

Table I. Patient characteristics and glypican-3-specific cytotoxic T lymphocytes.

Patient	HLA	Age (yrs.)	Gender	Etiology	Child-Pugh	No. of tumor	Tumor size (mm)	T ¹	N ¹	M ¹	AFP (<9.5 ng/ml)	PIVKA-II (<40 mAU/ml)	GPC3 expression ²	GPC3-specific CTLs ³			
														Pre	Post	Change	Δ spot ⁴
RFA1	A24	73	F	HBV	A	2	26	2	0	0	4.0	228	-	4	0	-	-4
RFA2	A24	68	M	HCV	B	1	20	1	0	0	5.0	300	+	10	24	+	+14
RFA3	A2	50	M	HCV	A	1	15	1	0	0	63.3	25	+	0	88	+	+88
RFA4	A24	79	F	HCV	A	1	10	1	0	0	484.2	30	+	0	10	+	+10
RFA5	A24	69	M	HCV	A	1	15	1	0	0	2.3	57	-	0	0	+/-	0
RFA6	A24	60	M	HCV	A	1	17	1	0	0	15.1	23	-	0	0	+/-	0
RFA7	A2	73	M	HCV	A	1	20	1	0	0	97.3	51	+	3	88	+	+85
RFA8	A2/A24	64	M	HBV/HCV	B	1	15	1	0	0	39.9	17	+	0	31	+	+31
RFA9	A2	60	M	HCV	B	1	10	1	0	0	92.0	19	-	19	15	-	-4
RES1	A24	48	M	HBV	A	1	20	1	0	0	19.7	38	+	32	15	-	-17
RES2	A24	66	F	HCV	A	1	26	2	0	0	63.4	77	+	20	3	-	-17
RES3	A24	64	M	HCV	A	2	30	2	0	0	10.1	276	+	12	0	-	-12
RES4	A2	72	M	-	A	1	60	2	0	0	9.2	1500	+	3	1	-	-2
RES5	A24	70	M	HCV	A	1	20	1	0	0	4.2	25	+	0	0	+/-	0
RES6	A24	42	M	HBV/HCV	A	2	98	3	0	0	15115.0	22477	+	50	30	-	-20
RES7	A2	75	M	-	A	1	75	2	0	0	22.8	10341	-	0	3	+	+3
RES8	A24	52	M	HCV	A	1	30	1	0	0	16.0	234	+	0	0	+/-	0
RES9	A24	60	M	HBV	A	1	30	1	0	0	15.6	23	-	0	0	+/-	0
TAE1	A2	64	M	-	A	3	30	2	0	0	10.7	98	+	0	330	+	+330
TAE2	A24	78	F	HCV	B	1	60	1	0	0	2483.0	3932	ND	34	0	-	-34
TAE3	A24	77	F	-	A	>5	35	3	0	0	180.2	11538	ND	0	3	+	+3
TAE4	A24	77	M	HCV	A	2	80	4	0	0	20014.0	241	ND	0	0	+/-	0
TAE5	A24	55	M	HBV	A	2	30	2	0	0	3.7	24	+	0	23	+	+23
TAE6	A24	77	M	-	A	>5	42	2	0	0	1407.0	1661	ND	0	20	+	+20
TAE7	A24	63	F	HCV	A	>5	32	2	0	0	640.3	270	ND	0	0	+/-	0
TAE8	A24	74	M	-	A	1	18	1	0	0	3.8	12	-	0	0	+/-	0
TAE9	A24	62	M	HCV	A	3	70	3	0	0	46.8	1907	ND	10	0	-	-10

¹Tumor stage was assigned according to the tumor-node-metastasis (TNM) classification of the Union for International Cancer Control (UICC). ²GPC3 expression was evaluated by immunohistochemical staining; +, positive; -, negative. ³Peripheral blood was taken from each patient before and after treatment, and GPC3-specific CTLs were measured by *ex vivo* interferon- γ enzyme-linked immunospot assay; +, increase; -, decrease; +/-, no change. ⁴The Δ spot was defined as the difference in the number of spots with each antigen between pre- and post-treatment. F, female; M, male; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; AFP, α -fetoprotein; PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence or antagonist II; GPC3, glypican-3; ND, not determined.

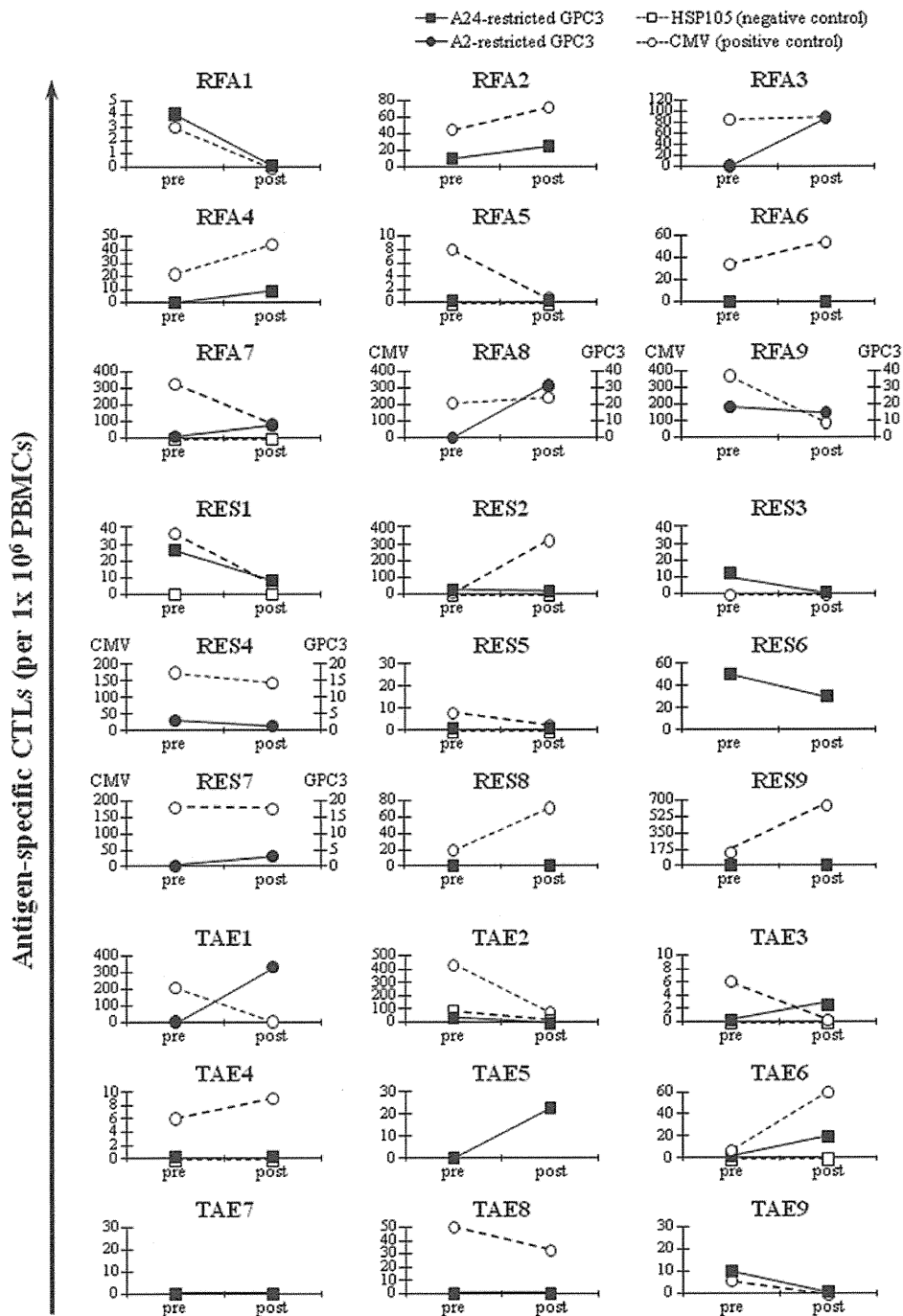


Figure 1. Kinetics of glypican-3 (GPC3)-specific CTLs between before and after treatment in each patient. A direct *ex vivo* interferon- γ enzyme-linked immunospot assay of PBMCs was performed before treatment and one month after treatment. The data are expressed as the number of interferon- γ producing cells, which indicate the CTLs specific with HLA-A24-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ peptide (EYILSLEEL) (■) or HLA-A2-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ peptide (FVGFFFTDV) (●). Heat shock protein 105 (HSP105) peptide (□) and cytomegalovirus (CMV) peptide (○) were used as the negative and positive control, respectively.

kinetics of tumor markers indicated that their treatment was effective. The frequency of GPC3-specific CTLs increased after RFA (RFA3) and TACE (TAE5), whereas it decreased after surgical resection (RES6).

RFA has the potential to strongly induce T-cell-mediated immune response: A case report. A 70-year-old woman was admitted because of recurrent HCCs. Thirteen months earlier, the patient had undergone RFA for primary HCC located in the S5/8 region of the liver. CT detected two recurrent HCCs:

one was contiguous to the previously ablated S5/8 region and the other was a distant tumor located in the S6 region. We performed surgical resection for these recurrent HCCs. Immunohistochemical examination of CD8 in the resected tumors revealed that a marked number of CD8⁺ T cells had infiltrated not only into the surrounding recurrent tumor but also into the distant recurrent tumor after RFA (Fig. 3). On the other hand, few CD4⁺ T cells were observed in these tumors (data not shown). Immunohistochemical analyses showed the expression of GPC3 and HLA class I in these tumors (data not

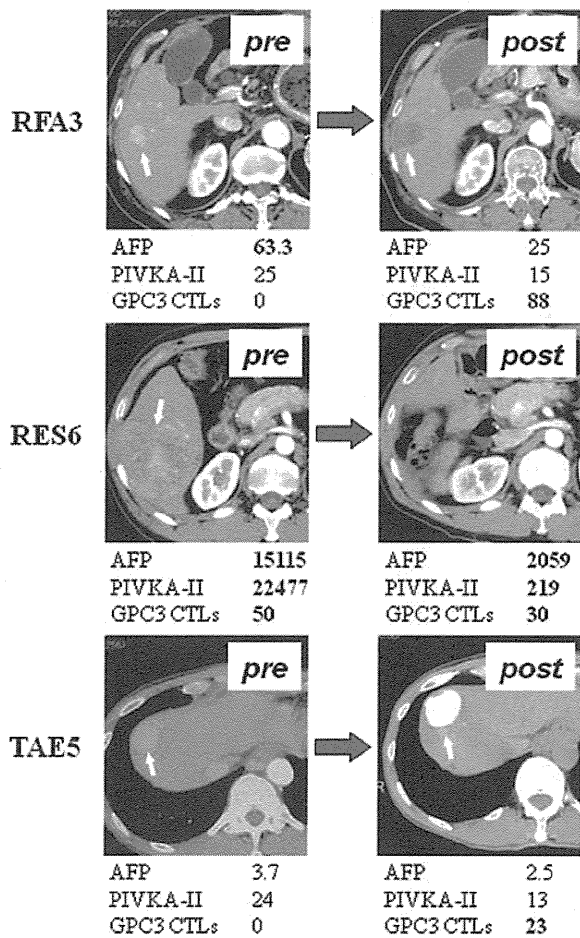


Figure 2. Changes in computed tomography images, serum levels of tumor markers, including α -fetoprotein (AFP) and protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II), and glypican-3 (GPC3)-specific CTLs in PBMCs between before and after treatment in patients RFA3, RES6, and TAE5. White arrows indicate nodules of hepatocellular carcinoma at pre- and post-treatment. The bold letters show the abnormal levels of tumor markers or the positive response of GPC3 specific CTLs.

shown). These findings suggest that RFA not only activates the immune response systemically but also induces local infiltration of CTLs into the tumors.

Analysis of immune response induced by RFA in a mouse model. The experimental schedule is shown in Fig. 4A. The IFN- γ ELISPOT assay with CD8⁺ T cells from the lymph nodes of mice demonstrated that the number of spots against both Colon 26 ($P=0.049$) and Colon 26/GPC3 ($P=0.049$) was larger after RFA compared to without treatment. On the other hand, the number of spots did not increase after surgical resection. These results suggest that RFA induced a significantly larger number of both Colon 26- and Colon 26/GPC3-reactive CTLs compared to no treatment or surgical resection (Fig. 4B).

The difference in number of spots between Colon 26 and Colon 26/GPC3 in each mouse, which represents GPC3-specific CTLs, is shown in Fig. 4C. As an effect of prior peptide vaccination, GPC3-specific CTLs were detected in the no treatment group. The frequency of GPC3-specific CTLs increased after RFA and decreased after surgical resection. As a result, the frequency of GPC3-specific CTLs after RFA was significantly greater than that after surgical resection ($P=0.049$).

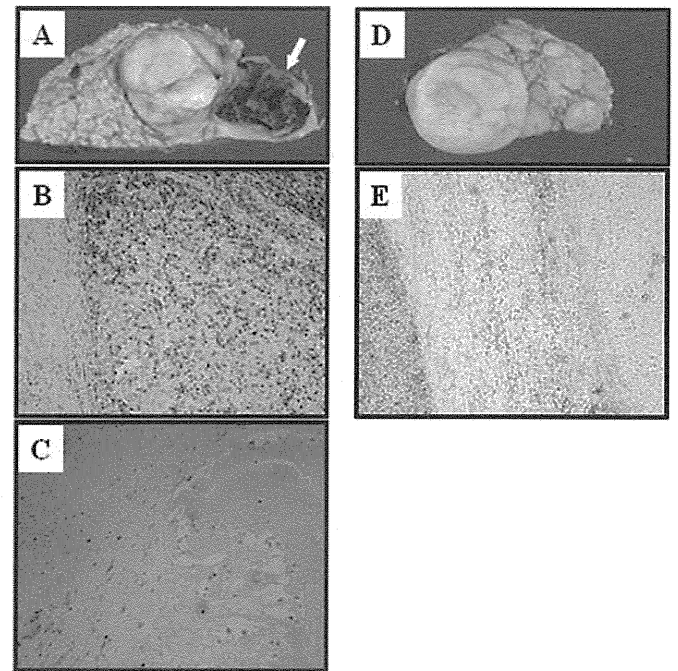


Figure 3. Macroscopic features and immunohistochemical examination of CD8⁺ T cells in the resected tumors that had recurred after radiofrequency ablation. (A and D) show the cut surface of the resected specimens. (A) The white arrow indicates the post-ablated lesion to which a recurrent tumor was contiguous. The other recurrent tumor was distant from the post-ablated lesion (D). A marked number of CD8⁺ T cells had infiltrated into the contiguous recurrent tumor (B) and the distant recurrent tumor (E), whereas few CD8⁺ T cells had infiltrated into the post-ablated necrotic lesion (C). Magnification $\times 100$ (B and C) and $\times 40$ (E).

These results suggest that RFA induced a significantly larger number of GPC3-specific CTLs compared to surgical resection (Fig. 4C).

Discussion

We previously reported that 39% of HCC patients had detectable GPC3-specific CTLs by a direct *ex vivo* IFN- γ ELISPOT assay (25). In this study, GPC3-specific CTLs were detectable before treatment in 11 of 27 patients (41%). Additionally, when we analyzed the patients with a prior treatment for HCCs using the same methods, 11 of 21 (52%) patients had detectable GPC3-specific CTLs (data not shown). These results are favorable for anticancer immunotherapy because the antigen-specific T-cell-mediated immune response could be detected without *in vitro* stimulation. As for frequency, GPC3-specific CTLs were detectable in $\sim 40\%$ of HCC patients, whereas AFP-, human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-, and multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3)-specific CTLs have been detected in 5-20, 6-12, and 14-21% of HCC patients with a single epitope peptide, respectively (26-28). As for tumor stages, a GPC3-specific immune response is frequently detected even in the early stages (24), whereas AFP-specific CTLs are more frequently detected in patients with advanced HCC (26). These results suggest that GPC3 has strong immunogenicity and GPC3-specific T-cell-mediated immunotherapy is suitable for adjuvant therapy against HCC because the induction of tumor-specific immune response in

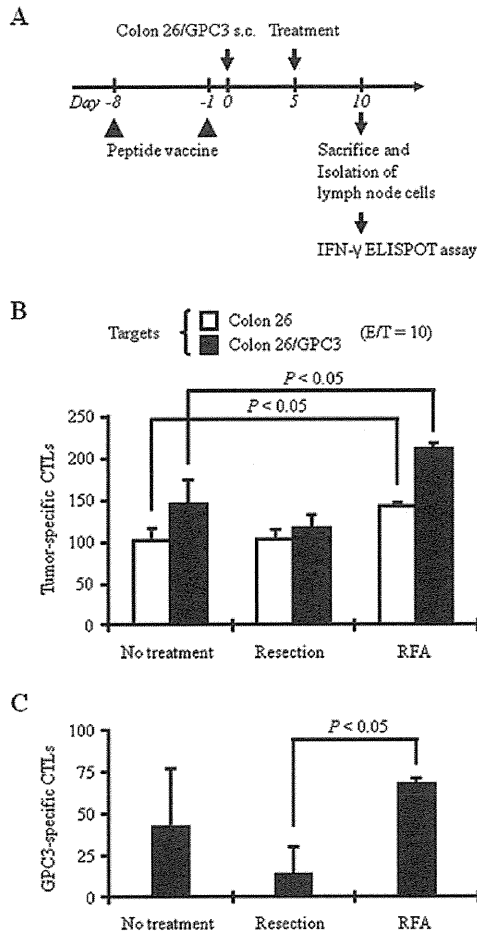


Figure 4. Investigation of the glypican-3 (GPC3)-specific immune response in a mouse model. (A) Experiment schedule. (B) An *ex vivo* interferon (IFN)- γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay of CD8⁺ lymph node cells (effector, 3×10^5 cells/well) against Colon 26 and Colon 26/GPC3 (target, 3×10^4 cells/well). No treatment column indicates the group of mice that received only the peptide vaccination and no therapy for the established tumor. The data are expressed as the mean + SD. Three mice were used for each group. Effector/target ratio=10. (C) The frequency of GPC3-specific CTLs, which is calculated from the difference in the number of spots between Colon 26 and Colon 26/GPC3 in each mouse.

the early stages would be more effective for suppression of tumor growth.

The association between the induction of an antigen-specific immune response and the antigen expression in tumor tissue remains unclear. In this study, we obtained the result that the presence of GPC3-specific CTLs in PBMCs potentially had a positive correlation with GPC3 expression in tumor tissue, but the correlation was not statistically significant. On the other hand, Mizukoshi *et al* showed a negative correlation between the frequency of MRP3-specific CTLs and MRP3 expression level (28). Moreover, Benavides *et al* showed that even antigen-naïve patients had pre-existing immunity (29). First, this may be because of tumor heterogeneity of cancer tissue. In most cases, the whole tumor cannot be evaluated and, in the case of truly antigen-naïve patients, antigen-specific CTLs cannot exist in theory. Second, antigen expression may be negative if antigen-specific CTLs have killed all of the antigen-expressing tumor cells as described by Jäger *et al* (30). As for the changes in an antigen-specific immune response between before and after treatment, in this study, we showed impressive data that all

patients with GPC3-expressing HCCs exhibited an increase in GPC3-specific CTLs after RFA or TACE, whereas no patient with GPC3-expressing HCCs did after surgical resection.

This is the first study to compare locoregional therapies, including RFA, surgical resection, and TACE, in terms of antigen-specific T-cell response in HCC patients and tumor-bearing mice. Half the patients after RFA or TACE showed an increase in GPC3-specific CTLs, which might have been induced by the treatment, whereas only 1 of 9 patients after resection showed an increase and more than half the patients after resection showed a decrease. Similarly, the frequency of GPC3-specific CTLs increased after RFA and decreased after resection in a mouse model. These results suggest that RFA induced a stronger GPC3-specific immune response compared to surgical resection. RFA destroys tumor tissue and causes local necrosis followed by the release of tumor-associated antigens (12), whereas all of the tumor-associated antigens must be completely removed after resection. With regard to TACE, whereas the results of an IFN- γ ELISPOT assay after TACE were as encouraging as that after RFA, we have no other favorable data on the immune response after TACE. Although further investigation is required, TACE, which is also a necrosis-inducing treatment, might induce an antigen-specific immune response.

A limitation of this study is the patient selection in the three kinds of locoregional therapy. Current treatment guidelines for HCC including the Japanese ones, which we followed in this study, recommend RFA to earlier HCCs and TACE to more advanced HCCs than those which receive surgical resection (2,31-33). Therefore, selection bias is unavoidable under the circumstances. To overcome this problem, we added a murine study. The advantage of RFA over surgical resection in the induction of GPC3-specific CTLs was demonstrated also in a mouse model.

The correlation between antitumor immune response and clinical response is controversial. In this study, a significant contribution of GPC3-specific CTLs toward an optimal prognosis was not demonstrated. Mizukoshi *et al* reported that enhancement of T-cell response did not last for long and did not contribute to the prevention of HCC recurrence (34). In view of the highly complex nature of the human immune system, patient prognoses might not be determined only by the CTL response. Previous studies have demonstrated that the release of tumor-derived antigens by necrosis-inducing treatment causes sufficient signaling to activate not only antigen-specific CTL response but also antigen-specific helper T-cell response (35,36), antigen-specific antibody response (36), and non-antigen-specific natural killer cell response (37). However, the mechanisms for cancer escape from immunosurveillance would suppress the efficiency of these immune responses (38). In the literature, tumor-infiltrating lymphocytes in HCC are associated with better prognosis (39), but, in our case, tumor-infiltrating CTLs were actually insufficient for suppression of cancer recurrence despite the massive infiltration. For successful anticancer immunotherapy, the development of an innovative strategy to link antitumor immune response with clinical response and to provide a survival benefit for cancer patients is necessary, and so we have just started the clinical trial of a GPC3-derived peptide vaccine for adjuvant therapy after RFA.

In conclusion, our results demonstrate that RFA has a stronger effect on the immune system compared with surgical resection. Although further investigation is necessary, the data on immune response support the rationale for combined immunotherapy for HCC patients.

Acknowledgements

D.N. would like to thank the Foundation for Promotion of Cancer Research (Japan) for the Third-Term Comprehensive Control Research for Cancer for awarding them a research resident fellowship. This study was supported in part by Health and Labor Science Research Grants for Research on Hepatitis from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. J.F. received honoraria and consulting fee from Bayer, Chugai, Eisai, Eli Lilly, Taiho and Phizer; J.F.'s institute received grants from Pfizer and Bayer.

References

- Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-543, 2001.
- Makuuchi M, Kokudo N, Arai S, *et al.*: Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res* 38: 37-51, 2008.
- Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, *et al.*: Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 38: 200-207, 2003.
- Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, *et al.*: Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers. *Hepatology* 44: 1518-1527, 2006.
- Nobuoka D, Kato Y, Gotohda N, *et al.*: Postoperative serum alpha-fetoprotein level is a useful predictor of recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 24: 521-528, 2010.
- Printz C: Clinical trials of note. Sorafenib as adjuvant treatment in the prevention of disease recurrence in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) (STORM). *Cancer* 115: 4646, 2009.
- Schwartz JD, Schwartz M, Mandeli J and Sung M: Neoadjuvant and adjuvant therapy for resectable hepatocellular carcinoma: review of the randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 3: 593-603, 2002.
- Ishii H, Yamamoto J and Ikari T: Adjuvant treatments for resectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 15: 459-462, 2008.
- Wisniewski TT, Hänslers J, Neureiter D, *et al.*: Activation of tumor-specific T lymphocytes by radio-frequency ablation of the VX2 hepatoma in rabbits. *Cancer Res* 63: 6496-6500, 2003.
- den Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, *et al.*: Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity. *Br J Cancer* 95: 896-905, 2006.
- McGahan JP, Brock JM, Tesluk H, Gu WZ, Schneider P and Browning PD: Hepatic ablation with use of radio-frequency electrocautery in the animal model. *J Vasc Interv Radiol* 3: 291-297, 1992.
- Yang WL, Nair DG, Makizumi R, *et al.*: Heat shock protein 70 is induced in mouse human colon tumor xenografts after sublethal radiofrequency ablation. *Ann Surg Oncol* 11: 399-406, 2004.
- Ali MY, Grimm CF, Ritter M, *et al.*: Activation of dendritic cells by local ablation of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 43: 817-822, 2005.
- Filmus J: The contribution of in vivo manipulation of gene expression to the understanding of the function of glypicans. *Glycoconj J* 19: 319-323, 2002.
- Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, *et al.*: Glypican-3, over-expressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 16-25, 2003.
- Nakatsura T and Nishimura Y: Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 19: 71-77, 2005.
- Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, *et al.*: Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *Int J Oncol* 34: 649-656, 2009.
- Nakatsura T, Komori H, Kubo T, *et al.*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin Cancer Res* 10: 8630-8640, 2004.
- Komori H, Nakatsura T, Senju S, *et al.*: Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 2689-2697, 2006.
- Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, *et al.*: HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: preclinical study using mice. *Int J Oncol* 32: 985-990, 2008.
- Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, *et al.*: Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 100: 1403-1407, 2009.
- Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, *et al.*: 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: 918-925, 2011.
- Sobin LH and Wittekind C: UICC: TNM Classification of Malignant Tumors. 6th edition, Wiley-Liss, New York, pp81-83, 2002.
- Tanaka Y, Eda H, Tanaka T, *et al.*: Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice. *Cancer Res* 50: 2290-2295, 1990.
- Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, *et al.*: Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol Rep* 22: 149-154, 2009.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tsuji H, Yamashita T and Kaneko S: Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 118: 1194-1204, 2006.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, *et al.*: Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43: 1284-1294, 2006.
- Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y and Kaneko S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 49: 946-954, 2008.
- Benavides LC, Gates JD, Carmichael MG, *et al.*: The impact of HER2/neu expression level on response to the E75 vaccine: from U.S. Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Clin Cancer Res* 15: 2895-2904, 2009.
- Jäger E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F and Knuth A: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66: 470-476, 1996.
- Llovet JM, Burroughs A and Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362: 1907-1917, 2003.
- Bruix J and Sherman M: Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases: Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 42: 1208-1236, 2005.
- Omata M, Lesmana LA, Tateishi R, *et al.*: Asian Pacific Association for the Study of the Liver consensus recommendations on hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 4: 439-474, 2010.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, *et al.*: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 126: 2164-2174, 2010.
- Ayaru L, Pereira SP, Alisa A, *et al.*: Unmasking of alpha-fetoprotein-specific CD4(+) T cell responses in hepatocellular carcinoma patients undergoing embolization. *J Immunol* 178: 1914-1922, 2007.
- Widenmeyer M, Shebzukhov Y, Haen SP, *et al.*: Analysis of tumor antigen-specific T cells and antibodies in cancer patients treated with radiofrequency ablation. *Int J Cancer* 128: 2653-2662, 2011.
- Zerbini A, Pilli M, Laccabue D, *et al.*: Radiofrequency thermal ablation for hepatocellular carcinoma stimulates autologous NK-cell response. *Gastroenterology* 138: 1931-1942, 2010.
- Zerbini A, Pilli M, Penna A, *et al.*: Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodules can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 66: 1139-1146, 2006.
- Wada Y, Nakashima O, Kutami R, Yamamoto O and Kojiro M: Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology* 27: 407-414, 1998.

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

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

独立行政法人国立がん研究センター東病院 がん治療開発部機能再生室長 中面 哲也

我々は、国立がん研究センターで医師主導の臨床研究として「がんペプチドワクチン (peptide vaccine) 療法」を行っていますが、このような免疫療法はまだエビデンス (evidence) が確立されておらず、我々が臨床研究をどんどんやらないといけない分野だと思っています。その中から良いものがあれば製薬会社にぜひ拾っていただいて、開発していただきたいと思っております。全部最初から治験でやるというのは無理がありますので、我々のような者が医師主導の臨床研究を行って、いろいろな抗原をどんどんみつけて良いものを製薬会社の人に拾っていただき、治験として開発していただくというのが良いと思っております。なお、本日 (2010.10.29) は、この後、癌治療学会ともブッキングしておりまして、パネルディスカッションは残念ながら出られないのですが、ご容赦ください。

先日の朝日新聞の記事にありましたように、がんワクチンがちょっと叩かれています。明日 (2010.10.30) もがん免疫学会主催で緊急のシンポジウムが東京大学医科学研究所で開催されます。私はそちらでも話しますが、今日は20分の持ち時間なので、いろいろ話したいことはあるのですが、限られた時間内で、できるだけのことを話したいと思っております。詳細は「臨床医薬」にも掲載されますし、西條長宏先生が監修された「Mebio」という雑誌の2010年12月号に特集が組まれますので、そちらもご覧いただければと思います。

私はもともと外科医で肝胆膵外科のレジデント (resident) をやっていたということもあり、国立がん研究センターに呼ばれて丸5年になります。江角先生に呼んでいただいたのですが、最初はこの Glypican-3 (GPC3) のペプチドワクチンのフェーズ I (phase I) を立ち上げるということで呼ばれました。国立がんセンターというところは化学療法が専門の先生が多いため、免疫療法を信用していない先生が多くて、かなり立ち上げに苦労しました。この臨床試験も、倫理審査委員会に出してから承認までに1年間かかりました。最近では西條先生はじめ諸先生方もペプチドワクチンのある程度評価してくださっていることから、がんセンターの中でも免疫療法の地位は確立できたと考えております。ただ、まだまだエビデンスが足りませんので、我々は一生懸命頑張っていきたいと思っております。

今日は主にこの GPC3 についての発表になります。

GPC3 というのは、もともと当時東京大学医科学研究所の中村祐輔先生のラボ (labo) の cDNA マイクロアレイ (microarray) のデータからみつけたものです。肝細胞がんの8割で高発現している遺伝子で、正常の臓器にはほとんど発現していない遺伝子としてみつけました。胎盤と胎生期の肝臓で発現している遺伝子で、胎盤と胎生期の肝臓は免疫学的に守られていますので、これがもし有望な抗原であれば、副作用が起きない理想的な抗原になるということでもみつけました。蛋白レベルで免疫染色をしても肝細胞がんでは染まりますが胆管細胞がんでは

全く染まらず、きれいな特異性があり、胎盤と胎生期の肝臓ではヒトでもマウスでも同じように発現が認められます。

GPC3は、肝細胞がんでは8割の人が陽性なのですが、陰性の2割の人は予後が良く、陽性の8割の人は予後が悪いという結果が得られています。

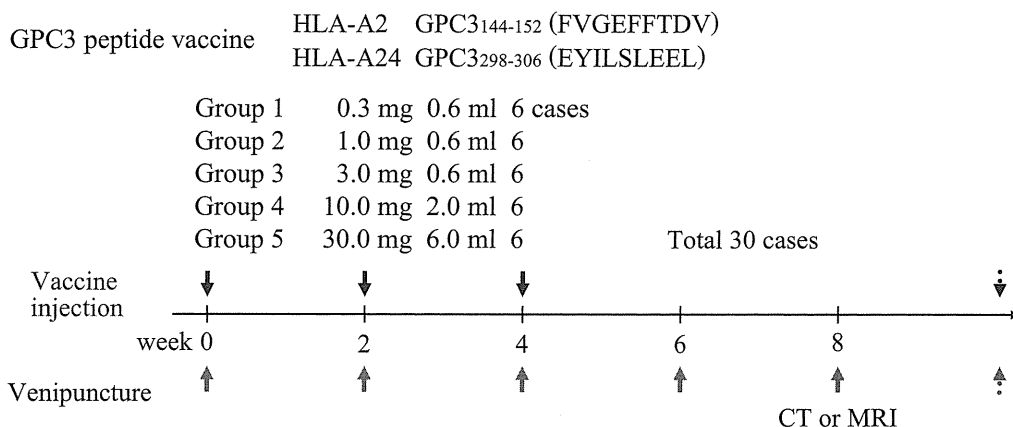
我々は熊本大学時代からこのGPC3におけるHLA-A24とHLA-A2、つまり、日本人に多いタイプのHLAに対するペプチドを同定して参りました。HLA-A24が日本人の6割で、HLA-A2は欧米白人においてメジャーなものですが、日本人の4割が陽性です。2つのペプチドを合わせると、日本人の85%に対応可能です。マウスの実験もいろいろとやり、ペプチドが有望で副作用を起こさない抗原であるということを実証してきました(表1)。

苦労した末に、2007年2月にスタートした臨床第1相試験は、進行肝細胞がんを対象としたスタディ(study)です。当初は再発予防のアジュバント・セッティング(advant setting)でやろうとしたのですが、「進行がんでやりなさい」ということで、進行がんでスタートしました。使っているのはこの2種類のペプチドで、あまり免疫療法には投与量は関係ないといわれていたのですが、抗がん剤に倣う形で、0.3mg, 1 mg, 3 mgとドース・エスカレーション(dose escalation)していく設定にしました。

3 mgが一番有望な結果が出ましたので、10mg, 30mgを追加することになりましたが、図1の

表1 GPC3 is an ideal tumor antigen for immunotherapy in mouse models

We identified
 HLA-A24 (A*2402)-restricted GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL),
 HLA-A2 (A*0201)-restricted GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV),
 Nakatsura T. *Clin. Cancer Res.* 10 : 8630-8640 2004.
 Komori H. *Clin. Cancer Res.* 12 : 2689-2697 2006.
 IFA is one of indispensable adjuvants for peptide-based immunotherapy, and the immunological effect of peptide vaccines depends on the dose of peptide injected.
 Motomura Y. *Int. J. Oncol.* 32 : 985-990, 2008.



- The principal endpoints : toxicity and immunological responses
 - The secondary endpoint : clinical responses.
- Clinical responses at 2 months after 1st vaccination (RECIST criteria)
 Monitoring the level of serum tumor markers

図1 Phase I clinical study of GPC3 derived peptide vaccine

量をみると分かるように、3 mg まではペプチドが溶けるのですが30mg となるとペプチドは溶けないので、混ぜる IFA (Incomplete Freund's adjuvant : 不完全フロイントアジュバント) の量も3倍、10倍になりました。6 cc の中には3 cc の IFA が入っていますので、30mg の場合は IFA の副作用が10倍高いということになります。進行がんでフェーズ I ですので、限られた設定で2週間に1回、3回ワクチンして、2ヵ月間で評価するという設定をとらざるを得ませんでした。患者さんの QOL (Quality Of Life) がかなり良かったものですから、「もっと打ってくれ」という患者さんの要望が強くなりました。そこで、最初のころの前半の患者さんは継続投与ができなかったのですが、あとで倫理審査委員会に承認していただいて、後半の12人は継続投与が可能になっています。フェーズ I のエンドポイント (end point) は、安全性と免疫学的な有効性、そして二次的にクリニカル (clinical) なレスポンス (response) をみるということです。

ペプチドワクチンは「何で効くのか」というメカニズム (mechanism) なのですが、まず肝細胞がんの HLA (Human Leucocyte Antigens : ヒトリンパ球抗原) class 1 には——すべての細胞に HLA class 1 が出ています——図 2 で示す GPC3 のペプチドが出ています。通常はキラー T 細胞が GPC3 のペプチドを見つけて殺しているはずなのですが、その機構が破綻しているのが、がん患者さんにあらわれているがんの塊です。正常細胞にはこの GPC3 のペプチドは出ていません。このペプチドは9アミノ酸が繋がったものですから人工的につくりことができ、GMP (Good Manufacturing Practice : 優良医薬品製造基準) グレードのものをつくってもらい使っております。それを IFA と混ぜて白い液を患者さんの脇の下の皮膚、皮内に注射しています。皮内にはランゲルハンス (Langerhans) 細胞というプロフェッショナル (professional) 抗原提示細胞がたくさんおり、ふだんはこのランゲルハンス細胞は自分の細胞の中でできたペプチドを出しているのですが、大量に GPC3 のペプチドを打ちますと、これが置きかわって、GPC3 ペプチドを乗せたランゲルハンス細胞がたくさんでき上がります。それが脇の下のリンパ節に移動して、GPC3 のペプチドを認識する T-cell receptor (T 細胞抗原受容体) を持つ CD8 陽性のキラー T 細胞 (Killer T cell) を活性化して増やすというメカニズムになっており、増えたキラー T 細胞は GPC3 のペプチドを出している肝臓がんの細胞だ

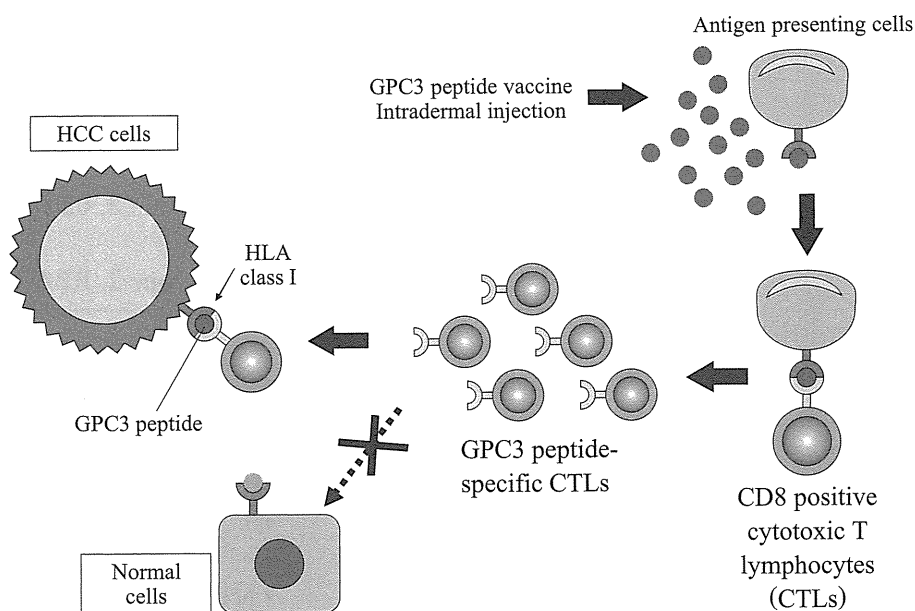


図 2 The mechanism of inducing tumorspecific CTLs by peptide vaccine

けを殺して、正常は殺さないという仕組みです。

今回のフェーズ I は、33 人がエンロール (enroll : 登録) して、3 人は 3 回ワクチンの 2 ヶ月が完遂できませんでしたので、今回は完遂できた 30 人での解析結果を示します (図 3)。

対象は、比較的肝機能の良い人が入っているのですけれども、半分はステージ 4 (Stage 4) の遠隔転移のある患者さんで、半分は肝臓のがんが大きくて治療できない、有効な治療がないという患者さんが入っております。HLA-A24 と A2 は半分ぐらいが入ってまして、前治療は様々で、いろいろな治療が抵抗性になった患者さんが 30 人入っています (表 2)。

GPC3 の免疫染色と HLA class1 の免疫染色における 30 人の内訳ですが、8 割以上の人が GPC3 も発現していて、HLA class1 も発現しているという患者さんたちです (表 3)。

まず安全性ですが、DLT (Dose-Limiting Toxicity : 用量規制毒性) は一例も出現しませんでした。グレード 2 までの副作用でおさまっています。全員に起こるのが、投与局所の発赤、

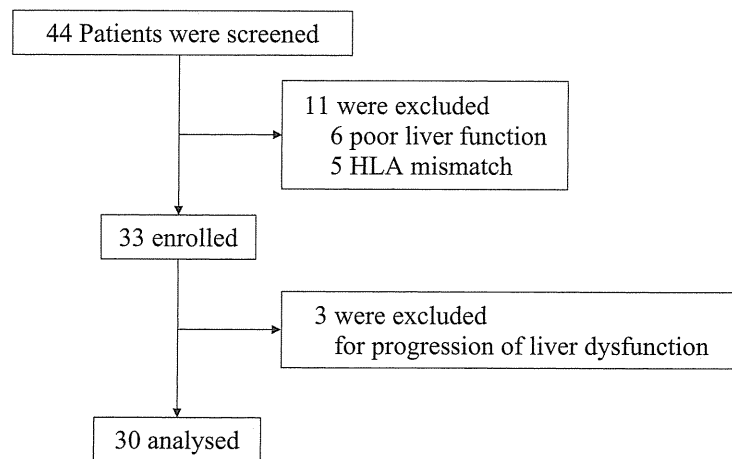


図 3 Patient's Enrollment

表 2 Patient characteristics

Age : 42-77 (mean 64.83)	Sex M 25 F 5
PS 0 : 29	1 : 1 Child-Pugh A : 25 B : 5
Stage II : 5, III A : 6, III C : 4, IV : 15	
HCV : 14, HBV : 7, NBNC ; 9	
HLA-A24 : 16, HLA-A2 : 14 (0201 : 11, 0206 : 3, 0207 : 2)	
Prior therapy	
TACE 8, TAI 6, Chemotherapy 7, RT 5, ope 2, RFA 1, none 1	

表 3 Immunohistochemical analysis of GPC3 and HLA class I

• Glypican-3 (GPC3)	• HLA class I
• ++ : 5 (19.2%)	• ++ : 3 (11.5%)
• + : 16 (61.5%)	• + : 20 (76.9%)
• - : 5 (19.2%)	• - : 3 (11.5%)
• NT : 4	• NT : 4
• Positive rate 80.7%	• Positive rate 88.4%

硬結で、これはグレード1で起こります。打ったときの一過性の発赤ですが、これは7割の人に認められ異所性の発疹が2人に認められました。37度5分以上の熱は一過性の熱なのですが、30人中6人に認められ38度以上は3人でした。いずれも解熱鎮痛剤を使用しないで、一過性に自然解熱しており、かゆみが5例あり、この5人には抗ヒスタミン剤の塗り薬を処方しています(表4)。

次に免疫学的な有効性について述べます。ペプチドを打つと本当にペプチド特異的キラーT細胞はできるのかというところがこの試験の大きなポイントで、エクスピボ(ex vivo:生体外)のIFN- γ (Interferon-gamma:インターフェロンガンマ)のエリスポット・アッセイ(ELISPOT assay:測定法)とデキストラマー(Dextramer)を使ったフローサイトメーター(flow cytometer)の解析を行いました。HIV(Human Immunodeficiency Virus)のエイズウイルスのペプチドに対するキラーT細胞は我々の体にはいませんので、これがネガティブコントロール(negative control)となります。打ったGPC3のペプチドに対するキラーT細胞はどれぐらいいるかというアッセイ(assay)ですが、この30mgを3回打った患者さんでは、投与前は血液中の50万個のリンパ球の中には1個もペプチド特異的キラーT細胞はいないのですが、2回ワクチンを打った後に50万個中441個、0.09%のペプチド特異的なキラーT細胞が出現しました。フローサイトメーターでも同じで、この0.1%というのはどのくらいインパクトを持つかといいますと、全身で1兆個のリンパ球がいますけれども、10億個のペプチド特異的なキラーT細胞が、わずか2回か3回のワクチンで誘導されたこととなります。

全員でこの解析をやり、ほとんどの患者さんでワクチン前に比べてワクチン後にペプチド特異的なキラーT細胞の数が増えています。しかも、その投与量の依存性が確認されていて、投与量が増えれば増えるほど、最高の数が図4のように増えていっているということが分かります。

平均と中央値をとってみても、0.3mgのワクチンよりも3mgのワクチンが良いということ は明らかで、「30mgは意味があるか」というのは議論があるところでした(図5)。

もう1つ、今回のエビデンスとしては生検はしづらいのですが、7人の患者さんからワクチン後に腫瘍の生検をさせていただきました。そうしますと、7人中5人でワクチン前のがんの中には茶色に染まったキラーT細胞はほとんどいないのですが、ワクチン後にがんの中にキラーT細胞がたくさん入っている像が確認できました。

臨床効果ですけれども、ネクロシス(necrosis)が起こった患者さんの例では、この患者さんでは一番大きい腫瘍に真っ黒い壊死が起こり、こちらの患者さんの場合たくさん肝細胞がんの中に壊死が起こりました。

次に縮小した症例ですけれども、肺門のリンパ節が縮小した症例と、胸部のリンパ節が縮小した症例があります。

表4 Toxicity

Adverse Event (CTCAE v3.0)	Grade 1	Grade 2
Allergic reaction (Flushing or Rash) 24 (80%)	transient flushing 22 (73.3%)	ectopic rash or flushing 2 (6.7%)
Allergic reaction (Drug fever) 6 (20%)	drug fever of <38°C 3 (10%)	drug fever of \geq 38°C 3 (10%)
Injection site reaction 30 (100%)	erythema ; induration 30 (100%)	pain or swelling with inflammation 0
Itching 5 (16.7%)	mild or focal itcing 5 (16.7%)	severe or wide itcing 0

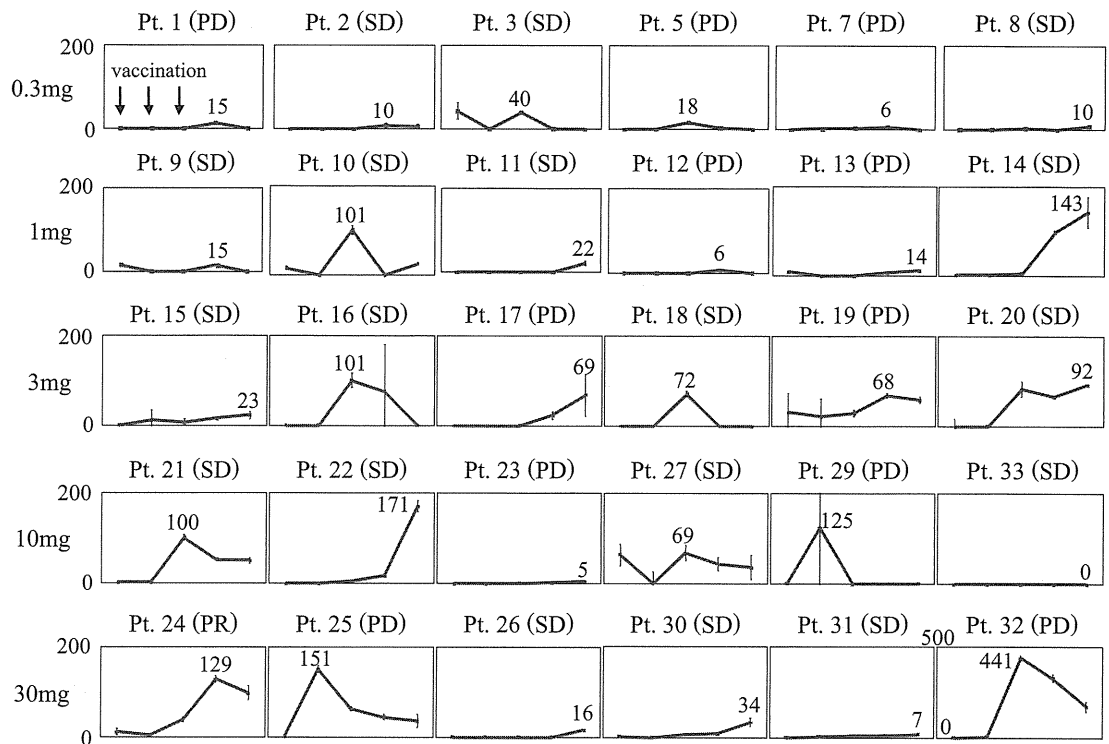


図 4 Immunological responses (1)

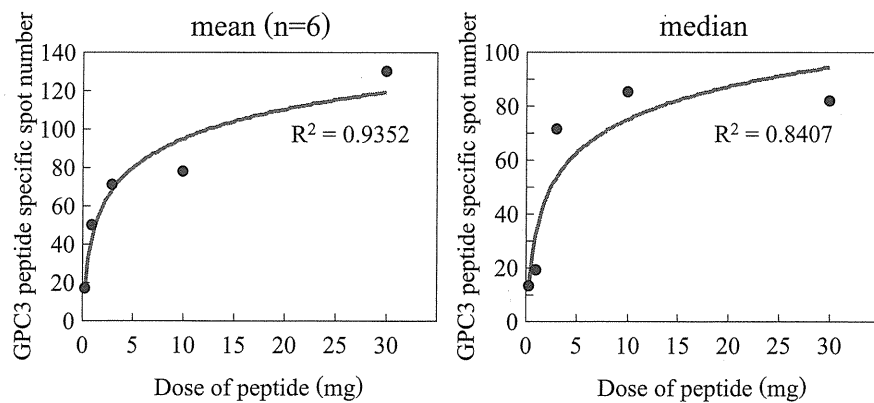


図 5 Immunological responses (2)

次に一番レスポンスがあったPR (Partial Response : 部分寛解) の患者さんの結果を示します。ワクチン前の状態で、多発の肝細胞がん、骨転移、肺転移、リンパ節転移の患者さんが30mgを3回打った結果、5.5cmの骨転移が大幅に縮小して、別の骨転移も真っ黒く壊死になってしまいました。1.4cmの肝臓内の腫瘍2個は完全に消えて、エコー (echo : 超音波検査) でもみえなくなりました。1.4cmの腫瘍が、CT (Computed Tomography) 上は同じ大きさで残っているようにみえるのですが、ここを生検させてもらうと、何とがんの中の半分はキラーT細胞という状態で、がんの量としては半分になっていることが分かりました。

表5が臨床効果のまとめです。RECIST criteria (Response Evaluation Criteria In Solid Tumorsによるガイドライン) で1例のPRと、2ヵ月間で12例のSD (Stable Disease : 不変) という事になっています。ネクロシスか、サイズの縮小がみられた患者さんが30例中5

表5 Clinical responses at 2 months after 1st vaccination (RECIST criteria)

peptide dosage	Clinical response				necrosis or size reduction of tumors	decrease tumor markers in the sera
	PR	SD	PR+SD	PD		
0.3mg	0	3	3 (50.0%)	3	1	1/6 (16.7%)
1.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	4/6 (66.7%)
3.0mg	0	4	4 (66.7%)	2	3	5/5 (100%)
10mg	0	4	4 (66.7%)	2	0	6/6 (100%)
30mg	1	3	4 (66.7%)	2	1	6/6 (100%)
total	1	18	19 (63.3%)	11	5 (16.7%)	22/29 (75.9%)

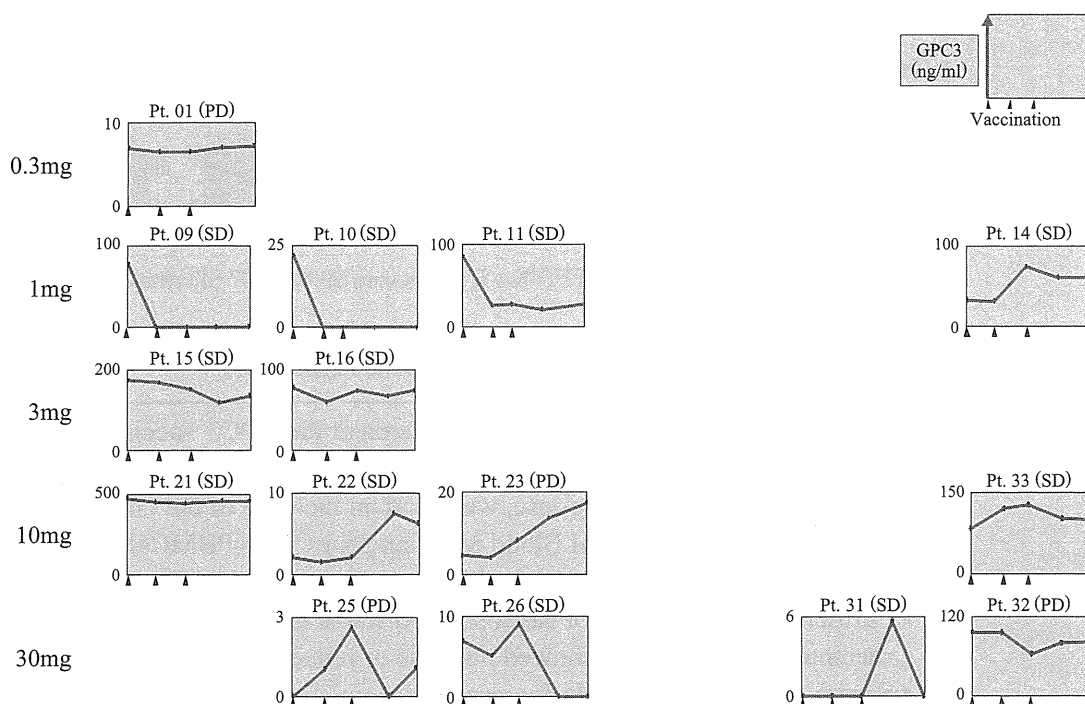


図6 Decrease of GPC3 in the sera 100% 15/15 SD rate : 73% 11/15

例で、AFP (Alpha Fetoproteins : 癌胎児性蛋白), PIVKA-II (Protein Induced by Vitamin K absence or Antagonist-II : ビタミン K 依存性凝固因子前駆体 II), GPC3 の腫瘍マーカー (tumor marker) が 2 ヶ月の間に 1 回でも下がった患者さんは 76% という結果です。

GPC3 は腫瘍マーカーにもなるのですが、投与前に陽性だった 15 例全員がワクチン期間中に 1 回は GPC3 が下がり、その下がった人の SD 率は 73% ですので、全体の SD 率 63% より高いということで、バイオマーカー (Biomarker : 生物指標化合物) にもなり得ると考えています (図 6)。

PIVKA-II も同じで、6 割の人がワクチン投与によって下がったのですが、下がった人は 75% が SD になっています (図 7)。

今回投与量は 0.3mg から 30mg まで、3 回しか打っていない人が 18 人含まれていますので、全く意味がないのですが、overall survival (OS : 全生存期間 9 ヶ月) はソラフェニブ (sorafenib : 複数のキナーゼ阻害薬) のフェーズ II の結果と比べると、遜色ない結果が得られています。本当に進行がんの方の予後を延ばせるのかというのは、今後のフェーズ II としての

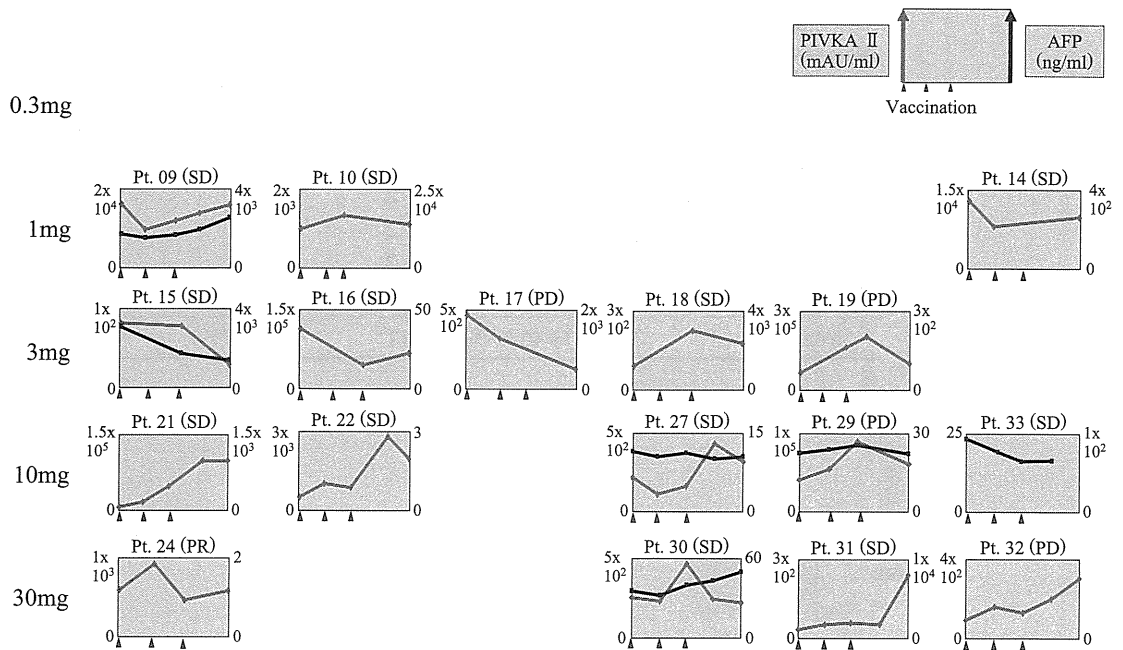


図7 Decrease of PIVKA II in the sera 59% 16/27 SD rate : 75% 12/16

表6 Result of the Phase I study

- Toxicity consisted of mainly local erythema at the GPC3 vaccine injection sites in all patients.
- As for immunological response, we found an increase of the GPC3 peptide-specific CTLs in 5×10^5 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of almost all patients by ex vivo IFN- γ Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) assay.
- Furthermore, about 60% of cases showed stable disease (SD) at 2 months after 1st vaccination. Some cases showed necrosis or reduction of tumor after vaccination.
- Serum tumor marker levels decreased in many cases after vaccination.
- One of 3 cases received 30mg, 3 times vaccination showed partial response (PR), including disappearance of some tumors.

課題になっていきます。

表6はフェーズIの結果のまとめですが、安全性に問題がなく免疫学的に有効性が確認され、臨床的にもそこそこいけたのではないかと考えております。では、進行がんの人に本当にQOLを保ちながらOS (overall survival) を延ばせるのか——QOLを保つのは間違いないと思っているのですが、抗がん剤と同じくらいのOSが期待できれば、QOLがいい分、十分、薬になると考えております。

現在進行中の臨床試験ですが、そのフェーズIの結果を踏まえて30mgでPRが出たのですが、3mgでも十分有効そうだということと投与局所の副作用、あるいはグレード2の副作用が30mgでは多いということで、推奨投与量は3mgに設定しています。これは切除後、ラジオ波後の初回治療の患者さんですけれども、我々の施設でも1年再発率4割、2年再発率6割以上という結果になっていて、それをどれくらいの確率に落とせるかという臨床試験で、1アーム (arm) なのですが、40例で現在実施していて、24例登録したところです。このよう

表7 A Phase II study is on going

A Phase II study of Glypican-3 (GPC3) peptide vaccine as adjuvant treatment for Hepatocellular carcinoma (HCC) after Surgical resection or Radiofrequency ablation (RFA)

To evaluate efficacy and safety of GPC3 peptide vaccine in the adjuvant treatment of HCC after potentially curative surgical resection or RFA

Primary endpoint : The one-year and two-year recurrence rate

Secondary endpoint : Adverse effects of GPC3 vaccination

GPC3-specific immune-responses to GPC3 vaccination

Injection of HLA-A24- or -A2-restricted GPC3 peptide (EYILSLEEL or FVGEFFTDV)

Emulsified with Montanide ISA51 adjuvant

3 mg intradermally injection, every 2 weeks, 6 times, and every 2 months, 4 times, total 10 times in a year, until disease recurrence

N=40 cases

Phase II study of Glypican-3 (GPC3) peptide vaccine as treatment for clear cell adenocarcinoma of ovary

表8 Next plan

-
- We are planning the randomized Phase II study of Sorafenib +/- GPC3 peptide vaccine for advanced HCC patients.
 - GPC3 is also expressed on the hepatoblastoma, Wilms tumor, squamous cell carcinoma of the lung, and so on. We are also planning Phase I or II studies on these cancers.
-

なワクチン療法は再発予防とか予防に生かすべきだと思っていて、もちろん進行がんの患者さんのQOLを保ったまま予後を延ばせるかという方も薬にしたいのですが、再発予防、あとは予防です。B型肝炎やC型肝炎の患者さんは日本には350万人といわれていますから、その患者さんたちの肝細胞がんの発症を抑えるということを考えながらやっていきたいと考えています(表7)。

また、卵巣の明細胞腺がんでも名古屋大学でフェーズIIがスタートしており、そのほか、ウィルムス・テューマー(Wilms tumor:ウィルムス腫瘍)やヘパトブラストーマ(hepatoblastoma:肝芽腫)、肺の扁平上皮がんでもGPC3が出ていることが確認されていますので、これらの臨床試験も計画中です。また進行肝細胞がんに関しては、ソラフェニブが標準治療になっていますので、ソラフェニブとGPC3併用あり・なしのランダム化比較試験(randomized controlled trial:無作為化対照試験)を計画して、近いうちに、倫理審査委員会に出すところです。また、ペプチドワクチン単独での免疫学的な腫瘍内の有効性をみるという臨床試験も倫理委員会に申請中です。ということで終わりなのですが、いろいろ言いたいことはあるのですが、このようながんワクチンは本当に有効なのかということは、我々が臨床研究でどんどん臨床試験をやっていくしかないと考えておまして、それでいいものが出てきたら製薬会社の人にぜひ拾っていただいて、治験をやって確認していただいて、ここから薬が出ていくことを期待しております。がん患者さんのために何とか我々も頑張って、製薬業界の方にも手伝っていただき、どんどん薬が出ればと考えております(表8)。

以上です。

5. 肝癌の個別化医療 ——ワクチン・免疫療法を中心に*

中面 哲也 澤田 雄 水野 正一**

【要旨】進行肝細胞癌患者を対象にした glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の結果、ほぼ全例の血液中にペプチド特異的 CD8陽性キラー T細胞 (CTL) の頻度の増加が検出され、また、CTL がペプチドワクチン後の癌組織内に多数浸潤していることも複数の症例で証明できた。今回、末梢血中 GPC3 ペプチド特異的 CTL の最大頻度と生命予後との関連についても報告し、個別化医療にまで踏み込んでみたい。

はじめに

本稿では肝細胞癌を対象としたワクチン・免疫療法について述べる。肝細胞癌においては、海外では目立った成績を示す癌ワクチンなどの免疫療法は開発されていない。国内では、われわれが HLA-A24, -A2陽性肝細胞癌患者を対象に glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチンの臨床試験を実施している。われわれの臨床試験や基礎研究をとおして、ワクチン・免疫療法を中心に本稿のテーマである肝癌の個別化医療にまで踏み込めればと考える。

I. 肝細胞癌に対する標準治療

遠隔転移のない肝細胞癌では切除、穿刺局所療法 (局所壊死療法)、動脈塞栓療法などの局所療

法が標準治療であり、肝内病変の大きさ、数などの腫瘍進行度と背景にある肝機能を評価して治療法が選択される。一般的に肝機能が良好で残肝機能が十分と判断される症例で、比較的大きな単発あるいは少数の腫瘍の場合には主に肝切除が選択され、3 cm、3個以下の症例では経皮的局所壊死療法、なかでも最近ではラジオ波焼灼療法が行われることも多い。これらはいずれも根治的治療と位置づけられている。その他に当院などでは陽子線治療も行われているが、治療成績はほかの肝細胞癌根治的治療に匹敵することが判明しつつある。これらの治療は局所制御に優れているものの、根治的治療施行後も5年累積再発率が70%を超えており、再発を防ぐための補助療法の開発が急務である。これまでレチノイド、インターフェロン、養子免疫療法、ビタミン K₂などの補助療法により良好な無再発生存率が得られたという報告も認められている。最近では、sorafenibの補助療法としての有効性を検証するグローバルな臨床試験も実施されている。しかしながら、現在までわが国はもちろん、国際的にも標準的な補助療法は確立していない。

一方、局所治療の適応とならない症例では抗癌

キーワード：ペプチドワクチン、glypican-3 (GPC3)、ペプチド特異的キラー T細胞 (CTL)

* Personalized cancer immunotherapy for hepatocellular carcinoma

** T. Nakatsura (室長), Y. Sawada, S. Mizuno : 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 (☎277-0882 柏市柏の葉6-5-1)。

薬による動注化学療法や全身化学療法が行われてきたが、長い間その有用性は示されなかった。近年、海外の臨床試験において sorafenib が生存期間の有意な延長を示し、本邦においても進行・再発肝細胞癌に対する治療薬として使用され始めた。しかし本邦の肝細胞癌患者に対する有用性についてはいまだ不明な点も多く、また低い奏効率や高い有害事象発生率などの問題点が指摘されており、さらに有効で副作用の少ない治療法の開発が求められている。

II. 癌の免疫療法

癌の免疫療法の概念はすでに19世紀からあった。医師たちは癌患者が細菌に感染すると、癌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、時には癌の完全退縮を得たが、広くは受け入れられなかった。また、癌にはまれであるが、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年ごろには癌細胞の自家移植の報告がなされている。手術で得られた癌組織から癌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、進行癌の患者でも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、癌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いえよう。

1991年に Boon¹⁾らにより、ヒトの免疫系が癌を異物として認識し、排除しうることに科学的な根拠が与えられたことによって、再び癌免疫研究は勢いを盛り返し現在にいたっている。現在までにさまざまな癌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すすめられている。最近では、前立腺癌に対して“Provenge” (Dendreon社、一般名：sipuleucel-T) という樹状細胞療法が米国食品医薬品局 (FDA) に承認され話題になったが、その他にもいくつかの第Ⅲ相臨床試験での有効性も報告されている。日本国内でもさまざまな施設から癌に対するペプチドワクチンの有効例の報告が散見される。一方では、最近、子宮頸癌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癌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

防法や癌発症予防法の開発も必要である。本稿では、われわれが研究している GPC3 ペプチドを用いた免疫療法について述べる。

III. ペプチドワクチン療法の概念実証 (proof of concept : POC)

ペプチドワクチン療法により癌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 Langerhans 細胞 (樹状細胞) 表面のヒト白血球抗原 (HLA) にペプチドがのり、その後リンパ節に移動して、リンパ節でペプチドをの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、血流にのってペプチドを HLA 表面に提示している癌細胞を攻撃するが、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、目でみることのできない複雑な生体反応である (図 1)。逆にいうと、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 が実際癌の組織の中に浸潤しない限りは癌細胞の傷害、つまり臨床効果は起こりようがない。すなわち、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 が実際に癌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“POC”であり、それすら起こっていなければ臨床効果は起こるはずがない。

IV. GPC3 ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験の概要²⁾

進行肝細胞癌 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, 30 mg 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 incomplete Freund's adjuvant (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 例全例にみられ、うち 6 例には軽度の搔痒があり、crotamiton クリームを処方した。炎症反

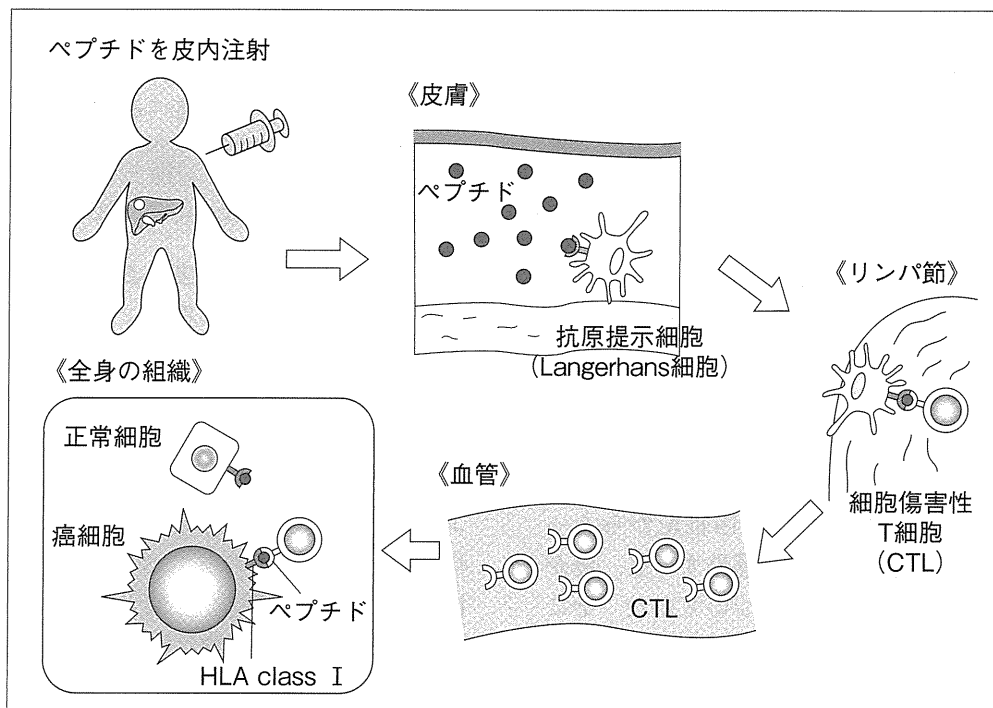


図1. ペプチドワクチン療法の概略

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、いずれも癌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、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³⁾。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 CTL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。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ヵ月後の CTの Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (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%), 13例が PD, 1例が 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。Time to progression (TTP) 中央値は3.4ヵ月、全生存期間 (OS) 中央値は9ヵ月であった。

V. 末梢血中 GPC3ペプチド特異的 CTLの最大頻度と生命予後との関連性についての解析

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患者33例の末梢血中 GPC3ペプチド特異的 CTLの最大頻度と生命予後との関連性を検討した。

免疫学的有効性の評価の指標として、*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 T細胞の最大頻度を用いた。GPC3ペプチド特異的 CTL活性が生命予後に対する効果を検討するため、OSの予後因子を単変量解析 (Mantel-Cox) および多変量解析 (Cox回帰分析) で検討した。

OSの予後因子は、単変量解析では遠隔転移なし ($p = 0.032$), 脈管浸潤あり ($p = 0.04$), AFP 100 ng/ml以上 ($p = 0.003$), RECIST腫瘍径10 cm以上 ($p = 0.003$), 肝内病変の長径和10 cm以上 ($p < 0.001$), GPC3ペプチド特異的 CTLの最大頻度50未満 ($p = 0.033$) であった。また、多変量解析では AFP 100 ng/ml以上 ($p = 0.007$), GPC3ペプチド特異的 CTL活性50未満 ($p = 0.040$) が予後因子

表1. 全生存期間に対する予後因子の解析

	<i>p</i>	多変量解析	AFPとCTLの交絡因子補正
性別(男/女)	0.991		
年齢(≥65歳/<65歳)	0.608		
performance status(0/1)	0.707		
Child-Pugh分類(A/B)	0.063		
肝炎ウイルスの有無(+/-)	0.956		
肝外病変の有無(+/-)	0.032	0.378	0.341
脈管浸潤(Vp3, Vv3以上)の有無(+/-)	0.040	0.703	0.791
AFP(≥100 ng/ml/<100 ng/ml)	0.003	0.007	0.004
腫瘍径 RECIST 評価(≥10 cm/<10 cm)	0.003	0.092	0.089
肝内病変の長径和(≥10 cm/<10 cm)	<0.001	0.903	0.518
CTL活性(≥50/<50)	0.033	0.040	0.013
HLA(A2/A24)	0.091		
ワクチン投与量(≥1 mg/<1 mg)	0.053		
interaction of AFP and CTL			0.144

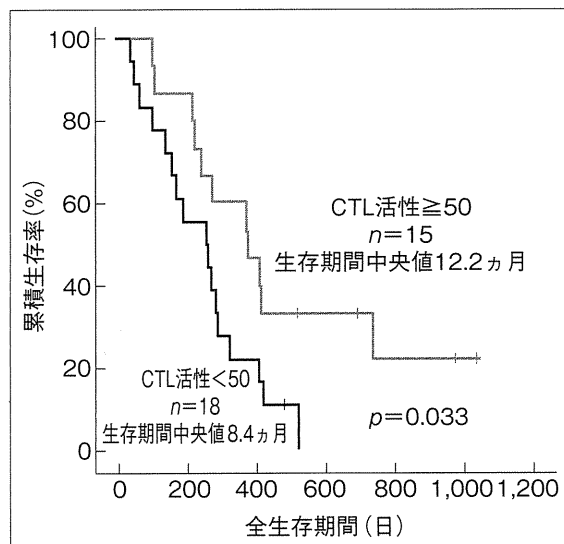


図2. 全生存期間 (CTL最大活性≥50群 vs <50群)

であった(表1). 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ヵ月、50未満群は8.4ヵ月と有意差($p = 0.033$)を認めた(図2). GPC3ペプチド特異的 CTLの最大頻度50以上($n = 15$)と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、ワクチン投与量(≥1 mg vs <1 mg)のみで有意差($p = 0.004$)を認めた(表2). これらの結果より、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.

ワクチン1.0 mg以上投与された患者の60% (25例中15例)でGPC3ペプチド特異的 CTL活性50以上となったが、十分なCTLの誘導(≥50)ができない患者も確かに存在した. またペプチドワク

表2. 臨床背景因子 (CTL活性 ≥ 50 群 vs CTL活性 < 50 群)

計 ($n = 33$)	CTL活性 ≥ 50 ($n = 15$)	CTL活性 < 50 ($n = 18$)	p
性別 (男/女)	13/2	15/3	1.000
年齢 (歳)	63.4 \pm 11.7	65.1 \pm 8.1	0.636
performance status (0/1)	12/3	16/2	0.639
Child-Pugh分類 (A/B)	13/2	13/5	0.413
肝炎ウイルスの有無 (+/-)	11/4	12/6	0.722
肝外病変の有無 (+/-)	10/5	10/8	0.722
脈管浸潤 (Vp3, Vv3以上)の有無 (+/-)	2/13	5/13	0.413
末梢血リンパ球数 (個/ μ l)	1,303 \pm 406	1,323 \pm 490	0.901
AFP (≥ 100 ng/ml/ < 100 ng/ml)	6/9	12/6	0.170
腫瘍径 RECIST 評価 (cm)	12.2 \pm 6.2	14.1 \pm 7.7	0.453
肝内病変の長径和 (cm)	6.9 \pm 8.1	11.5 \pm 9.4	0.148
HLA (A2/A24)	7/8	9/9	1.000
ワクチン投与量 (≥ 1 mg/ < 1 mg)	15/0	10/8	0.004

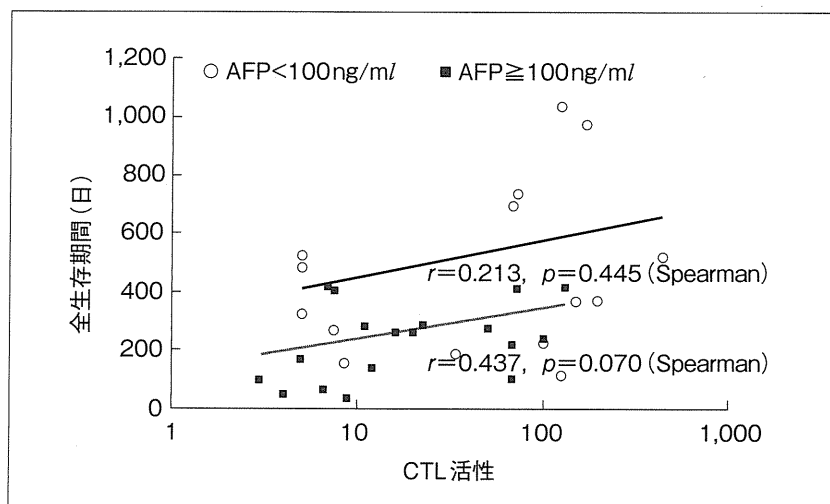


図3. OSとCTL活性分布 (AFP)

チン治療での responder と non-responder を予測することは、大きな課題となっている。今回、予後因子でもある AFP、肝内病変の長径和と CTL の誘導には関連が強い傾向 (表2) があり、次にこれらに着目し検討した。AFP ≥ 100 ng/ml ($n = 18$) と AFP < 100 ng/ml ($n = 15$) を 2 群に分け、GPC3ペプチド特異的 CTL 活性と OS の分布図 (図3) を検討すると、AFP < 100 ng/ml の群で CTL 活性がよい場合、長期生存が注目された。一方、AFP ≥ 100 ng/ml でも CTL 活性と OS は相関傾向を示していた。OS 中央値を検討すると、AFP ≥ 100 ng/ml ($n = 18$) では、GPC3ペプチド

特異的 CTL 活性 50 以上群 ($n = 6$) は 8.0 ヶ月、50 未満群 ($n = 12$) は 5.5 ヶ月に対して ($p = 0.589$)、AFP < 100 ng/ml ($n = 15$) では、GPC3ペプチド特異的 CTL 活性 50 以上群 ($n = 9$) は 24.2 ヶ月、50 未満群 ($n = 6$) は 8.8 ヶ月と GPC3ペプチド特異的 CTL 活性 50 以上が、統計学的な有意差はないものの大きく予後に寄与する傾向を認めた ($p = 0.117$) [図4]。同様に肝内病変の長径和 ≥ 10 cm ($n = 15$) と肝内病変の長径和 < 10 cm ($n = 18$) を 2 群に分け、GPC3ペプチド特異的 CTL 活性と OS の分布図 (図5) を検討すると、肝内病変の長径和 < 10 cm ($n = 18$) の群で CTL 活性がよ

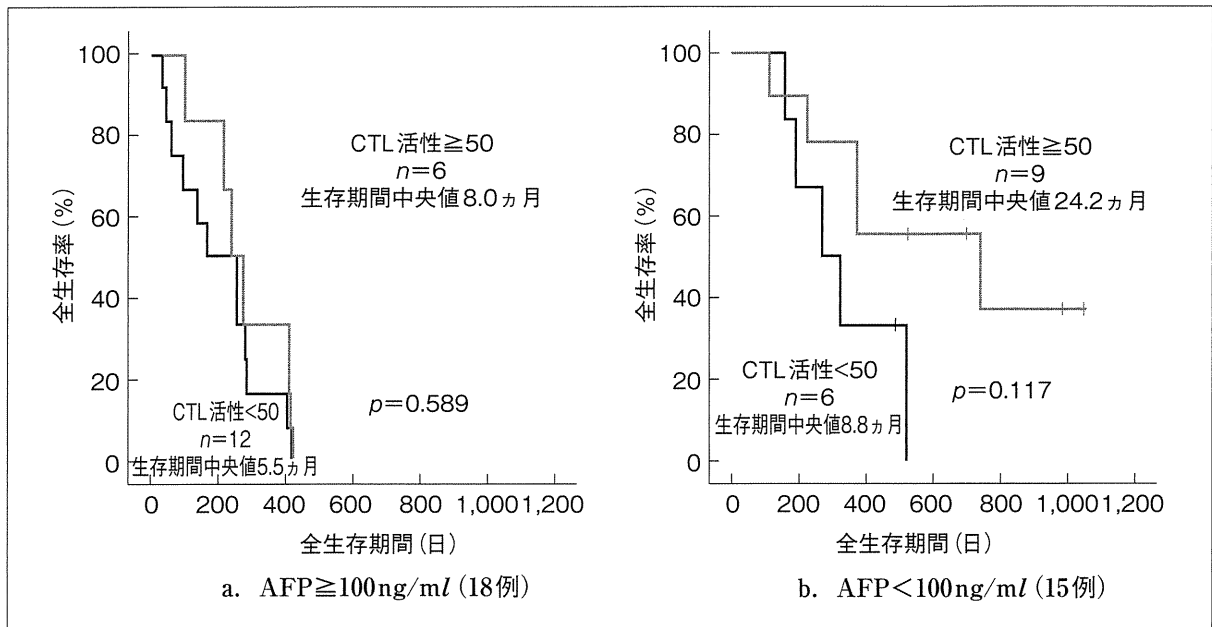


図4. 全生存期間 (CTL活性 ≥ 50群 vs < 50群)

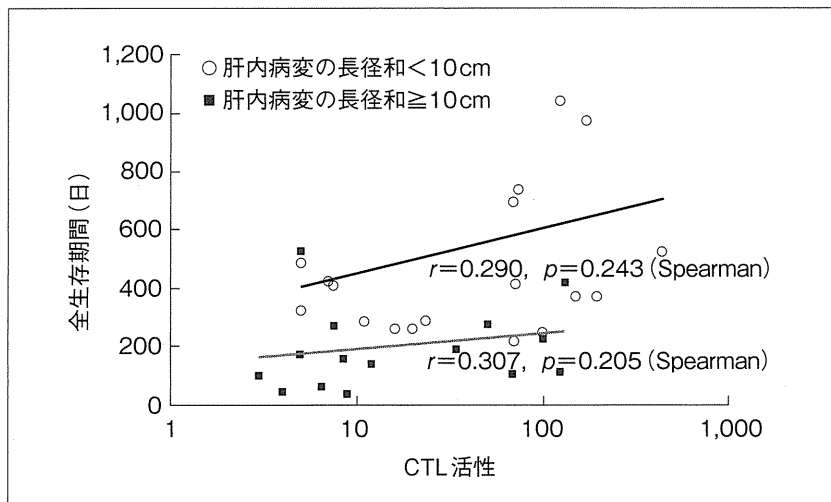


図5. OSとCTL活性分布 (肝内病変の長径和)

い場合、長期生存が注目された。OS中央値を検討すると、肝内病変の長径和 < 10 cm ($n = 18$) の群ではGPC3ペプチド特異的 CTL活性50以上群 ($n = 10$) は13.6ヵ月、50未満群 ($n = 8$) は9.4ヵ月とGPC3ペプチド特異的 CTL活性50以上が、統計学的な有意差はないものの大きく予後に寄与する傾向を認めた ($p = 0.125$) [図6]。

以上の結果から、AFP < 100 ng/ml、肝内病変の長径和 < 10 cmは responderの指標となりうる可能性を認めた。同じ進行肝細胞癌でも、これらのある程度予後のよい集団に対しては、ワクチン

による生存期間延長の可能性が期待できるため、その意義をさらなる臨床試験で確認すべきと考ええる。

一方 AFP ≥ 100 ng/ml、肝内病変の長径和 ≥ 10 cmの群でも CTL活性と OSは相関傾向もあり、予後の期待できないこれらの患者でも、OSの差は出にくいことは予想されるものの、ワクチンの効果を確認する意義はあると考えている。

おわりに

このようなワクチン療法は元来、腫瘍がない、