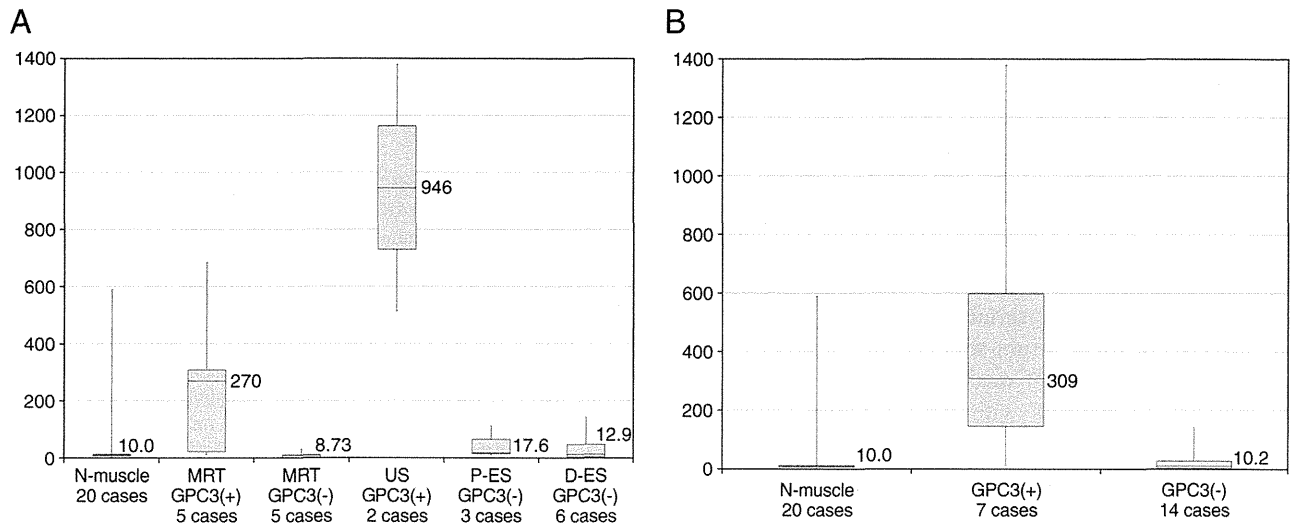


**Fig. 1** Hematoxylin and eosin histologic and GPC3 immunohistochemical findings. A and B, Malignant rhabdoid tumor (4-month-old male; liver). C and D, Pediatric undifferentiated soft-tissue sarcoma (4-year-old male; retroperitoneum). The tumor cells showed overexpression of GPC3 protein (B, D). E and 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 $\times 200$ ).



**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.

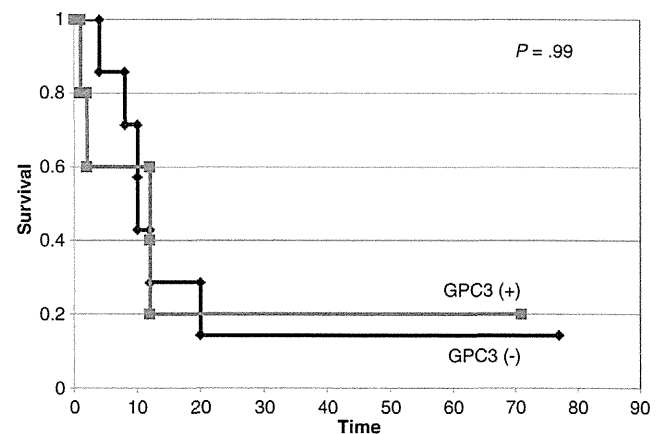
*GPC3* protein expression has been demonstrated in various tumors, such as embryonal tumor (Wilms tumor, hepatoblastoma and neuroblastoma), germ cell tumor (yolk sac tumor, immature teratoma and embryonal carcinoma), hepatocellular carcinoma, squamous cell carcinoma of the lung, malignant melanoma, ovarian 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, Assanases 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>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<sup>®</sup>)が<sup>3)</sup>、第III相臨床試験の結果を受け、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<sup>®</sup>)が悪性黒色腫に対する生存期間の延長を示し<sup>4)</sup>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相医師主導試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 &amp; 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 &amp; Clinical Trial Center, National Cancer Center, Kashiwa, Chiba 277-8577, JAPAN

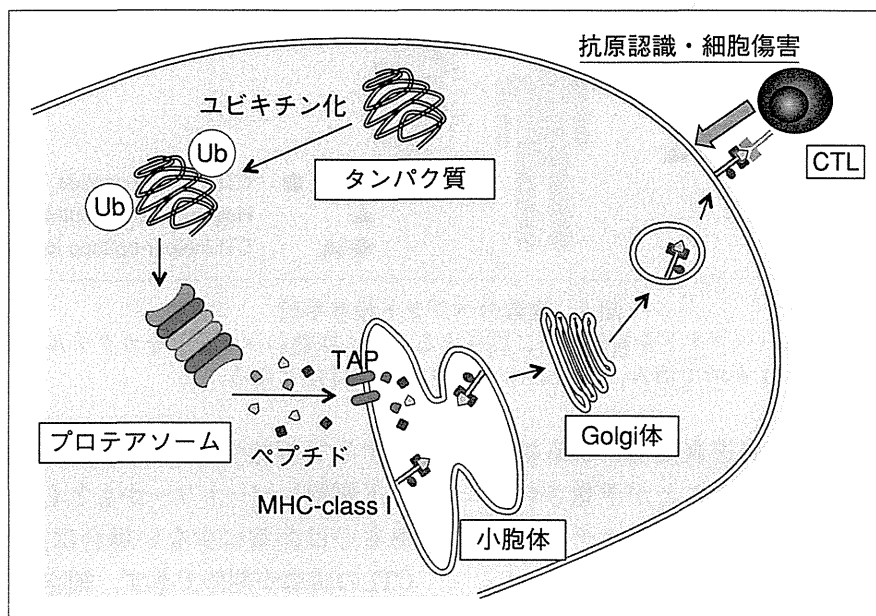


図1 内在性抗原のMHC class I分子による抗原提示

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エピトープである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できなくなる。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

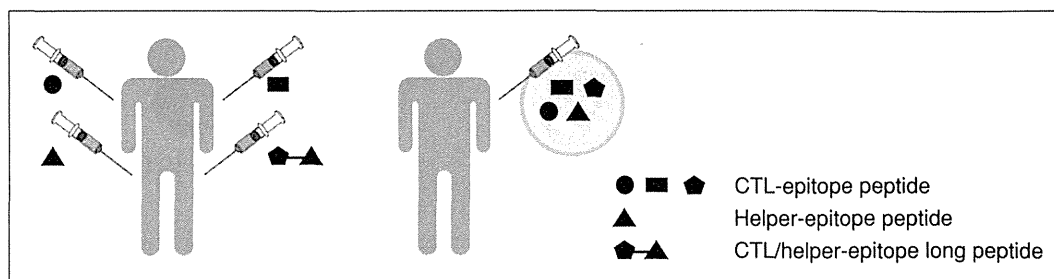


図2 複数のペプチド投与手段

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<sup>5)</sup>。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、投与方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、担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

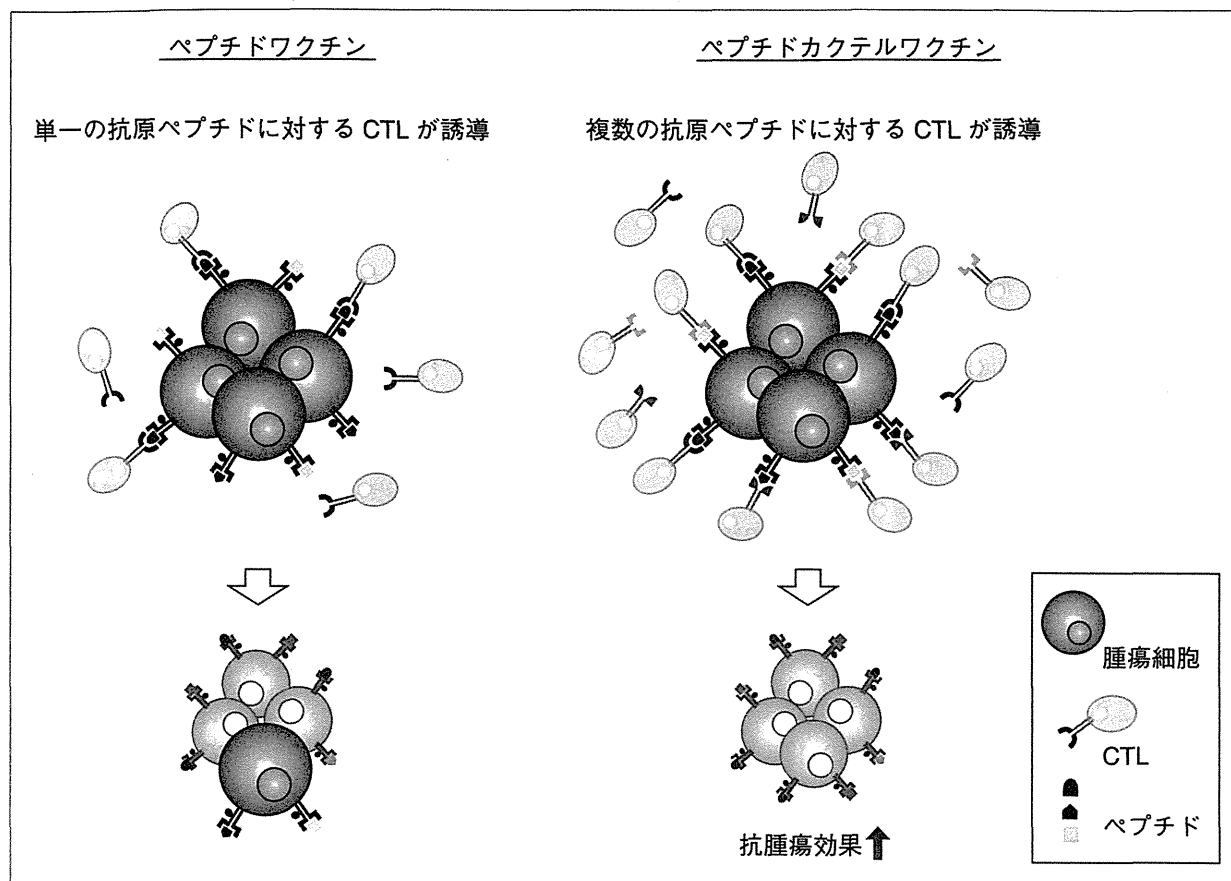


図3 単一抗原に対するペプチドワクチン療法とカクテルワクチン療法

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 CTLの誘導率の上昇 標的細胞に対する傷害活性の増強 投与ペプチドの選択肢増加	APC上のHLA-ペプチド間のaffinityに差が存在 品質保持の確認が煩雑 副作用増大の可能性 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エピトープのみを用いたカクテル製剤<sup>6)7)</sup>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<sup>5)8)</sup>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<sup>9)</sup>。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)<sup>10)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>12)</sup>。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  $5 \times 10^6$  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<sup>13)</sup>。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

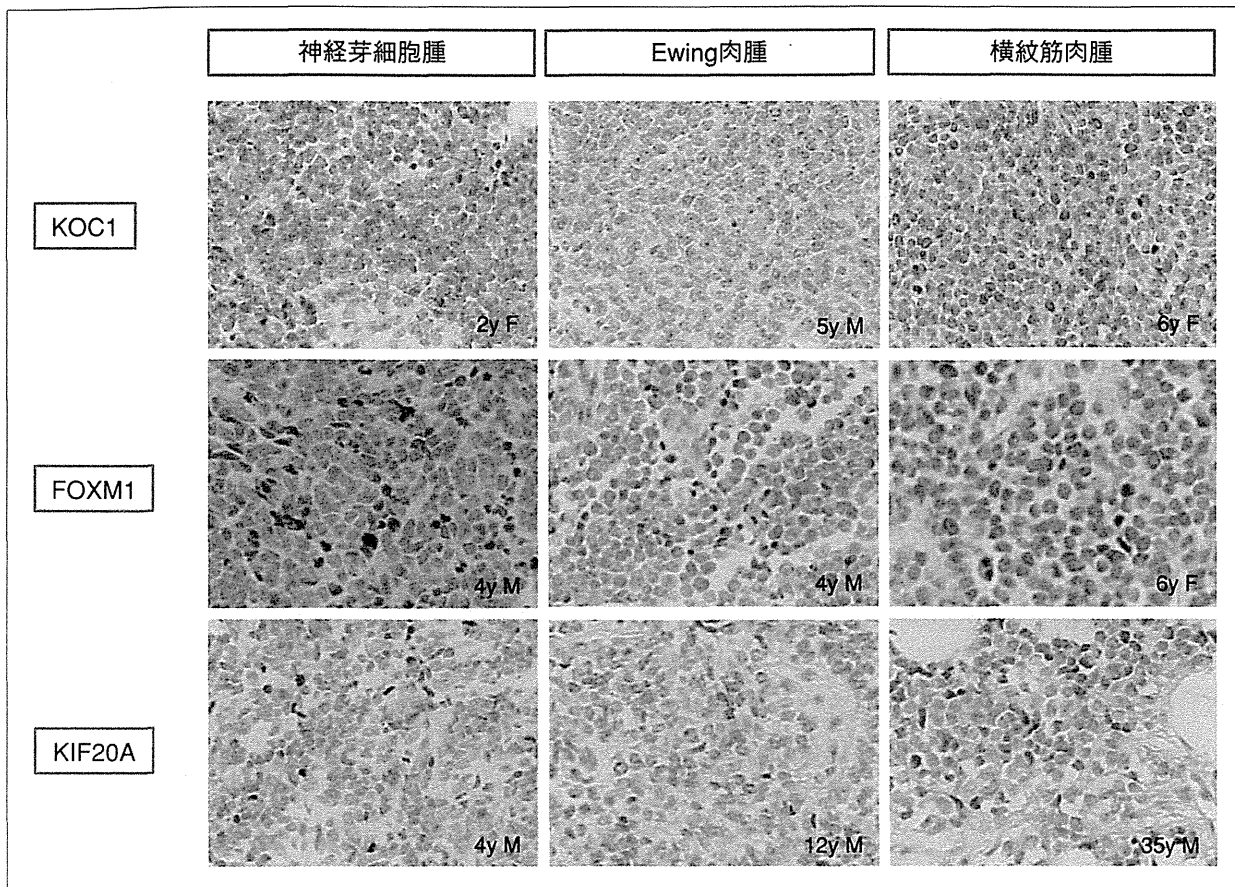


図4 各がん種と抗原の発現(免疫染色)

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<sup>14)</sup>。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<sup>15)</sup>、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<sup>16)</sup>。

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<sup>17)</sup>。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<sup>1)</sup>。IL-2使用によるCTLのクローニング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たことと, 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な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)

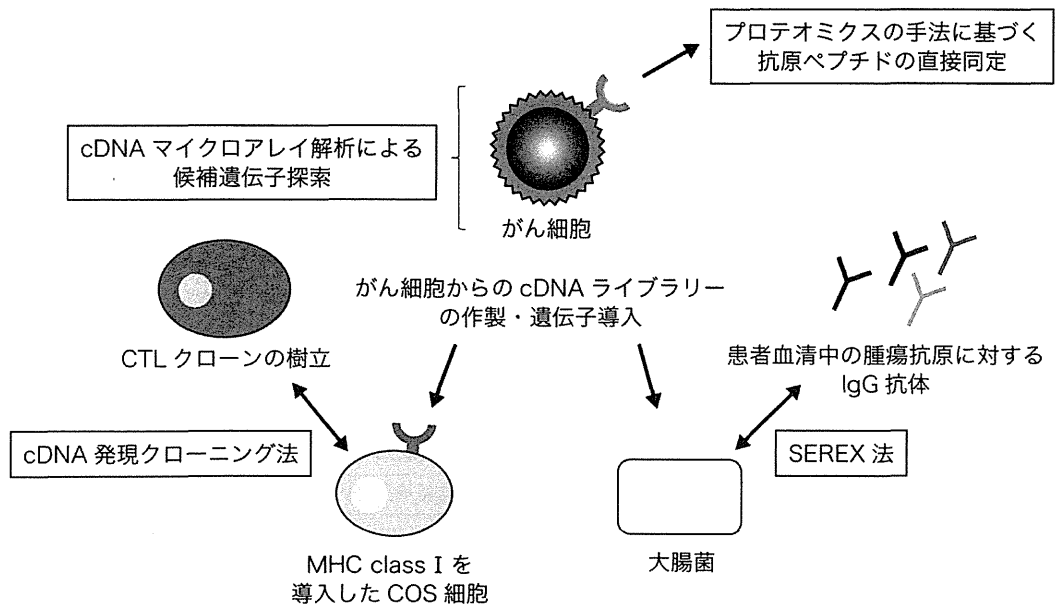


図1 腫瘍抗原同定のためのアプローチ

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<sup>2)</sup>。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<sup>\*1</sup> (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<sup>\*2</sup>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
<b>遺伝子異常に伴う抗原</b>		
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, 質量分析器やシーケ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<sup>3)</sup>。

## 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<sup>1)</sup>。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<sup>4)5)</sup>。現在では100以上の分子が同定され, データベースも行われている (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<sup>6)</sup>。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乘せ効果は認められたが、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<sup>7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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<sup>9)</sup>、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が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。

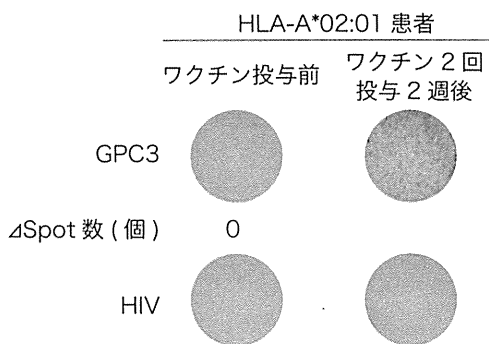
## 3 理想的な腫瘍抗原とは

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。

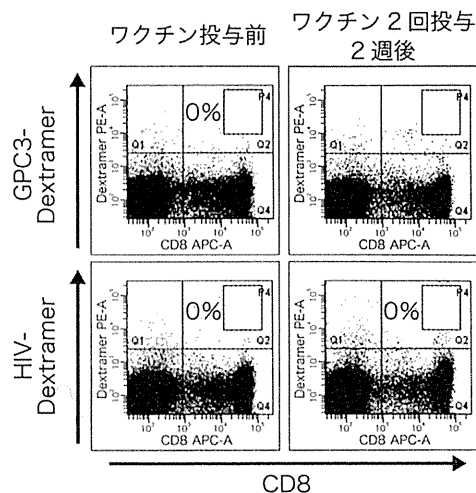
米国NCI(National Cancer Institute)では、腫瘍抗原の有用性について、治療効果、免疫原性、特異性、がん遺伝子性、発現レベル・陽性率、がん幹細胞での



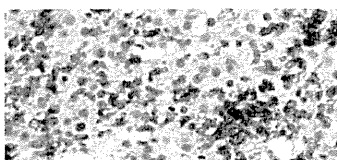
A) 1) ex vivo IFN- $\gamma$  ELISPOT assay



2) GPC3-Dextramer assay



3) 腫瘍内 CD8<sup>+</sup>リンパ球浸潤

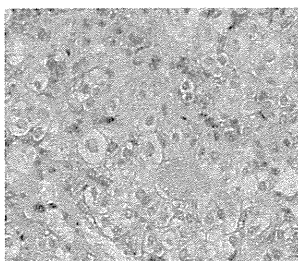


4) 腫瘍内ペプチド特異的 CTL

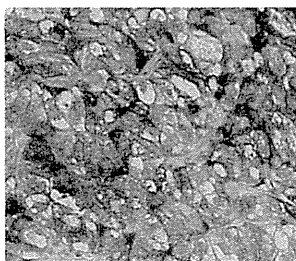
GPC3-Dextramer assay で、腫瘍浸潤リンパ球中の GPC3 ペプチド特異的 CTL を検出・単離して、GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立して解析

B)

1) MHC class I の発現



2) がん抗原タンパク質の発現



3) MHC class I とペプチド複合体の密度の評価

MHC class I とペプチド複合体

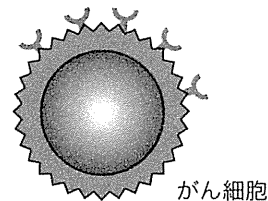


図2 GPC3 ペプチドワクチン臨床試験における免疫モニタリング

A) CTL 側の評価. 末梢血中の GPC3 ペプチド特異的な CTL が、ワクチン投与後に増加することを IFN- $\gamma$  ELISPOT assay および GPC3-Dextramer assay で示した. また組織中の CD8<sup>+</sup>リンパ球や GPC3 ペプチド特異的 CTL についても評価を行っている. B) がん細胞側の抗原発現の評価. MHC class I と抗原タンパク質を免疫組織学的解析で評価する他に、MHC class I とペプチド複合体の密度の評価も必要と考えられる (A, B ともに文献 11 より改変して転載)

発現の有無、抗原陽性患者数、エピトープ数、抗原発現部位の 9 項目を用いて評価することを試みている<sup>10)</sup>. 報告された 2009 年の時点では、75 個の抗原のうち、臨床試験での免疫原性の評価は 46 個の抗原にしか行われていなかったが、現在も多くの腫瘍抗原を用いた臨床試験が行われており、今後の解析が期待される.

4 抗原特異的免疫療法の免疫学的評価法

抗原特異的免疫療法の臨床試験では、CTL 側の評価、がん細胞側の抗原発現の評価が、ともに重要と考えられる. われわれが行ってきた進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチン療法臨床試験で

の免疫モニタリングを例として示す(図2A)<sup>11)</sup>。CTL側の評価として、GPC3ペプチドワクチン投与中は2週間ごとに末梢血単核球を採取している。末梢血単核球中の*ex vivo* IFN- $\gamma$  ELISPOT (enzyme-linked immunospot) assayとマルチマーを使用したフローサイトメーターの解析(GPC3-Dextramer assay)によりGPC3ペプチド特異的CTLの頻度をモニタリングしている。さらにGPC3ペプチド特異的CTLを単離して、多数のGPC3ペプチド特異的CTLクローンを樹立して解析している<sup>12)</sup>。また生検による組織学的解析を行い、ワクチン投与後にCD8<sup>+</sup>細胞が、がん組織内に浸潤する症例を確認している。現在ではGPC3-Dextramer assayで、腫瘍浸潤リンパ球中のGPC3ペプチド特異的CTLの検出とそのクローン化にも成功している。このようにわれわれは、末梢血中および腫瘍内に浸潤するGPC3ペプチド特異的CTLの頻度、質ともに可能な限り評価し、その臨床効果との相関性を示してきた。

がん細胞側の抗原発現の評価として、免疫組織学的評価で、HLA class I、抗原GPC3の発現の評価を行っている(図2B)。またがん細胞上のMHC class Iと抗原ペプチド複合体の密度の評価も試みているが、今のところ難しい。しかし、がん細胞上のMHC class Iと抗原ペプチド複合体の密度は、抗原特異的免疫療法の治療効果のバイオマーカーとして期待できるのではないかと考えている。

## おわりに

腫瘍抗原の同定法、腫瘍抗原の分類、理想的な腫瘍抗原について概説し、腫瘍抗原を用いた臨床試験における免疫学的評価法についても触れた。

これまでも多くの腫瘍抗原が同定されてきたが、

さらに有望な腫瘍抗原およびエピトープペプチドの探索は、がん免疫療法の開発において欠かすことのできない柱の1つであり、今後も新たな腫瘍抗原を同定する研究は必要と思われる。

## 文献

- 1) van der Bruggen, P. et al. : Science, 254 : 1643-1647, 1991
- 2) Kawakami, Y. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 3515-3519, 1994
- 3) Walter, S. et al. : Nat. Med., 18 : 1254-1261, 2012
- 4) Sahin, U. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 : 11810-11813, 1995
- 5) Chen, Y. T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 : 1914-1918, 1997
- 6) Schwartzenuber, D. J. et al. : N. Engl. J. Med., 364 : 2119-2127, 2011
- 7) Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. : Curr. Opin. Immunol., 21 : 233-240, 2009
- 8) Heemskerk, B. et al. : EMBO J., 32 : 194-203, 2013
- 9) Warren, R. L. & Holt, R. A. : Human Immunology, 71 : 245-254, 2010
- 10) Cheever MA, et al : Clin. Cancer Res., 15 : 5323-5337, 2009
- 11) Sawada, Y. et al. : Clin. Cancer Res., 18 : 3686-3696, 2012
- 12) Yoshikawa, T. et al. : Cancer Sci., 102 : 918-925, 2011

### <筆頭著者プロフィール>

澤田 雄：2005年、山形大学医学部卒業後、横浜市立大学消化器・腫瘍外科学(第二外科)入局。'10年、日本外科学会外科専門医取得。'11年4月より国立がん研究センター東病院免疫療法開発分野で、'13年6月より現所属にて中面哲也分野長の指導のもとに、がん免疫療法の開発を行っている。'12年4月より財団法人がん研究振興財団リサーチ・レジデント。現在は、ペプチドワクチン療法の臨床試験ならびにがん抗原特異的免疫療法の効果増強をめざした研究に従事している。

## 2. 肝臓のワクチン療法

国立がん研究センター東病院臨床開発センター免疫療法開発分野

大藤 和也 / 中面 哲也  
Kazuya Ofuji / Tetsuya Nakatsura

### はじめに

癌に対するワクチン療法とは、主に癌特異抗原を認識し、癌細胞を殺傷する能力を有する細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を効率的に誘導することにより、抗腫瘍効果をもたらす治療法を指す。米国において、癌ワクチン治療薬としては初めて、前立腺癌に対するProvenge<sup>®</sup>が2010年にFDAに承認された。わが国における癌免疫療法開発は、ペプチドワクチン療法を中心に盛んな基礎、臨床研究が展開されている。癌ワクチンの実用化には、ランダム化試験での有効性を示す必要があり、いまだ解決しなければならない課題も多い。本稿では、肝臓に対するワクチン療法の概略と現況、その展望について述べる。

### CTL誘導を目的としたペプチドワクチン療法の原理

癌に対するペプチドワクチン療法の原理を図1に示す。最終エフェクター細胞であるCTLは、細胞膜表面に提示される9~10個のアミノ酸断片（ペプチド）とHLA class I分子の複合体を抗原として認識する。ペプチドワクチン療法は、人工的に合成した癌抗原由来ペプチドをアジュバントと呼ばれる免疫を活性化する添加剤とともに投与することにより、抗原特異的CTLを誘導するものである。

### 癌特異抗原

癌特異抗原の免疫療法への応用には、癌抗原の発現頻度、腫瘍特異性、免疫原性などの特徴を捉え

ることが重要である。われわれは、肝臓の新規癌抗原としてglypican-3 (GPC3)を同定し<sup>1)</sup>、臨床試験を実施してきた。癌抗原としてのGPC3の最大の特徴は、肝臓に高頻度に発現し、正常組織においては胎生期の肝臓および胎盤でのみ発現している点である。したがって、GPC3特異的CTLを体内で誘導した場合、理論上、抗腫瘍効果は期待できるが自己免疫応答を誘導しないため、GPC3は理想的な癌特異抗原であるといえる。

### 肝臓に対するワクチン療法の臨床応用

国立がん研究センター東病院で進行肝臓に対するGPC3ペプチドワクチンの第I相臨床試験が施行され、ワクチン投与開始後2カ月

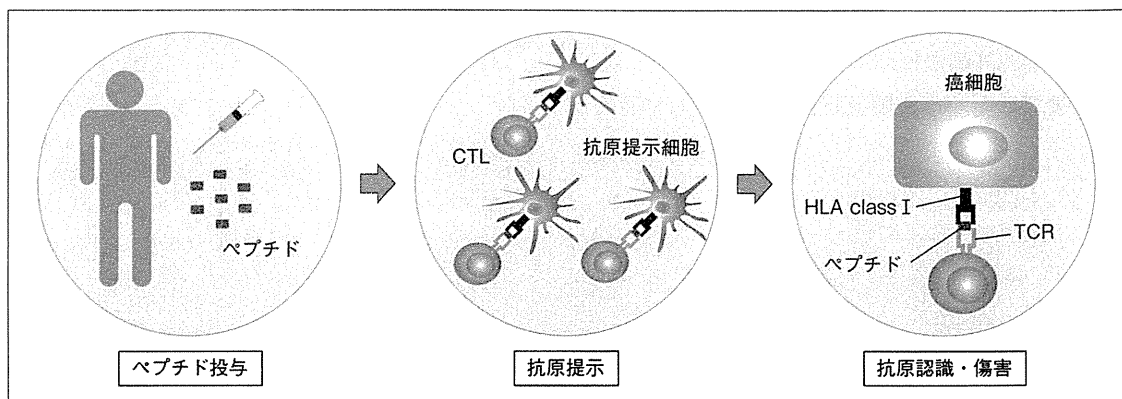
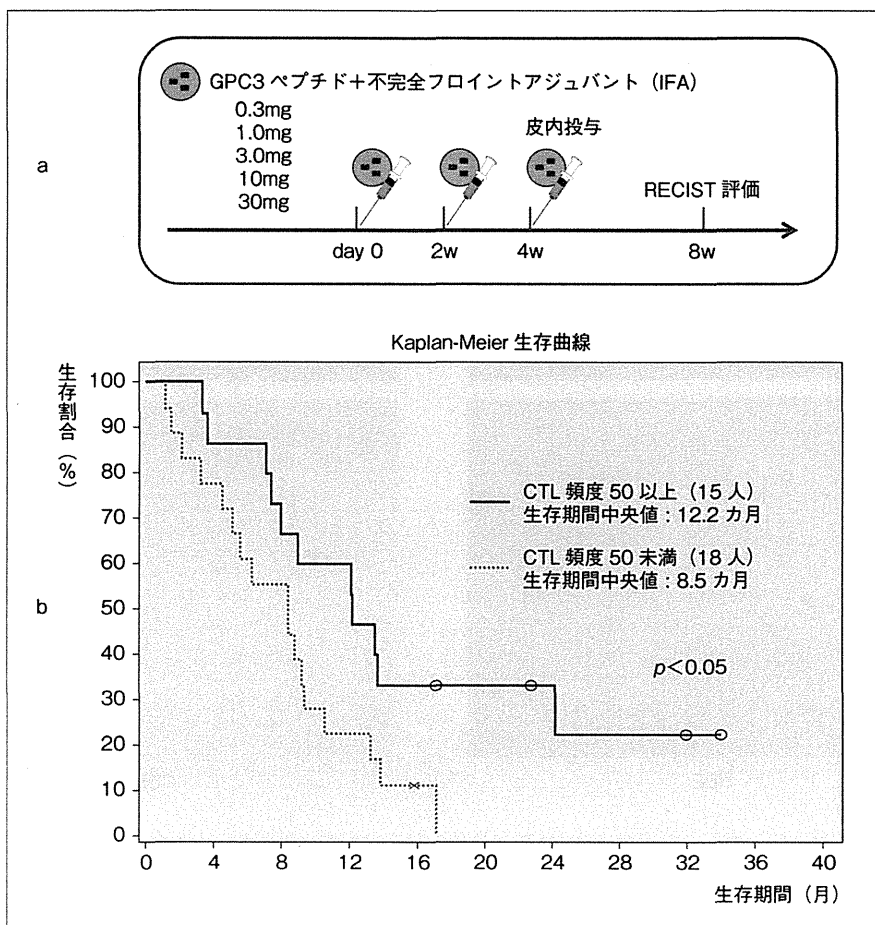


図1 ペプチドワクチン療法の原理

人工的に合成した9~10アミノ酸からなる癌抗原由来ペプチドを投与する。樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞は、投与されたペプチドを抗原提示する。抗原提示を受けた細胞傷害性T細胞は増殖、活性化し、癌局所へ遊走する。癌局所へ遊走した細胞傷害性T細胞は癌細胞が内在性に提示する癌抗原由来ペプチドとHLA class I複合体を認識し、傷害する



[文献2]より引用・改変

図2 進行肝癌に対するGPC3ペプチドを用いた第I相臨床試験

進行肝癌症例33例を対象としたGPC3ペプチドを用いた第I相臨床試験。1回投与量を0.3, 1, 3, 10, 30 mgの5段階とし、2週間ごと、3回皮内に不完全フロイントアジュバント (IFA) と投与するプロトコルで施行した。免疫学的解析において、末梢血単核球 $5 \times 10^5$ 個のうち50個以上のGPC3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カ月 vs. 8.5カ月) がみられた ( $p = 0.033$ )

後のRECIST評価では、33例中PRI例、SD19例であった。免疫学的解析では、末梢血単核球 $5 \times 10^5$ 個のうち50個以上のGPC3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カ月 vs. 8.5カ月) がみられた ( $p = 0.033$ )<sup>2)</sup> (図2)。

ペプチドワクチン療法によって、図3のような抗腫瘍効果を示す症例も存在する<sup>3)</sup>が、単剤のみでは効果が限定的である場合も多く、治療効果を増強させる工夫が

必要である。そのためのペプチドワクチンの応用として、腫瘍内ペプチド局注療法の開発<sup>4)</sup>や、体外でペプチド特異的CTLを大量培養し体内に移入する養子免疫療法などの検討も行っている。標準治療である分子標的薬や化学療法、放射線療法との併用による効果の増強も期待される。肝癌に特徴的な治療法としてはTACE施行時の腫瘍内への樹状細胞投与なども試みられている。また、現時点で投与前および投与開始後早期に効

果を予測することは困難であり、個別化医療を目指したワクチン療法の発展のためには、有効な新規バイオマーカーの開発が重要な課題である。

### おわりに

ペプチドワクチン療法の最大の特徴は、従来の化学療法と比べ副作用が軽微であり、外来にて簡便に施行できる点である。もう治療法がない進行癌患者の最後の砦と