

学 位 論 文

Doctor's Thesis

肝細胞癌の免疫療法に有用な新規癌胎児性抗原 Glypican-3 由来の
HLA-A2 および A24 拘束性 CTL エピトープの同定
(Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for
glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma)

小森 宏之

Hiroyuki Komori

熊本大学大学院医学研究科博士課程外科系専攻外科学第二

指導： 馬場 秀夫 教授

西村 泰治 教授

2006 年 3 月

1	要旨	4
	SUMMARY	4
2	発表論文リスト	6
3	謝辞	7
4	略語一覧	8
5	研究の背景と目的	8
5-1)	HLA 分子による T 細胞への抗原提示	8
5-2)	抗腫瘍免疫のあらまし	13
5-3)	従来法による腫瘍拒絶抗原の同定	14
5-4)	cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定	16
5-5)	癌胎児性抗原 GLYPICAN-3	19
①	GPC3 の機能	19
②	HCC 癌組織での GPC3 の発現	19
③	腫瘍マーカーとしての GPC3	20
④	腫瘍拒絶抗原としての GPC3	24
5-6)	本研究の目的	27
6	実験方法	28
6-1)	マウス	29
6-2)	使用した細胞	29
6-3)	使用したペプチド	29
6-4)	HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた CTL エピトープの同定	30
6-5)	HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた自己免疫反応の検討	31
6-6)	血液サンプルおよび癌組織の採取	32
6-7)	対象患者血液中の分泌 GPC3 の検討	32
6-8)	腫瘍組織における GPC3 と HLA-クラス I 分子の発現	33
6-9)	HCC 患者末梢血からの GPC3 反応性 CTL の誘導	33
6-10)	細胞傷害活性の検討	36
6-11)	CTL の MHC 拘束性の検討	36
6-12)	腫瘍増殖抑制実験	37
7	実験結果	38
7-1)	GPC3 由来 HLA-A2(A*0201)拘束性エピトープペプチドの決定	38

7-2) 免疫されたマウスにおける自己免疫現象の検討	40
7-3) HCC 患者におけるエピトープペプチドを用いた GPC3 反応性 CTL の誘導	40
7-4) GPC3 特異的ヒト CTL の HLA 拘束性の検討.....	43
7-5) GPC3 発現腫瘍に対する養子免疫療法の効果	46
8 考察	50
9 結論	51
10 参考文献	53

1 要旨

【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。glypican-3 (GPC3)は肝細胞癌に高発現し、腫瘍免疫のターゲットとして理想的な癌特異的抗原である。我々は、癌胎児性抗原である GPC3 が肝細胞癌に特異的に高発現することを発見し、腫瘍マーカーとして有用であることを示した。さらに BALB/c マウスを GPC3 由来のペプチドで免疫することにより GPC3 を強制発現させた腫瘍細胞に対する拒絶効果が得られ、GPC3 ペプチドが肝細胞癌患者に対する免疫療法に利用できる可能性について報告してきた。

【目的】 本研究は、GPC3 エピトープペプチドを用いた免疫療法のヒトへの応用を目指し、HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2Tgm)を用いて、自己免疫現象を起こさない HLA-A2 拘束性 GPC3 由来の CTL エピトープを同定することを目的とする。さらに HLA-A24 拘束性 CTL エピトープ GPC3₂₉₈₋₃₀₆とともに、これらのペプチドが GPC3 を認識して GPC3 陽性肝細胞癌を破壊する CTL を、肝細胞癌患者から誘導できるか否かを検討することを目的とする。

【方法と結果】 HLA-A2 結合モチーフを持ち、マウスとヒトで共通のアミノ酸配列を示す GPC3 ペプチド 10 種類を作製した。それぞれのペプチド混合物をパルスした HLA-A2Tgm 骨髄由来樹状細胞を、HLA-A2Tgm に 2 回免疫後、その脾細胞を回収し、各ペプチド特異的 CTL の誘導の有無を ELISPOT 法により検討した。HLA-A2 エピトープ候補として GPC3₁₄₄₋₁₅₂を同定した。このペプチドを免疫した Tgm の重要臓器へのリンパ球浸潤は組織学的に認められず、自己免疫現象は生じていなかった。この GPC3₁₄₄₋₁₅₂と GPC3₂₉₈₋₃₀₆を用いて HLA-A2 または HLA-A24 陽性の肝細胞癌患者 PBMC から、ペプチド特異的 CTL を誘導できるか否かを検討した結果、両ペプチドともに約半数の症例において GPC3 に反応性を有する CTL が誘導出来た。さらに、これらのエピトープペプチドで誘導したヒト CTL を、GPC3 発現細胞株を移植した免疫不全マウス (NOD/SCID マウス)に投与したところ、コントロール群に比べ有意に腫瘍増殖抑制効果が観察された。

【考察】 HLA-A2Tgm を用いて自己免疫反応を起こすことなく、ヒト GPC3 に特異的なヒト CTL を誘導し得る HLA-A2 拘束性のエピトープペプチドを同定できた。また、BALB/c マウスは HLA-A24 拘束性のエピトープペプチドを同定するのに有用であると思われた。さらに、これらの GPC3 ペプチドを用いて誘導した CTL の投与は、GPC3 発現腫瘍に対する治療に有用である可能性が示唆された。

【結論】 HLA-A2またはHLA-A24により提示される新規癌胎児性抗原Glypican-3由来のCTLエピトープを同定し、これらを用いて誘導されたヒトCTLはGPC3を発現するヒト肝癌細胞株を傷害することを証明した。同ペプチドはHLA-A2またはHLA-A24陽性肝細胞癌患者に対する免疫療法に有用であると考えられた。

Summary

Purpose and Experimental Design: We previously reported that glypican-3 (GPC3) was overexpressed specifically in hepatocellular carcinoma (HCC) and melanoma in humans, and it was useful as a novel tumor marker for them. We also reported that the pre-immunization of BALB/c mice with dendritic cells pulsed with the H-2K^d-restricted mouse GPC3 298-306 (EYILSLEEL) peptide prevented the growth of tumor expressing mouse GPC3. Because of similarities in the binding peptide motifs between H-2K^d and HLA-A24 (A*2402), the GPC3 298-306 peptide thus seemed to be useful for the immunotherapy of HLA-A24⁺ patients with HCC and melanoma. In this report, we investigated whether the GPC3 298-306 peptide could induce GPC3 reactive CTLs from the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of HLA-A24 (A*2402)⁺ HCC patients. In addition, we used HLA-A2.1 (HHD) transgenic mice (Tgm) to identify the HLA-A2 (A*0201)-restricted GPC3 epitopes to expand the applications of GPC3 based immunotherapy to the HLA-A2⁺ HCC patients.

Results: We found that the GPC3 144-152 (FVGEFFTDV) peptide could induce peptide-reactive CTLs in HLA-A2.1 (HHD) Tgm without inducing autoimmunity. In 5 out of 8 HLA-A2⁺ GPC3⁺ HCC patients, the GPC3 144-152 peptide-reactive CTLs were generated from PBMCs by in vitro stimulation with the peptide and the GPC3 298-306 peptide-reactive CTLs were also generated from PBMCs in 4 of 6 HLA-A24⁺ GPC3⁺ HCC patients. The inoculation of these CTLs reduced the human HCC tumor mass implanted into NOD/SCID mice.

Conclusion: Our study raises the possibility that these GPC3 peptides may therefore be applicable to cancer immunotherapy for a large number of HCC patients.

2 発表論文リスト

1. Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Beppu, T., Matsui, M., Torigoe, T., Sato, N., Baba, H., and Nishimura, Y. Identification of HLA-A2- or -A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.*12: 2689-2697, 2006.
2. Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 66: 2414-22, 2006.
3. Miyazaki, M.*, Nakatsura, T.>(*Equal contribution), Yokomine, K., Senju, S., Monji, M., Hosaka, S., Komori, H., Yoshitake, Y., Motomura, Y., Minohara, M., Kubo, T., Ishihara, K., Hatayama, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Cancer Sci.* 96: 695-705, 2005.
4. Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Oagawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res.* 10: 8630-8640, 2004.
5. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y.: Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immnotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin. Cancer Res.* 10: 6437-6448, 2004.
6. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 16-25, 2003.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部 感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授、ならびに消化器外科分野の馬場秀夫教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた、千住覚助教授および中面哲也助手に深く感謝いたします。組織の免疫染色に御協力いただきました、分子病理学分野の山本哲郎教授、久保多津子さんに深く感謝いたします。検体の提供に御協力いただきました肝細胞癌患者の皆様、および消化器外科分野の別府透講師をはじめ諸先生方に深く感謝いたします。さらに、HLA-A2Tgm を御提供いただきました、埼玉医科大学の松井政則教授に深く感謝いたします。また、当教室での研究の機会を与えて頂いた、消化器外科分野の小川道雄前教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

BM-DC; bone marrow cell-derived dendritic cell
cDNA; complementary DNA
CTL; cytotoxic T lymphocyte
DC; dendritic cell
DNA; deoxyribonucleic acid
ELISA; enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT; enzyme-linked Immunospot
GM-CSF; granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPI;glycosyl phosphatidyl inositol
H&E; hematoxinlin and eosin
HCC; hepatocelluer carcinoma
HLA; human histocompatibility leukocyte antigens
IFN; interferon
Ig; immunoglobulin
IL; interleukin
i.v.; intravenous injection
LN; lymph node
MHC; major histocompatibility complex
mAb; monoclonal antibody
mRNA; messenger ribonucleic acid
PBMC;peripheral blood mononuclear cell
RT-PCR; reverse transcription-PCR
SEREX;serological analysis of recombinant cDNA expression libraries
TAP; transporter associated with antigen processing
TCR; T cell receptor
Tgm; transgenic mouse
TIL; tumor infiltrating lymphocyte
TNF; tumor necrosis factor
TNM;Tumor Node Metastasis

5 研究の背景と目的

5-1) HLA 分子による T 細胞への抗原提示

主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) によりコードされる MHC 分子は、細胞内で抗原が分解されてできたペプチドを分子の先端に結合して細胞表面に発現する。T 細胞は抗原を直接認識することはできず、細胞表面に発現する抗原ペプチドと MHC 分子を複合体として認識する。MHC 分子にはクラス I とクラス II の 2 種類があり、それぞれ細胞内での局在が異なる抗原に由来するペプチドを機能の異なる T 細胞に提示して活性化を促す(1)。ヒトの MHC は白血球の血液型として発見されたために、ヒト組織適合性白血球抗原 (human histocompatibility leukocyte antigen; HLA) 系と呼ばれる。

$\alpha\beta$ 型 T 細胞レセプター (TCR) を発現する T 細胞のうち、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、HLA クラス I 分子に結合する性質を持つ CD8 分子を発現する。HLA クラス I 分子は主に核や細胞質の蛋白質に由来するペプチドを結合して、すべての有核細胞と血小板の表面に発現する。CTL は TCR を介して自己の HLA クラス I 分子に結合した、ウイルスあるいは細菌などの非自己蛋白質に由来するペプチドを認識して感染細胞を破壊する。さらに、腫瘍細胞の表面に発現する HLA クラス I 分子に結合した、自己あるいは非自己ペプチドを認識した CTL は腫瘍細胞を破壊する(2)。また HLA クラス I 分子は、特定のウイルスあるいは細菌に感染した細胞、あるいは腫瘍細胞を破壊する性質をもつナチュラルキラー (NK) 細胞のレセプター (killer-cell inhibitory receptor; KIR) に結合し、NK 細胞の細胞傷害活性を抑制する(図 1C) (3)。

HLA クラス I 分子に結合するペプチドは、細胞質蛋白質にユビキチンが複数結合した後に、プロテアソーム (proteasome) あるいは LMP (large multifunctional protease) と呼ばれる蛋白分解酵素の複合体により、エネルギー (ATP) 依存性に分解されてできたものである(4, 5)。近年、細胞質内で mRNA が翻訳されてきたばかりの蛋白質のうち、30%にも及ぶものが直ちにこの経路に入ることが示されている。さらにペプチドは、HSP70 などのシャペロンにより小胞体に運搬され、TAP (transporter associated with antigen processing) 分子により、エネルギー (ATP) 依存性に小胞体の内腔

図 1

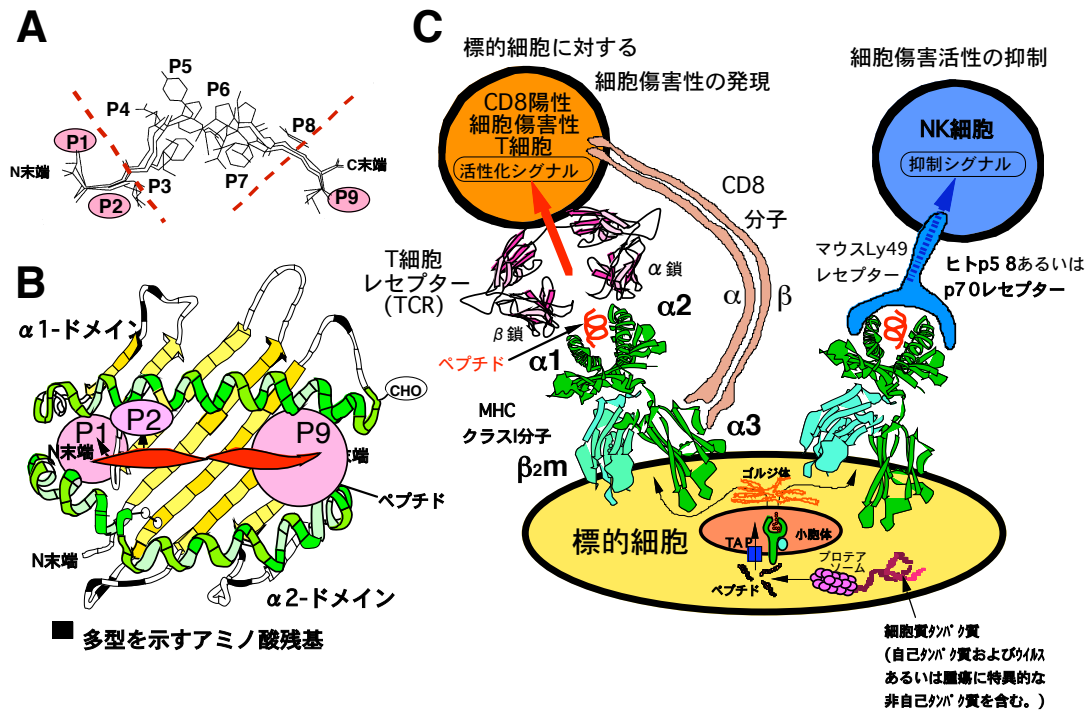


図 1. MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの CD8⁺細胞傷害性 T 細胞(CTL)への提示

A. MHC クラス I (ヒトの HLA-A2 分子) に結合性を示す、ウイルス由来の 5 種類のペプチドを重ねて横から見た図。ペプチドは P1~P9 で示した 9 個のアミノ酸からなり、両端 (N および C 末端) のアミノ酸はすべて一致しており、この部分のアミノ酸の側鎖が MHC クラス I のペプチド収容溝にある 3 つのポケットに収容される。ペプチドの中央部分のアミノ酸残基 (P3~P7) の側鎖は、ペプチド収容溝からせり上がり TCR により認識される。B. MHC クラス I (HLA-A2 分子) のペプチド収容溝を、TCR 側より見た図。溝は相対する 2 つの α ヘリックス (右巻きらせん) 構造に囲まれている。丸は A, B および F ポケットの位置を示し、() 内の数字に対応するペプチド上のアンカーアミノ酸残基の側鎖がここに収容される。黒塗りの部分は MHC クラス I (ヒトの HLA クラス I) で多型を示すアミノ酸残基を示す。CHO は糖鎖を示す。C. MHC クラス I により提示された抗原ペプチドの認識による CTL の活性化および NK 細胞の細胞傷害活性の抑制。 α 1, α 2, α 3 および β 2m は、それぞれ MHC クラス I の細胞外ドメインおよび β 2 ミクログロブリンを表し、KIR は細胞傷害抑制性レセプター (killer-cell inhibitory receptor) を表す。

へと導かれ、そこでHLA クラス I 分子のペプチド収容溝に結合する(図1)(6)。このペプチド収容溝には、A～F ポケットと呼ばれる6個のポケットが存在する。MHCクラス I 結合ペプチドは9個のアミノ酸 (N末端側よりposition-1;P1～P9と呼ばれる。)により構成されていることが多く、ペプチドは溝の両端からはみ出すことなく納まっている(図1A, B)(7-9)。MHCクラス I 分子で多型を示すアミノ酸残基の多くは、分子の先端にあるペプチドを収容する溝を構成する $\alpha 1$ および $\alpha 2$ ドメインに集中している。このような多型によりペプチド収容溝の形状が変化するため、MHCクラス I 分子に結合可能なペプチドの構造もMHCクラス I 分子ごとに、ペプチドのNあるいはC末端寄りのアミノ酸には一定の傾向 (MHCクラス I 結合モチーフ) が認められ(10)、各々A(P1)、B(P2)あるいはF(P9)ポケットに収容される(図1B) (6, 11)。これらのポケットとカッコ内に示した抗原ペプチド上の特定の位置に存在するアンカーアミノ酸の側鎖の大きさ、極性 (親水性あるいは疎水性) および荷電などの性質が適合した場合に、ペプチドはMHCクラス I に結合する。MHCクラス I 結合性ペプチドは中央部で折れ曲がりペプチド収容溝からせり上がっており、この部分のアミノ酸の側鎖がTCRにより認識される。この状況は特にアミノ酸の数が10個以上のペプチドで顕著である。

一方、HLA クラス II 分子に結合する性質を持つCD4分子を発現するT細胞は、主に樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B細胞などのプロフェッショナル抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) に限定して発現する HLA クラス II 分子に結合した非自己抗原ペプチドを認識して種々のサイトカインを分泌する。サイトカインはB細胞に増殖と形質細胞への分化を誘導して抗体産生を促進したり、T細胞の分化と増殖および抗原提示細胞の活性化を促したりして、細胞内の微生物の排除を促進する。抗原提示細胞はHLA クラス I結合性ペプチドの提示のみならず、HLA クラス II 分子により提示される抗原のプロセッシングと提示という重要な機能を担っている。

図 2C に示すように、抗原提示細胞は細胞外から抗原を取り込み、これをエンドソーム内の種々の酵素により還元および分解してペプチドを作る。さらにペプチドはMIIC (MHC class II compartments) やCIIV (class II vesicles) と呼ばれる別の細胞内コンパートメントで、HLA クラス II 分子に結合して細胞表面に発現する。MHC クラス II 分子のペプチド収容溝には、MHC クラス I 結合ペプチドと比較して長い、10～30 数個 (多くは15個前後) のア

図 2

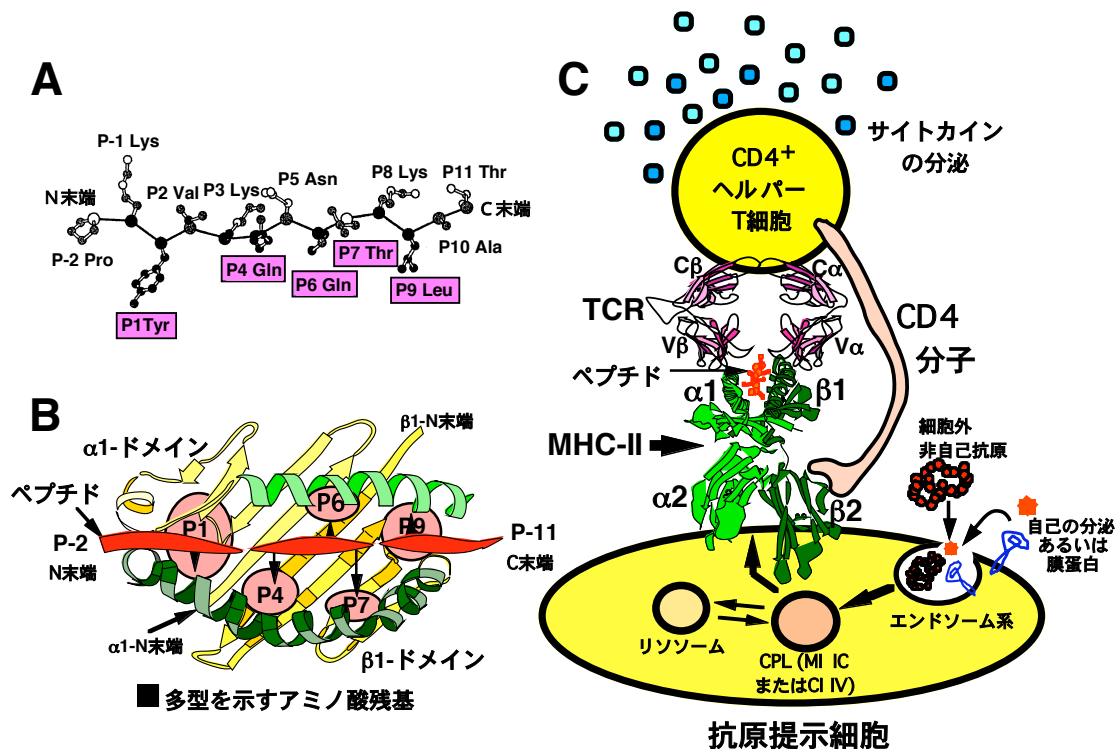


図 2. MHC クラス II 分子による抗原ペプチドの CD4⁺ヘルパー T 細胞への提示

A. MHC クラス II 分子 (HLA-DR1) により抗原提示を受けるインフルエンザヘマグルチニンペプチド(HA306-318)の構造を示す。MHC クラス II 分子との結合に重要なアンカーアミノ酸残基で、最もN末端側の Tyr の位置を position 1 (P1)としてC末端方向に番号を付けた場合の、各残基の番号およびアミノ酸を表示した。またアミノ酸の側鎖が、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝の5個のポケットに収容されるアミノ酸残基を四角で囲んで示した。ペプチド結合で結ばれたペプチドの主鎖を黒の実線で示す。各アミノ酸上の黒く塗りつぶした原子は MHC クラス II 分子に接している原子を、白い原子は MHC クラス II 分子とは接触していない原子を示す。B. HA306-318 を結合した MHC クラス II 分子を真上 (TCR 側) より見た立体構造を示す。円は、HA306-318 ペプチド上で MHC クラス II 分子との結合に重要な5個のアンカーアミノ酸残基 (P1, P4, P6, P7 および P9) の側鎖を収容すべく、MHC クラス II 分子のペプチド収容溝に存在するするポケットの位置を示す。黒塗りの部分は、ヒトの代表的な MHC クラス II である HLA-DR 分子において多型性を示すアミノ酸残基を示す。C. 細胞外から抗原提示細胞に取り込まれた抗原がペプチドへと分解され、MHC クラス II 分子と結合して CD4⁺T 細胞に提示される様子を示す。α1, α2, β1 および β2 は、MHC クラス II 分子の細胞外ドメインを示す。TCR 部分の α, β は TCR の α 鎖と β 鎖を、また C と V は定常領域と可変領域をそれぞれ示す。

ミノ酸からなるペプチドが、伸張された形で結合している(12, 13)。MHC クラス I ではペプチドを収容する溝の両端が閉じているのに対して、MHC クラス II では開放されているために、ペプチドの両端のアミノ酸残基は溝の両端からはみ出している。ペプチド収容溝に収まるペプチド部分は、MHC クラス I と同様に約 9 個のアミノ酸からなり、1 アミノ酸残基進むごとに側鎖の方向が回転するため、ペプチド上で MHC クラス II に向かう複数の（通常 4~5 個）アミノ酸残基の側鎖がアンカーとなる。これらが MHC クラス II 上のペプチド収容溝に存在する 4~5 個のポケットに、うまく収容される形をしたアミノ酸の組み合わせ（MHC クラス II 結合モチーフ）になっている場合に、ペプチドは MHC クラス II に結合する(13)。ペプチド上の最も N 末端側のアンカー残基の位置を position 1 (P1) として C 末端方向に各アミノ酸残基に番号を付けると、通常 P1, P4, P6 (P7) および P9 の各アミノ酸残基の側鎖が MHC クラス II 分子の溝に向かいアンカー残基となっていることが多い（図 2A, B）。さらに、これらのアンカー残基の間に介在している残基の側鎖が TCR により認識される。

HLA 分子は、たとえ非自己抗原が存在しても、その大多数は正常な自己蛋白に由来するペプチドを結合して細胞表面に発現しており、これを認識する T 細胞は胸腺における T 細胞の分化過程で消滅(クローン欠失)しているか、末梢で不活性化されアナジューの状態になるなどして免疫寛容（トレランス）の状態にあり、応答を示すことはない。しかし、細胞表面に数千~数万個発現している HLA クラス I 分子のうちの数個~数十個が非自己抗原ペプチドを結合していると、CTL はこれを認識して細胞傷害活性を発現する。一方、抗原提示細胞表面の HLA クラス II 分子のうち数十~数百個が非自己抗原ペプチドを結合すると、CD4 陽性ヘルパー T 細胞がこれを認識して免疫応答を開始する。

5-2) 抗腫瘍免疫のあらまし

「悪性腫瘍に対して免疫系の応答は有効か」という疑問に対する、現時点での答えは以下のとおりであろう。腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)中に腫瘍に反応性の T 細胞が多いこと、癌患者の末梢血に腫瘍抗原に対する免疫応答が検出されることなどから、免疫系は腫瘍と戦ってはいるが、腫瘍を排除するには至っていない。

従来免疫強化療法は、非特異的に活性化された免疫応答のなかに抗腫瘍効果を期待したものであった。これに対し近年は、腫瘍に特異的な免疫応答をいかに増強するかが研究の焦点となっている。この分野では 1) HLA により提示される腫瘍拒絶抗原ならびにペプチドの同定、および 2) これを認識する T 細胞の活性化方法の開発、が重要な問題となっている。近年の基礎免疫学の進歩により多くの腫瘍拒絶抗原が発見され、T 細胞活性化のメカニズムも次第に明らかとなり、腫瘍免疫学は新しい局面を迎えつつある。

前述したように腫瘍拒絶抗原が細胞内でペプチドへと分解され、HLA クラス I 分子により腫瘍細胞の表面に発現されると、主に CTL がこれを認識し腫瘍細胞を傷害する。ただし、多くの腫瘍細胞は、抗原を一度も認識したことのないナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80(B7-1)/CD86(B7-2)などの共刺激分子を発現しておらず、直接 CTL を活性化することは出来ない。図 3 に示したように CD80/86 分子を発現する最もすぐれた抗原提示細胞である樹状細胞は腫瘍抗原を貪食し、腫瘍拒絶抗原ペプチドを HLA 分子に結合して、ナイーブ CD4 陽性ヘルパー T 細胞および CD8 陽性 CTL に提示できる。ナイーブ T 細胞が活性化されてエフェクター T 細胞になると、腫瘍細胞のように共刺激分子を発現していなくても T 細胞レセプター (TCR) が認識可能な HLA・ペプチド複合体を発現していれば、T 細胞はこれを認識して免疫応答を示す(14)。この際に CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する (図 3)。活性化された B 細胞は腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

図 3

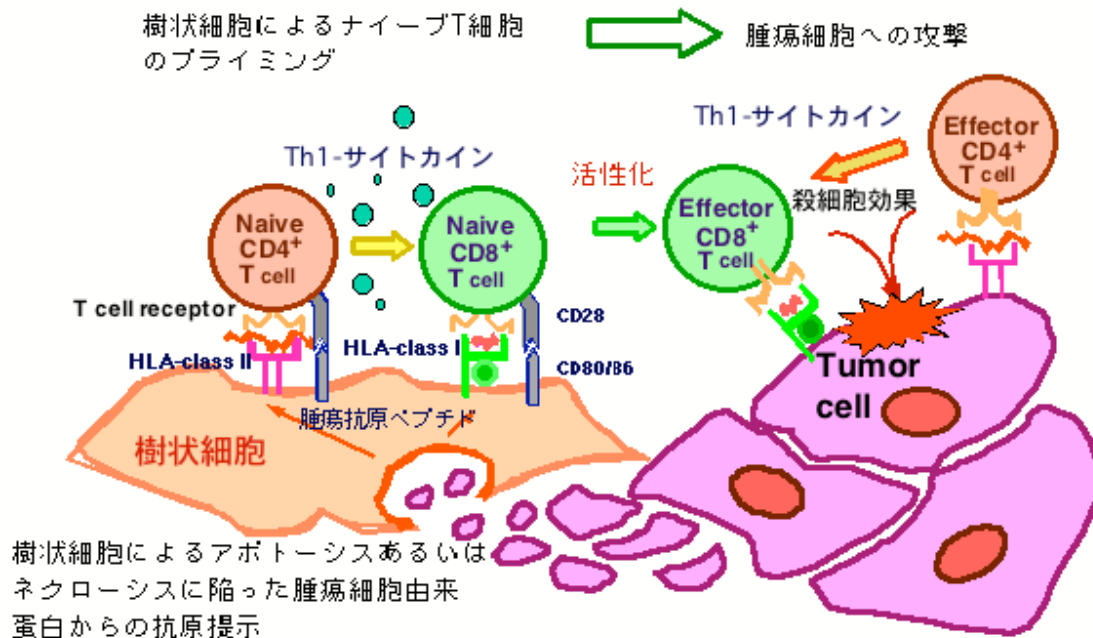


図 3. 樹状細胞などの抗原提示細胞による抗腫瘍免疫応答の活性化

腫瘍細胞それ自体は、ナイーブ T 細胞の活性化に不可欠な CD80/86 などの分子を発現していないことが多い。腫瘍抗原を貪食した樹状細胞は、これらをペプチドに分解し、HLA クラス I あるいは HLA クラス II 分子と結合した形で細胞表面に提示する。この HLA とペプチドの複合体を CD8 陽性ナイーブキラー T 細胞、あるいは CD4 陽性ナイーブヘルパー T 細胞が T 細胞レセプターを介して認識するとともに、T 細胞上の CD28 分子が抗原提示細胞上の CD80/86 分子と結合して活性化される。一旦活性化されたエフェクター T 細胞は、CD80/86 を発現していない腫瘍細胞に対しても免疫応答を示すことができる。CTL は腫瘍細胞を認識してこれを破壊し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞は IL-2, IFN- γ , TNF および GM-CSF などのサイトカインを産生し、T 細胞、B 細胞、あるいは抗原提示細胞を活性化することにより抗腫瘍免疫応答を増強する。活性化された B 細胞は、腫瘍抗原に特異的な抗体を産生する。

5-3)従来法による腫瘍拒絶抗原の同定

科学的基盤に立った癌の免疫療法を確立するための第一のステップは、ターゲットとなる腫瘍抗原を同定することである。このために、20世紀初めよりヒトや実験動物に発生した種々の癌を用いて多大な努力がなされてきた。しかし、腫瘍抗原の存在をヒトの癌で実証することはむずかしく、長いあいだその存在すら疑われていた。地道な研究が実を結び、ヒトの腫瘍抗原が分子レベルで明らかにされたのは、1991年であった。Ludwig 癌研究所 (Brussels Branch) の Boon らのグループ (15)は、メラノーマ患者の 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た。彼らの論文が、ヒトの腫瘍抗原に科学的根拠を与え、また腫瘍抗原の同定方法も確立させた最初の報告であった。インターロイキン(IL)-2 を利用した CTL の長期培養とクローン化、ならびに、遺伝子の発現クローニング法という二つのよく確立された技術を組み合わせたことがこれを可能ならしめた。さらに 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支援した。CTL は抗原丸ごとを認識するのではなく、抗原蛋白質由来の 8~12 個のアミノ酸から成るペプチドと、主要組織適合遺伝子複合体(MHC) の遺伝子産物である MHC クラス I 分子とが結合した複合体を認識する (2)。MHC 分子の役割は、ペプチド (抗原) を T 細胞に提示することである。したがって、抗原蛋白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、細胞表面に移動して 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 らの発表後、癌患者由来の CTL が認識するメラノーマやほかの癌の腫瘍抗原が、分子生物学的方法、もしくは生化学的方法を用いて同定されている (16-20)。最近、抗腫瘍免疫における CD4⁺ヘルパーT 細胞の重要性が指摘され、これが認識する腫瘍抗原も分子生物学的方法や生化学的方法を用いて同定されるようになってきた (21, 22)。同定された抗原をターゲットにした癌の免疫療法の臨床試験が、欧米でもわが国でもすでに開始されている (23-26)。しかし、T 細胞の活性化を指標にした癌抗原の遺伝子発現クローニングによる同定には技術的な制約が多く、これまで同定された腫瘍抗原はメラノーマに関連するものが主であり、他の種々の癌における腫瘍抗原の同定にまでは普及しなかった。

抗体を用いた腫瘍抗原同定の試みは、CTL による試みより長い歴史をもつ。特に腫瘍特異的モノクローナル抗体は、大きな期待をもって迎えられた。しか

し、作製された抗体の多くは分化抗原に対するもので、“癌特異的”な抗原は同定されず、しかも癌免疫療法での抗体の有用性は、特定の抗原を発現する癌に限定されたものとなっている。しかし、1995 年にドイツ・Saarland 大学の Pfreundschuh ら (27)により、癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が認識する腫瘍抗原を、遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning)が確立された。SEREX 法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでに SEREX 法により同定された多数の腫瘍抗原 (28-31) がデータベース化されている(<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB>)。

また、われわれが世界に先駆けて行った、cDNA microarray analysis を用いた腫瘍特異抗原の探索も有用であることが明らかになってきている。さらにこれらの方法で同定された抗原の一部をターゲットにした、抗腫瘍免疫療法の臨床試験も開始されている。

5-4) cDNA マイクロアレイを用いた腫瘍抗原の同定

癌特異的抗原の免疫療法への応用を考える場合には、多くの患者に使えるという共通性 (発現頻度)、腫瘍特異性、免疫原性、腫瘍拒絶能、抗原消失性、自己免疫などの副作用、などによって各抗原の特徴をとらえる必要がある。すなわち、理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質として、以下の 3 つが考えられる。①癌患者の体内において免疫応答を誘導する抗原；癌細胞の拒絶までは至らないとしても、癌患者の血液中に抗原特異的な抗体や T 細胞の存在が検出できるもの。②発現の組織特異性が優れた抗原；癌細胞での発現は強いが、正常組織にはほとんど発現しておらず、腫瘍抗原に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないもの。たとえば、胎児期組織および癌組織のみに発現する癌胎児性抗原や、癌細胞と免疫系から隔離された組織のみに発現する癌精巣抗原 (CT 抗原) など。③免疫系からの逃避が起こりにくい抗原；癌細胞の悪性形質転換、組織浸潤や転移に重要な役割を担っている分子で、癌細胞がその発現を欠落すると、癌の悪性形質を失うもの。

また、現在までに同定されているヒト癌抗原を分類すると、①cancer-testis 抗原、②組織特異抗原、③変異ペプチド抗原、④癌遺伝子、癌抑制遺伝子産物、⑤癌胎児性抗原、⑥癌細胞で発現が増強している抗原などがあげられるが、T 細胞によって認識されるヒト腫瘍抗原の同定法として、以下の 4 つがあげられる。①癌化と関連した腫瘍抗原の候補に対する T 細胞応答の解析；細胞の癌化に関連した癌遺伝子や癌抑制遺伝子産物の突然変異部分、融合蛋白質の境界部

分、あるいはウィルス抗原に由来するペプチドを特異的に認識する T 細胞の証明 (変異 Ras、変異 p53、BCR/ABL、TEL/AML1 ほか)。②癌細胞に特異的に反応する T 細胞株 (クローン) を利用した、癌細胞由来の cDNA ライブラリーのスクリーニング (MAGE-1/3、チロシナーゼ、gp100、Melan-A/MART-1、SART-1 ほか多数)。③癌患者血清中の抗腫瘍抗原 IgG を利用した、癌細胞由来の cDNA ライブラリーのスクリーニング (SEREX 法) (NY-ESO-1 ほか多数)。④cDNA microarray analysis による、遺伝子発現の組織特異性から抗腫瘍免疫の誘導に適した腫瘍抗原の同定と、その抗原性の解析 (PP-RP (32)、Glypican-3 (33)ほか)。

cDNA マイクロアレイ解析の概略を図 4 に示した。腫瘍抗原候補の同定に cDNA マイクロアレイ解析を用いることの最大の利点は、一度に数千～数万種類の遺伝子の発現をスクリーニングすることができるところである。そこでまず理想的な癌拒絶抗原が備えているべき性質のうちの②の条件を満たす遺伝子を選出することができる。場合によっては③の条件を満たす遺伝子を選出することもできる。さらに cDNA マイクロアレイ解析は患者毎に遺伝子発現を解析することができるため、各遺伝子の発現頻度も知ることができる。

我々は、すでに東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターの中村祐輔博士との共同研究により、cDNA マイクロアレイ解析を用いて、肝臓癌に特異的に高発現する遺伝子を同定するために以下の 2 つの手順を踏み、上記の理想的な癌抗原としてふさわしい Glypican-3;GPC3 の同定に成功した。①肝臓癌患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、多くの症例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を選ぶ。②27 臓器 (胎生期の 4 臓器を含む) の正常組織における 23,040 種類の遺伝子の発現プロフィールを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を選ぶ。

この方法により、肝臓癌患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討することにより、20 症例以上で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上の遺伝子を 16 種類選び、次にそれらの各遺伝子について 27 臓器 (胎生期の 4 臓器を含む) の正常組織における 23,040 種類の遺伝子の発現プロフィールを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子を探し出した。今回われわれが腫瘍抗原として同定した GPC3 は、肝臓癌患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上 (平均 396.2) で、胎盤および胎児の肝、肺、腎に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器には発現を認めない遺伝子であった。(図 5)

図 4

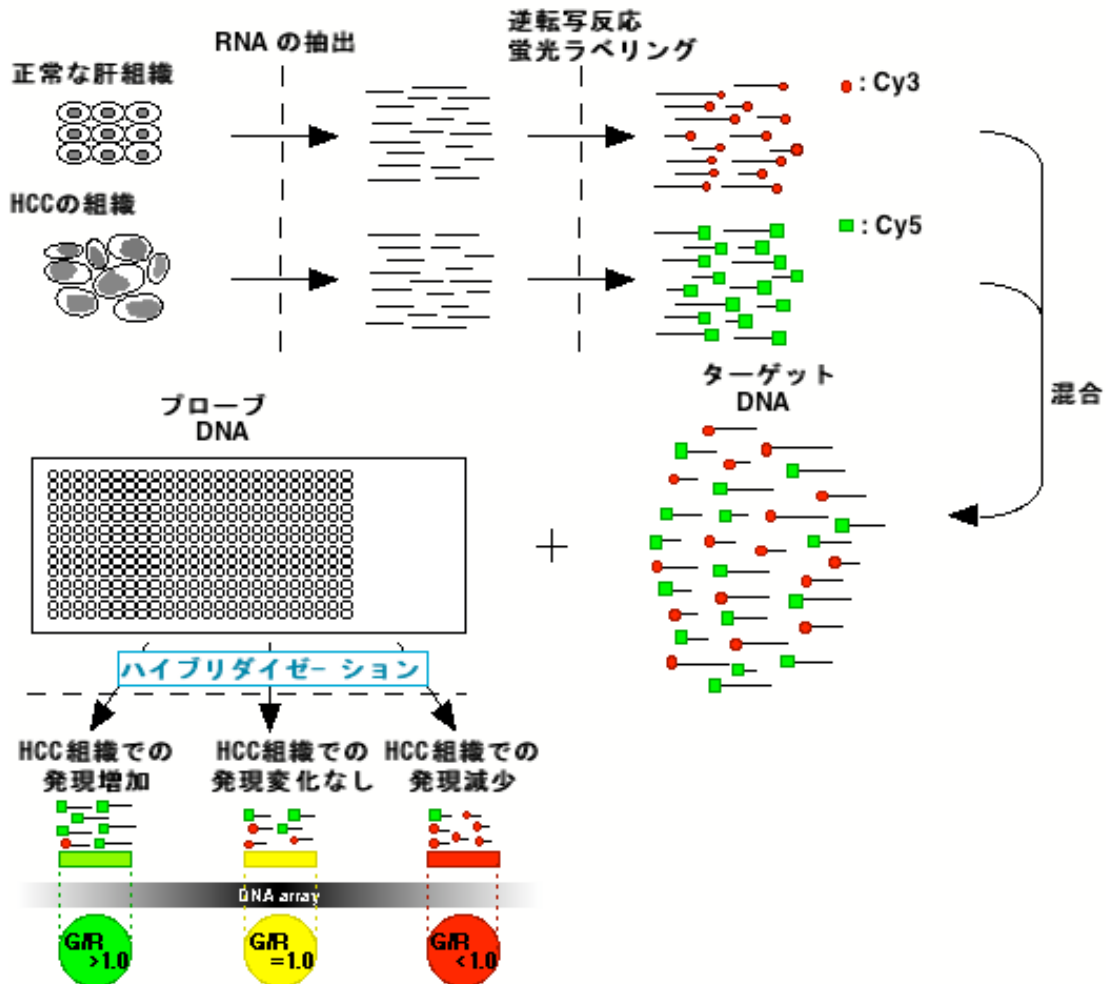


図 4. cDNA マイクロアレイ解析の概要

比較する2つの状態の細胞や組織からRNAを抽出する(今回の場合、HCCの癌部と非癌部組織をLaser capture microdissectionにて回収し、それぞれの組織からRNAを抽出した)。逆転写反応によりcDNAを合成する際に、2種類の蛍光色素をそれぞれ取込ませ標識する(今回の場合、HCC癌部DNAをCy5で、非癌部DNAをCy3で標識した)。標識されたcDNAを混合し、ターゲットDNAとする。プローブDNAをアレイしたスライドガラス上でハイブリダイゼーションを行ったのち、非特異的な結合を洗浄し取り除き、CCDカメラあるいは蛍光スキャナーを用いてハイブリダイゼーション後の蛍光画像を取込み、疑似カラー(Cy3:赤、Cy5:緑)をつけて表示するとともに、それぞれの蛍光強度の比(R/G)を計算し、遺伝子発現プロファイルとして示す。

5-5)癌胎児性抗原 glypican-3

Glypican-3(GPC3)は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPGs)ファミリーに属する糖鎖修飾が強い GPI アンカー蛋白質である。その機能としては、ある種の腫瘍細胞の増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスに関連があると報告されている(34)。我々は、上記のごとく、cDNA マイクロアレイ解析を用いて、肝細胞がん (HCC) 特異的に高発現する遺伝子として GPC3 を同定した。

① GPC3 の機能

細胞表面上にあるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) には、膜貫通型のシンデカン (Syndecan) ファミリーと膜結合型のグリピカン (Glypican) ファミリーがあり、現在までのところ、それぞれ4種類の Syndecan と6種類の Glypican が存在することが報告されている。GPC3 は、580 アミノ酸からなる60kD のコア蛋白に糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で、C 末端を GPI アンカーで細胞膜に結合している。1996 年に、Pilia らは X 染色体(Xq26)連鎖疾患である Simpson-Golabi-Behmel 症候群(SGBs)において、GPC3 の遺伝子変異を認めると報告している(35)。これらの患者では、巨人症、嚢胞腎、口蓋裂などの症状を呈することが知られている。また、GPC3 ノックアウトマウスでも、SGBs と同様に巨大化などの表現型を示すことがわかっている(36)。また、GPC3 は、そのコア蛋白が直接 Wnt と結合することにより、Wnt signal を活性化し、肝細胞癌の増殖を促進するとの報告もある(37)。

② HCC 癌組織での GPC3 の発現

我々は、HCC 癌組織における GPC3 遺伝子の高発現を確認するとともに、蛋白質レベルでの高発現にも反映されているか否かを検討するために、RT-PCR 法、組織切片における免疫染色法を実施した(図 6)。肝臓組織は、胎児期において GPC3 を発現するが出生後発現しなくなり、HCC においては再び発現するようになる。この再発現が発癌において重要であるか否かは明らかでない。逆に、正常の卵巣、乳腺組織、中皮細胞には若干の GPC3 の発現を認めるが、卵巣癌、乳癌、中皮腫組織では発現しなくなる。これらの腫瘍形成と GPC3 の発現レベ

ルとの関係における組織特異的な差異は、これらの各組織における GPC3 の細胞増殖の促進あるいは抑制への関与のしかたが異なるためではないかと推測される。GPC3 は少なくとも HCC において癌胎児性蛋白質としての性格を有している。一般に、癌胎児性蛋白質は腫瘍の進行において重要な役割を担うとは考えられていないが、腫瘍マーカーまたは免疫療法の標的として利用されてきた(38, 39)。

③ 腫瘍マーカーとしての GPC3

中面らは、GPC3 は GPI アンカーを有する膜蛋白質であるが HCC 細胞株からの分泌を観察した。そこで ELISA 法を用いて HCC 患者の血清中の GPC3 蛋白について検討したところ、約 40% の患者で GPC3 蛋白が検出される事を見出した(図 5)。しかしながら、健常人、慢性肝炎、その他の肝疾患では全く検出されなかった。GPC3 が HCC 患者の血清中にのみ検出されることから、GPC3 が HCC の腫瘍マーカーとして有用であることが示唆された(40)。HCC の腫瘍マーカーとしての GPC3 の有用性に関しては、他施設からも同時期に報告されている(41,42)。さらに、その後の研究において、我々は、メラノーマでも GPC3 が高発現することを発見し、メラノーマ患者の血清からも、約 40% に GPC3 蛋白が検出されることを発見した(43)。従来メラノーマの腫瘍マーカーと比較して、比較的早期のメラノーマ患者からも検出されることから、早期診断や治療効果の判定など臨床への応用が期待される。

図 5

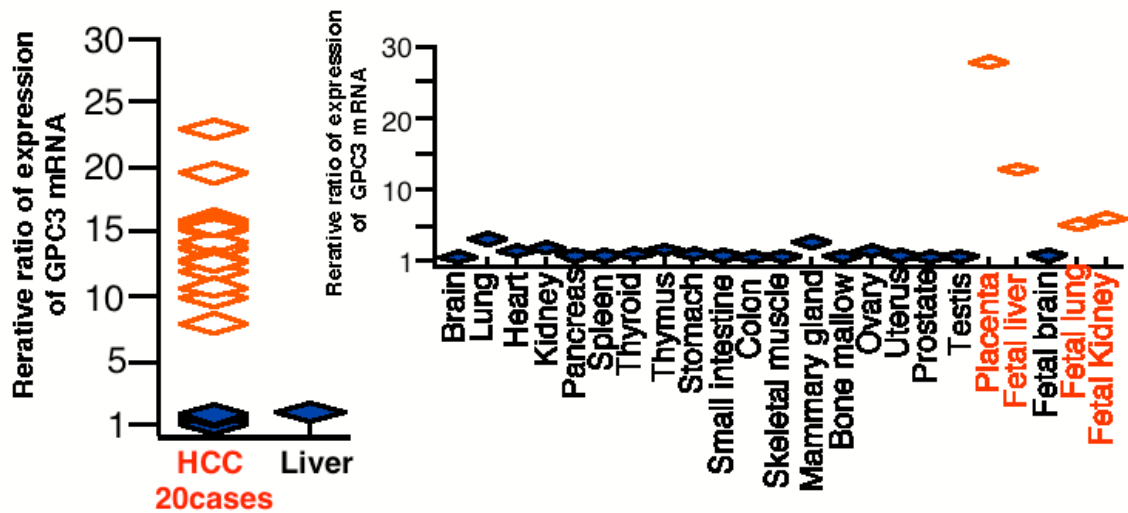
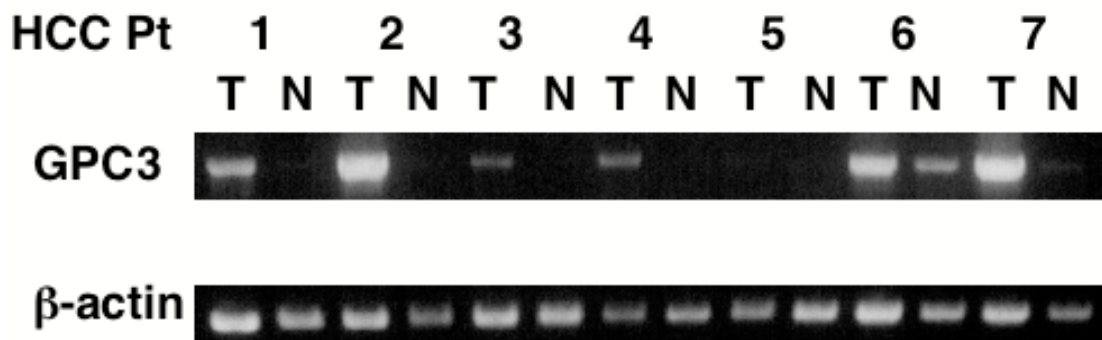


図 5.肝細胞癌 20 例の癌部・非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ(東大医科研ヒトゲノムセンター: 片桐豊雅、古川洋一、中村祐輔先生らの研究成果) Okabe H et al. Cancer Res. 61: 2129, 2001.

肝臓癌患者 20 例の癌部と非癌部における 23,040 種類の遺伝子の発現を比較検討し、発現の比が 5 以上の遺伝子を 16 種類選び、さらに 27 臓器（胎生期の 4 臓器を含む）の正常組織において、それらの各遺伝子の発現プロファイルを解析して、胎生期の組織あるいは免疫学的に隔離された胎盤や精巣にしか発現しない遺伝子 GPC3 を探し出した。GPC3 は、肝臓癌患者 20 例中 16 例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上（平均 396.2）で、胎盤や胎児肝、肺、腎に発現する以外は、ほとんどの正常臓器に発現を認めない遺伝子であった。

図6

A



T: 癌部、N: 非癌部

B

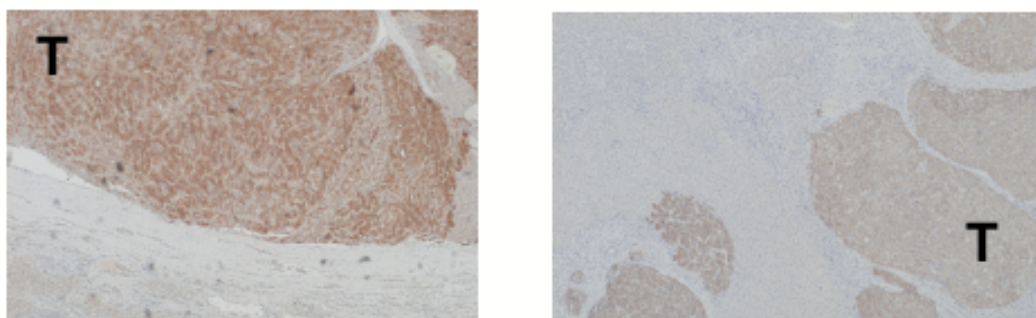


図6．HCC 組織における GPC3 の発現

A: HCC 組織の癌部、非癌部における GPC3mRNA の発現の有無を RT-PCR 法にて検討し、癌部においてのみ GPC3 の発現を認めた。B: HCC 組織切片における GPC3 蛋白の発現を、抗 GPC3 抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。

図 7

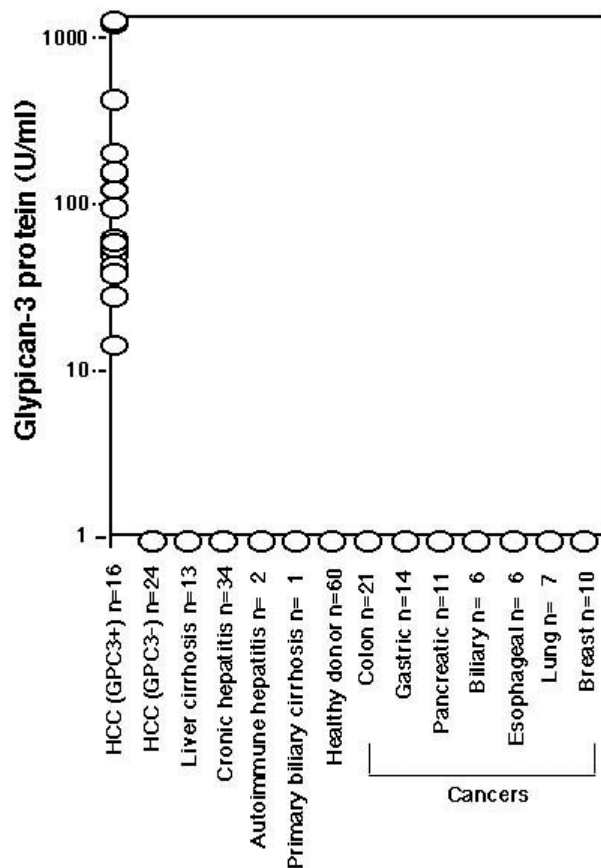


図 7. ELISA 法による血清中の GPC3 蛋白質の検出(文献 40)

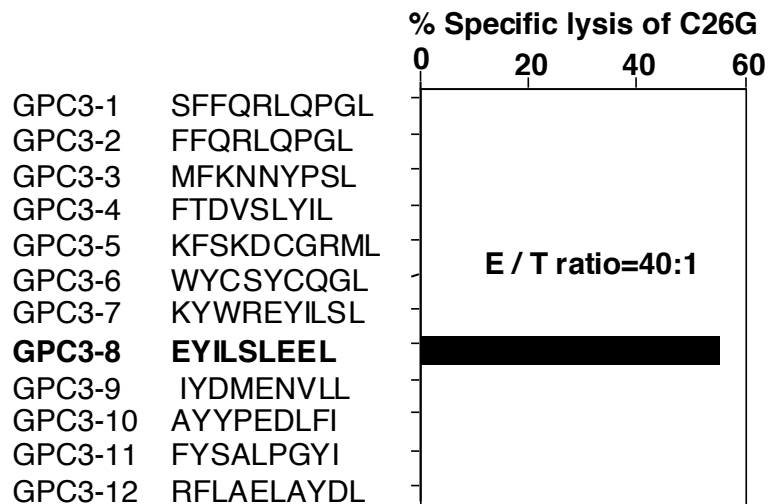
HCC 患者 40 人のうち 16 人の血清中に、GPC3 蛋白質が検出された。しかし、健常人、その他の肝疾患、あるいはその他の癌患者では検出されなかった。

④ 腫瘍拒絶抗原としての GPC3

発現の組織特異性が優れていることから、中面らは、この新規癌胎児性抗原 GPC3 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になりえるかどうかを検討した。日本人の約 60%が陽性である HLA-A24 と、BALB/c マウスのクラス I 分子の K^d に結合するペプチドの構造モチーフは非常に一致していることがわかっている。さらに、ヒトとマウスの GPC3 では、95%以上のホモロジーを認めることから、ヒトとマウスの GPC3 でアミノ酸配列が完全に一致し、HLA-A24、K^d のいずれにも結合しうる GPC3 由来のペプチドを合成した。これらを BALB/c マウスに免疫して解析し、K^d 拘束性の CTL エピトープペプチドを同定した図 8(33)。このエピトープペプチドをパルスした骨髄細胞由来樹状細胞(BM-DC)ワクチンを用いた GPC3 発現腫瘍の増殖抑制実験では、予防的に投与した場合(図 9)、あるいは皮下に移植した腫瘍に GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL を投与する養子免疫療法による治療実験においても、コントロール群に比べ GPC3 発現腫瘍の増殖を有意に抑制でき、さらに、脾細胞投与 21 日後の腫瘍局所における細胞浸潤を免疫染色にて検討したところ、増殖抑制効果を認めた C26/GPC3 に GPC3-8 誘導 CD8 陽性脾細胞を投与した群では局所の CD8 陽性細胞浸潤とアポトーシスに陥った細胞の存在を認めた(図 10)。このエピトープペプチドは HLA-A24 によっても提示され、ヒトでも同様に CTL エピトープとなる可能性があると思われた。また、当教室の本村はマウス GPC3 を遺伝子導入したマウス ES 細胞より分化誘導した樹状細胞(ES-DC)をマウスに免疫することにより、in vivo において GPC3 特異的な CTL を誘導し、移植された GPC3 発現腫瘍の増殖転移を抑制できることを報告している(44)。

図8

A



B

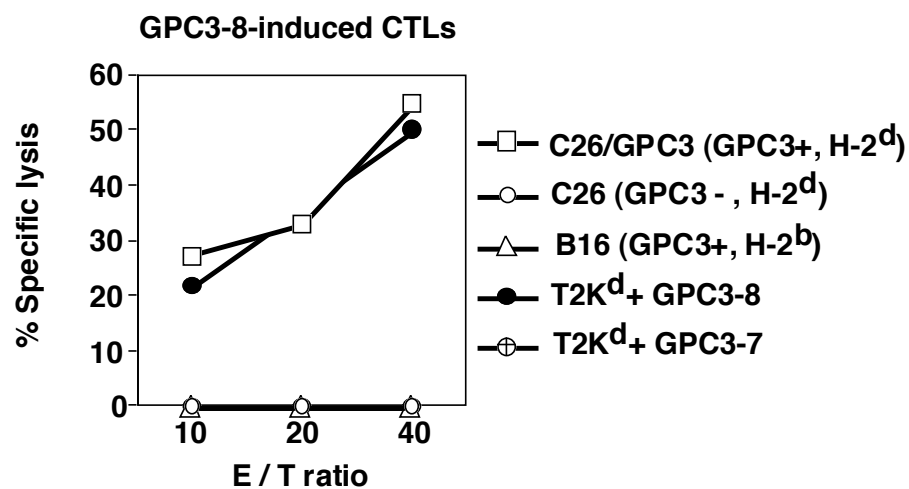


図8. BALB/cマウスを用いたGPC3由来K^d拘束性エピトープペプチドの決定

A: BALB/cマウスを12種類のGPC3由来K^d拘束性ペプチド混合物にて免疫し、採取した脾細胞をin vitroでそれぞれのペプチド(10 μM)にて再刺激した。IL-2(100u/ml)添加し5日間培養後GPC3発現細胞株C26/GPC3に対する細胞傷害活性を測定した。GPC3-8(EYILSLEEL)がエピトープペプチドとして同定された。B: GPC3-8ペプチドで誘導されたCTLの様々な細胞株に対する傷害活性。コントロールに比べ、GPC3発現大腸癌細胞株C26/GPC3およびH-2K^dを発現するT2細胞株に対して著明な傷害活性を示した。

図9

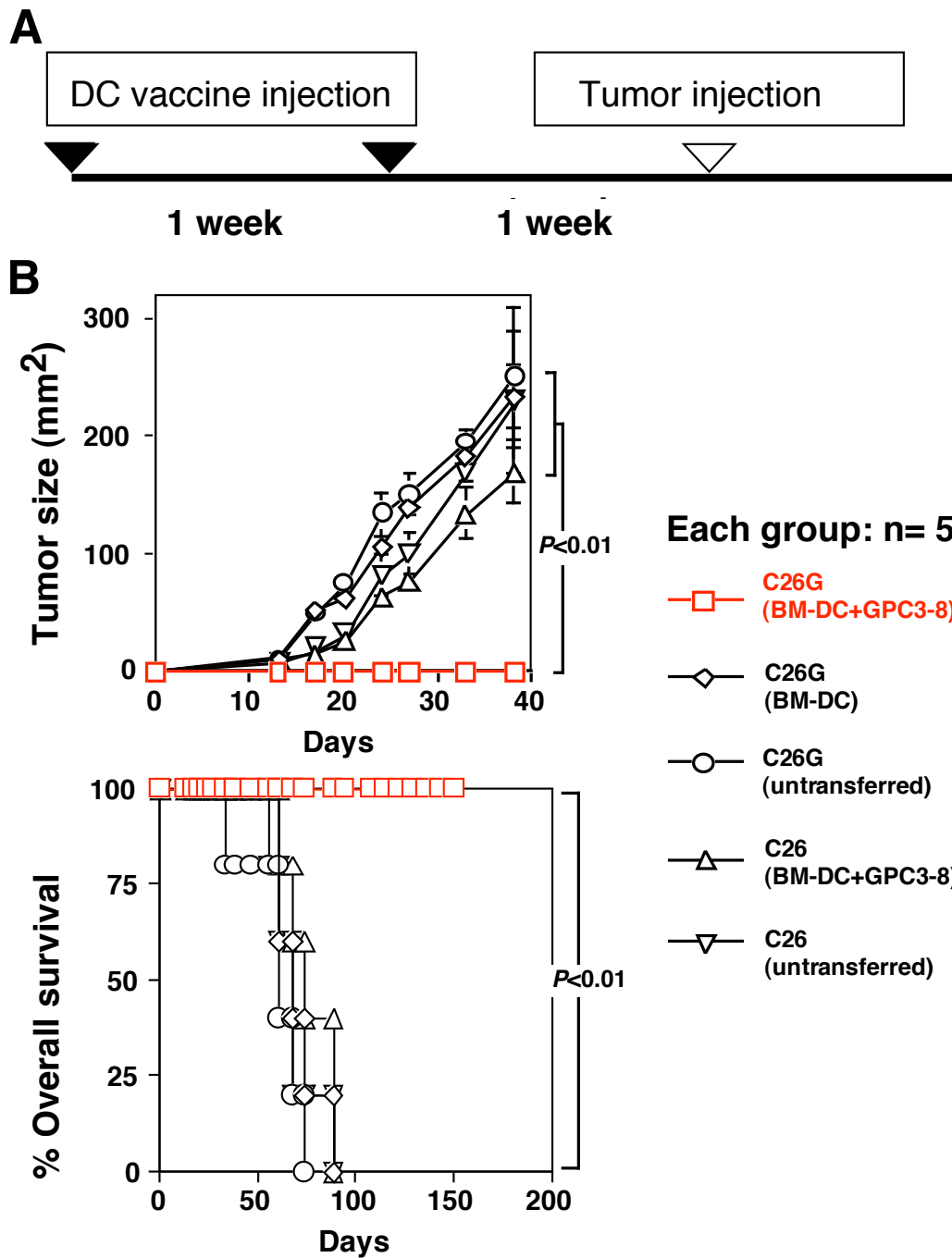
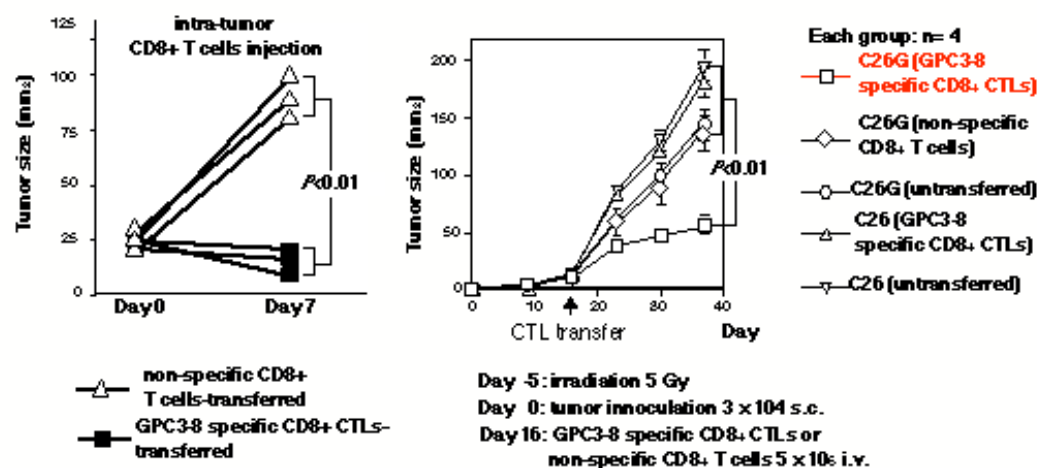


図9. GPC 3-8 ペプチドを提示させたBM- DCワクチン による腫瘍抑制 効果の検討

A: BM-DCは1週間毎2回マウスの腹腔内に 5×10^5 投与した。その1週間後に腫瘍を 3×10^4 個背部に皮下移植した。B: GPC3-8ペプチドを提示させたBM-DCワクチンを投与した後にC26/ GPC3を投与した群では、腫瘍の拒絶が認められた(上段)。生存期間の検討でも、この群が有意に長期間生存していた(下段)。

図10

A



B

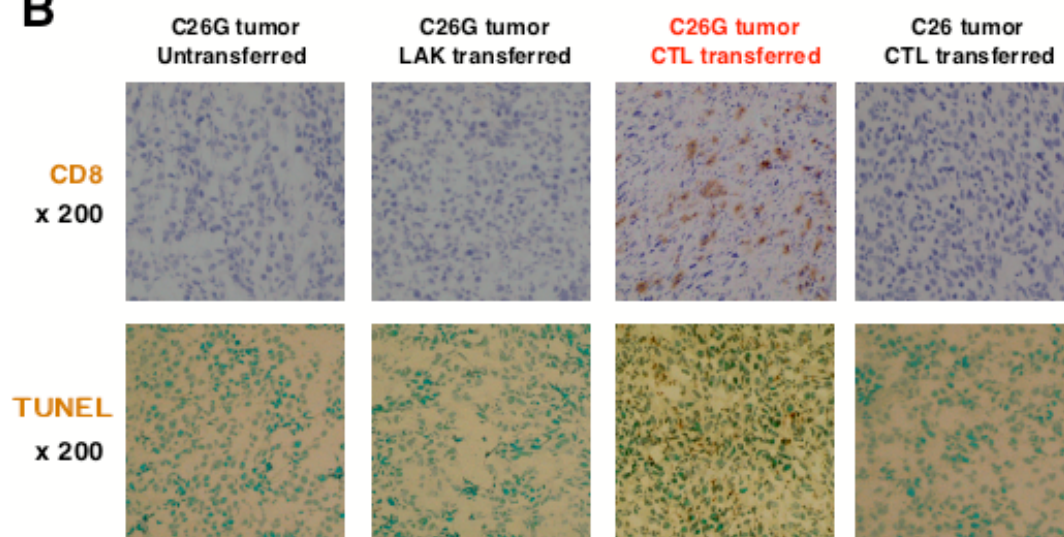


図10. GPC3発現腫瘍に対するGPC3ペプチドで誘導したCTL投与の抗腫瘍効果の検討

A: 図と同様にGPC3-8で誘導したCD8陽性の脾細胞と、IL-2のみで刺激したCD8陽性の脾細胞それぞれをC26/GPC3あるいはC26腫瘍が5x5mm大になった時点で腫瘍内もしくは静脈内投与した。C26/GPC3に対し、GPC3-8誘導CD8陽性脾細胞を投与した場合、他と比較して腫瘍増殖抑制効果を認めた。B: 脾細胞投与21日後の腫瘍局所における細胞浸潤を免疫染色にて検討したところ、増殖抑制効果を認めたC26/GPC3にGPC3-8誘導CD8陽性脾細胞を投与した群では局所のCD8陽性細胞浸潤とアポトーシスに陥った細胞の存在を認めた。

5-6) 本研究の目的

GPC3 は HCC に高発現する新規癌胎児性抗原であり、ヒトの HCC の腫瘍マーカーとしてだけでなく、マウスを用いた研究により、免疫療法の、標的腫瘍抗原としても有用と考えられる。本研究は、GPC3 エピトープペプチドを用いた免疫療法のヒトへの応用を目指した前臨床研究を目的とする。このため、HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いて、自己免疫現象を誘導しない HLA-A2 拘束性 GPC3 由来エピトープを同定し、HLA-A24 拘束性 GPC3 由来 CTL エピトープとともに、GPC3 特異的に GPC3 発現癌細胞を破壊する CTL を、HCC 患者末梢血から誘導できるか否かを検討する。

6 実験方法

6-1) マウス

HLA-A2 トランスジェニックマウス(47,48)は埼玉医科大学 松井政則教授の御好意により分与いただき、7 週齢のメスを用いて検討した。HLA-A*0201 の mRNA の発現は RT-PCR 法にて mRNA の発現を確認した。NOD/SCID マウスは日本 CLEA より購入し、SPF (specific pathogen free condition)環境にて飼育されたものを使用した。動物実験の施行に関しては、熊本大学動物実験指針および、熊本大学本荘-大江地区動物実験委員会規則を遵守して行った。

6-2) 使用した細胞

GPC3 を発現する肝癌細胞株として HepG2 (HLA-A2 および HLA-A24 とともに陽性)、HuH-7(HLA-A2 および HLA-A24 とともに陰性)を用いた。GPC3 を発現しない肝癌細胞株として SK-Hep-1(HLA-A2 および HLA-A24 とともに陽性)および GPC3 を遺伝子導入した SK-Hep-1/GPC3、同じく GPC3 を発現しない大腸癌細胞株である SW-620(HLA-A2 および HLA-A24 とともに陽性)および GPC3 を遺伝子導入した SW-620/GPC3 を用いた。HLA-A2 エピトープペプチド特異的な CTL の誘導の確認には久留米大学の伊東恭吾教授 (免疫学講座)からいただいた、T2-A*0201 (TAP 遺伝子の発現を欠損し、HLA-A*0201 遺伝子を発現する細胞株)を用いた。HLA-A24 エピトープペプチド特異的な CTL の誘導の確認には、熊本大学の滝口雅文教授 (ウイルス制御学講座)より頂いた C1R A*2402(HLA をほとんど発現しない EB ウイルス感染 B 細胞株である C1R に、HLA-A*2402 遺伝子を導入した細胞株)を用いた。

6-3) 使用したペプチド

特定の HLA に結合するペプチドの構造モチーフ探索データベース (<http://bimas.dcrt.nih.gov/>)を利用して、ヒトとマウスの GPC3 に保存さ

れたアミノ酸配列をもつペプチドで、HLA-A2(A*0201)に結合すると推定される GPC3 由来の 9~10 個のアミノ酸からなるペプチドを 9 種類選択し(表 1)、バイオロジカ(東京)に合成を依頼し購入した。HLA-A24 拘束性の CTL エピトープは、中面らが同定した(33)結合するペプチドの構造モチーフが HLA-A24 と同一である、マウス H2-K^dにより CTL に提示される GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL)ペプチドを用いた。

表1 ヒトとマウスで共通のアミノ酸配列をもちHLA-A2(A*0201)に結合すると推定されるGPC3ペプチド

A2-binding peptide	Position	Subsequence residue listing	HLA-A2 binding *
GPC3A2-1	44-52	RLQPGLKWV	879
GPC3A2-2	102-110	FLIIQNAAV	319
GPC3A2-3	144-152	FVGEFFTDV	828
GPC3A2-4	155-163	YILGSDINV	162
GPC3A2-5	169-177	ELFDSLFPV	1055
GPC3A2-6	254-268	RMLTRMWYC	1259
GPC3A2-7	281-289	VMQGCMAGV	196
GPC3A2-8	326-334	TIHDSIQYV	496
GPC3A2-9	522-560	FLAELAYDL	402

*HLA-A2(A*0201)分子へのbinding scoreは、BIMASソフトウェアを用いて算出した

6-4) Tgm を用いた CTL エピトープの決定

HLA-A2 トランスジェニックマウス(HLA-A2 Tgm)の骨髓細胞から DC(BM-DC)を誘導した。誘導法に関しては先に報告した方法(33)を用いた。すなわち HLA-A2 (A*0201)Tgm の骨髓細胞 2×10^6 個にマウスの GM-CSF を 5ng/ml の濃度で加え、10cm 培養プレート内で 1 週間培養して誘導した。このようにして得られた BMDC を上記で決定したペプチド 9 種類の混合物(各 $10 \mu\text{M}$)と 2 時間インキュベートした後に、HLA-A2 Tgm 一匹あたり 5×10^5 個ずつ腹腔内に投与(免疫)した。1 週間の間隔をおいて 2 回免疫した後、マウスの脾細胞を回収して Cytotoxic T Lymphocyte (CTL: 細胞傷害活性 T リンパ球)の誘導に用いた。CD4 陽性 T リンパ球による非特異的反応の影響を除外するため、脾細胞は採取時 MACS Beads を用いて CD4 T リンパ球を取り除い

たものを用いた(図 12A)。

回収した免疫マウスの脾細胞を、試験管内でペプチドを添加した BM-DC により再刺激した。培養 6 日目に再び、ペプチドを添加した BM-DC およびペプチドを添加していない BM-DC を標的細胞とし、ペプチド特異的に CTL が産生する IFN- γ を ELISPOT 法にて検討した。IFN- γ 産生 CTL の数に相関するスポット数の検出は、検出キット(BD Biosciences ELISPOT Set)のプロトコールに準じて行った。前日から IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレートに培養液にて洗浄後、エフェクター細胞(100 μ L /well)と標的細胞(100 μ L /well)を混合し、37°C で 22 時間培養した。その後、プレートを滅菌水で洗浄し、ビオチン化抗体と 2 時間、さらにストレプトアビジン-HRP と 1 時間反応させ、基質溶液にて IFN- γ 陽性のスポットを検出した(45)。スポットのカウントは、MINERVA TECH 社の自動解析装置にて行った。

6-5) HLA-A2Tgm を用いた自己免疫反応の検討

前項に示した GPC3 ペプチド負荷 BM-DC を免疫した HLA-A2Tgm の重要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、皮膚)に対する自己免疫現象の有無を、2 回目の免疫 1 週間後に各臓器における CD8 および CD4T リンパ球の浸潤の有無により検討した。免疫した HLA-A2Tgm の各臓器を採取し、抗 CD8 抗体および抗 CD4 抗体にて免疫染色を施行した。脾臓はポジティブコントロールとして検討した。

6-6) 血液サンプルおよび癌組織の採取

ヒトの検体を用いた研究に関しては、熊本大学倫理審査委員会に研究計画書を提出し、承認を得たうえで実施した。熊本大学医学部消化器外科にて治療中の HLA-A2(A*0201)陽性の肝細胞癌患者からインフォームドコンセントを得た後に、末梢血サンプル 30~50ml を採取し、先に報告した Ficoll-Conray 密度勾配遠心法(46)によって、末梢血単核球細胞(PBMC)を単離した。各患者が HLA-A2 あるいは A24 を有しているか否かは、PBMC を抗 HLA 抗体と FITC 抗マウス IgG 抗体により間接蛍光染色し、フローサイトメトリー(FACScan, Becton Dickinson)を用いて検討した。本研究に用いた抗ヒト HLA モノクローナル抗体は以下の通りである。W6/32(抗 HLA-class I フレームワーク抗体), anti-HLA-A2, anti-HLA-A24, (SIGMA Saint-louis USA)。

サンプル提供患者に関しては、年齢、性別、腫瘍の臨床病期(UICC 国際分類 ; TNM 分類)、血清中の GPC3 値を検討した。癌組織の手術摘出検体を検討出来た患者に対しては、腫瘍組織における HLA の発現および GPC3 の発現を検討した。用いたモノクローナル抗体は以下の通りである。抗ヒト GPC3 抗体 : 1G12(BioMosaic 社)、抗 HLA-class I 抗体 : EMR-5(札幌医科大学鳥越俊彦先生より御供与)

6-7) 対象患者血清中の分泌 GPC3 の検討

対象とした患者血清中の GPC3 の測定は、以前中面らが報告した方法(40)で施行した。すなはち、抗ヒト GPC3 ポリクローナル抗体でコーティングした 96 穴 ELISA プレートに、ブロックエースにて 200 倍希釈した患者血清を加え、さらに抗ヒト GPC3 ポリクローナル抗体にて検出するサンドイッチ ELISA 法にて検出した。

6-8) 腫瘍組織における GPC3 と HLA-クラス I 分子 の発現

切除された HCC 組織における GPC3 の発現は、マウス抗ヒト GPC3 モノクローナル抗体である 1G12(Bio Mosaic 社)を使用した免疫組織化学的検索により行った。また、腫瘍組織の HLA-クラス I 分子の発現解析には、札幌医大鳥越先生より御供与いただいた抗 HLA-クラス I 抗体 EMR8-5 を使用した。

6-9) HCC 患者 PBMC からの GPC3 反応性 CTL の誘導

HLA-A2陽性の肝細胞癌患者10人、およびHLA-A24陽性の肝細胞癌患者12人のPBMCを、それぞれのHLAに拘束性を示すCTLエピトープ候補ペプチドで刺激し、HLA-A2(A*0201)拘束性もしくはHLA-A24(A*2402)拘束性にペプチドを認識する細胞株を樹立した。具体的な方法を、図11および以下に示す。

まず全血よりFicoll-Conrey密度勾配遠心法にてPBMCを分離した後、マイクロビーズ (Miltenyl Biotec社) を用いてCD8陽性細胞とCD14陽性細胞を分離し、CD8陽性細胞は凍結保存した。CD14陽性細胞をGM-CSF (100 ng/ml) とIL-4 (100 U/ml) を添加した10%ウシ胎児血清入りRPMI1640メディウム中で培養して、5日目にTNF- α を20 ng/mlになるように加えさらに2日培養し、成熟樹状細胞 (DC) に分化させ、抗原提示細胞として使用した。CTLの誘導には10%自己血清入りRPMI1640メディウムを使用した。24穴プレートに1ウェルあたりDCを1~2 $\times 10^5$ 個と、5 μ Mのペプチドを加え2時間後に35Gyの放射線を照射した。その後に凍結保存しておいた2 $\times 10^6$ 個

のCD8陽性細胞を加え培養した。第1日目にIL-7 (5 ng/ml)を加えた。またこの日から新しいDCの誘導を始めた。第8日および第15日に同様のDCを準備し、CD8陽性細胞をRPMI1640で1回洗浄後、DCで再刺激した。この際にIL-7 (5 ng/ml)とIL-2(10 U/ml)を加えた。

図11

末梢血単核細胞ドナー：HLA-A2あるいはA24陽性の肝細胞
癌患者

メディウム：10%自家血漿添加RPMI-1640培養液

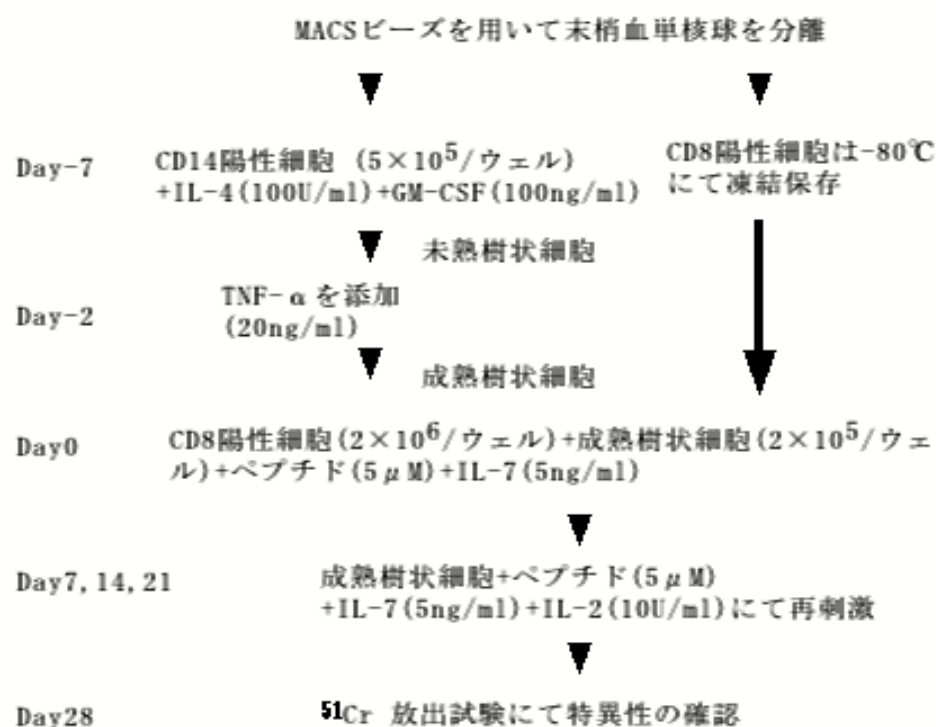


図11. 腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTL株の樹立法

末梢血からFicoll-Conray比重遠心法にてPBMCを分離し、抗CD8抗体と抗CD14抗体を付着させたMACSビーズで、それぞれCD8陽性細胞とCD14陽性細胞を分離した。CD8陽性細胞は、凍結保存した。CD14陽性細胞は、GM-CSFとIL-4をいれたメディウム中で6穴プレート1ウェルあたり 5×10^5 個でまいた。5日目にTNF- α を添加して、成熟樹状細胞に分化させた。一度洗浄した後、 2×10^5 個の成熟樹状細胞と $5 \mu\text{M}$ のペプチドを24穴プレートにいれ、2時間静置した後、35Gyの放射線を照射した。そこに 2×10^6 個のCD8陽性細胞とIL-7を加えた。その日から新たに樹状細胞の誘導を開始した。7日と14日後に同様に樹状細胞とペプチドで再刺激した。その際に、IL-2もさらに加えた。28日目に ^{51}Cr 放出試験にて、ペプチド特異性を確認した。

6-10) 細胞傷害活性の検討

ペプチド特異的 CTL の誘導の確認は、HLA-A2 拘束性エピトープペプチドに関しては T2-A*0201 細胞を、HLA-A24 拘束性エピトープペプチドに関しては C1R-A*2402 細胞を標的細胞にした ^{51}Cr 放出法による細胞傷害試験により行った。 ^{51}Cr 放出法による細胞傷害の定量は、各細胞を ^{51}Cr ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) で 1 時間ラベルした後、96 穴 U 底プレートに 1 ウェルあたり 1×10^4 個まき、ペプチドをパルスした群としなかった群にわけ、それぞれをエピトープペプチドで誘導した CTL と共培養し、培養上清中に死細胞より放出された ^{51}Cr を測定して、2 群間で比較することにより行った。

GPC3 反応性 CTL の誘導の確認は、HLA-A2 と A24 陽性で GPC3 を発現していない肝細胞癌細胞株 SK-Hep1、および HLA-A2 と A24 陽性で GPC3 を発現していない大腸癌細胞株 SW620 と、これらの細胞に GPC3 遺伝子を導入した SK-Hep1/GPC3 あるいは SW620/GPC3 を用いて細胞傷害活性を測定した。

通常の癌細胞に対する細胞傷害活性は、HLA-A2 と A24 陽性で GPC3 を発現している肝細胞癌細胞株 HepG2、HLA-A2 と A24 が共に陰性で GPC3 を発現している肝細胞癌細胞株 HuH-7 を標的細胞として用いて検討した 1 日目に細胞を ^{51}Cr で 1 時間ラベルした後に、96 穴平底プレートに 1 ウェルあたり、 1×10^4 個まいた。2 日目にターゲット細胞に対して、5、10、20、40 倍の数の CTL 細胞株を加え、4 時間後に培養上清を採取して死細胞より放出された ^{51}Cr を測定した。

6-11) CTL の MHC 拘束性の検討

GPC3 ペプチド特異的 CTL が MHC 拘束性に細胞傷害活性を示すか否かを、抗体による HLA-クラス I のブロッキング試験にて検討した。細胞傷害活性の検討を ^{51}Cr 放出法あるいは ELISPOT アッセイにて検討する際、標的細胞

を抗HLA-クラス I 抗体であるW6/32(10 µg/ml)と共に1時間培養した後、CTL と共培養して傷害活性阻害の有無を検討した。コントロールとして、抗HLA-DR 抗体であるH-DR-I 抗体を使用した。

6-12) 腫瘍増殖抑制実験

7 週齢のメスの NOD/SCID マウスを日本クレア社より購入し、熊本大学の Center for Animal Resources and Development (CARD)にて SPF 環境下に飼育した。まず、GPC3 遺伝子を導入した 5×10^6 個のヒト肝臓癌細胞株 SK-Hep1 を、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。SK-Hep1/GPC3 が腫瘍を形成し、その大きさが(5×5 mm) 25mm²になったところで、 5×10^6 個の GPC3 ペプチド特異的な CTL 細胞株、コントロールの CD8⁺ T 細胞株、あるいは生理食塩水のみをマウスに静脈内投与した。コントロールの CD8⁺ T 細胞株として、肝細胞癌患者の PBMC を HIV 由来のペプチドで刺激後に得た CD8⁺ T 細胞株を用いた。移植後 9 日目と 14 日目に 2 回、各 T 細胞株を投与し、その後 3 日毎に腫瘍の大きさ（長径×短径）を測定した。

6-13) 統計学的解析

細胞傷害活性および腫瘍の増殖の各群間の有意差検定については、Two-tailed Student's *t* test を用いて行った。 $P < 0.05$ の場合に、有意差ありと判定した。統計解析は StatView 5.0 (Abacus Concept 社製)を用いて行った。

7 実験結果

7-1) HLA-A2 Tgm を利用した GPC3 由来 HLA-A2

(A*0201)拘束性エピトープの同定

選択した HLA-A2(A*0201)に結合親和性を示すと推定された GPC3 由来のペプチド 9 種類のうち、最も強く GPC3 特異的に CTL を誘導出来るエピトープペプチドを ELISPOT アッセイにて決定した (図 12)。各々のペプチドについて検討したところ、ペプチド A2-3;GPC3₁₄₄₋₁₅₂ を提示させた BM-DC により in vitro で再刺激後に、ELISPOT アッセイにおける刺激細胞としてペプチド A2-3 を負荷した BM-DC を用いた場合に生じたスポット数は、 2×10^4 個の CD4 陰性脾細胞あたり 36 ± 2.85 個であり、一方コントロールとしてペプチド負荷しない BM-DC に対しては 23 ± 1.84 個であり最も強く GPC3 特異的反応を認めた ($p < 0.005$)。

また各スポット長径の総和を検討すると、ペプチド A2-3;GPC3₁₄₄₋₁₅₂ では $1878 \pm 131 \mu\text{m}$ に対し、コントロールでは $437 \pm 77 \mu\text{m}$ とスポット数と同様に有意差を認めた。以上よりペプチド A2-3 を検討したペプチドのうちで、最も優れた GPC3 由来 HLA-A2 拘束性 CTL エピトープと決定した(図 12B)。

図12

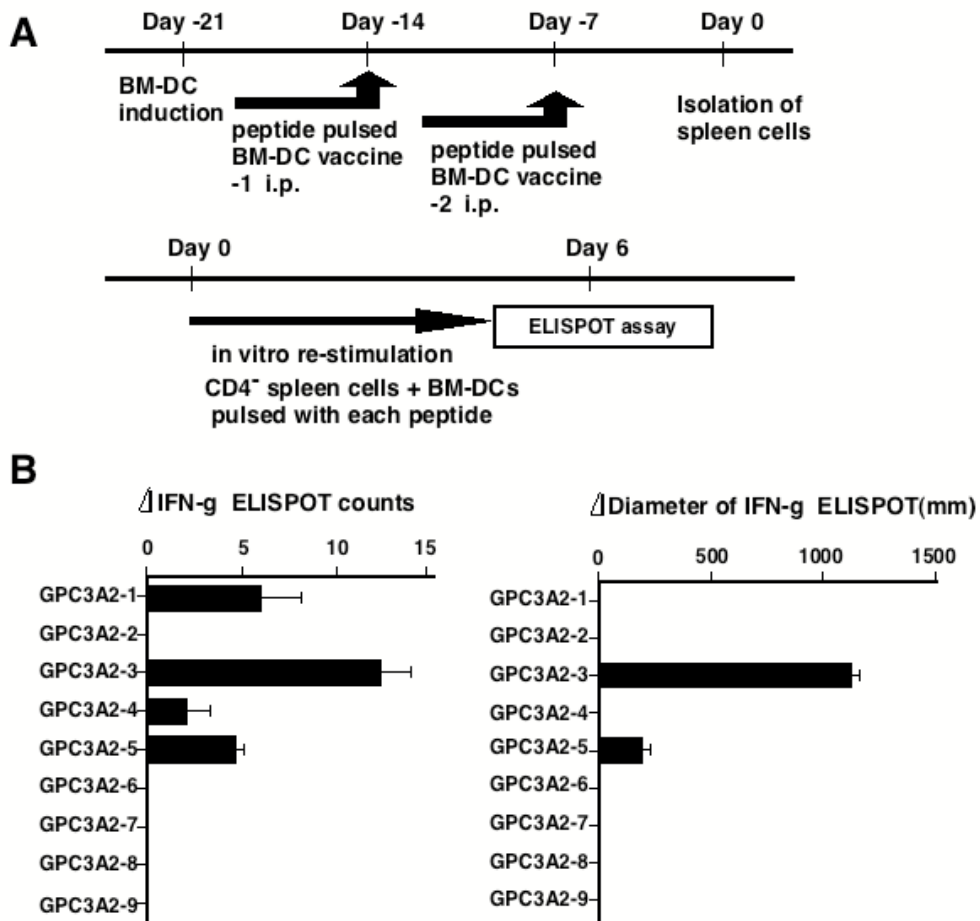


図12.HLA-A2Tgmを用いたGPC3由来のHLA-A2拘束性CTLエピトープの同定

A: CTLエピトープ同定のためのプロトコル。HLA-A2TgmのBMDCにHLA-A2拘束性GPC3ペプチド9種類の混合物を負荷し、1週間毎に2回、 5×10^5 個ずつ腹腔内投与にて免疫し、7日後に脾細胞を回収した。CD4陰性脾細胞をソートし、in vitroにて再びBM-DCにそれぞれのGPC3ペプチドを負荷したものと共培養し、6日後にELISPOTアッセイにて最もよくペプチド特異的なCTLを誘導できたペプチドを決定した。ELISPOTの際には刺激細胞としてペプチドを負荷したBM-DCと、負荷しないBMDCを用い、両刺激の間でスポット数およびスポット径の総和の差が最も大きいものをエピトープ候補とした。B: 左はスポット数、右はスポット径の総和を示す。GPC3A2-3が最も優れたCTLエピトープと判定した。

7-2) GPC3 ペプチドを免疫されたマウスにおける

自己免疫現象の検討

癌免疫療法の臨床応用を目指す際には、癌特異的抗原に対する免疫応答が自己免疫現象を誘導するか否かに留意しなければならない。例えば、良く知られているメラノーマの分化抗原の MART-1 や gp100 はメラノーマの免疫療法に有用であるが、自己免疫反応として白斑やブドウ膜炎を誘導する場合がある。GPC3 A2-3 ペプチドを含む GPC3 由来ペプチドにて 2 回免疫した HLA-A2Tgm について、重要臓器(脳、皮膚、心、肺、肝、腎)への CD8 陽性細胞または、CD4 陽性細胞の浸潤を免疫染色にて検討したところ、細胞浸潤を認めず自己免疫反応は生じていないものと判断した。これは GPC3 A2-3 ペプチド単独で免疫した場合でも同様であった(図 13)。また、マウスの体重減少や下痢、毛並みの乱れなどの、自己免疫疾患の発症を推測させる以上も観察されなかった。

図13

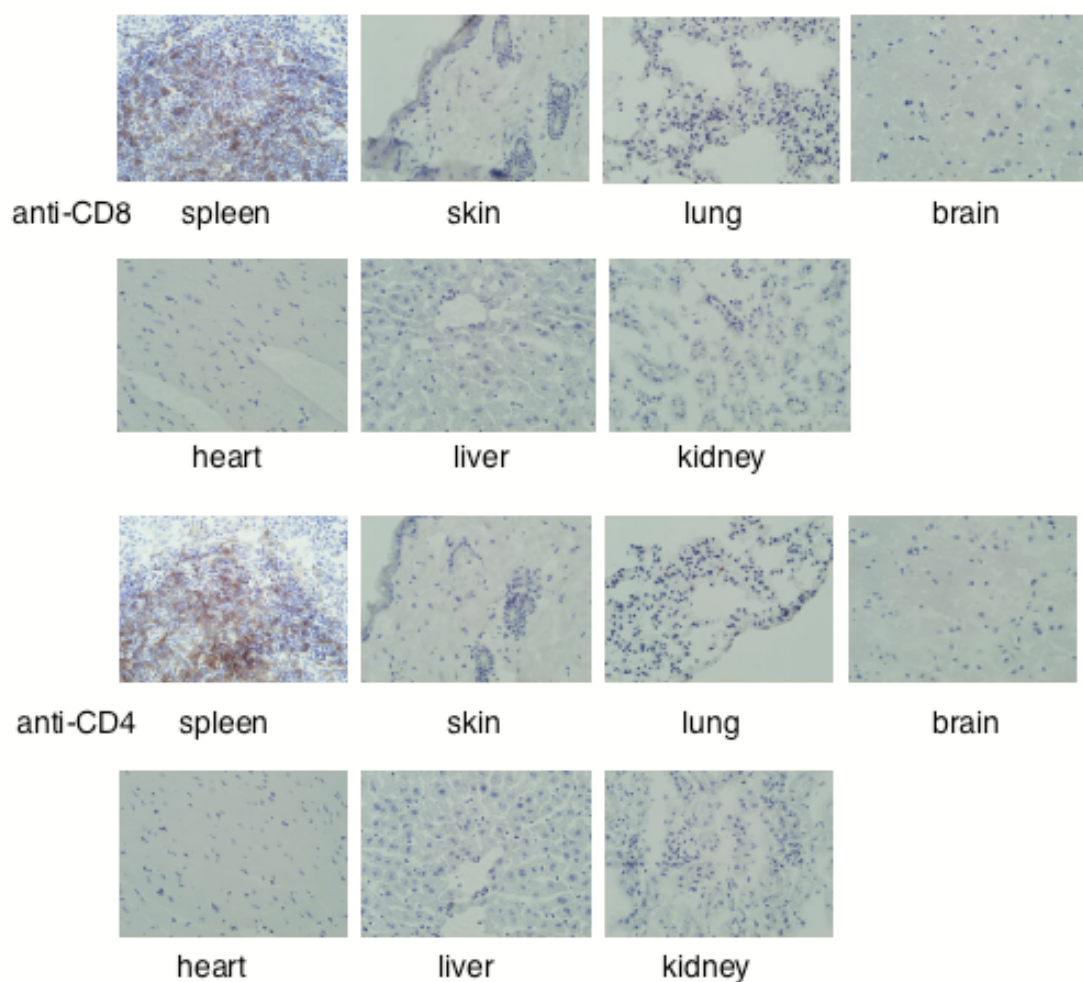


図13 GPC3ペプチドを負荷したワクチンは自己免疫現象を誘導しない。
 Gpc3ペプチドを負荷したBMDCワクチンを施行した1週間後に脾臓を採取する際に、同時に重要臓器への細胞浸潤の有無を検討した。抗CD8抗体、抗CD4抗体を用いて脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、皮膚へのリンパ球浸潤の有無を検討したが、浸潤は認められなかった。

7-3) HCC 患者におけるエピトープペプチドを用いた

GPC3 反応性 CTL の誘導

上記の HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV)と、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL)を用いて、HLA-A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の PBMC から、ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた(図 14)。図 14A はペプチド特異的に CTL を誘導出来た HCC 患者 Pt-A2-8 のデータを示す。患者の PBMC から誘導した CTL は HLA-A2 拘束性ペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV)を負荷した T2-A0201 細胞に対して、ペプチドを負荷していないものに比べて明らかに強い細胞傷害活性を示した。同様に Pt-A24-12 の PBMC から誘導した CTL は、C1RA*2402 細胞に HLA-A24 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL)を負荷した細胞に対して、ペプチドを負荷していないものに比べて明らかに強い細胞傷害活性を示した。

次に癌細胞を傷害する CTL の誘導に用いたペプチドが癌細胞内でプロセッシングを受け、該当 HLA-クラス I 分子と GPC3 ペプチドの複合体として癌細胞の表面に提示されているか否かを検討するために、GPC3 を発現しない HLA-A2 陽性-A24 陽性の HCC 細胞株 SK-Hep-1 および、GPC3 を発現しない HLA-A2 陽性-A24 陽性の大腸癌細胞株 SW-620 と、それぞれに GPC3 を遺伝子導入した SK-Hep-1/GPC3、SW-620/GPC3 を標的細胞として用いて検討した(図 14B)。Pt-A2-3 から誘導した CTL においてはコントロールである SK-Hep-1 に比べ、GPC3 を遺伝子導入した SK-Hep-1/GPC3 に対して強い細胞傷害活性を示した。Pt-A24-7 から誘導した CTL においてはコントロールである SW-620 に比べ、GPC3 を遺伝子導入した SW-620/GPC3 に対して強い細胞傷害活性を示し、Pt-A24-12 から誘導した CTL においてはコントロールである SK-Hep-1 に比べ、GPC3 を遺伝子導入した SK-Hep-1/GPC3 に対して強い細胞傷害活性を示した。以上の結果は、今回同定した 2 つのエピトープペプチドが GPC3 遺伝子導入した癌細胞内で、自然なプロセッシングを受けて産生されていることを示している。

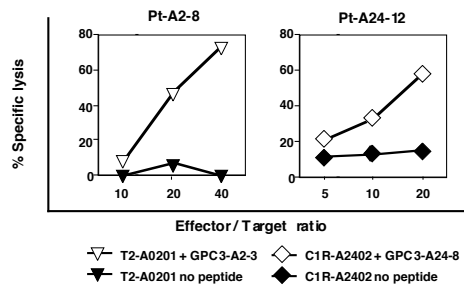
さらに内因性の GPC3 を発現している HCC 細胞株において検討した結果を図 14C に示す。細胞傷害活性の程度は異なるものの、Pt-A2-1、3、4 から誘導した CTL では GPC3 陽性かつ HLA-A2 陽性である HepG2 に対して細胞傷害活性を示したが、GPC3 陽性であるが HLA-A2 陰性である HuH-7 や、HLA-A2 陽性であるが GPC3 陰性である SW620 に対して細胞傷害活性

を示さなかった。同様に Pt-A24-7、12 から誘導した CTL では GPC3 陽性かつ HLA-A24 陽性である HepG2 に対し傷害活性を示すが、GPC3 陽性であるが HLA-A24 陰性である HuH-7 や、HLA-A24 陽性であるが GPC3 陰性である SK-Hep-1 に対して傷害活性を示さなかった。これらの結果は、今回同定した 2 つの CTL エピトープペプチドが、GPC3 発現癌細胞内でプロセッシングを受けていることを示唆している。

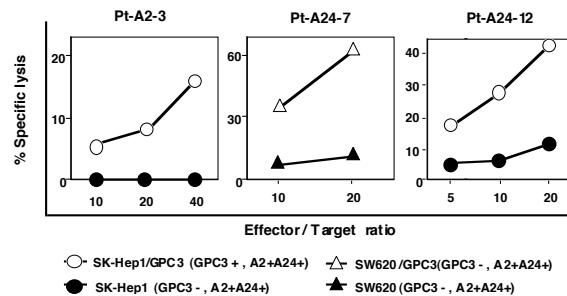
今回検討した HCC 患者の HCC 組織における GPC3 の発現、血清 GPC3 蛋白質の存在と GPC3 を認識する CTL の誘導率を表 2 にしめす。HLA-A2 陽性患者 10 人のうち HCC 組織における GPC3 の発現を確認できたのは 6 症例で、このうち CTL が誘導できた症例は 3 人であった。これら 3 名の HCC 組織には HLA-クラス I の発現が認められた。同様に HLA-A24 陽性患者 12 名のうち、HCC 組織の GPC3 の発現を確認できたのは 6 症例で、このうち 3 人において CTL が誘導できた。これら 3 名の腫瘍組織には HLA-クラス I の発現が認められた。CTL 誘導の有無と年齢、性別、病期との間には相関は認められなかった。

図14

A



B



C

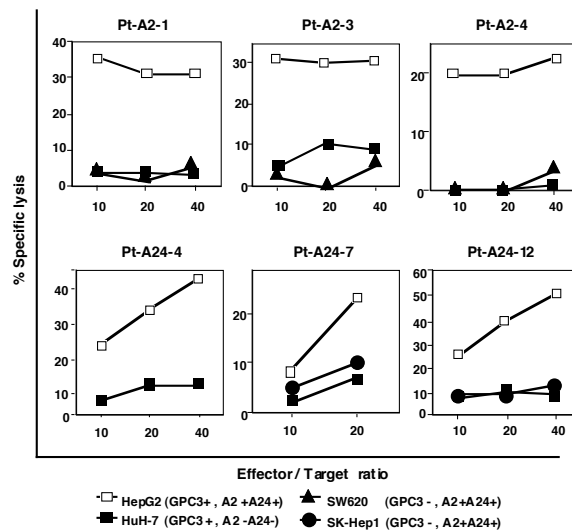


図14. HCC 患者におけるGPC3ペプチドを用いたGPC3 特異的なCTLの誘導

HCC患者のPBMCより、GPC3ペプチドを用いてGPC3ペプチド特異的に細胞傷害活性を示すCTLを誘導した。A: ペプチド特異性はHLA-A2拘束性エピトープに関しては、T2細胞にGPC3A2エピトープを加えたもの(▼)に対する傷害活性と、コントロールとしてペプチドを加えないもの(▽)に対する傷害活性を比較した。HLA-A24拘束性エピトープに関しては、C1R細胞にGPC3A24エピトープを加えたもの(◆)に対する傷害活性と、コントロールとしてペプチドを加えないもの(◇)に対する傷害活性を比較した。B: GPC3特異性はHLA-A2陽性-A24陽性の肝癌細胞株であるSK-Hep-1(●)あるいは大腸癌細胞株であるSW620(▲)と、それぞれにGPC3を遺伝子導入したSK-Hep-1/GPC3(○)、あるいはSW620/GPC3(△)に対する傷害活性の有無で検討した。C: 内因性GPC3を発現するHCC細胞株Hep-G2(□GPC3+, HLA-A2+, A24+)とHuH-7(■GPC3+, HLA-A2-, A24-)に対する細胞傷害活性を比較することにより、発現しているGPC3から生成されるエピトープとHLA分子を認識して、CTLが細胞傷害活性を示していることがわかった。

表2 HCC患者の肝癌組織におけるGPC3の発現、血清GPC3蛋白質の存在とGPC3特異的CTLの誘導

HLA-A2 (A*0201)-positive patients	Age	Gender	State of tumor*	GPC3 expression*	Serum GPC3 ‡	HLA expression*	CTL induction*
Pt-A2-1	80	F	IIa	+	+	+	+
Pt-A2-2	72	M	II	+	+	+	+
Pt-A2-3	67	F	II	ND	+	ND	+
Pt-A2-4	54	M	I	+	-	+	+
Pt-A2-5	57	M	I	ND	-	ND	-
Pt-A2-6	66	M	I	-	+	-	-
Pt-A2-7	54	M	IIa	+	-	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	-	ND	+
Pt-A2-9	68	F	IIa	+	-	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	+	-

HLA-A24 (A*2402)-positive patients	Age	Gender	State of tumor*	GPC3 expression*	Serum GPC3 ‡	HLA expression*	CTL induction*
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIa	+	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIa	ND	-	ND	+
Pt-A24-5	52	M	IVb	-	-	+	-
Pt-A24-6	65	M	I	ND	+	ND	+
Pt-A24-7	61	M	I	ND	-	ND	+
Pt-A24-8	74	M	II	ND	-	ND	-
Pt-A24-9	59	M	IVb	-	-	-	-
Pt-A24-10	69	M	IVa	+	+	+	-
Pt-A24-11	72	M	II	-	-	+	-
Pt-A24-12	61	M	IIa	+	+	+	+

脚注：F: 女性、M: 男性、ND: 施行しておらず † TNM分類 *陽性(+)および陰性(-)は腫瘍周囲の正常組織の染色と比較して判断した。‡ 106ng/ml以下を陽性とした。★腫瘍細胞膜が染色されたものを陽性とした。※GPC3ペプチドで誘導されたCTLがHep-G2細胞に対し、E/T比20で20%以上の細胞傷害活性を示した場合にCTLが誘導されたと判断した。

7-4) GPC3 特異的ヒト CTL の HLA 拘束性の検討

GPC3 ペプチド特異的ヒト CTL が HLA 拘束性に細胞傷害活性を示すか否かを、抗体による HLA-クラス I の阻止実験により検討した (図 15)。図 15A は HLA-A2 陽性の HCC 患者 Pt-A2-8 の PBMC から誘導した CTL が、GPC3 を発現する HCC 細胞株 HepG2 に反応して IFN- γ を産生するが、この反応が抗 HLA-クラス I 抗体である W6/32 により抑制されることを示している。この反応は、抗 HLA-DR 抗体では抑制されなかった。また図 15B は HLA-A24 陽性の HCC 患者 Pt-A24-6 の PBMC から誘導した CTL が、GPC3 を発現する HCC 細胞株 HepG2 に反応して示す細胞傷害活性が、同様に W6/32 により抑制され、抗 HLA-DR 抗体では抑制されないことを示している。

図15

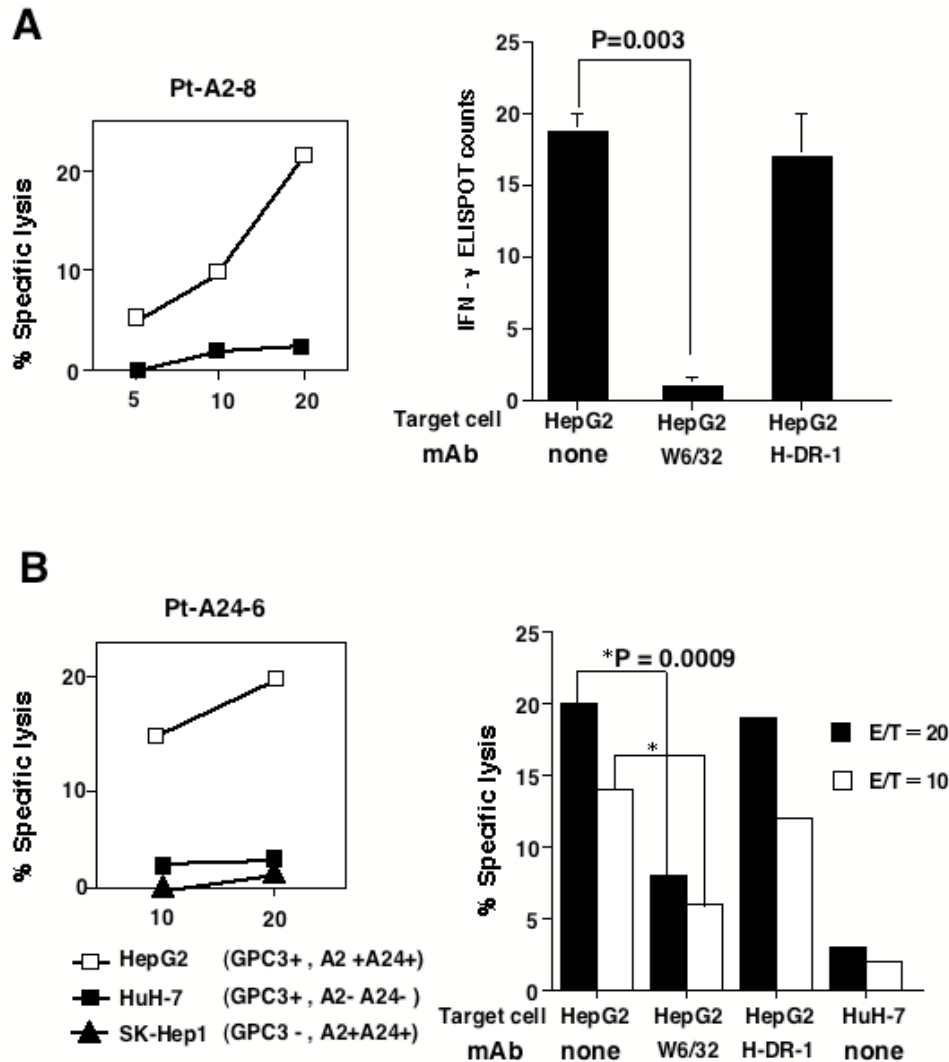


図15.GPC3特異的ヒトCTLのHLA-クラスI 拘束性の証明

Hep-G2細胞(GPC3+, HLA-A2+, A24+)に対する細胞傷害活性が、HLA-クラスI 拘束性に生じているか否かを、抗HLA-クラスI抗体であるW6/32と抗HLA-DR抗体であるH-DR-1を用いた細胞傷害活性の抑制実験により検討した。A: HLA-A2拘束性エпитープで誘導したCTLのHep-G2に対する細胞傷害活性はW6/32の存在下に有意に抑制された。B: また症例A24-6のPBMCからHLA-A24拘束性エпитープを用いて誘導したCTLは、エリスポットを用いて検討するとW6/32の存在下に有意にIFN- γ 産生細胞スポット数が減少した。

7-5) GPC3 発現ヒト HCC に対する養子免疫療法の効果

NOD/SCID マウスに GPC3 発現ヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下注射して生着させた後に、HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV)あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL)で刺激することにより誘導されたヒト CTL 株を養子免疫した。HIV 蛋白由来のペプチドで刺激された CD8 陽性 T 細胞株投与群、あるいは生理食塩水のみを投与した群をコントロールとして用いた。NOD/SCID マウスに生着した SK-Hep1/GPC3 細胞が形成した腫瘍の大きさの経時的変化を図 16 に示す。GPC3 エピトープペプチドにて誘導した CTL 株を養子免疫した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与した群と比較して、有意差をもって腫瘍の増殖抑制が認められた。

図16

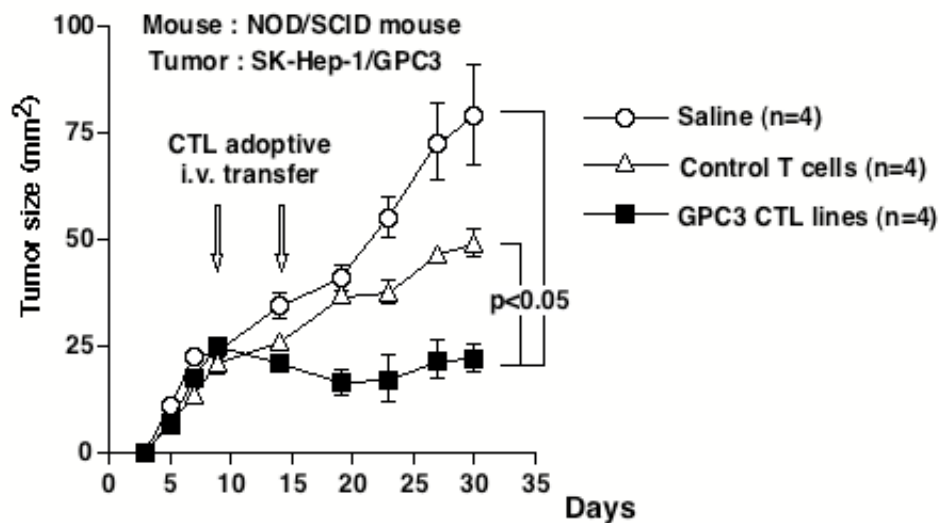


図16. GPC3発現ヒトHCCに対する養子免疫療法の効果

免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスに移植したGPC3発現ヒトHCC細胞株に対する、ヒトCTL養子免疫による抗腫瘍効果を検討した。免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスにSK-Hep-1/GPC3を 1×10^7 個移植し、5x5mmの大きさになったところで、CTLを 8×10^7 個i.v.投与した。HCC患者のPBMCをGPC3エпитープペプチドで刺激して誘導したCTL投与群(■)と、コントロールとしてHIVエпитープペプチドで誘導したCTL投与群(△)、生理食塩水のみ投与した群(○)間で比較すると、GPC3特異的CTL投与群でコントロールに比べ有意に腫瘍増殖が抑制された。

8 考察

我々は今回 HLA-A2(A*0201)あるいは HLA-A24(A*2402)拘束性の GPC3 由来ヒト CTL エピトープを同定し、これらのペプチドを用いて HCC 患者の PBMC から約 50%の頻度で GPC3 に反応する CTL を誘導出来た。これらのペプチドを負荷した BM-DC によるワクチンは HLA-A2Tgm に自己免疫反応を引き起こすことなく CTL を誘導できた。

GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL)は BALB/c マウスにおいて K^d拘束性 CTL エピトープとして同定されたペプチドであり、マウス K^d とヒト HLA-A24 (A*2402)に結合するペプチドの構造モチーフの相同性より、HLA-A24 拘束性エピトープとなりうる可能性を予想し、今回の検討にてこれを実証出来た。このことは BALB/c マウスが HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定に有用であることを示唆している。HLA-A2Tgm は HLA 拘束性ペプチドを用いた免疫療法の動物モデルとして有用であることが報告されている(47,48)が、我々も今回の研究により HLA-A2 拘束性 CTL エピトープの決定に有用であることを確認した。HLA-A2Tgm を用いることで HCC 患者の血液を用いずに検討でき、採血の負担を軽くすることが可能であった。

本研究では、最も強く CTL を誘導するメジャーエピトープを決定することが目的であったため、マウスの免疫では 9 種類のペプチドの混合物を提示させた BM-DC を投与し、最も強く CTL を誘導できるペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV)を同定し、これを詳細に検討した。このペプチド以外にも IFN- γ -ELISPOT にてペプチド特異的 CTL 応答を誘導するペプチドが数個存在したが、これらのペプチドについてはヒト CTL エピトープとなりうるか否かを今後検討する予定である。近年 MHC に弱い結合性を示すペプチド、たとえば今回用いた BIMAS システムでは検出されてこないようなバインディングスコアが小さいペプチドが、ペプチド特異的な CTL を誘導するとの報告(49)もあり、今回わずかのペプチド特異的 CTL 応答を誘導したマイナーエピトープも検討する必要があると考える。また HLA-A2 拘束性のペプチドを選択する際マウス GPC3 とヒト GPC3 とで共通のアミノ酸配列を持つペプチドを選んだが、ヒト GPC3 のみに存在するペプチドを見落としている可能性もある。また、HLA-A2Tgm の HLA-A2 上に提示されたペプチドを認識する T 細胞はマウス由来であるため、マウス CTL に認識されないペプチドの中に、ヒトの CTL が認識するエピトープが存在する可能性も考慮しなければならない。

癌抗原として免疫系からの逃避が起こりにくい抗原、すなわち癌細胞の悪

性形質転換、組織浸潤や転移に重要な役割を担っている分子で、癌細胞がその発現を欠落すると、癌の悪性形質を失うものを選択する事が理想的である(50,51)。GPC3 は Wnt シグナルを介して、HCC の増殖に重要な役割を担っていることが近年 Capurro らにより報告された(37)。また我々が EMR8-5 を用いて HCC 組織を免疫染色したところ、癌細胞における HLA-クラス I の発現欠失は比較的に少ないことより、GPC3 は HCC の免疫療法における標的抗原として非常に有用であると思われる。我々を含めた複数の施設より、GPC3 は早期の HCC でも発現し、早期の HCC の診断にも有用であることが報告されている(41)。早期から発現することより B,C 型肝炎や肝硬変から発生した肝癌の早期治療においても GPC3 免疫療法は効果が期待出来ると思われる。

今回の検討では約 50%の患者から GPC3 に反応する CTL が誘導出来た。GPC3 免疫療法を臨床応用するためには、さらに症例を増やして検討する必要がある。腫瘍組織における CTL の浸潤や GPC3 反応性の CTL の誘導と、その患者の予後との相関について、HCC 患者 A2-10、A24-1、A24-2、A24-4、A24-9、A24-11、A24-12、の 7 名に関して調査したが、相関は認められなかった。A24-1、A24-4、A24-12 の 3 名からは GPC3 反応性 CTL が樹立できたが、A24-12 は手術 6 ヶ月後に再発した。一方、GPC3 反応性 CTL が樹立できなかった A2-10、A24-2、A24-4、A24-9、A24-11 では、HCC に GPC3 が発現していない A24-9 が手術 6 ヶ月後に再発した。A24-2 に関しては、手術 3 ヶ月後に再発し、再発後 3 ヶ月後に死亡した。これら再発をきたした症例の HCC 組織にはすべて高度な脈管浸潤が認められている。現段階では CTL の誘導と予後、脈管浸潤との相関は統計的に示せないが、今後とも症例を増やして検討したい。

NOD/SCID マウスに SK-Hep1/GPC3 を皮下移植し、GPC3 反応性 CTL の養子免疫すると、コントロールに比べ有意に腫瘍の増殖が抑制された。しかしながら、2 度目の養子免疫の 2 週間後から再び腫瘍が増殖を始めた。したがって可能な限り何度も養子免疫を繰り返すことが必要と思われた。

HCC 患者における GPC3 をターゲットとした免疫療法の有用性を確認すべく、現在、中面らは臨床試験を進めるべく準備を進めている。また、GPC3 はメラノーマでも発現しており、メラノーマにおける免疫療法のターゲットとなる可能性も期待出来る。

9 結論

我々の最終的な目標は、HCC 患者の術後あるいは HCC を発生するリスク

が高い B 型肝炎、C 型肝炎の患者を対象として GPC3 を標的とした免疫療法により、癌の再発および発生を予防することにある。本研究では、患者さんの負担を軽減するとともに、*in vivo* 実験が可能なマウスを用いた実験により GPC3 由来の HLA-A2 もしくは-A24 拘束性 CTL エピトープを決定し、これらを用いて実際の HCC 患者より GPC3 特異的な CTL による抗腫瘍免疫応答の誘導が可能であることを示した。また、これらのエピトープで誘導した CTL がマウスに自己免疫現象を誘導しないこと、ならびに CTL を用いた、癌に対する養子免疫療法の有用性も示唆された。将来的には GPC3 を用いた HCC あるいはメラノーマに対するペプチドワクチン、樹状細胞ワクチンなどの抗腫瘍ワクチンが、HCC やメラノーマに有効な補助療法となることを期待している。

10 参考文献

1. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287-99.
2. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994;12:735-73.
3. Lanier LL, Phillips JH. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. *Immunol Today* 1996;17:86-91.
4. York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369-96.
5. Heemels MT, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995;64:463-91.
6. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987;329:512-8.
7. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991;353:326-9.
8. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991;351:290-6.
9. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 1994;12:181-207.
10. Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995;41:178-228.
11. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991;219:277-319.
12. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, et al. Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 1994;368:711-8.
13. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-21.
14. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 1994;264:961-5.

15. 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;254:1643-7.
16. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997;9:684-93.
17. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:3515-9.
18. Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997;16:313-39.
19. Cox AL, Skipper J, Chen Y, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994;264:716-9.
20. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:277-88.
21. Wang RF, Wang X, Atwood AC, Topalian SL, Rosenberg SA. Cloning genes encoding MHC class II-restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science* 1999;284:1351-4.
22. Pieper R, Christian RE, Gonzales MI, et al. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1999;189:757-66.
23. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4:321-7.
24. Jager E, Jager D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:143-50.
25. Marchand M, van Baren N, Weynants P, et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999;80:219-30.
26. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998;4:328-32.
27. Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11810-3.
28. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene

- cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:936-44.
29. Monji M, Senju S, Nakatsura T, et al. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:734-41.
 30. Nakatsura T, Senju S, Ito M, Nishimura Y, Itoh K. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur J Immunol* 2002;32:826-36.
 31. Monji M, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, et al. Identification of a novel cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 2004; in press.
 32. Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, et al. Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using cDNA microarray analysis. *Clin Cancer Res* 2004; in press.
 33. Nakatsura T et al. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clinical Cancer Research* 2004;10:8630-8640
 34. Gonzalez AD et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol* 1998;141:1407-1414
 35. Pilia G et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 1996;12:241-247
 36. Cano-Gauci DF et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* 1999;146:255-264
 37. Capurro MI et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:6245-6254
 38. Coggin, J.H. Jr., CRC Critical Reviews in Oncology 1992; Hematology 5:37-55
 39. Matsuura, H et al. The Oncofetal Domain of Fibronectin Defined by Monoclonal Antibody FDC-6: Its Presence in Fibronectins from Fetal and Tumor Tissues and Its Absence in Those from Normal Adult Tissues and Plasma *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985; 82:6517-6521
 40. Nakatsura T et al. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:16-25.
 41. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, et al. Identification of soluble NH2-terminal

- fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:2418-23..
42. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2003;125:89-97.
 43. Nakatsura T et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clinical Cancer Research* 2004;10:6612-6621
 44. Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., Matsuyoshi, H., Hirata, S., Monji, M., Komori, H., Fukuma, D., Baba, H., and Nishimura, Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 2006; 66: 2414-22,
 45. Bourgault Villada I et al. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64:8761-8766
 46. Nakatsura, T et al. Cellular and humoral immune responses to a human pancreatic cancer antigen, coactosin-like protein, originally defined by the SEREX method. *Eur. J. Immunol*; 2002;32, 826-836.
 47. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997;185:2043-51.
 48. Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, et al. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol* 1999;29:3112-21.
 49. Bredenbeck A, Losch FO, Sharav T, et al. Identification of noncanonical melanoma-associated T cell epitopes for cancer immunotherapy. *J Immunol* 2005;174:6716-24.
 50. Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997;16:313-39.
 51. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:614-20.