

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592127

研究課題名（和文）難治性卵巣がんに対する新規がん胎児性抗原を標的とした免疫療法の開発  
 研究課題名（英文）Development of novel oncofetal antigen targeting immunotherapy for refractory ovarian carcinoma

研究代表者

柴田 清住 (Shibata Kiyosumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90335026

研究成果の概要（和文）：

難治性卵巣がんの免疫療法として「卵巣明細胞腺がんに対する HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3 (GPC3)由来ペプチドワクチン療法の臨床第Ⅱ相試験」をスタートさせており、症例登録が徐々に進んでいる。Ex vivo IFN $\gamma$ ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることおよび安全性が確認できつつある。また、進行症例 1 例において PR の結果を得ており今後さらに症例の集積を行う。

研究成果の概要（英文）：

We started a phase II clinical trial of HLA-A24 and A2 restrictive Glypican-3 (GPC3) peptide vaccine for clear cell carcinoma of ovary as one of the immunotherapy for refractory ovarian carcinoma. We confirmed the safety of the vaccine and GPC3 specific CTL by Ex vivo IFN $\gamma$ ELISPOT assay. Furthermore we confirmed a partial response in a advanced patient. In future we continued this trial and further analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：婦人科腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：難治性卵巣がん、免疫療法、Glypican-3、ペプチドワクチン、臨床試験

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣がん患者の死亡数は年々増加傾向にある。進行、再発卵巣がんの治療は化学療法が中心であるが、抗がん剤抵抗症例の予後は極めて不良である。卵巣明細胞腺癌は本邦に多く、抗がん剤耐性であることは良く知られている。抗がん剤耐性症例の予後改善を目指し

て、新規癌胎児抗原を標的とした免疫療法の開発を指向した。そして免疫療法のターゲットとして新規癌胎児抗原である Glypican-3 に着目した。GPC-3 は細胞表面上に存在する膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、肝細胞がん患者の 80%のがん組織に発現しており、最近、Wnt シグナルを活性化し

肝細胞がんの増殖を促進するとの報告がある。また、精巣腫瘍においては 2004 年 Sugimura らによって GPC-3 遺伝子は精巣性卵黄嚢腫瘍において他の精巣性胚細胞腫瘍と比較して発現の増強が報告された。そして、卵巣がんにおいてはごく最近になって Esheba らによって明細胞腺癌において発現の増強が認められるとの報告がなされた (Am J Surg Pathol. 2008)。我々のこれまでの検討においては GPC-3 が上皮性卵巣癌の中で明細胞腺癌に特異的に発現していることを確認しており、胚細胞腫瘍では卵黄嚢腫瘍において 100%の発現を認めた。また、GPC-3 は正常組織にはほとんど発現しておらず、卵巣明細胞腺癌、卵黄嚢腫瘍の免疫治療のターゲットとして理想的な癌特異抗原であり、副作用の少ないペプチドワクチンを開発することが可能であると考えられた。現在、卵巣癌に対する治療の主流は外科的手術による癌病巣の切除である。しかしながら、切除の許容を超えた進行症例や再発症例では根治切除が困難である。そのような症例に対して、多くは化学療法が行われる。卵巣癌は化学療法が奏功する症例も多いが、明細胞腺癌は他の組織型に比較して抗癌剤に対して抵抗性の症例が多く、術後残存腫瘍を有する症例の予後はきわめて不良であり、婦人科腫瘍医が直面する最も重要な課題の一つである。そこで、明細胞腺癌の化学療法として現在の卵巣癌の標準治療である TC (パクリタキセル、カルボプラチン) 療法に代わるレジメンとして CPT-P (イリノテカン、シスプラチン) が日本から提案され現在臨床試験が進行中である。このような抗癌剤の組み合わせを工夫とともに、新規抗癌剤や分子標的治療薬が開発されつつあるが、卵巣癌においては世界的にも研究がすすんでいないのが現状であり、今後有用な創薬への展開が期待されている。また、一方で免疫療法に関しても卵巣癌ではほとんど研究が行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

今回の研究において我々は腫瘍特異抗原としての GPC-3 に着目し、GPC-3 を標的とした癌免疫治療の実現を目指す。具体的な本研究の目的は以下のごとくである。

### (1) 腫瘍抗原としての GPC-3 の同定 :

我々はすでに免疫組織染色において GPC-3 が明細胞腺癌、卵黄嚢腫瘍に特異的に発現していることを確認していたが、さらにこれら患者血清中の GPC-3 を ELISA kit にて測定する。また、明細胞腺癌、卵黄嚢腫瘍のがん部、非がん部、また正常組織における GPC-3 遺伝子の cDNA マイクロアレイ解析を行い、GPC-3 の腫瘍特異性を検討する。

### (2) 卵巣明細胞腺癌および卵黄嚢腫瘍患者に

おける腫瘍免疫の解析 :

ヒト白血球抗原 (HLA-クラス I 対立遺伝子) のうち、HLA-24 は日本人の約 60%が所有し、HLA-A2 は約 20%が所有する。HLA-24 または HLA-2 に結合親和性の高い GPC-3 エピトープペプチドを複数作製しこれらのペプチドを用いて、患者末梢血単核球 (PBMC) からペプチド特異的 CTL の誘導を Tetramer アッセイ、ELISPOT アッセイにて検討し、GPC-3 特異的 CTL を最も効率よく誘導できるペプチドを同定するとともにペプチド特異的に誘導された CTL による細胞傷害活性を *in vitro* と *in vivo* で証明する。

### (3) 臨床試験の実施 :

(1) (2) の前臨床試験の結果をふまえて、進行、再発卵巣明細胞腺癌で標準的治療を終了した患者を対象として GPC-3 ペプチドを用いた免疫療法の臨床試験を予定する。前臨床試験によって同定された抗原ペプチドの有効性および安全性の確認を行う。臨床試験においても、GPC3 ペプチド単独および抗がん剤との併用による効果の検討を行う。

## 3. 研究の方法

今回の研究目的を到達するために今後の研究計画を以下の項目に分類し、研究を遂行する。

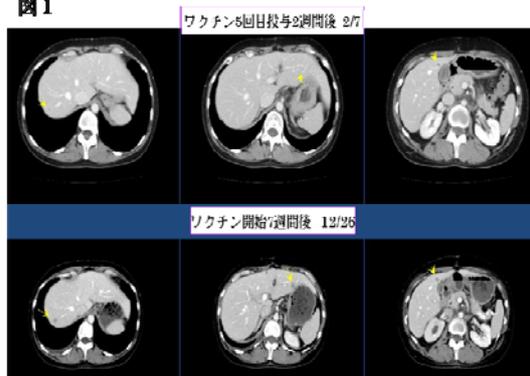
(1) 腫瘍抗原としての GPC-3 の同定、GPC-3 の機能解析 (2) 卵巣明細胞腺癌および卵黄嚢腫瘍患者における腫瘍免疫の解析、GPC-3 ペプチド誘導 CTL の抗腫瘍免疫応答の検討 (3) 臨床試験の実施具体的な方法は以下のごとくである。卵巣明細胞腺癌細胞株 KOC-7C にレトロウイルスベクターを用いて GPC3shRNA を遺伝子導入し GPC3 ノックダウン細胞を作製し安定した GPC3 ノックダウン細胞 (stable clone) を作製する。ノックダウンを確認後、細胞増殖能に与える影響を MTS アッセイにて検討し、浸潤能に与える影響をマトリゲルインバージョンアッセイにて検討する。KOC-7C に対して、クロミウム放出試験によって GPC3 由来ペプチドにて誘導した CTL による細胞障害性をコントロールペプチドにて誘導した CTL による細胞傷害性と比較検討する。さらに別の実験系において、抗癌剤 (シスプラチン、パクリタキセル) と GPC-3 由来ペプチドとの併用効果も検討を行う。GPC3 由来ペプチドを用いた癌ワクチン療法の臨床第 II 相試験を計画した。対象患者は HLA-A24 と HLA-A2 陽性の卵巣明細胞腺癌、3, 4 期あるいは再発症例および非寛解症例、寛解症例とし、3 つのグループに分けて、GPC3 ペプチドをそれぞれ 3.0mg を 2 週間ごと 6 回皮内注射する。主評価項目は安全性であり NCI-CTC により評価する、副次的に臨床効果を RECIST ガイドラインにて評価する。

#### 4. 研究成果

HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンを用いて卵巣明細胞腺がん細胞株に対する IFN- $\gamma$  ELISPOT assay および細胞傷害性試験を行った。その結果、IFN- $\gamma$  ELISPOT assay 及び細胞傷害性試験により、GPC3 ペプチド特異性が認められ、明細胞腺がん細胞株 KOC-7c を傷害した。GPC3-shRNA 導入により KOC-7c の GPC3 発現量を低下させることでこの CTL の反応は抑制された。様々ながん種を対象とした検討では、CTL クロンの免疫応答は GPC3 の発現量に左右される結果であった。subtoxic な抗がん剤用量であっても、前治療を併用することで CTL による細胞傷害効果の上乗せが認められた。GPC3 発現量と GPC3 ペプチド特異的 CTL クロンの免疫応答について相関関係が認められたことから、臨床試験に用いている HLA-A2 の GPC3 ペプチドについては、HLA-A2 陽性の GPC3 陽性がん細胞から内因性に提示される本ペプチド量は、GPC3 自体の発現量を調べることで推測されうると考えられた。subtoxic な抗がん剤用量での前治療と GPC3 特異的 CTL の併用によって細胞傷害性に上乗せ効果が得られた。次いで臨床試験の結果を示す。ペプチドワクチンを投与された卵巣明細胞腺がん患者における Ex vivo IFN $\gamma$  ELISPOT アッセイを用いた免疫学的モニタリングにて 17 症例中 16 症例（寛解群 11 例、化学療法併用群 1 例および進行群 4 例）においてワクチン投与前に比べ、ワクチン投与後で GPC3 特異的 CTL が末梢血中に増加していることが確認できた。TC（パクリタキセル+カルボプラチン）療法と併用された 1 例のみではあるが、免疫抑制作用のある化学療法併用群においても GPC3 特異的 CTL が誘導された結果が確認できた。現在までの登録症例は 20 例とまだ少数例ではあるが、注射部局所の発赤や硬結は全例にみられたものの、投与中止基準に相当する Grade4 のような重篤な非血液有害事象の発生は 1 例もみられなかった。

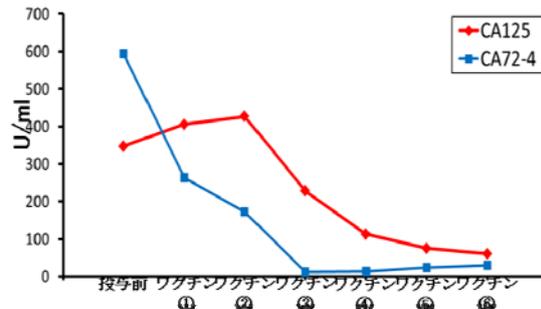
2012 年 1 月末時点で、寛解群（ワクチン投与計 10 回のプロトコール終了 7 例およびワ

図1



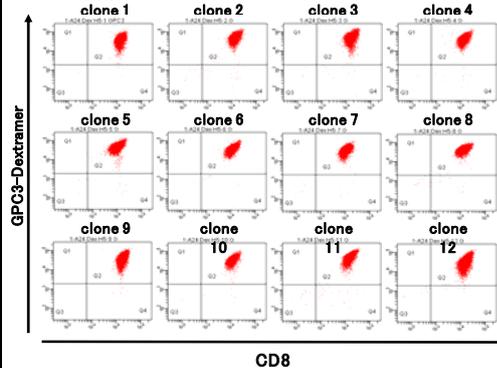
クチン投与中 6 例) の平均観察期間は 7.6 か月とまだ短いものの、全例において再発は認められていない。進行群 5 例中 1 例で、治療開始 3 か月時点で PR の臨床効果（肝転移、傍大動脈および右外腸骨リンパ節転移の縮小あり、新規病変なし）を認めた(図1)。また、この症例を含み進行群 5 例中 3 例で、ワクチン投与前に比べ腫瘍マーカーの低下がみられた (図2)。HLA-A2402 陽性であった進行群患者 2 名のワクチン投与後 PBMC から

図2



の GPC3 ペプチド特異的 CTL 誘導ではそれぞれの患者の PBMC から 12 個および 10 個のクローンが樹立された。樹立された 22 個の CTL クローンは、すべて Dextramer を用いた FACS 再解析で、ほぼ 100%において GPC3 デキストラマー陽性の GPC3 ペプチド特異的 CD8 陽性キラーT細胞であり、GPC3 ペプチドをパルスした標的細胞 (T2 細胞) に対して IFN $\gamma$  ELISPOT アッセイにおいても明らかな GPC3 ペプチド特異性が認められた (図3)。

図3 12種類のHLA-A24 GPC3 CTL cloneのGPC3-Dextramer解析



現在までの登録症例は 20 例と少数例ではあるが、卵巣明細胞腺がん患者においても安全性および免疫学的有効性が確認できつつある。1 例のみではあるが、卵巣がんの標準的化学療法レジメンである TC 療法と GPC3 ワクチン療法との併用症例においても GPC3 特異的 CTL が誘導された結果が確認できており、他のレジメンを含めさらなる症例の蓄積および検証が望まれる。基礎研究では、軽度の増殖抑制はおこすもののアポトーシスはき

たさない程度の subtoxic な用量であっても、抗がん剤による前治療を併用することで CTL による細胞傷害効果の上乗せがみられる細胞傷害性試験の結果を得ていることから、臨床試験を通して併用によって有効性が期待できる抗がん剤の種類やその機序を解析していきたい。HLA-A2 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンについては高親和性であるものが樹立されているのに比べ、HLA-A24 結合性 GPC3 ペプチドに対して高親和性である CTL クローンがこれまでに樹立されていないため、HLA-A24 陽性卵巣明細胞腺がん株についての基礎的研究は遅れている。そのため、ワクチン投与卵巣明細胞腺がん患者の PBMC を用いるといった工夫をして、よりよい HLA-A24 拘束性 GPC3 ペプチド特異的 CTL クローンの樹立を今後も計画する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirosawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T.

Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clearcell carcinoma. *Cancer Sci.*102(9):1622-9.2011. 査読有

2) Hirosawa T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y.

Mismatched human leukocyte antigen class II-restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells may mediate selective graft-versus-leukemia effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci.* 102(7):1281-1286, 2011. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 柴田清住、吉川史隆 婦人科癌に対する特異的癌免疫療法—明細胞腺癌を対象としたGPC3特異的ペプチドワクチン療法の第I,II相臨床試験 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月5日、名古屋国際会議場

2) 鈴木史朗、吉川聡明、廣澤友也、柴田清住、吉川史隆、中面哲也 卵巣明細胞腺がんに対するGPC3由来ペプチドワクチン療法の可能性 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月5日、名古屋国際会議場

3) 近藤紳司、岡村文子、牧寛之、Rong Zhang、植村靖史、藤田貢、山本英子、柴田清住、吉川史隆、葛島清隆 内因性HLAの発現を抑制し目的のHLA-A24を発現する人工抗原を用いた卵巣がんを傷害するCTLの誘導 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柴田 清住 ( Shibata Kiyosumi )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：90335026

##### (2) 研究分担者

吉川 史隆 ( Kikkawa Fumitaka )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40224985

##### (3) 連携研究者 なし