

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 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591756

研究課題名（和文） ラジオ波凝固療法とグリピカン3ペプチド樹状細胞ワクチンを用いた肝
癌の再発予防研究課題名（英文） Prevention of HCC recurrence by Radiofrequency ablation with
Glypican-3 epitope peptide injection to tumor site

研究代表者

小森 宏之（KOMORI HIROYUKI）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50444881

研究成果の概要（和文）：ラジオ波凝固療法（Radiofrequency ablation：RFA）による肝癌治療の際、Glypican-3（GPC3）ペプチドを腫瘍内投与することで樹状細胞を刺激し、術後再発を抑制しうる補助療法としての免疫療法を開発する。我々は GPC3 ペプチドを用いた樹状細胞ワクチンによる腫瘍生着抑制効果および、NOD/SCID マウスを用い、同ペプチドにて誘導した HCC 患者由来の CTL がヒト腫瘍の増殖を抑制することを確認した。共同研究者である国立がんセンター東病院の中面哲也らの研究にて、マウスの皮下に移植した Colon26/GPC3 を RFA で治療した後、IFN- γ Elispot assay を行ったところ、切除治療群に比べ有意に多くの GPC3 特異的 CTL が検出されることが分かった。また肝細胞癌患者における検討では、治療歴のない肝細胞癌患者を対象に、それぞれの治療前後における PBMC 中の GPC3 特異的 CTL の推移を検討したところ、治療後に GPC3 特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA5 例、肝切除術 1 例とヒトにおいても RFA が切除に比べ高頻度に GPC3 特異的 CTL を誘導することがわかった。

GPC3 ワクチンの安全性は癌センター東病院の中面らによる Phase 1 study において確認済みであるが、今後は RFA 後のワクチン投与の時間、量など検討する必要がある。さらには GPC3 ワクチン投与による残肝再発抑制効果に関する臨床研究を計画していきたい。

研究成果の概要（英文）：Injection of Glypican-3（GPC3）epitope peptide to tumor site of Hepatocellular carcinoma（HCC）in Radiofrequency ablation（RFA）reasonable to be adjuvant immunotherapy preventing recurrence of HCC after treatment with stimulating dendritic cells.

We previously reported that DC vaccine stimulated by GPC3 peptide could suppress the GPC3+ tumor growth. And also GPC3 specific CTLs, isolated from HCC patients, could reduce growth of GPC3+human HCC tumor cell line implanted into NOD/SCID mouse.

Nakamura T et al studied prospectively HCC patients treated with locoregional therapies, including radiofrequency ablation（RFA）and surgical resection. Circulating GPC3-specific CTLs were increased in 5 of 9 patients after RFA, but in only 1 of 9 patients after surgical resection. The number of increased GPC3-specific CTLs after RFA was significantly larger than that after surgical resection.

The safety of GPC3 peptide vaccination was checked in phase 1 study by Nakamura and collaborators at National Cancer Center East. We will try to check the more effective interval time from RFA to injection epitope peptide into tumor site, and more effective doze of that. In clinical study, we want to make sure this strategy may be a novel adjuvant immunotherapy that can potentially help to prevent the appearance, advance and/or recurrence of HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学・肝臓外科学

キーワード：CTL、GPC3、HCC、RFA、ペプチドワクチン

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は治療後も高頻度に再発を繰り返すため予後不良な癌であり、肝炎、肝硬変から発生したごく初期の癌に対する早期治療法や、治療後の再発予防のために有効な補助療法の確立が望まれる。

申請者らは GPC3 が肝細胞癌組織に特異的に発現し、マウスを用いた実験ではその DC ワクチンが GPC3 発現腫瘍の増殖を抑制することをすでに報告した。ヒトにおいては特に日本人に多いとされる HLA-A2 もしくは A24 拘束性の CTL エピトープペプチドも同定している (Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006;12:2689-97.)。以前より樹状細胞(以下 DC)ワクチンの有効性が報告されているが、体外で DC を成熟させ、ペプチドを負荷し投与するより、体内で DC を成熟させ、多量の抗原にさらすことでより効果的な DC を誘導することが可能となる。マウスの実験で腫瘍を Ablation する事により、体内の DC の成熟化が促進されることが報告されている (MHMG den Brock et al British J of Cancer 2006 95; 896-905)。

この場合、個人で異なる抗原のエピトープが存在する可能性をカバーし得るという利点もある。肝細胞癌に対するラジオ波凝固療法は確立した治療法であり、さらに治療後の残肝再発の防止のために GPC3 ペプチドを腫瘍内に adjuvant(免疫賦活剤)とともに注入することで、局所の炎症が増強し、遊走した数多くの DC が局所で成熟し GPC3 ペプチドを提示することが期待でき、GPC3 特異的な CTL の誘導、さらに再発予防に寄与することが期待出来る。

2. 研究の目的

肝細胞癌の術後再発 (散布再発および多中心

性再発)を抑制しうる補助療法としての免疫療法を開発する事にある。免疫応答が形成されうる BALB/c マウスを用いる。同系由来の腫瘍細胞株にマウス GPC3 を遺伝子導入したものを準備し、腫瘍を接種する。腫瘍に凝固療法を施行する。その後腫瘍を再接種し、拒絶の有無、および凝固療法を施行していないマウスに接種した場合との増殖の遅延の有無を検討する。更に、我々が同定した GPC3 エピトープペプチドを凝固療法と同時に腫瘍内に接種する。その後腫瘍を再接種し、拒絶の程度を前者(ワクチン非追加投与群)と比較検討する。さらに GPC3 エピトープペプチドを負荷した DC ワクチンにて処置をした群との比較でこの手技の有効性を比較検討する。

GPC3 が肝細胞癌に発現し、特異的な CTL を誘導でき、免疫療法のターゲットとして利用できることを証明した報告は申請者らの論文以外にはない。GPC3 は種々の癌細胞においてアポトーシスを促進するという報告があるが、肝細胞においては Wnt signal を介し、細胞増殖の促進から癌化するという報告がなされている (Capurro MI et al Cancer Res 2005 65:6245-54)。肝細胞癌細胞にとってその生存に不可欠な分子であると考えられ、免疫逃避の一要因である antigen loss の可能性が低いと予想できる。ヒトとマウスに共通のシーケンズをもつ GPC3 由来の HLA-A24 拘束性ペプチドをバインディングスコアが高い順に x 種類、DC ワクチンの腫瘍抑制効果をマウスにおいて検討した。これらのエピトープ候補のうち GPC3-8 の樹状細胞ワクチンを投与したマウスにおいて、GPC3 発現腫瘍の転移巣形成抑制を認めている (Nakatsura, T et al Clin Cancer Res 2006 343; 269-278)。

また申請者は HLA-A24 とならんで日本人に多い HLA-A2 拘束性ペプチドを作成し、HLA-A2Tgm を用い、HLA-A2 エピトープペ

プチド GPC3-A2-3 を同定した。さらにこれらのエピトープペプチドは肝細胞癌患者において CTL を誘導しうるエピトープであること、またこれらのペプチドにて誘導した CTL を投与すると、NOD/SCIDmouse に移植した GPC3 を発現するヒト腫瘍の増殖を抑制すること (Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006;12:2689-97.)はすでに報告済みである。また重要臓器における細胞浸潤を調べることで、自己免疫現象の発症の有無を検討する方法についても同報告にて経験済みである。

3. 研究の方法

ラジオ波凝固療法による肝癌治療の際、GPC3 ペプチドを腫瘍内投与することで樹状細胞を腫瘍局所で成熟させ腫瘍抗原さらすことで抗原提示を増強させより強力な腫瘍抗原特異的な CTL を誘導し肝細胞癌の再発を予防する。

腫瘍移植と ablation、腫瘍の拒絶実験
BALB/c 由来の大腸癌細胞株である colon26 に mouse の GPC3 を遺伝子発現させた colon26G は既に作成されている。GPC3 発現の再確認と腫瘍を mouse の皮下に 3x10⁴ 個移植し、1cm 大へ成長したところへ Ablation を施行する。腫瘍の Ablation は Cotop 社製の SMK-15system を用いて施行する (MHMGM den Brock.et al British J of Cancer 2006 95; 896-905)。

設定①：Ablation 群の自然経過を観察する (Ablation 後の自然経過)。

設定②：ablation 群と腫瘍切除群にそれぞれ colon26G を再チャレンジする (Ablation の免疫賦活効果の有無の検討。切除群との免疫賦活効果の比較)。さらに、

設定③：Ablation 群と、Ablation 群にさらに腫瘍内に GPC3 エピトープペプチド +adjuvant を追加投与した群を設定しそれぞれ colon26G を再チャレンジする (GPC3 エピトープペプチド+adjuvant を付加することで免疫賦活効果、腫瘍拒絶効果が増強するかの検討)。以上により腫瘍の Ablation による免疫賦活効果を再チャレンジ後の腫瘍の生着の有無により検討する。再チャレンジは Ablation もしくは切除後 40 日目に行う。 <spleen cell 内の GPC3 特異的 CTL の存在の確認>
腫瘍の Ablation により、GPC3 特異的な CTL がどの程度増強されたかを確認する。Ablation 後 2 週間後に spleen cell を採取し、

IFN- γ を検出する ELISPOT assay を用いて検討する。この時標的細胞には BALB/c mouse の骨髄から採取した BM-DC にエピトープペプチドを負荷したものをを用いる。この方法はすでに報告済みである (Komori H, et al. Clin Cancer Res 2006;12:2689-97.)。通常の GPC3 エピトープを load した DC ワクチンとの効果の比較

設定④：Ablation 群と Ablation 施行せず腫瘍を切除した群に ex-vivo の GPC3-DC ワクチン (Nakatsura, T. et al Clin Cancer Res 2006 343; 269-278) を施行した後に腫瘍を再チャレンジする (Ablation の免疫賦活効果の有無の検討。ex-vivo の DC ワクチン群との免疫賦活効果の比較)。

従来の DC ワクチンと比較して今回の in vivo での抗原負荷による DC ワクチンの有用性の有無を検討する。

<局所凝固療法を施行した肝細胞癌症例における GPC3 由来ペプチドワクチンの安全性の確認・有効性の確認>

上記の基礎実験をもとに臨床研究を計画：GPC3 ワクチン投与による残肝再発抑制効果に関する RCT をデザインする。GPC3 ワクチンの安全性は癌センター東病院の中面らによる Phase 1 study において確認済みである。GPC3 は約 40% の肝臓癌患者で末梢血液中に検出され、腫瘍マーカーとなりうる (Nakatsura T et al, BBRC 2003;306:16-25)。対象は血液中の GPC3 陽性例で、これをランダムに振り分け、無再発生存率を比較するが、すべてのプロトコールは熊本大学医学部生命倫理委員会および文部科学省、厚生労働省の倫理指針に沿って実施する。

以上の実験の推進における研究協力体制は熊本大学消化器外科を中心として国立がんセンター東病院臨床開発センターの中面らおよび熊本大学大学院免疫識別学と連携体制をとり、project を進めていく。熊本大学に在籍する研究代表者 (小森宏之) は全体の総括と実験指導を行い共同研究者との連携をはかる。実際の mouse を用いた実験などは小森と大学院生で行う。

4. 研究成果

肝細胞癌の術後再発 (散布再発および多中心性再発) を抑制しうる補助療法としての免疫療法を開発する事にある。

具体的にはラジオ波凝固療法による肝癌治療の際、GPC3 ペプチドを腫瘍内投与することで樹状細胞を腫瘍局所で成熟させ、腫瘍抗原にさらすことで抗原提示を増強する。より強力な腫瘍抗原特異的 CTL (細胞障害性 T

細胞)を誘導し、肝細胞癌の再発を予防する。マウスを用いた予防実験にて腫瘍生着抑制効果を確認、ヒト腫瘍の増殖を抑制することを確認した。BALB/c由来の大腸癌細胞株 Colon26に mouse の GPC3 を遺伝子発現させ RT-PCRにて再確認した。腫瘍の ablation に関しては、共同研究者である国立がんセンター東病院の中面哲也、本村裕らの研究によると、マウスの皮下に移植した Colon26/GPC3 を切除あるいは RFA で治療した後、ソケイリンパ節を回収し、IFN- γ Elispot assay を行ったところ、RFA 治療群において有意に多くの GPC3 特異的 CTL が検出されることが分かった。

またの肝細胞癌患者における検討では、治療歴のない HLA-A24 あるいは-A2 陽性の肝細胞癌患者 27 人(RFA9 例、肝切除術 9 例、動脈塞栓術 9 例)を対象に、それぞれの治療前後における PBMC 中の GPC3 特異的 CTL の推移を検討したところ、治療後に GPC3 特異的 CTL の増加を認めた症例は、RFA 6 例、肝切除術 1 例、動脈塞栓術 4 例と human においても RFA が他の治療に比べ高頻度に GPC3 特異的 CTL を誘導することがわかった。我々の研究においては、GPC3 を発現する病変に対し RFA を施行した後に、直接ペプチドワクチンを注入し、より効率的に CTL の誘導を試みるものである。

以上の基礎実験をもとに臨床研究を計画：GPC3 ワクチン投与による残肝再発抑制効果に関する RCT をデザインする。GPC3 ワクチンの安全性は癌センター東病院の中面らによる Phase 1 study において確認済みであるが、実査の HCC 患者を対象とした RCT は現在実施できていない。

今後も RFA 後のワクチン投与の時間、量など検討する予定としている。DC ワクチンとの比較においては、引き続き東病院臨床開発センターと協力し、行っていく予定である。

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) 小森宏之、西村泰治、「【広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査[第7版] その数値をどう読むか】 腫瘍マーカー GPC3(glypican-3)」日本臨床 68:増刊号 7 広範囲血液・尿化学検査 免疫学的検査、査読無、4 巻 833-836、2010

(2) Masuda T、「Occurrence of hepatocellular carcinoma after a hepatic

resection of ahepatoblastoma in an adult patient with hepatitis C virus.」、Hepatolo Res、査読有、39 巻 525-530、2009

[学会発表] (計 3 件)

(1) 太田尾 龍
「肝切除後における胆汁外瘻化が肝再生を阻害する」

第 109 回日本外科学会

2009 年 4 月 4 日

福岡県 福岡国際会議場

(2) 崔 林承

「経皮経肝門脈塞栓術は肝細胞癌の右肝切除における無再発生存率を向上させる」

第 109 回日本外科学会

2009 年 4 月 4 日

福岡県 福岡国際会議場

(3) Hasita

「肝癌における myofibroblast の関与」

第 109 回日本外科学会

2009 年 4 月 4 日

福岡県 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 宏之 (KOMORI HIROYUKI)

熊本大学医学部附属病院 非常勤診療医師

研究者番号：50444881

(2) 研究分担者

別府 透 (BEPPU TORU)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70301372

堀野 敬 (HORINO KEI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：60452900

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905