性

が高いと考えられた。我々は、悪性黒色腫に発現する有望な腫瘍抗原として、その他にも HSP105 や SPARC を同定しており、今後はそれらの抗原も含めて、悪性黒色腫に有望なペプチドワクチン療法のプロトコルの作成を目指す。

Ⅲ. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍での GPC3 蛋白質発現はほぼ確実であり、GPC3 ペプチドワクチン療法への応用は問題ないと考えられるが、神経芽腫においては、mRNA レベルでは GPC3 の発現が確認できるものの蛋白質レベルでは明らかに強い発現が確認できておらず悪性黒色腫と同じような状況になっている。ELISA においては良性腫瘍も含む様々な小児の腫瘍で血清中の GPC3 蛋白質陽性の頻度が極めて高く、今後は健常小児の血清中に GPC3 は検出されないのか、さらには生まれたばかり、あるいは1-2歳児の正常臓器に GPC3 が発現していないことを確認する必要がある。

Ⅳ. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

現在、卵巣がんの標準的初回化学療法は TC 療法（タキソール+カルボプラチン）であり、再発症例においても化学療法が卵巣がん治療の中心となっているが、明細胞腺がんは抗がん剤抵抗性であり、予後不良な組織亜型であることが認識されているため、組織特異的な臨床試験を通じてより効果的な新規治療法を評価すべきである。GPC3 ペプチドワクチン療法の効果が期待される。

Ⅴ. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

今後は肺扁平上皮がんにおける GPC3 陽性と臨床病理学的項目や予後との相関について検討を行い、肺扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を計画する。

新規肺がん抗原 Lengsin については、さらなる解析を行う。

[平成 22 年度]

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

進行肝細胞がんにおいては、ペプチドワクチン投与後に CTL ががんの中に入るかを検討する臨床試験と、ソラフェニブとの併用効果を検討するランダム化比較試験を実施する。また、再発しやすい肝細胞がんの再発予防を目的とした臨床試験としては、現行の切除後、ラジオ波後の臨床試験に加え、新たに陽子線治療との併用の臨床試験を計画した。

Ⅱ. 悪性黒色腫を対象としたペプチドワクチン療法の開発

悪性黒色腫の先進部のマクロファージ様細胞（メラノファージ）が悪性黒色腫の悪性度に関与しているという報告も散見されるが、これらに GPC3 が発現しているのは興味深く、今後の検討課題である。

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。しかし、GPC3 タンパクの悪性黒色腫細胞での発現がはっきりしない今までの結果では積極的に 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。GPC3 発現量の比較的低い悪性黒色腫については腫瘍抗原の発現回復や CTL による免疫応答増強を期待できるような併用療法や GPC3 以外の HSP105 や SPARC などの腫瘍抗原も標的とすることにより有用なペプチドワクチン療法の開発につながる可能性が考えられた。

Ⅲ. 小児がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

小児がんには多彩な組織型が存在するが、総じて HLA class I 発現量が低下している。引き続き小児がんにおける GPC3 発現の程度を評価していくとともに、ペプチドワクチン療法の有効性を期待しうるのに十分な HLA class I 発現量を検討していく必要があると考えられた。ペプチドワクチン療法は副作用が少ないため他のさまざまな療法との併用も期待される。腫瘍抗原および HLA class I 発現量の上昇や CTL による免疫応答増強を期待できるような併用療法を検討することにより有用なペプチドワクチン療法の開発につながると考えられた。

時間はかかったが、実施体制も強力になり、いよいよ来年度から小児がんに対して多施設で GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を実施できる見込みとなった。

Ⅳ. 卵巣明細胞腺がんおよび卵巣卵黄嚢腫瘍を対象としたペプチドワクチン療法の開発

現在までの登録症例は 8 例と少数例ではあるが、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。GPC3 発現量と GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの免疫応答について相関関係が認められたことから、臨床試験に用いている HLA-A2 の GPC3 ペプチドについては、HLA-A2 陽性の GPC3 陽性がん細胞から内因性に提示される本ペプチド量は、GPC3 自体の発現量を調べることで推測されうると考えられ、今後、GPC3 の発現量を基準に HLA-A2 の GPC3 ワクチンの不適格患者を選別することや、治療効果を予測する一指標として検討することの基礎的根拠となるかと考えられた。現在、卵巣がんの標準的初回化学療法は TC 療法（タキソール+カルボプラチン）であり、再発症例においても化学療法が卵巣がん治療の中心と

なっているが、ペプチドワクチン療法は副作用が少ないため他のさまざまな療法との併用も期待される。subtoxicな抗がん剤用量での前治療と GPC3 特異的 CTL の併用によって細胞傷害性に上乗せ効果が得られたことから、卵巣がん generally に使用される抗がん剤のうち、低用量であっても CTL 療法との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明らかにできれば、副作用などで抗がん剤の減量を余儀なくされたような卵巣がん患者に対しては早期の臨床応用が期待できるのではないかと考えられた。卵巣明細胞腺がんの GPC3 ペプチドワクチン臨床第Ⅱ相試験における対象には、抗がん剤併用群も設定されており、現在の卵巣がん治療をふまえて有効性を検証できるプロトコールとなっていることもあり、その作用機序を含め今後の追加解析を計画している。

V. 肺がんを対象としたペプチドワクチン療法の開発

倫理審査委員会の指摘を受けて、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相試験の研究計画を改定中である。

新規肺がん抗原 Lengsin 由来ペプチド Lengsin(270-279)は、肺がんに対するペプチドワクチン療法を含む免疫療法の新たな標的として有用であると考えられた。

VI. 新規 CTL 誘導法による GPC3 ペプチド特異的 CTL 療法の開発

GPC3-siRNA 導入による解析から、GPC3 特異的 CTL クローンは癌細胞から内因性に提示された GPC3 に由来するペプチドを認識し、細胞を傷害しうることが示唆された。Dextramer ソートにより樹立した CTL クローンは、GPC3 陽性の肝癌細胞株を傷害したが、GPC3 弱陽性の 526mel は認識できなかった。より高い親和性の CTL クローンを樹立するために CD107a ソートを行い、Dextramer ソートよりもさらに親和性が高く、526mel も傷害できる CTL クローンが樹立された。このことより、GPC3 発現量の低い癌細胞を傷害するには、より高い親和性が必要であると考えられた。

新規 CTL 培養法により、簡便な方法で約 50ml の採血量で細胞移入療法を行う数の CTL を誘導できる可能性が見込まれた。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。今回行った新規 CTL 誘導法においても、細胞の増加率には個人差があるが、培養前の PBMC から予測できる可能性が見込まれた。今後細胞が増殖しにくい患者に対して細胞が

増殖する培養条件を検討し、培養前の予測と至適培養条件を組み合わせるオーダーメイド細胞療法を確立することにより、より多くの患者に適応できる治療につながる可能性があると考えられる。

さらに、別の研究として行っている TCR 遺伝子導入細胞移入療法については、GPC3 ペプチドワクチン投与患者 PBMC から HLA-A2⁺, GPC3⁺癌細胞株を傷害し得る GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを複数樹立した。現在、CTL クローンからの TCR 遺伝子のクローニングが完了しており、TCR 遺伝子導入細胞移入療法へ向けた検討を行っている。

VII. 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

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、このペプチド腫瘍内注入が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して臨床応用を目指すうえでは、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腫瘍効果を生じることが重要であり、現在、抗原 spreading に関する追加実験を行っている。

[平成 23 年度]

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。

C57BL6 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、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。

E. 結論

[平成 21 年度]

進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの臨床第Ⅰ相試験により、GPC3 を標的とするペプチドワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認することができただけでなく、臨床的効果も見出すことができた。

今後の臨床第Ⅱ相試験において、進行肝細胞がんへの効果だけでなく、根治的治療後の再発予防効果に期待している。

悪性黒色腫においては、GPC3 の発現程度は肝細胞がんに比べると低い可能性が示唆された。今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドを標的とした免疫療法の開発を目指す。

小児がんにおいては、肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫瘍以外にも GPC3 発現陽性の様々な小児がんが存在する可能性が示唆された。GPC3 発現小児がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験の計画、実施を目指す。

卵巣がんにおいては、明細胞腺がんでは、①初回治療終了後、臨床的寛解が得られている寛解群 (adjuvant 症例)、②初回治療後の残存腫瘍に対して Second-line 化学療法を予定されている非寛解群、③今後化学療法施行予定のない再発・進行群の 3 群を対象とし、卵巣卵黄嚢腫瘍は再発・進行症例のみを対象としてプロトコールを作成し、倫理審査委員会に申請した。今後の成果が期待される。

肺がんにおいては、肺扁平上皮がんの約半数に GPC3 の発現が確認された。GPC3 を発現する肺扁平上皮がんを対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法の臨床試験を計画する。

[平成 22 年度]

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て、進行肝細胞がん患者を対象とした臨床試験として 2 種類の臨床試験を計画した。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。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相試験も計画し、国立がん研究センター倫理審査委員会に申請した。

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローン

は、肝細胞がん細胞株と比較して GPC3 発現量の少ない悪性黒色腫細胞株に対しても IFN- γ ELISPOT assay にて IFN- γ の産生が確認でき、免疫応答が認められた。我々は、悪性黒色腫に発現する有望な腫瘍抗原として、その他にも HSP105 や SPARC を同定しており、今後はそれらの抗原も含めて、悪性黒色腫に有望なペプチドワクチン療法の開発を目指す。

今後は GPC3 にこだわらず HSP105 や SPARC 由来のペプチドなどを標的とした免疫療法の開発を目指す。

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンは、他がん腫細胞株と比較して HLA class I 発現量の少ない小児がん細胞株に対しても GPC3 特異的な免疫応答が認められた。今後の臨床試験の結果が期待される。

卵巣明細胞腺がんに対する GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 II 相試験において科学的エビデンスを創出しうるためには、卵巣がん標準治療をふまえたプロトコールが必要であると考えられる。2010 年より名古屋大学医学部附属病院において、「卵巣明細胞腺がんに対する 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 II 相試験」を実施している。

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倫理審査委員会からの指摘を受け、改定中である。札幌医大との共同研究で肺がん免疫療法に応用可能な、新規肺がん抗原 Lengsin 由来 HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープを同定した。

樹立した CTL クローンの解析により、GPC3 特異的 CTL は GPC3 ペプチドに対して高親和性であり、HLA-class I 拘束性かつ GPC3 特異的に癌細胞を傷害しうることが示された。

新規 CTL 誘導法、及び TCR 遺伝子導入細胞移入療法より、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。

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。

[平成 23 年度]

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

[平成 21 年度]

- 1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int J Oncol*. 34:649-656, 2009.
- 2) Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep*. 22:149-54, 2009.
- 3) Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 100(8):

- 1403-1407, 2009.
- 4) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 126(9): 2153-63, 2010.
 - 5) Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura T. Identification of β 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol Rep*. 23(5):1325-1330, 2010.
 - 6) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 125:2854-2862, 2009.
 - 7) Okusaka T, Kasugai H, Shiroyama Y, Tanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial. *J Hepatol*. 51(6): 1030 -1036, 2009.
 - 8) Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*. 115(11):2491-2504, 2009.
 - 9) Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T. NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer Res*. 69(6):2647-2654, 2009.
 - 10) Lin J, Takata M, Murata H, Goto Y, Kido K, Ferrone S, Saida T. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst*. 101(20):1423-1427, 2009.
 - 11) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Haruta M, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J Immunotherapy*. 32(3):219-231, 2009.
 - 12) Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Sakai R. Distinct role of ShcC docking protein in the differentiation of neuroblastoma. *Oncogene*. 28(5):662-673, 2009.
 - 13) Kinoshita Y, Souzaki R, Tajiri T, Ieiri S, Hashizume M, Taguchi T. A preoperative evaluation for neo-infantile liver tumors using a three-dimensional reconstruction of multidetector row CT. *Oncol Rep*. 21(4):881-886, 2009.
 - 14) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Tanaka S, Koga Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Hara T, Taguchi T. Risks and benefits of ending of mass screening for neuroblastoma at 6 months of age in Japan. *J Pediatr Surg*. 44(12): 2253-2257, 2009.
 - 15) Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Mizutani S, Nawa A, Kikkawa F. The expression of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV/CD26) is associated with enhanced chemosensitivity to paclitaxel in epithelial ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci*. 101(2):347-354, 2010.
 - 16) Umezu T, Shibata K, Shimaoka M, Kajiyama H, Yamamoto E, Ino K, Nawa A, Senga T, Kikkawa F. Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 101(1):143-148, 2010.
 - 17) Shimada Y, Ishii G, Nagai K, Atsumi N, Fujii S, Yamada A, Yamane Y, Hishida T, Nishimura M, Yoshida J, Ikeda N, Ochiai A. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci*. 100(11): 2054-2059, 2009.
 - 18) Ito T, Ishii G, Nagai K, Nagano T, Kojika M, Murata Y, Atsumi N, Nishiwaki Y, Miyazaki E, Kumamoto T, Ochiai A. Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage I B squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies. *Lung Cancer*. 63(3):418-424, 2009.
 - 19) Nakatsugawa M, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Takahashi A, Inosa S, Kiriya K, Nakazawa E, Harada K, Takasi H, Tamura Y, Kamiguchi K, Shijubo N, Honda R, Nomura N, Hasegawa T, Takahashi H, Sato N. Novel spliced form of a lens protein as a novel lung cancer antigen, Lengsin splicing variant 4. *Cancer Sci*. 100(8):1485-1493, 2009.