



Original contribution

Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression^{☆,☆☆}

Kenichi Kohashi MD, PhD^a, Tetsuya Nakatsura MD, PhD^b,
Yoshiaki Kinoshita MD, PhD^c, Hidetaka Yamamoto MD, PhD^a, Yuichi Yamada MD^a,
Tatsuro Tajiri MD, PhD^d, Tomoaki Taguchi MD, PhD^c, Yukihide Iwamoto MD, PhD^e,
Yoshinao Oda MD, PhD^{a,*}

^aDepartment of Anatomic Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812–8582, Japan

^bSection for Cancer Immunotherapy, Investigative Treatment Division, Research Center for Innovative Oncology, National Cancer Center Hospital East, Kashiwanoha 6-5-1, Kashiwa, Chiba 277–8577, Japan

^cDepartment of Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812–8582, Japan

^dDepartment of Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kajii-cho 465, Kamigyo-ku, Kyoto 602–8566, Japan

^eDepartment of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812–8582, Japan

Received 10 April 2012; revised 20 June 2012; accepted 27 June 2012

Keywords:

Glypican 3;
SMARCB1/INI1;
Malignant rhabdoid tumor

Summary Glypican 3 (GPC3), a membrane-bound heparin sulfate proteoglycan, is mutated in Simpson-Golabi-Behmel syndrome, characterized by tissue overgrowth and an increased risk of embryonal malignancies such as Wilms tumor. Malignant rhabdoid tumor (MRT), originally described as a rhabdomyosarcomatoid variant of Wilms tumor, is a tumor with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. We analyzed the frequency of GPC3 protein expression, *GPC3* mRNA, and serum-soluble GPC3 levels in 71 cases of tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression, including 14 MRTs, 48 epithelioid sarcomas (ES) (proximal-type, 21; distal-type, 27), 4 extraskelletal myxoid chondrosarcomas, and 5 pediatric undifferentiated soft-tissue sarcomas. We found that GPC3 overexpression of more than 10% of the labeling index was recognized in 6 (42.9%) MRTs, 1 (2.1%) proximal-type ES, and 3 (60%) pediatric undifferentiated soft-tissue sarcomas (MRT vs ES, $P = .0003$). All the remaining cases revealed GPC3-absent expression of less than 1% of the labeling index. The median values of *GPC3* mRNA in the GPC3-absent expression group and overexpression group were 10.2 and 309, respectively, with a statistically significant difference between these 2 groups ($P = .004$). However, there was no statistically significant difference in the prognoses of these 2 groups of

[☆] Disclosure/conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest to disclose.

^{☆☆} This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (No. 21390107) and Young Scientists (B) (No. 21790356) from the Japan Society for the Promotion of Science, the National Cancer Center Research and Development Fund (23-B-12), and Health and Labor Science Research Grants for Clinical Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Tokyo, Japan. The English used in this manuscript was revised by KN International (<http://www.kninter.com/>).

* Corresponding author.

E-mail address: oda@surgpath.med.kyushu-u.ac.jp (Y. Oda).



MRT ($P = .99$). In analyzable cases of small-number MRT and pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma, there is no significant correlation between GPC3 immunoreactivity and serum-soluble GPC3 level. Therefore, evaluation of GPC3 immunoreactivity may be a useful diagnostic tool to distinguish ES from MRT, especially extrarenal MRT. It was suggested that MRTs with GPC3 overexpression may become a new target of GPC3 immunotherapy.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glypican 3 (GPC3), which is located in Xq26, is a member of the glypican family of heparin-sulfate proteoglycans. This protein is linked to the cell surface through a glycosylphosphatidylinositol anchor, and is thought to regulate cell growth and apoptosis through interactions with morphogenic or growth factors such as Wnt5a, fibroblast growth factor 2, bone morphogenic protein 7, and tissue factor pathway inhibitor [1-3]. Loss-of-function mutations in the human *GPC3* gene result in Simpson-Golabi-Behmel syndrome, an X-linked condition characterized by severe malformations and pre- and postnatal overgrowth. Furthermore, these patients have a high risk of developing embryonal tumors, mostly Wilms kidney tumor and neuroblastoma [4].

Malignant rhabdoid tumor (MRT), which was originally described in 1978 as a rhabdomyosarcomatoid variant of Wilms tumor, is a rare and highly aggressive embryonal tumor in infancy or childhood [5]. SMARCB1/INI1 (INI1) immunohistochemical expression has not been detected in any MRT cases except in rare examples, and this feature has been reported to be useful for the correct diagnosis of MRT [6-8]. However, loss of INI1 protein expression has also been demonstrated in all renal medullary carcinomas, almost all epithelioid sarcomas, half of epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumors, about half of pediatric myoepithelial carcinomas, and some extraskelatal myxoid chondrosarcomas [9-13].

In the present study, we analyzed the frequency of GPC3 protein expression in a large series of MRT cases and other tumors with loss of INI1 protein expression. Furthermore, we examined mRNA expressions of *GPC3* in frozen samples by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and serum-soluble GPC3 protein in preoperative blood samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

2. Materials and methods

2.1. Patients

Tumors with loss of INI1 protein expression in the present study were selected from among more than 15 000 cases of bone and soft-tissue tumors registered in the Department of Anatomic Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan, between 1955 and 2010. The primary monoclonal antibodies used in the case selection

were BAF47, an antibody to the SMARCB1/INI1 gene product (clone 25; 1:250; 20-minute microwave; BD Transduction Laboratories, San Diego, CA). As a result of this screening, formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of 72 sarcoma cases with loss of INI1 protein expression (no staining of tumor nuclei) were available. These tumors with loss of INI1 protein expression were comprised of 14 MRTs, 48 epithelioid sarcomas (proximal-type, 21; distal-type, 27), 4 extraskelatal myxoid chondrosarcomas, and 5 pediatric undifferentiated soft-tissue sarcomas. The clinicopathologic findings of the 14 cases of MRT and the 48 cases of epithelioid sarcoma are summarized in Tables 1 and 2. Immunoreactivities for CAM5.2, AE1/AE3, and CD34 were graded semiquantitatively as 0, no staining; 1+, <5% tumor cells reactive; 2+, 5% to 25% tumor cells reactive; 3+, 26% to 50% tumor cells reactive; and 4+, >50% tumor cells reactive. In addition, we also examined 20 samples of surrounding non-tumorous skeletal muscle that were collected from patients with various types of sarcoma as controls for the quantitative RT-PCR analysis. In all cases, the diagnosis was based on light microscopic examination with hematoxylin and eosin staining according to the most recent World Health Organization classification (MRT, epithelioid sarcoma, extraskelatal myxoid chondrosarcoma) and report of undifferentiated soft-tissue sarcoma [14-17]. Moreover, immunoperoxidase procedures using the streptavidin-biotin-peroxidase method were carried out in all cases. The institutional review board at Kyushu University approved this study (permission code: 22-152).

2.2. Immunohistochemistry for Glypican 3 protein

Immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method (Histofine; Nichirei, Tokyo, Japan). A monoclonal antibody against glypican 3 (clone 1G12, 1:200; BioMosaics, Burlington, VT) was employed. We assessed the immunoreactivity with the labeling index (LI). To determine the GPC3 LI, the number of positively stained tumor cells among at least 500 tumor cells were counted by three pathologists (K.K., H.Y., Y.Y.) independently for each tumor. Furthermore, the protein expression in tumors was classified into three categories: -, less than 1% of LI; ±, 1-10% of LI; +, more than 10% of LI.

2.3. RNA extraction

Total RNA was extracted from frozen and paraffin-embedded samples using Trizol reagent (Invitrogen,

Table 1 Clinicopathologic data in malignant rhabdoid tumor patients

Case	Age	Sex	Site	Prognosis	CAM5.2 ^a	AE1/AE3 ^b	CD34 ^c	GPC-3
EMRT-1	0 d	F	Retroperitoneum	2 mo DOD	2+	2+	0	+
EMRT-2	4 mo	M	Liver	12 mo DOD	3+	3+	2+	+
EMRT-3	5 mo	F	Neck	12 mo DOD	1+	1+	2+	+
EMRT-4	6 mo	M	Back	20 mo DOD	4+	4+	0	-
EMRT-5	2 y	F	Back	1 month DOD	4+	1+	0	+
EMRT-6	5 y	F	Buttock	10 mo DOD	1+	1+	0	-
MRTK-1	3 mo	M	Right kidney	8 mo DOD	0	1+	0	-
MRTK-2	5 mo	M	Right kidney	71 mo NED	1+	0	0	+
MRTK-3	1 y	M	Right kidney	Not available	0	1+	1+	+
MRTK-4	1 y	F	Left kidney	4 mo DOD	1+	0	0	-
MRTK-5	1 y	M	Left kidney	10 mo DOD	1+	1+	0	-
MRTK-6	2 y	M	Right kidney	77 mo NED	1+	0	0	-
AT/RT-1	3 y	F	Right cerebello-pontine angle	12 mo DOD	3+	1+	0	-
AT/RT-2	7 y	M	Brain-stem	Not available	4+	4+	0	-

Abbreviations: EMRT, extrarenal malignant rhabdoid tumor; MRTK, malignant rhabdoid tumor of the kidney; AT/RT, atypical teratoid/rhabdoid tumor; DOD, died of disease; NED, no evidence of disease.

^a Clone CAM5.2; 1:20; 30-minute microwave; Becton-Dickinson, Mountain view, CA.

^b Clone AE1/AE3; 1:1000; 20-minute microwave; Dako, Glostrup, Denmark.

^c Clone QBEnd/10; 1:50; 30-minute 0.1% trypsin; Leica Microsystems, Tokyo, Japan.

Carlsbad, CA) according to the manufacturer’s instructions. Five micrograms of RNA from each sample were reverse-transcribed using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) in order to prepare first-strand cDNA.

2.4. TaqMan PCR to detect mRNA quantity of GPC3

Quantitative RT-PCR for *GPC3* was performed and analyzed using previously developed TaqMan assay reagents (*GPC3* Hs00170471_m1.; *GAPDH* Hs99999905_m1.; all from Applied Biosystems, Foster City, CA) and an ABI Prism 7700 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The PCR reaction was carried out according to the manufacturer’s protocol. The obtained data were standardized using data of the international housekeeping gene, *GAPDH*. All the reactions for standard samples and samples of patients were performed in triplicate. The data were averaged from the values obtained in each reaction. The final numerical value (*V*) in each sample was calculated as follows: $V = GPC3 \text{ mRNA value} / GAPDH \text{ mRNA value}$.

2.5. Detection by ELISA of the serum-soluble glypican 3 protein

Preoperative blood serum samples were available in 4 patients having tumors with loss of INI1 protein expression and 1 congenital mesoblastic nephroma case of GPC3-absent expression. Glypican-3 levels were measured using a commercially available ELISA kit (BioMosaics, Burlington, VT) following the manufacturer’s protocol.

3. Results

3.1. Glypican 3 immunoreactivity

The results of the immunohistochemical analysis are summarized in Table 3. In 6 of the 14 MRTs (42.9%), 1 (2.1%) of the 48 epithelioid sarcomas and 3 of the 5 pediatric undifferentiated soft-tissue sarcomas (60%), overexpression of

Table 2 Clinicopathologic data in epithelioid sarcoma patients

Sex	Age (y)	Site	Size	Depth	Rhabdoid cell
Proximal-type epithelioid sarcoma					
Male	12	≥20	17	Trunk ^a	21
					≥5cm
Female	9	<20	4	Extremities	0
					< 5cm
Distal-type epithelioid sarcoma					
Male	15	≥20	25	Trunk	23
					≥5 cm
Female	12	<20	2	Extremities	4
					<5 cm

^a Trunk (including genital areas) and head and neck.

Table 3 Glypican 3 expression in tumor with loss of INI1 protein expression

	GPC3(+)	GPC3(-)
Malignant rhabdoid tumor	6 (42.9%)	8
EMRT ^a	4	2
MRTK ^b	2	4
AT/RT ^c	0	2
Epithelioid sarcoma	1 (2.1%)	47
Proximal-type	1	20
Distal-type	0	27
Extraskeletal myxoid CS ^d	0 (0%)	4
US ^e	3 (60.0%)	2

NOTE. Malignant rhabdoid tumor vs epithelioid sarcoma: $P = .0003$.
Malignant rhabdoid tumor vs proximal-type epithelioid sarcoma: $P = .010$.
^a Extrarenal malignant rhabdoid tumor.
^b Malignant rhabdoid tumor of the kidney.
^c Atypical teratoid/rhabdoid tumor.
^d Chondrosarcoma.
^e Pediatric undifferentiated soft tissue sarcoma.

more than 10% of LI was recognized (Fig. 1A-D). However, all the remaining cases showed absent expression of less than 1% of LI (Fig. 1E-H). GPC3 immunoreactivity was found significantly more frequently in MRT than in epithelioid sarcoma ($P = .0003$) or proximal-type epithelioid sarcoma ($P = .010$).

3.2. Glypican 3 mRNA expression by TaqMan PCR

Fig. 2A shows boxplots of *GPC3* mRNA expression (20 non-tumorous skeletal muscle group, median value=10.0; 5 GPC3-overexpression cases of MRT, 270; 5 GPC3-absent expression cases of MRT, 8.73; 2 GPC3-overexpression cases of pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma, 946; 3 GPC3-absent expression cases of proximal-type epithelioid sarcoma, 17.6; 6 GPC3-absent expression cases of distal-type (conventional-type) epithelioid sarcoma, 12.9). In addition, these analyzed cases were divided into two groups according to the result of immunohistochemistry: a group showing GPC3 overexpression (more than 10% of the LI) and a group showing GPC3-absent expression (less than 1% of the LI). In the GPC3-overexpression and -absent expression groups, median values of *GPC3* mRNA expression were 309 and 10.2, respectively (Fig. 2B). This difference between the two groups was statistically significant ($P = .004$).

3.3. Serum-soluble glypican 3 protein level

The serum-soluble GPC3 protein levels in tumors with loss of INI1 protein expression are summarized in Table 4 (GPC3-absent expression cases of pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma, 334 ng/mL and 99 ng/mL; GPC3-overexpression cases of MRT, 233 and 151 ng/mL). In the 1 congenital mesoblastic nephroma case of GPC3-absent expression, the serum GPC3 level was 19 ng/mL.

3.4. Prognosis of malignant rhabdoid tumor according to glypican 3 immunoreactivity

Follow-up data were available in 12 of 14 cases (7 cases of less than 1% of LI and 5 cases of more than 10% of LI). However, there was no statistically significant difference in the prognosis of the 2 groups ($P = .99$, Fig. 3).

4. Discussion

MRT is characterized by rhabdoid cells having a globoid, and hyaline or eosinophilic intracytoplasmic inclusions [8,16]. However, the existence of rhabdoid cells is recognized in a wide variety of tumors, such as epithelioid sarcoma, synovial sarcoma, extraskeletal myxoid chondrosarcoma, leiomyosarcoma, malignant mesothelioma and desmoplastic small round-cell tumors [8]. The histological features of proximal-type epithelioid sarcoma particularly resemble those of MRT, especially extrarenal MRT [12,14]. Some data exist regarding the histologic and immunohistochemical differences between proximal-type epithelioid sarcoma and MRT, but such findings are not yet conclusive. At present, immunoreactivity for CD34 is generally accepted as a differential marker; approximately half of all ES cases are positive for CD34, whereas MRT cases scarcely reveal immunoreactivity for this marker [8].

In the present study, GPC3 immunoreactivity was significantly more frequent in MRT cases (42.9%) than in other cancers with loss of INI1 expression, whereas only one such epithelioid sarcoma case (2.1%) showed a positive reaction ($P = .0003$). Moreover, as for *GPC3* mRNA expression, it was a predictable result that the expressions in GPC3-positive-immunoreactivity cases of MRT and pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma were higher than that in non-tumorous skeletal muscle of control cases and negative-immunoreactivity MRT and epithelioid sarcoma (including distal-type and proximal-type), and pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma cases. Therefore, GPC3 immunoreactivity has the potential to be a useful ancillary tool in the differential diagnosis of MRT and epithelioid sarcoma, especially proximal-type epithelioid sarcoma.

Meanwhile, GPC3-positive immunoreactivity appeared at almost the same rate in MRT and pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma. Histologically, 4 of the 5 pediatric undifferentiated soft-tissue sarcomas showed a proliferation of small rounded cells having scant cytoplasm without rhabdoid cells, resembling malignant lymphoma or previously reported pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma with loss of INI1 expression [18]. One of these previously reported cases did not have rhabdoid cells with intracytoplasmic inclusions at diagnosis, but did display rhabdoid cells at definitive surgery following chemotherapy [18]. Therefore, it seems that pediatric undifferentiated soft-tissue

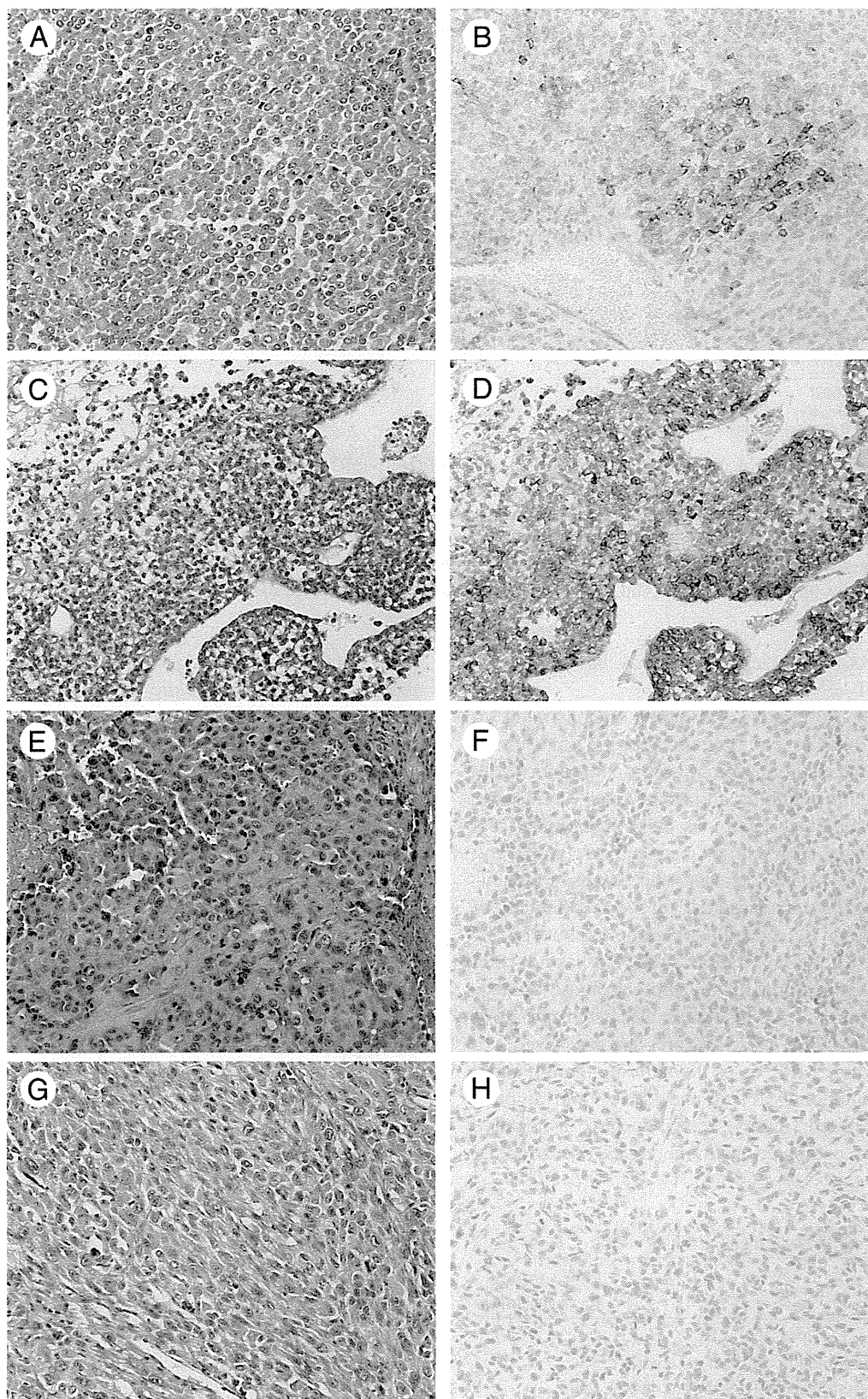


Fig. 1 Hematoxylin and eosin histologic and GPC3 immunohistochemical findings. A and B, Malignant rhabdoid tumor (4-month-old male; liver). C and D, Pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma (4-year-old male; retroperitoneum). The tumor cells showed overexpression of GPC3 protein (B, D). E and F, Proximal-type epithelioid sarcoma (46-year-old male; groin). G and H, Distal-type epithelioid sarcoma (58-year-old male; hand). On the other hand, most epithelioid sarcoma cells showed no GPC3 protein expression (F, H). (Original magnification×200).

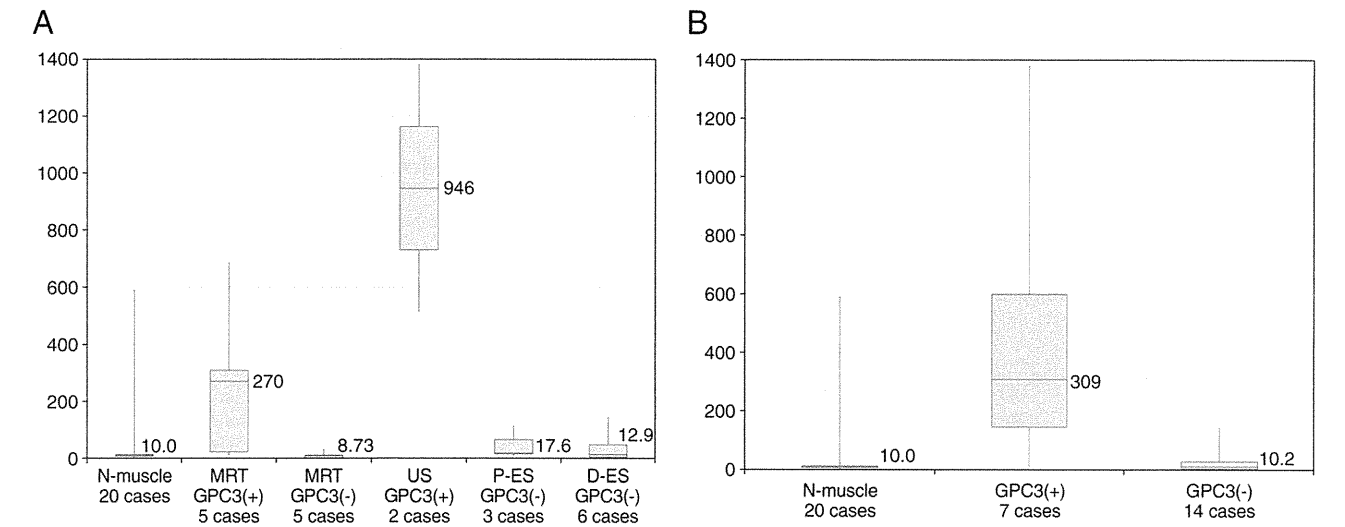


Fig. 2 Boxplot of *GPC3* mRNA expression. A, The median values of *GPC3* mRNA expression in non-tumor skeletal muscle (N-muscle), malignant rhabdoid tumor (MRT) with *GPC3* overexpression (*GPC3*+), MRT with *GPC3*-absent expression (*GPC3*-), pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma (US) with *GPC3* overexpression (*GPC3*+), proximal-type epithelioid sarcoma (P-ES) with *GPC3*-absent expression (*GPC3*-), and distal-type epithelioid sarcoma (D-ES) with *GPC3*-absent expression (*GPC3*-) were 10.0, 270, 8.73, 946, 17.6, and 12.9, respectively. B, The median value of all analyzable *GPC3* overexpression cases (*GPC3*+) was 309, whereas that of all *GPC3*-absent expression cases (*GPC3*-) was 10.2 (*GPC3* overexpression cases vs *GPC3*-absent expression cases, $P = .004$).

sarcoma with loss of INI1 expression may have the same spectrum as MRT.

GPC3 protein expression has been demonstrated in various tumors, such as embryonal tumor (Wilms tumor, hepatoblastoma and neuroblastoma), germ cell tumor (yolk sac tumor, immature teratoma and embryonal carcinoma), hepatocellular carcinoma, squamous cell carcinoma of the lung, malignant melanoma, ovarian clear cell carcinoma, and so on. On the other hand, patients with Simpson-Golabi-Behmel syndrome have increased risk for the development of embryonal tumor and hepatocellular carcinoma, but risk for these other *GPC3* expression tumors and MRT has not been suggested in this syndrome. In the present study, clinico-pathologic differences including a prognosis between *GPC3*-overexpression and *GPC3*-absent expression cases were not evident among whole MRT cases. In addition, though many typical rhabdoid tumor (MRT of the kidney and atypical teratoid/rhabdoid tumor) cases seemed to have a negative *GPC3* expression compared with the cases of extrarenal

MRT, pathologic and prognostic differences between typical and extrarenal MRTs were uncertain. Therefore, *GPC3* protein overexpression may not be associated with tumorigenesis.

GPC3 mRNA and protein have been shown to be overexpressed in hepatocellular carcinoma and melanoma [19,20]. Although *GPC3* mRNA is highly expressed in the placenta, fetal liver, fetal lung and fetal kidney, *GPC3* mRNA levels are low in most normal adult tissues [21]. Therefore, it was proposed that *GPC3* peptides may be applicable to cancer immunotherapy [19–21]. MRT is characterized by extremely aggressive biological behavior. Development of new therapies is a pressing need, because

Table 4 Serum-soluble glypican 3 protein level

	<i>GPC3</i> protein level (ng/ml)
<i>GPC3</i> (+)	
Pediatric undifferentiated soft tissue sarcoma-1	334
Pediatric undifferentiated soft tissue sarcoma-2	99
<i>GPC3</i> (-)	
Extrarenal malignant rhabdoid tumor	233
Malignant rhabdoid tumor of the kidney	151
Congenital mesoblastic nephroma	19

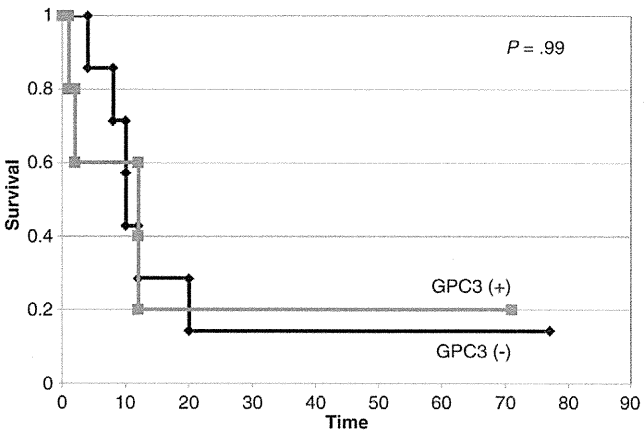


Fig. 3 Overall survival curves of patients in the malignant rhabdoid tumor group with *GPC3* overexpression (*GPC3*+) and *GPC3*-absent expression (*GPC3*-). There was no statistically significant difference between the two groups ($P = .99$).

the long-term survival rate of MRT patients as a whole has been reported to be less than 25%, regardless of multimodality therapy [22]. In the present study, about half of MRT cases showed GPC3 overexpression; therefore, immunotherapy using the GPC3 peptide may have a beneficial role for MRT patients.

It was previously reported that the serum-soluble GPC3 protein level in hepatocellular carcinoma patients was elevated [20,21]. Significant correlation between protein or mRNA expression and the serum-soluble protein level was also seen [20,21]. The serum-soluble GPC3 protein level may thus be a useful tumor marker for cancer diagnosis in large numbers of patients with hepatocellular carcinoma [20,21]. In the present study, the low serum-soluble GPC3 protein level in one congenital mesoblastic nephroma case with GPC3-absent expression supported previous reports [20,21]. However, in analyzable cases of small number MRT and pediatric undifferentiated soft tissue sarcoma, there was no significant correlation between GPC3 immunoreactivity and serum-soluble GPC3 protein level. The usefulness of the serum-soluble GPC3 protein level as a novel tumor marker in MRT or undifferentiated soft-tissue sarcoma cases was not fully clarified in the present study. Further studies using a larger number of cases will be required to confirm its usefulness.

In previous studies, survival analysis showed that hepatocellular carcinoma patients with GPC3 overexpression had a significantly shorter overall survival time than those with low or absent GPC3 expression [23-26]. In other words, GPC3 overexpression was correlated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. However, in the present study, the status of GPC3 protein expression did not affect the prognosis of patients having MRT ($P = .99$). GPC3 expression may have limited use as a prognostic indicator in MRT.

In summary, we analyzed the GPC3 protein and mRNA expression, and the serum-soluble GPC3 protein level in tumors with loss of INI1 protein expression. MRT cases showed significantly more frequent GPC3 protein expression than epithelioid sarcoma cases. Our results support the assertion that evaluation of GPC3 immunoreactivity has the potential to become an ancillary parameter in the differential diagnosis of MRT and epithelioid sarcoma, especially proximal-type epithelioid sarcoma. In addition, MRT with GPC3 overexpression may be new candidate for GPC3 immunotherapy.

References

- [1] Maeda D, Ota S, Takazawa Y, et al. Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Mod Pathol* 2009;22:824-32.
- [2] Sung YK, Hwang SY, Park MK, et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2003;94:259-62.
- [3] Zynger DL, Dimov ND, Luan C, Teh BT, Yang XJ. Glypican 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1570-5.
- [4] Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996;12:241-7.
- [5] Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 1978;41:1937-48.
- [6] Hasselblatt M, Gesk S, Oyen F, et al. Nonsense mutation and inactivation of SMARCA4 (BRG1) in an atypical teratoid/rhabdoid tumor showing retained SMARCB1 (INI1) expression. *Am J Surg Pathol* 2011;35:933-5.
- [7] Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, et al. Highly aggressive behavior of malignant rhabdoid tumor: a special reference to SMARCB1/INI1 gene alterations using molecular genetic analysis including quantitative real-time PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007;133:817-24.
- [8] Oda Y, Tsuneyoshi M. Extrarenal rhabdoid tumors of soft tissue: clinicopathological and molecular genetic review and distinction from other soft-tissue sarcomas with rhabdoid features. *Pathol Int* 2006;56:287-95.
- [9] Chbani L, Guillou L, Terrier P, et al. Epithelioid sarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 106 cases from the French sarcoma group. *Am J Clin Pathol* 2009;131:222-7.
- [10] Hollmann TJ, Hornick JL. INI1-deficient tumors: diagnostic features and molecular genetics. *Am J Surg Pathol* 2011;35:e47-63.
- [11] Hornick JL, Dal Cin P, Fletcher CDM. Loss of INI1 expression in characteristic of both conventional and proximal-type epithelioid sarcoma. *Am J Surg Pathol* 2009;33:542-50.
- [12] Kohashi K, Izumi T, Oda Y, et al. Infrequent SMARCB1/INI1 gene alteration in epithelioid sarcoma: a useful tool in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor. *HUM PATHOL* 2009;40:349-55.
- [13] Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, et al. SMARCB1/INI1 protein expression in round cell soft tissue sarcomas associated with chromosomal translocations involving EWS: a special reference to SMARCB1/INI1 negative variant extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1168-74.
- [14] Guillou L, Kaneko Y. Epithelioid sarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon, France: IARG Press; 2002. p. 205-7.
- [15] Lucas DR, Heim S. Extraskeletal myxoid chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon, France: IARG Press; 2002. p. 213-5.
- [16] Schofield D. Extrarenal rhabdoid tumour. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon, France: IARG Press; 2002. p. 219-20.
- [17] Somers GR, Gupta AA, Doria AS, et al. Pediatric undifferentiated sarcoma of the soft tissues: a clinicopathologic study. *Pediatr Dev Pathol* 2006;9:132-42.
- [18] Kreiger PA, Judkins AR, Russo PA, Biegel JA, Lestini BJ, Assanasen C, et al. Loss of INI1 expression defines a unique subset of pediatric undifferentiated soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 2009;22:142-50.
- [19] Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:6612-21.
- [20] Nakatsura T, Nishimura Y. Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* 2005;19:71-7.
- [21] Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25.
- [22] Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, et al. Long-term survival after autologous peripheral blood stem cell transplantation in two patients with malignant rhabdoid tumor of the kidney. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:888-90.

- [23] Ning S, Bin C, Na H, et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancer patients. *Mol Biol Rep* 2012;39:351-7.
- [24] 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* 2009;34:649-56.
- [25] Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:1403-7.
- [26] Yorita K, Takahashi N, Takai H, et al. Prognostic significance of circumferential cell surface immunoreactivity of glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2011;31:120-31.

特集

変貌するがん免疫療法

ペプチドカクテル
ワクチン療法*大 藤 和 也**
中 面 哲 也****Key Words** : peptide cocktail vaccine, multi-antigen vaccine, glypican-3

はじめに

がん免疫療法が第4のがん治療法として期待されて久しいが、抗体療法と一部のサイトカイン療法を除いては、現在標準治療として確立されたものはない。1991年にBoonらによりメラノーマ抗原MAGE遺伝子が同定され、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¹⁾。以降、がん拒絶抗原、エピトープペプチドが多数同定され、さまざまながん種に対するがんワクチン療法の臨床試験が行われた。2004年にはRosenberg博士により、がんワクチンによる奏効率はわずか2.6%であったという悲観的な報告²⁾もなされたが、近年では、臨床効果の実証が今後期待できる報告も相次いでいる。2010年には、前立腺がんに対してsipuleucel-T(Provenge[®])が、第III相臨床試験³⁾の結果を受け、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration ; FDA)により承認された。さらに、免疫チェックポイント分子であるCTLA-4を阻害するipilimumab(Yervoy[®])が悪性黒色腫に対する生存期間の延長を示し⁴⁾2011年に承認された。これらの事項はがん免疫療法の第4のがん治療としての地位の確立に向けての第一歩であると

いえる。著者らは新規がん胎児性抗原であるglypican-3(GPC3)を同定し、国立がん研究センター東病院でがんペプチドワクチン療法の臨床試験を行ってきた。その経験をふまえ、本年より本院を中心とする難治性小児がんに対するペプチドカクテルワクチン療法の第I相医師主導治験をスタートさせた。

本稿では、がんペプチドカクテルワクチン療法の意義、展望について著者らの取り組みも交えて概説する。なお、本稿におけるがんペプチドカクテルワクチン療法とは、複数抗原ペプチドを一つのカクテル製剤として用いる治療法とし、複数抗原ペプチドをそれぞれの部位に投与する投与法を複数抗原ペプチドワクチン-ノンカクテルと区別して記載する。

細胞傷害性 T 細胞の
抗原認識と腫瘍拒絶

ペプチドワクチンの最大の特徴はその抗原特異性の高さにあるといえる。がん抗原由来エピトープペプチドをワクチンとすることで、正常組織への影響は少なく、有害事象の発現も低いと考えられる。細胞療法等に比べると投与までの過程が煩雑ではなく、外来治療において比較的簡易、安全に投与可能であることが大きな利点である。また比較的安価で、高純度な製剤が製造可能なことも特徴の一つである。このよう

* Peptide cocktail vaccine.

** Kazuya OFUJI, M.D & Tetsuya NAKATSURA, M.D., Ph.D.: 独立行政法人国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター免疫療法開発分野(☎277-8577 千葉県柏市柏の葉6-5-1); Division of Cancer Immunotherapy, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa, Chiba 277-8577, JAPAN

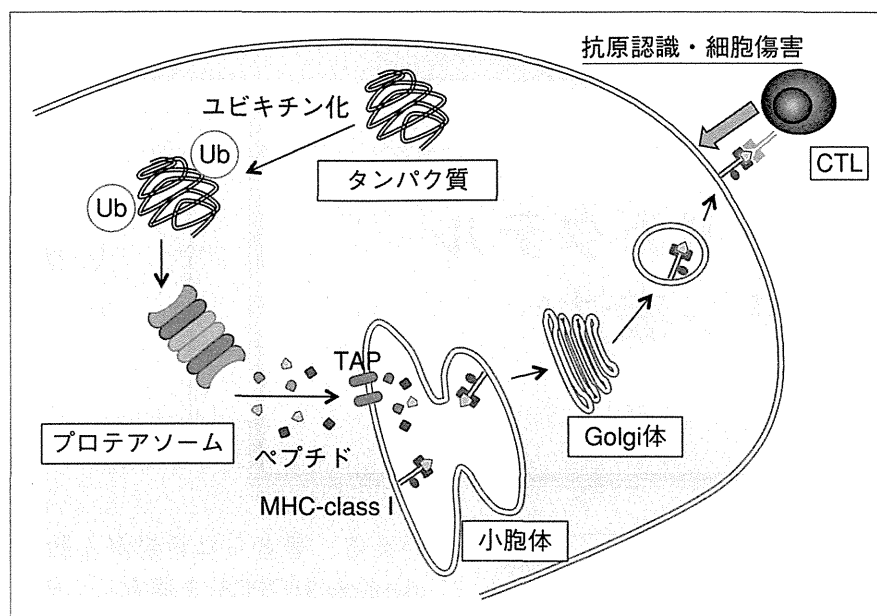


図1 内在性抗原のMHC class I 分子による抗原提示

な背景のもと、本邦ではペプチドワクチン療法を中心にがん免疫療法開発が進められてきた。以下に作用機序を述べるが、がんペプチドワクチン療法はがんに対して免疫機構を介して間接的に作用し効果を発揮する。これは、直接的な効果を有する抗がん剤や低分子化合物とはまったく異なる作用機序を有しており、がんペプチドワクチン開発は、従来の抗がん剤とは異なる考えで進められなくてはならない。

がん細胞拒絶を目的としたワクチン療法は、主に、最終エフェクター細胞と考えられる細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)の誘導を目的としている。CTLはがん細胞膜表面上に提示される、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)と8~10個のアミノ酸で構成されるペプチドの複合体を、抗原として認識する。ワクチンとしてのがん関連抗原の投与には腫瘍ライセート、腫瘍関連蛋白、がん抗原由来ペプチドなどが用いられる。その中でもがん抗原由来ペプチドは、CTLエпитープである8~10個のアミノ酸で構成されており、細胞性免疫誘導を惹起可能な抗原の最小単位である。抗原をワクチンとして投与すると、樹状細胞(dendritic cell; DC)に代表される抗原提示細胞によって抗原提示がなされることによりCTLが誘導される。一方、標的細胞側では、内在性抗

原である標的分子はプロテアソームにてペプチド断片化され、小胞体内でMHC分子と結合しゴルジ体を介して膜表面へと運ばれる。この膜表面に提示されたペプチドをCTLが認識し、標的細胞が傷害される(図1)。

上記のような流れでCTLが誘導され標的細胞の認識から拒絶に作用とすると考えられるが、単一のペプチドを投与する場合、誘導されるCTLが認識できるペプチドも基本的に単一であり、複数種類のペプチドを認識できるCTLを誘導することはできない。また、がんワクチン療法の最も重要といえるポイントは、どんなに効率的に細胞傷害性の高いCTLが誘導可能であったとしても、標的細胞側の膜表面に抗原提示がされていなければ細胞傷害活性を示せない点である。一般的に、がん細胞は免疫監視からのさまざまな逃避機構を備えており、一例をあげれば、MHC分子の発現量の不足、標的がん抗原の欠落、接着分子の発現不全、免疫抑制因子の産生、免疫抑制性の微小環境の構築などがある。ワクチンにより誘導されたCTLは、MHC分子の発現低下や、標的抗原の欠落など標的細胞との作用部位に変化を受けた場合、細胞傷害性を示すことはなくなる。したがって、ペプチドワクチン療法の抗原特異性の高さが同時に弱点ともなりえるといえる。さらに、単一のペプチドによるワク

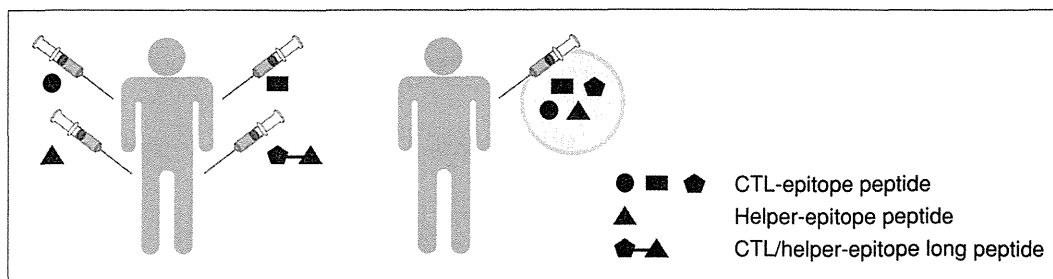


図2 複数のペプチド投与手段

左：それぞれの単一ペプチドを複数か所に投与する。右：複数のペプチドをカクテル製剤として投与する。接種が1か所で済み、多数のペプチドが投与可能となる。

チン療法の場合では、免疫逃避機構による細胞傷害活性の低下は顕著となることが予想され、より有効性の高い新規のペプチドワクチン療法開発が求められる。

がんペプチドカクテルワクチン療法

ペプチドワクチンの効果増強のための一つの手段として、複数のエピトープペプチドをワクチンとして投与する手法が試みられてきた。複数のエピトープペプチドを投与することで、それぞれのペプチド特異的CTLを誘導しようという考えである。さらには、ヘルパーT細胞エピトープを含むワクチンを投与し、より効果増強を狙う試みもなされている⁵⁾。複数個のエピトープの投与を考える場合、単一抗原由来の複数のエピトープを用いる場合と、複数のがん抗原由来ペプチドを用いる場合がある。また、投与法では複数の単一ペプチドを複数か所に投与する(複数抗原ペプチドワクチン—ノンカクテル)、あるいはカクテル製剤(がんペプチドカクテルワクチン)として1か所に投与する手段がある(図2)。前者の場合、がん患者に対し複数か所注射するのは本人への負担も大きく、現実的には投与可能なペプチドの個数も3~4種程度までに限定される。一方で、カクテル製剤とすることで、使用できるペプチド数に理論上の制限はない。

複数抗原に対するペプチドをカクテル製剤、あるいはノンカクテル製剤として投与することによる考えうる利点を、①特異的CTL誘導と②標的細胞の抗原提示の側面からあげる。①まず特異的CTL誘導の側面からみると、現時点でワクチン投与前にペプチド特異的CTLが誘導できるかどうかを予測することはできない。ペプチドを認

識するT細胞受容体(T cell receptor ; TCR)をもつT細胞レパートリーがもともと存在しないか、あるいは非常に少ない場合は、ペプチド特異的CTLの誘導が期待できず、細胞傷害性を示すことはできない。したがって、投与するエピトープが複数であれば、特異的CTLが誘導できる可能性がより高まる。②標的細胞の抗原提示の側面からみると、がん細胞はさまざまな抗原を提示しているが、一つの標的病変だけでみても、そのheterogeneityにより提示されるがん抗原エピトープも細胞個々で当然異なることが予想される。仮に3種のがん抗原由来ペプチドを投与して、それぞれに対する特異的CTLが誘導できたとすると、標的細胞が3種すべての抗原を提示していれば、複数の種類のCTLが認識し傷害できる可能性が考えられ、細胞傷害活性が高まると考えられる。標的細胞が1種の抗原のみ提示している場合でも、少なくともそのペプチド特異的CTLによる傷害が期待できる。単一のペプチドワクチンではこのような利点は期待できず、標的細胞に抗原提示されていなければ特異的CTLによる腫瘍拒絶には至らない(図3)。複数のエピトープでCTLを誘導することは、がん細胞の免疫逃避機構からの克服の観点からも理にかなっているものと思われる。

このように複数抗原ペプチドをカクテル製剤とすることで投与ペプチドの選択肢が広がり、抗腫瘍効果増強の期待も高まるが、一方で、カクテル製剤にすることによる負の側面も考えられる。まず、各ペプチドを溶解するための適切な溶媒の選択が必要となる。さらに、ペプチドを混合することで、ペプチド間の相互作用等によりペプチドに変性をきたさないか等の品質保

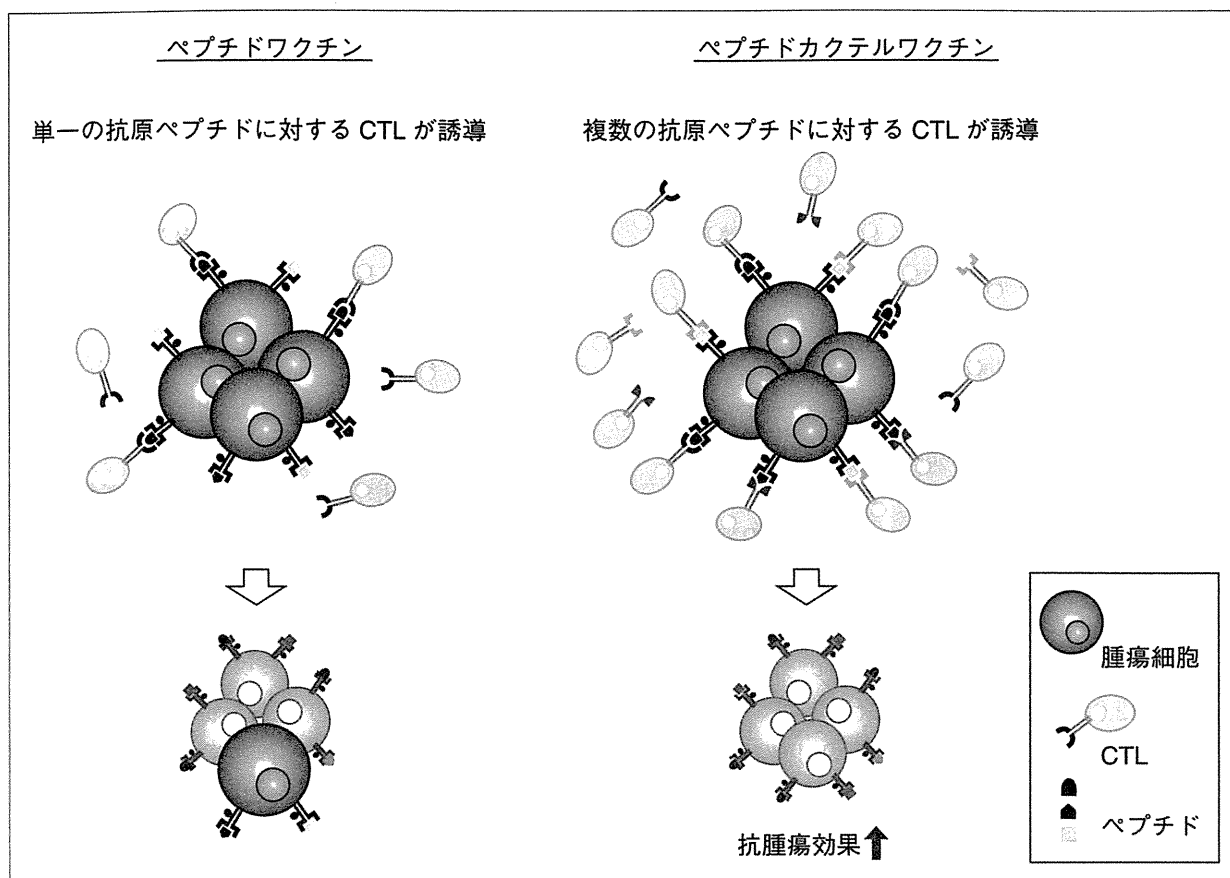


図3 単一抗原に対するペプチドワクチン療法とカクテルワクチン療法

単一抗原に対するワクチンでは単一のCTLが誘導される。カクテルワクチンとして複数のペプチドを投与することで複数抗原に対するCTLの誘導が期待される。標的細胞側には種々のペプチドが提示されているため、CTLが複数種類誘導されれば、CTLにより傷害できる可能性が高まる。

表1 がんペプチドカクテルワクチン療法における利点と不利点

利点	不利点
複数抗原に対するCTLを誘導可能	APC上のHLA-ペプチド間のaffinityに差が存在
CTLの誘導率の上昇	品質保持の確認が煩雑
標的細胞に対する傷害活性の増強	副作用増大の可能性
投与ペプチドの選択肢増加	ペプチドごとのDTH反応の評価が不可

持の確認がなされなくてはならず、ペプチド数が増えるごとに安定性の評価がより煩雑になる。次に、それぞれのMHC-ペプチド間のaffinityに差が存在するため、1か所に複数抗原に対するペプチドを投与した場合、各ペプチド間で抗原提示細胞上のMHC class I分子との結合に差が生じることが予想され、CTL誘導に影響する可能性が考えられる。がんペプチドカクテルワクチン療法においては、affinityの差による特異的CTLの誘導効率については十分考慮されなくてはならない。複数抗原ペプチドをカクテル製剤として

投与する際の利点および不利点を表に示す(表1)。

がんペプチドカクテルワクチン療法は、多彩な組み合わせが可能であり、CTLエпитープのみを用いたカクテル製剤⁶⁾⁷⁾や、CTLエピトープおよびヘルパーエピトープを含むカクテル製剤⁵⁾⁸⁾など、さまざまな臨床試験、開発がすすめられており、今後のがんペプチドワクチン療法開発の主流になるであろうことが予想される。標準治療不応の進行・再発食道がんに対する、TTK、LY6K、IMP-3の3種のペプチドワクチンを用いた臨床第II相試験では、高い忍容性が確認され、

HLAがマッチした群においてマッチしない群に比べ、統計学的な有意差には至らないものの全生存期間(OS)の延長がみられる傾向にあり[生存期間中央値(median survival time; MST) 4.6か月 vs. 2.6か月], 無増悪生存期間では、有意差をもって延長がみられた。さらには免疫学的解析において、1個<2個<3個と複数種類のペプチド特異的CTL反応が多く得られた群で、よりOSの延長がみられる傾向にあった⁹⁾。また、標準療法抵抗性の再発大腸がんに対するtegafur-uracil/leucovorin (UFT/LV)との併用で行われたRNF43, TOMM34由来ペプチドを用いたペプチドカクテルワクチン療法臨床試験においては、RNF43, TOMM34両者に対するCTL反応が得られた群において、CTL反応がどちらか一方のみであった群に対して、有意にOSの延長がみられた(MST 34.2か月 vs. 12.9か月)¹⁰⁾。また、欧米において10種のペプチドカクテルワクチン(IMA901)の第III相臨床試験が進行中である。この10種の抗原ペプチドはヒト腎細胞がん組織細胞膜表面への提示が確認されたエピトープペプチドであり、IMA901は9つのCTLエピトープと1つのヘルパーエピトープから構成される。腎細胞がんに対するIMA901の第II相臨床試験では、2種あるいはそれ以上のペプチドに対する免疫反応が得られたグループで、生存期間の延長が観察された¹¹⁾。これらの臨床試験の結果は、がんペプチドカクテルワクチン療法がより有望な選択肢となることを示すものであり、複数抗原ペプチドをカクテル製剤として用いることの一つの根拠となるものと思われる。

GPC3由来がんペプチド ワクチン療法の取り組み

筆者らは、新規がん抗原としてGPC3を同定した¹²⁾。GPC3は肝細胞がん、卵巣明細胞腺がん、肺扁平上皮がん等に発現し、小児がんにおいては、肝芽腫、腎芽腫、卵黄嚢腫等に発現がみられ、正常組織においては胎生期の肝臓、胎盤のみに高発現している。当院では進行肝細胞がんに対するGPC3由来ペプチドワクチンを用いた第I相臨床試験を行い、安全性を報告し、免疫学的解析において末梢血単核球 5×10^6 個のうち50個

以上のペプチド特異的CTLが誘導できた群では、50個未満の群に比べOS中央値の有意な延長(12.2か月 vs. 8.5か月, $P=0.033$)がみられたことを報告した¹³⁾。さらに、ワクチンによりCTLの腫瘍への浸潤が増加することを生検検体の解析で示した。このことは、ペプチドワクチン療法のproof of conceptを示した結果といえる。肝がんに対するGPC3ペプチドワクチン療法は臨床試験の結果をうけ企業への導出がなされ、GPC3ペプチドを含むカクテルワクチンの企業治験がスタートしている。また、再発予防効果の検証を目的とした、肝細胞がん根治的治療後の第II相試験が進行中であり、登録が完了している。他がん種では、卵巣明細胞腺がんに対する第II相試験が進行中であり、肝細胞がんと同様部分寛解(partial response; PR)症例もみられている。小児がんに対しても、GPC3を発現する肝芽腫等を対象とした多施設第I相試験が進行中であり、小児患者に対する安全性や至適用量決定の評価が待たれる。

難治性小児固形がんに対する がんペプチドカクテルワクチン 多施設第I相臨床試験の概要

国立がん研究センター東病院では、当院を中心に多施設で難治性小児固形がんに対するKOC1, FOXM1, KIF20A由来ペプチドカクテルワクチンを用いた第I相の医師主導治験を2013年3月よりスタートさせた。対象年齢は1~40歳で、標準治療不応の進行、再発神経芽腫、Ewing肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫、骨肉腫を対象疾患とした。これら対象疾患の治療法は外科的切除、化学療法、放射線療法などの集学的治療となる。治療成績は集学的治療により著明に改善されてきており、現在、小児がん全体では70%が治癒可能となった。しかし、約30%は難治性であり、再発した場合には5年生存割合が20~30%と予後不良である。再発後の治療として確立した治療法はなく、一般臨床では既存の薬剤を用いた治療(二次化学療法)が行われるが、その後の治療は試験的治療となる。このような難治性の小児腫瘍は100~200人程度/年であり、限られた数ではあるが、未来を担う小児を一人でも多く救

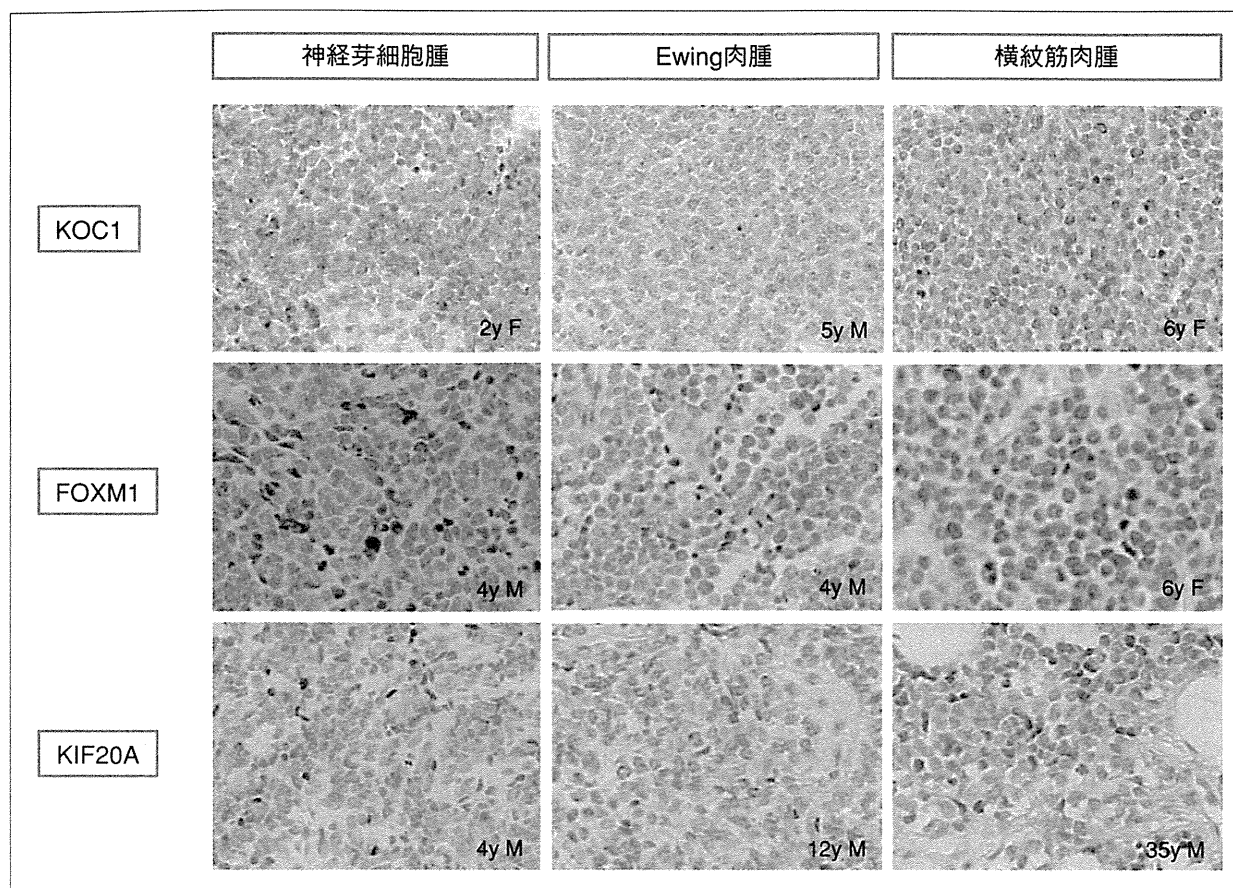


図4 各がん種と抗原の発現(免疫染色)

済できる治療法を開発することは、重要な課題であると筆者らは考えている。

難治性小児固形腫瘍の治療開発としては、新規薬剤開発、放射線治療の改良などが多く試みられているが、開発コストの問題や期待される有効性に達しない等の理由から後期開発に進む治療はほとんどない。一方、免疫療法は臨床研究としては20年以上前から検討が続けられてきた。最近では、神経芽腫に対して、標準療法に加え、抗GD2抗体とIL2/GM-CSFの併用療法が予後を延長したことが報告されている¹⁴⁾。骨肉腫に対しては、単球、マクロファージを活性化するmifamurtide (MEPACT®)の初発時標準治療との併用下でのOS、無増悪生存期間の延長効果が示され¹⁵⁾、2009年に欧州医薬品庁において非転移性骨肉腫に対し認可されるなど、小児難治性悪性腫瘍に対する治療開発戦略において、がん免疫療法は大きな比重を占めるに至っている。また、ペプチドワクチン療法では、本邦において、小児横紋筋肉腫に対するWT1ペプチドでの寛解例

の報告もみられている¹⁶⁾。

本試験において用いるNCCV Cocktail-1はHLA-A24拘束性KOC1, FOXM1, KIF20A由来ペプチドのカクテル製剤である。小児固形腫瘍におけるKOC1, FOXM1, KIF20Aの発現について報告はないが、自験例において、ほとんどの小児固形腫瘍で高い発現率を呈していた。具体的には、免疫組織染色においてKOC1, FOXM1については、神経芽腫5名中5名、Ewing肉腫ファミリー腫瘍5名中5名、横紋筋肉腫6名中6名、骨肉腫5名中5名、KIF20Aについては、神経芽腫5名中4名、Ewing肉腫ファミリー腫瘍5名中5名、横紋筋肉腫6名中6名、骨肉腫5名中5名で発現を確認した(図4)。以上の結果をふまえ、小児固形腫瘍患者の中でも、ほとんどの神経芽腫、Ewing肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫、骨肉腫にKOC1, FOXM1, KIF20A発現が確認されることから、これらの疾患に対して上記3種類のがん抗原由来のがんペプチドカクテルワクチン療法の開発が可能と判断した。カクテルワク

チン療法とした理由は上述した通りである。本試験が成功し、企業治験としての第II相試験に引き継がれ、難治性小児がん患者の恩恵となればこの上ない喜びである。

おわりに

FDAは、2009年9月にがん治療用ワクチンに対する臨床的考察としての企業向けガイダンスードラフト版を発表し、2011年10月に最終版を発表した¹⁷⁾。最終版にはmulti-antigen vaccinesの項が新たに設けられ、以下のごとく述べられている。「複数の腫瘍特異的な免疫応答を惹起し、潜在的な腫瘍逃避機構を回避するため、がんワクチン製剤は、複数の腫瘍関連抗原を含む場合がある。一般的に、複数の腫瘍関連抗原を含むがんワクチン製剤の各成分に関しては、個別に安全性と活性を評価する必要はない。ケースバイケースである。」このように複数抗原ペプチドワクチンの投与については、FDAからも言及があり、新規ワクチン療法としての開発がさらに期待される。現在本邦においては、がん治療に対し認可されたワクチン療法はなく、実用化にはランダム化比較試験において、その有効性を実証しなければならない。がん免疫療法は現在精力的に開発がすすめられており、がんペプチドカクテルワクチン療法が、今後のがん治療の一端を担うことを期待したい。

文 献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991 ; 254 : 1643.
- 2) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004 ; 10 : 909.
- 3) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 411.
- 4) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 711.
- 5) Barve M, Bender J, Senzer N, et al. Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10-epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine, in metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 4418.
- 6) Slingluff CL Jr, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, et al. Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multi-peptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 6386.
- 7) Meyer RG, Korn S, Micke P, et al. An open-label, prospective phase I/II study evaluating the immunogenicity and safety of a ras peptide vaccine plus GM-CSF in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007 ; 58 : 88.
- 8) Maslak PG, Dao T, Krug LM, et al. Vaccination with synthetic analog peptides derived from WT1 oncoprotein induces T-cell responses in patients with complete remission from acute myeloid leukemia. *Blood* 2010 ; 116 : 171.
- 9) Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, et al. Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens. *J Transl Med* 2012 ; 10 : 141.
- 10) 杉浦史哲, 井上啓介, 奥野清隆, ほか. 進行再発大腸癌に対するUFT/LV併用ペプチドワクチンカクテル療法の臨床試験. *癌と化学療法* 2012 ; 39 : 1760.
- 11) Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, et al. Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012 ; 18 : 1254.
- 12) Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 306 : 16.
- 13) Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, et al. Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma : Immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clin Cancer Res* 2012 ; 18 : 3686.
- 14) Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin

- for neuroblastoma. N Engl J Med 2010 ; 363 : 1324.
- 15) Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma : the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival—a report from the Children’s Oncology Group. J Clin Oncol 2008 26 : 633.
- 16) Ohta H, Hashii Y, Yoneda A, et al. WT1 (Wilms tumor 1) peptide immunotherapy for childhood rhabdomyosarcoma : a case report. Pediatr Hematol Oncol 2009 ; 26 : 74.
- 17) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry : Clinical Considerations for Therapeutic Cancer Vaccines. October 2011.

*

*

*

6. 腫瘍抗原の分類と 抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法

澤田 雄, 中面哲也

腫瘍抗原の同定により, 科学的な根拠に基づくがん免疫療法の開発が可能となり, 現在検証試験を含めた多くの臨床試験を行う段階となっている。これまでにさまざまな方法で腫瘍抗原が同定されてきたが, 治療標的として用いる際には各抗原の特徴をとらえる必要がある。本稿では, これまでに同定された腫瘍抗原の分類およびその生物学的特性について, 臨床応用への観点も含めて概説する。また腫瘍抗原に対する免疫応答機構の解明もがん免疫療法の開発に不可欠であり, われわれが取り組んできた腫瘍抗原 GPC3 (glypican-3) ペプチドワクチン療法の臨床試験を例に, 抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法についても紹介する。

はじめに

腫瘍抗原を標的としたがん免疫療法は, 理論上重篤な有害事象の生じる可能性が低く, 魅力的な治療法と考えられ, その腫瘍抗原同定のためにヒトや実験動物のがんを用いて多くの研究がなされてきた。1991年に, ベルギーのBoonらのグループは, メラノーマ患者の細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が認識する腫瘍抗原, MAGEの遺伝子クローニ

ングに成功し, ヒトの腫瘍抗原を分子レベルではじめて明らかにした¹⁾。IL-2使用によるCTLのクローン化と遺伝子の発現クローニング法という2つのよく確立された技術を組み合わせることと, T細胞による抗原認識の分子機構の解明という学問的進展がこれを可能にらしめたと考えられる。

CTLは抗原を丸ごと認識するのではなく, 抗原タンパク質由来の8~12個のアミノ酸からなるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I 分子とが

[キーワード&略語]

腫瘍抗原, 細胞傷害性T細胞 (CTL), エピトープペプチド, GPC3 (glypican-3), がんワクチン

CTL: cytotoxic T lymphocyte

(細胞傷害性T細胞)

CT抗原: cancer-testis antigen

(がん・精巣抗原)

ELISPOT: enzyme-linked immunospot

GPC3: glypican-3 (グリピカン3)

MHC: major histocompatibility complex

(主要組織適合遺伝子複合体)

NCI: National Cancer Institute

(米国国立がん研究所)

SEREX: serological identification of antigens
by recombinant expression cloning

TIL: tumor-infiltrating lymphocyte

(腫瘍浸潤リンパ球)

Tumor antigens, and immunomonitoring of patients during antigen specific immunotherapy

Yu Sawada/Tetsuya Nakatsura: Division of Cancer Immunotherapy, Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, National Cancer Center (国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター免疫療法開発分野)

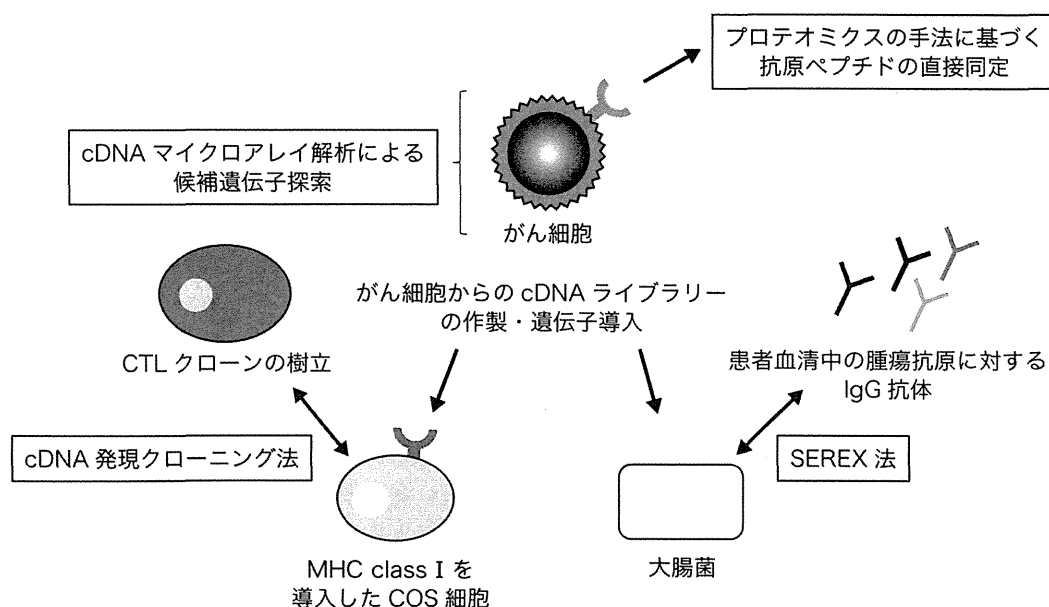


図1 腫瘍抗原同定のためのアプローチ

結合した複合体を認識する。したがって、抗原タンパク質そのものが細胞表面に存在する必要はなく、核や細胞質に存在する分子も適切にペプチドに分解されMHC分子に結合すれば、細胞表面に移動しT細胞に認識される。この画期的な発見は、それまで主に抗体を用いて検出することにより細胞表面分子に限定して考えられていた腫瘍抗原の概念を大きく変え、腫瘍抗原となりうる分子の種類と数を飛躍的に拡大させた。

Boonの発表後、がん患者由来のCTLが認識するメラノーマや他のがんの腫瘍抗原が、分子生物学的方法などを用いて同定されている²⁾。同定された抗原をターゲットにしたがんの免疫療法の臨床試験は、現在検証試験を含めた多くの臨床試験を行う段階となっている。またわれわれは、新規腫瘍抗原GPC3 (glypican-3)を同定し、国立がん研究センター東病院でがんペプチドワクチン療法の臨床試験を行ってきた。本稿では、腫瘍抗原の種類とその基礎的・臨床的意義について概

説し、われわれが取り組んできたGPC3ペプチドワクチンの臨床試験を例に、抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法についても紹介する。

1 腫瘍抗原の同定法

腫瘍抗原の固定法としては、これまでに数多くの手法が報告されており、代表例を以下に示す(図1)。最初に行われたcDNA発現クローニング法^{*1}(MAGEなど)は、がん細胞に特異的に反応するT細胞クローンあるいは株を用いて、がん細胞由来のcDNA発現ライブラリーとヒトMHC class Iを導入したCOS細胞などのライブラリーをスクリーニングすることで、T細胞が認識する抗原をクローニングする方法である。最もオーソドックスな方法であるが、T細胞株とがん細胞株の両者を要するなど技術的な制約が多い。そこで、抗原特異的なT細胞株の樹立を必要としないスクリーニング方法として用いられたのが、SEREX法^{*2}や網

※1 cDNA発現クローニング法

がん細胞由来のcDNA発現ライブラリーとMHC class Iを導入したCOS細胞などに対して、腫瘍反応性T細胞株の免疫応答を解析することで、がん抗原遺伝子をクローニングする方法。腫瘍反応性T細胞株の樹立を要する。

※2 SEREX法

がん細胞由来のcDNAライブラリーを大腸菌などに発現させ、患者血清中の抗腫瘍抗原に対するIgG抗体が反応するがん抗原をクローニングする方法。腫瘍反応性T細胞株の樹立を必要とせずに抗原の検索が可能。

表 同定された腫瘍抗原の分類と特徴

がん抗原	代表的な抗原名	特徴
CT (cancer-testis) 抗原	MAGE, NY-ESO-1	がん組織および正常組織では testis (精巣), 卵巣, 胎盤のみに発現する抗原. 生殖系の細胞には MHC 分子の発現がないか非常に少なく, がん特異的に標的にすることが可能
分化抗原	tyrosinase, gp100, Melan-A (MART-1), PSA	がん細胞とそのがんが発生した正常組織に特異的に発現する抗原
遺伝子異常に伴う抗原		
点突然変異抗原	p53	単一もしくは複数の塩基に変異が生じた遺伝子産物に伴う抗原
過剰発現抗原	HER2, hTERT	遺伝子産物が, 増幅あるいは過剰発現することで免疫原となった抗原
スプライシング変異抗原	Survivin-2B	スプライシング異常に由来する分子に伴う抗原
融合遺伝子	bcr/abl	融合遺伝子産物に伴う抗原
ウイルス抗原	HPV E6, 7	ウイルス関連配列に伴う抗原

羅的遺伝子解析法などである。SEREX 法 (NY-ESO-1 など) は, がん患者血清中の IgG 抗体と, がん細胞 (あるいは組織) 由来の cDNA 発現ライブラリーとの反応を検索し, 血清中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子をクローニングする方法である。簡便であり, 腫瘍抗原の候補が世界中でたくさん同定されたが, 現在まで生き残っている抗原はごく一部にすぎない。また網羅的遺伝子解析法 (GPC3 など) は, cDNA マイクロアレイ解析などを行うことで, 遺伝子発現の組織特異性ががん特異的なものを抗原の候補として見出す方法である。抗原遺伝子 (タンパク質) の発現のがん特異性という意味では優れた方法である。しかし, SEREX 法や網羅的遺伝子解析法によって見出された遺伝子 (タンパク質) は, あくまでもがん抗原の候補であり, 候補となったタンパク質のなかに, CTL が認識する抗原ペプチドが存在するかの保証がないため, その保証を得るための免疫原性を証明する実験を必要とする。

また腫瘍抗原ペプチドの同定に, がん細胞の MHC class I に結合しているペプチドを分離し, 質量分析器やシークエンサーなどを用いて直接同定する方法は以前より開発されていたが, 近年のプロテオミクスの技術の発展に伴い, 同手法による抗原ペプチド同定の発展も期待される。ドイツの Jasuja らのグループは, 腎がんに対して, 同手法を利用し同定したペプチドのカクテルワクチンを開発しており, シクロホスファミドと併用した臨床試験の結果を報告している³⁾。

2 腫瘍抗原の分類およびその特性

腫瘍抗原は, がん・精巣 (cancer-testis : CT) 抗原, 分化抗原, 遺伝子異常に関する抗原 (点突然変異抗原, 過剰発現抗原, スプライシング変異抗原, 融合遺伝子産物), ウイルス抗原などに分類される (表)。以下に各抗原の詳細について述べる。

1) がん・精巣 (CT) 抗原

CT 抗原と総称される抗原は, 名前が示すとおり to 種々のがん組織および正常組織では testis (精巣), 卵巣, 胎盤のみに発現する抗原群で, ヒトのメラノーマで同定された最初のがん抗原 MAGE が CT 抗原の代表である¹⁾。発現パターンから免疫療法の理想的なターゲットと考えられており, 同定された CT 抗原をターゲットとしたがん免疫療法の臨床試験が多く行われてきた。CTL で同定された MAGE, BAGE, GAGE などの CT 抗原に加えて, SEREX 法でも CT 抗原である NY-ESO-1 がメラノーマと食道がんより同定された⁴⁾⁵⁾。現在では 100 以上の分子が同定され, データベース化も行われている (CT antigen data base, <http://www.cta.lncc.br/index.php>)。がん免疫療法においては, CT 抗原に対する CTL は MHC 分子が存在しない生殖系細胞を攻撃することなく, がん細胞のみを選択的に攻撃すると考えられる。CT 抗原は, もともと同定されたがんに限らず, 頻度はそう高くないが, さまざまながんが発現する。食道がんより同定された NY-ESO-1 は, メラノーマの約 40 % に, また乳がんの約

30%にも発現する。この事実は、CT抗原が抗腫瘍免疫の標的として多くのがんに応用できる可能性を示しており、その有用性を高めている。

2) 分化抗原

がん細胞とがんが発生した正常組織に特異的に発現する分化抗原が、がん患者の免疫系によって抗原として認識されることがある。例えば、正常メラノサイトにも発現しているtyrosinase, gp100, Melan-A (MART-1)などを認識するCTLが、メラノーマ患者から樹立されている。Rosenbergらは、メラノーマ患者に対しては、分化抗原由来のペプチド、もしくはMHCクラスI分子への結合親和性を高めるように改変されたペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験を早期に行ってきた⁶⁾。gp100ペプチドワクチン+IL-2投与とIL-2単独投与の比較第Ⅲ相臨床試験では、ワクチンの無増悪生存期間と奏効率への有意な上乗せ効果は認めたが、当初にがんワクチンに期待された治癒をもたらすほどの効果は認めなかった。一方でRosenbergらは、抗がん剤と全身放射線照射にて体内リンパ球除去前処置後、体外で大量培養した腫瘍浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocyte: TIL)を体内へ戻すTIL養子免疫療法によって、進行メラノーマに対して、奏効率70%という驚異的な結果を報告している⁷⁾。この治療で用いられたCTLのなかには、MART-1, gp100といったメラノサイト分化抗原由来のペプチドに反応するものも多く、この治療により、正常メラノサイトへの攻撃による白斑やぶどう膜炎などの自己免疫現象も観察された。このことは、がんを拒絶できるほどの免疫療法が行われた場合、そのCTLが認識する抗原が自己の正常臓器にも発現するものであれば、その臓器を傷害してしまう可能性があることを示している。しかし、有望な分化抗原がある場合には、例えば胃全摘出を行った胃がん患者の転移がんを分化抗原の免疫療法のターゲットとすることで、副作用のない治療も可能になると考えられる。

3) 遺伝子異常に由来する抗原

がんは遺伝子異常が蓄積して起きる病気であり、起きた遺伝子異常が、がん細胞の生存に必須である場合もある。がん細胞特異的に発生する遺伝子異常を免疫療法のターゲットにできれば理想的である。また、がん細胞の不死化に必須であるがん遺伝子やがん抑制遺

伝子などの異常をターゲットとして免疫を成立させることができれば、大きな治療効果が期待できる。これまで、変異遺伝子の産物に対してがん患者の免疫系が応答を示すか否かということに関して、多くの研究がなされてきた⁸⁾。遺伝子異常に起因するいくつかの腫瘍抗原が同定されており、ヒトの免疫系ががん関連変異遺伝子の産物を認識して反応することを示している。具体的には、①点突然変異遺伝子産物(p53など)、②増幅あるいは過剰発現した遺伝子産物(HER2やhTERTなど)、③スプライシング異常産物(Survivin-2Bなど)、さらに④融合遺伝子産物(bcr/ablなど)としての性格をもつ腫瘍抗原が同定されている。また変異遺伝子のエピトープのいくつかは同定されており⁹⁾、その一部はデータベース化も試みられている(<http://cancerimmunity.org/peptide/mutations/>)。

問題は、特定の遺伝子異常ががんにおいて発生する頻度と、がん細胞の生存に必須である遺伝子異常が免疫原性を有するか否かということである。発生頻度の低い遺伝子異常は、いくらその遺伝子産物の免疫原性が強くても汎用性という面から有用性に乏しい。仮にがん細胞の生存に必須である異常遺伝子の産物が強い免疫原性をもっていれば、そのような遺伝子異常をもつがん細胞は免疫監視機構によって除かれるはずである。したがって、できあがってしまったがんに存在する異常遺伝子の産物の免疫原性はきわめて弱いにちがいないという仮説も生じうる。異常遺伝子産物に由来する抗原が、免疫療法のターゲットとなりうるか否か、今後の研究が期待される。

3 理想的な腫瘍抗原とは

免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に適用できるかという汎用性、がん特異性、免疫原性、がん拒絶能、抗原消失性および自己免疫などの有害事象誘導の危険性などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。理想的ながん拒絶抗原が備えているべき性質として、①がん患者の体内において免疫応答を誘導する抗原、②発現の組織特異性が優れた抗原、③免疫系からの逃避が起りにくい抗原、の3つが重要である。

米国NCI(National Cancer Institute)では、腫瘍抗原の有用性について、治療効果、免疫原性、特異性、がん遺伝子性、発現レベル・陽性率、がん幹細胞での