

平成 26 年度

学位論文 博士（理学）

Glypican-3 由来ペプチドワクチンにより
臨床効果を示した肝細胞がん患者における
細胞傷害性 T 細胞の解析

東京理科大学大学院 生命科学研究所

多田 好孝

目次

要旨	4
略語一覧	7
第 1 章 序論	
第 1 節 背景	10
第 1 項 肝細胞がん	10
第 2 項 HCC の原因	11
第 3 項 HCC の治療法	12
第 4 項 免疫療法	15
第 5 項 HCC に対するペプチドワクチン	19
第 2 節 目的	23
第 2 章 方法	
第 1 節 GPC3 由来ペプチドワクチン臨床試験と臨床研究倫理的配慮	24
第 2 節 GPC3 由来ペプチドワクチン臨床第 I 相試験	24
第 3 節 GPC3 ペプチドワクチンの免疫学的評価のための臨床試験	25
第 4 節 患者末梢血検体の採取	25
第 5 節 免疫学的モニタリング	25
第 6 節 がん細胞株	26
第 7 節 プラスミドベクターと遺伝子導入	26
第 8 節 GPC3 ₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL の誘導法	26
第 9 節 CD107a アッセイ	27

第 10 節	GPC3 ₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローン樹立法	27
第 11 節	細胞傷害性試験.....	28
第 12 節	IFN- γ ELISPOT アッセイ	28
第 13 節	CTL クローンの表現型解析.....	29
第 14 節	ペプチドタイトレーションアッセイ	29
第 15 節	RNA 干渉.....	29
第 16 節	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR).....	30
第 17 節	TCR- β 鎖の配列解析	31
第 18 節	統計解析.....	32

第 3 章 結果

第 1 節	GPC3 ペプチドワクチン投与により臨床効果が認められた症例と腫瘍組織の免疫組織化学染色	33
第 2 節	免疫モニタリングによる GPC3 ₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL 誘導の評価	33
第 3 節	GPC3 ₁₄₄₋₁₅₂ 特異的 CTL クローンの樹立	34
第 4 節	CTL クローンの表現型解析.....	34
第 5 節	TCR の親和性の評価.....	35
第 6 節	CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する認識能の評価	35
第 7 節	CTL クローン 24-4-2 の GPC3 特異性の確認.....	36
第 8 節	CTL クローンの TCR- β 鎖の遺伝子配列解析	37
第 9 節	CTL クローン 24-4-2 の HLA-A*02:07 拘束性の確認.....	37
第 10 節	著しい腫瘍の退縮が認められた他の患者 PBMC を用いた CTL クローンの樹立.....	38

第4章 考察	40
第5章 参考文献	45
第6章 図表	63
謝辞	77

要旨

[背景]

近年、外科手術、抗がん剤、放射線といった治療法に次ぐ“第4のがん治療法”として「免疫療法」に期待が集まっている。免疫療法には様々な方法が存在するが、そのうちの一つとして「ペプチドワクチン療法」がある。ペプチドワクチンは、数個のアミノ酸から成るがん抗原由来のペプチドをワクチンとする方法である。このため簡易かつ安全、さらに安価な治療法として特に注目され、世界で多くの研究が行われている。しかし、まだ標準治療としての確立には至っておらず、科学的根拠に基づいたがん治療法の開発が必要とされている。

Glypican-3 (GPC3) は肝細胞がん (HCC) に高発現が見られるタンパクであり、GPC3 陽性 HCC 患者では予後不良であることも知られている。一方で、GPC3 は胎盤と胎児期の肝臓を除く正常組織にはほとんど発現が見られないことから、GPC3 は HCC に対する免疫療法の良い標的になると考えられている。

当研究室では、GPC3 に由来する HLA-A*24:02 拘束性ペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) と HLA-A*02:01 拘束性ペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) を同定し、これらのペプチドを用いて進行 HCC 患者を対象としたペプチドワクチンの臨床第 I 相試験を行った。その結果、ペプチドワクチンの安全性とともに、ほぼすべての患者で、GPC3 由来ペプチドワクチン投与によって末梢血液中に GPC3 由来ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることが確認され、HLA-A*02:07 陽性の患者 1 例では 30%以上の腫瘍の退縮が認められた。さらに、第 I 相試験に次いで施行された GPC3 ペプチドワクチンの免疫学的評価のための臨床試験においても、HLA-A*02:07 陽性の患者 1 例で著明な腫瘍の壊死が認められた。

[目的]

GPC3 ペプチドワクチン投与によって誘導された CTL が抗腫瘍効果に関与した可能性を示すため、ペプチドワクチン投与後著明な臨床効果を示した 2 例の HLA-A*02:07 陽性患者 PBMC から GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、がん細胞傷害能を詳細に解析した。

[方法・結果]

まず免疫学的モニタリングにおいて、末梢血中に GPC3 特異的 CTL の増加が確認されたペプチドワクチン投与後の患者 PBMC を GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド・IL-2・IL-15 で 14 日間刺激培養し、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL を誘導した。誘導した CTL は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷した HLA-A02:07 陽性がん細胞株 1-87 と共培養し、その後 CD107a 陽性細胞をフローサイトメーターにてシングルセルソーティングすることにより CTL クローンを樹立した。

樹立した CTL クローンは、IFN- γ ELISPOT アッセイ、細胞傷害性試験を用いて GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異性を評価し、樹立した CTL クローンが GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異性を持つことを確認した。また、臨床第 I 相試験症例から樹立した CTL クローン 3 株に対しては、表現型解析、ペプチドタイトレーションアッセイ、T 細胞受容体 (TCR) - β 鎖遺伝子配列解析によって 3 株が異なる TCR- β 鎖を持ち、異なる親和性の TCR を有する CTL クローンであることを確認した。

樹立したすべての CTL クローンは GPC3 陽性がん細胞株に対する IFN- γ ELISPOT アッセイと細胞傷害性試験により、GPC3 陽性がん細胞株に対する反応性を評価し、樹立した CTL クローンのうち、最も高親和性 TCR を持つ CTL クローンにおいて、GPC3 陽性がん細胞に対する IFN- γ 産生能と細胞傷害活性が確認された。

[結語]

これらの結果から、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した 2 人の HLA-A*02:07 陽性患者は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチン投与により GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL が誘導され、特に臨床第 I 相試験の患者においては、ペプチドワクチンによって、高親和性 TCR をもち、GPC3 陽性がん細胞に対して細胞傷害活性を示す CTL が誘導されたことを証明した。

略語一覽

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-presenting cell
BMP	bone morphogenetic protein
CLL	chronic lymphocytic leukemia
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CR	complete response
CT	computed tomography
CTL	cytotoxic T lymphocyte
Da	dalton
DAA	Direct Acting Antivirals
DC	dendritic cell
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EBV	Epstein-Barr virus
ELISPOT assay	enzyme-linked immunospot assay
E/T	effector/target
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
GMP	good manufacturing practice
GPC3	glypican-3
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
Gy	gray
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2

HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HPV	Human papillomavirus
HS	heparan sulfate
IFA	incomplete Freund's adjuvant
IFN	interferon
IHC	immunohistochemistry
IL	interleukin
MAGE	Melanoma-associated antigen
mRNA	messenger ribo nucleic acid
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NK	Natural killer cell
NKT	Natural killer T cell
OS	overall survival
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PD	progressive disease
PE	Phytoerythrin
PFS	Progression-free survival
PHA	phytohemagglutinin-P
PR	partial response
RFA	radio frequency ablation
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RR	relative ratio
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SD	stable disease
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel syndrome
siRNA	small interfering ribo nucleic acid
TAA	tumor-associated antigen

TACE	transcatheter arterial chemoembolization
TAE	transcatheter arterial embolization
TAP	transporter associated with antigen processing
T _{CM}	central memory T cell
TCR	T cell receptor
T _{EM}	effector memory T cell
T _{EMRA}	CD45RA ⁺ effector memory T cell
TILs	tumor infiltrating lymphocytes
T _{naive}	naive T cell
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRBD gene	T cell receptor beta diversity gene
TRBJ gene	T cell receptor beta joining gene
TRBV gene	T cell receptor beta variable gene
TSA	tumor-specific antigen

第 1 章 序論

第 1 節 背景

第 1 項 肝細胞がん

肝臓がんは世界において 5 番目に患者数が多く、またがん死亡者数では 3 番目に位置する悪性腫瘍のひとつである [Schutte K et al., 2009; Ferlay J et al., 2010; Jemal A et al., 2011]。肝臓がんのうち、肝細胞がん (hepatocellular carcinoma: HCC) が 85-90% を占め、その他に胆管細胞がんや肝芽腫などがある [El-Serag HB et al, 2007]。

肝臓がんは北米・南米・欧州・オセアニアと比べ、東南アジアやアフリカでの発症率が高いことが知られているが [El-Serag HB et al, 2007]、先進欧米諸国においても発症率が増加していることが問題となっている。アジア・アフリカ地域においては肝炎ウイルスの感染率が高いことが主な原因とされている。また、人種や性別により HCC 発症率に差があることも報告されており [Parkin DM, 2010; Ryder RW et al., 1992; Chang MH et al., 2000]、男性は女性と比較して 2-4 倍程度発症率が高いとされている。その要因としては飲酒・喫煙などのリスク要素となる生活習慣や肝炎ウイルス感染者が男性に多いことなどが理由とされている [El-Serag HB et al, 2007]。また、動物実験においてオスのマウスがメスのマウスと比較して 3-5 倍 HCC 発症率が高いという結果から、男性ホルモンも HCC 発症に関与するという報告や、女性ホルモンが HCC を抑制に働くという報告もある [Ghebranious N et al., 1998; Maeda S et al., 2005; Bosch FX et al., 2004; Yang W et al., 2012]。

第2項 HCCの原因

HCC患者のうち8割以上は慢性肝疾患から肝硬変を経てHCCを発症するという経過をたどる。肝硬変の主な原因として肝炎ウイルスがあげられるが、一部に、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) などが原因とされるものも存在する[Schafer DF et al., 1999]。

1) 肝炎ウイルス

肝炎ウイルスにはA、B、C、D、E、Fなどの種類があるが、全HCC患者のうち75%はB型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV) またはC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV) によるものであり、わが国においては、約90%の患者でどちらかの持続感染を有している。これらのウイルスは長期間の感染とそれに伴う慢性炎症によって発がんを引き起こすことが知られている。

HBV保有者は全世界で3億人以上存在するとされており、HBVは世界的にみるとHCCの最大の原因とされている。全HBV保有者の10-20%に肝発がんが認められ、年間100万人以上の患者がHBV関連HCCで死亡している。わが国においてはHCC患者の約16%がHBV保有者である[Yoshizawa H, 2002]。HBVに対する最も有効な対策としてワクチン接種がある。世界の一部の国々ではHBVに対するワクチン接種が行われており、日本を始め先進国では新生児への接種が義務付けられている。これらの国ではHCC発症率が低下したという報告もある[Chang MH et. al., 1997]。

HCVは世界的にみるとHBVに次ぐ慢性肝疾患の原因である。HCV保有者は世界中に約2億人近く存在する。わが国のHCV保有者は約200万人以上と推定されており、HCC患者の約80%がHCV保有者である[Yoshizawa H, 2002]。HCV保有者の発がん率は海外の報告では年率1-4%とされているが、わが国で

は5-7%と高い[Freeman AJ et al., 2001]。HCV に対するワクチンはまだ開発されておらず、インターフェロン(interferon : IFN) 治療が一般的であるとされてきたが[Bruno S et al., 2001]、近年直接作用型抗ウイルス薬 (Direct Acting Antivirals: DAA) と呼ばれる薬剤が次々と開発されている[Au JS et al., 2013]。DAA は HCV の増殖に必須な NS3/4A、NS5A、NS5B といったタンパクを阻害することで、作用を発揮する。DAA の登場により HCV の治療成績が格段に上昇しているが、一方で耐性変異を引き起こすこともわかってきており[Xiao F et al., 2014]、併用療法による効果増強やさらなる新薬開発が期待されている。

2)その他の原因

わが国のHCCの9割近くがHBVかHCVの持続感染を背景にもっていたが、HCV 起因のHCCが減少傾向になり、過去10年間でHBV、HCV マーカー陰性のいわゆる非B非C型HCCが倍増し、HCC全体の10%を超すようになった。非B非C型肝炎の多くはアルコール起因であるとされているが、肥満、糖尿病、高血圧など生活習慣病に伴う肝障害からの発がんの増加が問題となっている。

肥満や糖尿病患者では、様々ながんの発生率が高いことが報告されており[Calle EE et al., 2003]、特にこのような患者では非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) やNASHを伴うことが多く、HCCの発がん率も高くなっている[Lai MS et al., 2006]。

NAFLDの10-20%がNASHであるとされ、米国ではHCCの13%がNASH起因であるとの報告がある[Bugianesi E, 2007]。

第3項 HCC の治療法

2013年度版肝臓診療ガイドラインの治療アルゴリズムでは、肝障害度、腫瘍数、腫瘍径の3因子によりHCCの治療法が設定されている。HCCに対する治

療法としては、肝切除、局所療法、化学療法などがある。

1) 肝切除

肝障害度が重篤でなく、腫瘍数が単発であれば、肝切除が推奨される。肝切除はもっとも根治性の高い治療法と考えられている。切除技術の向上や機械設備の進歩により治療成績も向上している。また、腹腔鏡手術により開腹なしに治療を行うこともできるようになり、侵襲性も低く抑えることができるようになった。

2) 局所療法

HCC 治療において最も多い治療法として挙げられるのが局所療法であり、ラジオ波焼灼療法 (radio frequency ablation: RFA) や肝動脈化学塞栓療法 (transcatheter arterial chemo-embolization: TACE) などがある[Imamura H et al, 2003]。

RFA は周波数 460-480kHz のラジオ波の通電加熱により組織凝固壊死を引き起こす治療法である。RFA 治療による 5 年生存率は切除可能症例で 68-86%、切除不能症例で 33-58%と報告されている[Lau WY et al., 2009]。また、RFA 治療部位の 11.8%は再発を起こし[Kim YS et al., 2013]、RFA 治療部位再発は生物学的悪性度が高いことが報告されている[Mima K et al., 2013]。

TACE は肝動脈を塞ぐことにより腫瘍を阻血壊死させる肝動脈塞栓療法 (transcatheter arterial embolization: TAE) と化学療法を組み合わせた治療法である。油性造影剤リピオドールと抗癌剤の混濁液を注入し、ゼラチン粒子で塞ぐのが最も一般的な方法である。TACE 治療による 5 年生存率は 26%であり、切除可能症例に限ると 52%と、肝切除と同等の結果が報告されている[Takayasu K

et al., 2006]。

3) 化学療法

近年、分子標的薬であるソラフェニブ (ネクサバル) が進行 HCC 患者の全生存期間 (overall survival: OS) を延長することが証明され、全身治療の第一選択薬として標準治療薬となっている[Llovet JM et al., 2008; Cheng AL et al., 2009; Kim HY et al., 2011]。ソラフェニブはマルチキナーゼ阻害剤であり、元々 B-Raf や C-Raf といったセリン・スレオニンキナーゼ活性を標的とすることで ERK 1/2 経路を阻害する薬剤として開発されたが、他の作用として、FLT-3, KIT, FGFR-1, RET などの腫瘍増殖に関与するチロシンキナーゼ受容体や VEGFR や PDGFR などの血管新生に関与するチロシンキナーゼ受容体を阻害する作用を持つ [Wilhelm SM et al., 2004; Adnane L et al., 2006; Keating GM et al., 2009]。また、ソラフェニブは抗アポトーシスタンパク質である MCL-1(myeloid cell leukemia-1) を下方調節することで MAPK 経路を阻害し、アポトーシスを誘導することも知られている[Rahmani M et al., 2005; Wilhelm S et al., 2006]。

しかし、固形がんの治療効果判定規準である RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) による評価では、ソラフェニブの奏効率は 5%以下と極めて低く [Morimoto M et al., 2011]、また、わが国の実地臨床の成績では、無増悪生存期間 (Progression-free survival: PFS) 中央値が 2.1 ヶ月と Llovet JM らによって報告された PFS 中央値 5.5 ヶ月を大きく下回ったことが報告されている [Kaneko S et al., 2012]。

ソラフェニブは分子標的薬であるため、理論上副作用はほとんどないとされていたが、実際には手足皮膚反応、皮疹、下痢、高血圧、間質性肺炎などの副作用が確認されている。副作用の発生率は高齢の患者において高く [Morimoto M et al., 2011]、日本人は海外と比較して副作用の頻度が高い傾向にある。さらに、

ソラフェニブ治療の無効患者に対してのセカンドラインになる治療法は確立されていないという問題もある。

1) - 3) に示した治療法を単独または併用し治療が行われているが、根治的な治療後も5年累積再発率が70%を超えており、予後が悪いことが報告されている[Yamamoto J et al., 2001; Imamura H et al, 2003; Tateishi R et al., 2006]。このことから、HCCに対する新たな治療法の開発が急務とされ様々な研究が進められており、そのうちの一つに免疫療法がある。

第4項 免疫療法

免疫療法は、長い間がんに対する魅力的なアプローチであると考えられてきた。免疫療法には様々な療法が存在し、interleukin (IL) -2 や IFN といったサイトカイン療法、リツキシマブ (抗 CD20 抗体) やトラスツズマブ (抗 human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) 抗体) といった抗体療法、さらにはがん抗原特異的免疫療法などがある。免疫療法は免疫の力を利用した治療法であり、がんに対する傷害活性を示す免疫細胞として、Natural killer (NK) 細胞、Natural killer T (NKT) 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などがあるが、その中の一つに細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) がある。

MHC 分子による抗原提示と CTL の抗原認識

体内のほとんどすべての細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 分子を細胞表面に発現している。MHC は特にヒトにおいてはヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) 分子とも呼ばれている。MHC 分子は主に抗原提示と呼ばれる働きをしている。抗原提示とは、抗原タンパクを分解し、その分解物の一部を細胞表面に提示する免疫機構であ

る。

細胞内に存在する抗原タンパクはユビキチン化を受けたのち、プロテアソームによってペプチド断片に分解される。断片化されたペプチドは、TAP (transporter associated with antigen processing) によって小胞体内に輸送され、MHC-class I 分子と結合する。ペプチドが結合したペプチド-MHC-class I 複合体は、ゴルジ体を通して細胞表面に提示される。

CTL は細胞表面に提示されたペプチド-MHC-class I 複合体を T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) によって認識し活性化する。活性化した CTL は細胞増殖、IFN- γ や tumor necrosis factor (TNF) - α などのサイトカイン産生、パーフォリンやグランザイム B などの細胞傷害顆粒の放出などを起こす。CTL はこの機構によって細菌やウイルスなどの感染病原体の排除などに重要な働きをしている。がん細胞ではがん抗原と呼ばれるがん特有のタンパクが産生されていることが知られており、CTL はがん抗原由来ペプチド-MHC-class I 複合体を認識することで、がん細胞の排除にも働く。

がん抗原

がん抗原は、1991 年に Boon T らによって Melanoma-associated antigen (MAGE) -1 が同定されて以来[van der Bruggen P et al., 1991]、現在 100 種類以上同定されている。がん抗原は、腫瘍特異的抗原 (tumor-specific antigen: TSA) と腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen: TAA) の 2 種類に大別される。TSA には①p53、K-ras、BCR-ABL といった、遺伝子変異に基づく「遺伝子変異由来抗原」、②エプスタイン・バール・ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) やヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus: HPV) といった「発がんウイルス由来抗原」が含まれ、TAA には③MAGE や NY-ESO-1 といったがんと精巣以外には発現しない「がん精巣抗原」、④Carcinoembryonic antigen (CEA) や α -fetoprotein (AFP) と

いった、がんと胎生期の組織以外には発現しない「がん胎児性抗原」、⑤ glycoprotein (gp) 100 や melanoma antigen recognized by T cells (MART) -1 といった、がんが発生してきた組織のみに発現する「分化抗原」、⑥HER-2 や WT-1 といった、正常組織に比べてがんで過剰に発現している「過剰発現抗原」、などが含まれる。これらの抗原のうち血液中で測定が可能なものは、腫瘍マーカーとして臨床検査で使用されている。これらのがん抗原を標的とした、がん抗原特異的免疫療法は効果的で副作用の少ないがん治療の新たなアプローチであると考えられている。

がん抗原特異的免疫療法

がん抗原特異的免疫療法には、免疫反応を担うリンパ球を体外で活性化して再び体内に戻す「受動免疫療法」と、免疫反応を起こす物質を接種することにより、体内に存在する免疫系を活性化する「能動的免疫療法」に大別され、代表的な治療法として、前者は「養子免疫療法」、後者には「がんワクチン」がある。がんワクチンはさらに腫瘍細胞ワクチン、樹状細胞 (dendritic cell: DC) ワクチン、タンパクワクチン、DNA ワクチン、組換えウイルスワクチン、ペプチドワクチンの6つに分類される[Dermine S et al., 2002]。

1) 養子免疫療法

養子免疫療法はがん患者に抗腫瘍活性を持つ CTL や腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte: TIL) を移入する治療法であり、高い効果が期待できる。また、他の抗腫瘍効果を持つ免疫細胞 (NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞) を用いた養子免疫療法も行われている[Cheng M et al., 2013; Fujii S et al., 2013; Latha TS e al., 2014]。

Rosenberg SA らは、転移性メラノーマ患者に TIL を移入することで、43 例中 5 例 (12%) が完全寛解 (Complete Response: CR)、43 例中 16 例 (37%) が部分寛解 (partial response: PR) となり、奏効率は 49%であることを報告した。さらに、この治療法にリンパ球除去を目的とした 12Gy の全身放射線照射と化学療法を組み合わせることで、25 例中 10 例 (40%) が CR、25 例中 8 例 (32%) が PR となり、奏効率は 72%まで上昇したことを報告した[Rosenberg SA et al., 2011]。

近年、腫瘍反応性 TCR やキメラ抗原受容体(Chimeric Antigen Receptor: CAR) を導入した改変末梢リンパ球を養子免疫する方法も試みられている。TCR 導入リンパ球移入療法では、転移性メラノーマや滑膜肉腫患者において、完全な腫瘍退縮が報告されており[Morgan RA et al., 2006; Johnson LA et al., 2009; Robbins PF et al., 2011]、抗 cluster of differentiation (CD)19 抗体の抗原結合領域と CD3 ζ 鎖とのキメラ遺伝子を導入した CAR-T 細胞移入療法では、化学療法抵抗性になった CD19 陽性の慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia: CLL) 患者 8 例のうち、2 例で CR、4 例で PR という結果が認められるなど[Kochenderfer JN et al., 2012]、劇的な臨床効果とともに、サイトカインストームなどの重篤な有害事象症例も報告されている[Kenderian SS et al., 2014]。

2) ペプチドワクチン

わが国のがん免疫療法はペプチドワクチン療法を中心に進められてきた。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。数個のアミノ酸で構成されるがん抗原由来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ている。養子免疫療法などと比べて、投与までの過程が煩雑でなく、外来治療において比較的簡易かつ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製造可能であることも利点の一つである。

ペプチドワクチンは、がん細胞の MHC-class I 分子に提示されるがん抗原由来ペプチドと同じものを人工的に合成し、体内に投与することで、がん細胞を傷害できる CTL を誘導する治療法である[Hailemichael Y et al., 2014]。投与されたペプチドは抗原提示細胞(Antigen-presenting cell: APC) の MHC-class I 分子上に結合する。APC はリンパ管を通過してリンパ節に移行し、リンパ節内で CTL を活性化する。活性化した CTL は血流などに乗ってがん細胞のもとへ移行し、がん細胞表面に提示されたがん抗原由来ペプチド-MHC-class I 分子複合体を認識し、細胞傷害を起こす。

現在までに多くのペプチドワクチンの臨床試験が行われており、期待されるほどの効果はほとんど見られていないものの、一部に効果が見られる症例の報告もあり、治療法の更なる改良とともに、効果の得られる患者を事前に検査できる方法の開発も今後の課題となっている。

最近では、数種類のペプチドを同時にワクチンするカクテルペプチドワクチンや、複数のペプチドをつなげたロングペプチドワクチンなども行われている[Yamada A et al.,2013; Ohtake J et al., 2014]。

第 5 項 HCC に対するペプチドワクチン

免疫療法は HCC の治療法としても期待されており、HCC に関連する多くの腫瘍抗原がペプチドワクチンへ応用できる候補となりうると考えられている [Greten TF et al., 2006; Mizukoshi E et al., 2011]。HCC で同定されているがん抗原としては、AFP、MAGE-A、NY-ESO-1、SSX2、telomerase reverse transcriptase (TERT) などが挙げられる [Breous E et al., 2011]。AFP や TERT を標的としたペプチドワクチンは既に報告があるものの、満足いく結果は出ていない [Butterfield LH, 2007; Greten TF et al., 2010]。

Glypican-3 (GPC3)

complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) マイクロアレイを用いた HCC 患者のがん部と非がん部における遺伝子発現量の網羅的解析により、HCC に高発現する遺伝子として Glypican-3 (GPC3) が見出された[Nakatsura T et al., 2003]。その後 HCC 組織における免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry: IHC) や HCC 患者血清中の GPC3 定量が行われ、タンパクレベルでの発現や血中に分泌されることも確認された[Nakatsura et al., 2003; Capurro et al., 2003; De Cat B et al., 2003]。また、その他のがん種においても発現が見られ、メラノーマ、ウィルムス腫瘍、肝芽腫、卵巣明細胞癌、卵黄嚢腫瘍、胚芽腫、神経芽細胞腫、肺扁平上皮がんなどで報告されている[Nakatsura T et al., 2004; Toretsky JA et al., 2001; Stadlmann S et al., 2007; Maeda D et al., 2009; Baumhoer D et al., 2008; Saikali Z et al., 2000; Boily G et al., 2007; Aviel-Ronen S et al., 2008]。

GPC3 は 580 アミノ酸からなる 65-kDa のタンパク質である。ヘパラン硫酸 (heparan sulfate: HS) 鎖を持つプロテオグリカンファミリーの一つであり、C 末端側の 560 番目のセリンを介してグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosyl-phosphatidylinositol: GPI) アンカーにより細胞膜の外側に結合している[Filmus J et al., 1995; Filmus J et al., 2001]。一般的に GPI アンカー結合タンパク質は脂質ラフトに結合していることから細胞膜の頂端部に局在するとされているが[Mayor S et al., 2004]、GPC3 においては脂質ラフトの外側、側底膜に局在している[Mertens G et al., 1996]。

GPC3 はシンプソン-ゴラビ-ベーメル症候群 (Simpson-Golabi-Behmel syndrome: SGBS) という遺伝性先天性疾患の原因遺伝子の一つとして同定された [Pilia G et al., 1996; Pellegrini M et al., 1998]。GPC3 は、Wnt、Hedgehog、骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP)、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast

growth factor: FGF) などのシグナル伝達分子に HS 鎖の結合を介して刺激と阻害の両方のシグナル調節をしていると考えられているが[Capurro M et al., 2014; Capurro MI et al., 2012; Filmus J et al., 2014; Midorikawa Y et al., 2003; Grisar S et al., 2001; Paine-Saunders S et al., 2000]、GPC3 の機能についてはまだ不明な点が多い。

GPC3 は前述の通り HCC に高発現することが確認されている一方、胚発生時に組織特異的に一定期間のみしか発現せず、胎盤と胎児期の肝臓を除く正常組織にはほとんど発現が見られない[Nakatsura et. al., 2003; Pellegrini M et al., 1998; Iglesias BV et al., 2008]。さらに、GPC3 は Wnt や Hedgehog と結合することで、HCC の細胞増殖を促すことや[Capurro MI et al., 2005; Capurro MI et al., 2008]、GPC3 陽性の HCC 患者は予後不良であることが報告されている[Nakatsura T et al., 2003; Capurro M et al., 2003; Nakatsura T et al., 2005; Shirakawa H et al., 2009; Shirakawa H et al., 2009]。このことから、GPC3 は前述のがん胎児性抗原に分類され、HCC に対する免疫療法の良い標的になると考えられる。

GPC3 由来ペプチドワクチン

当研究室ではこれまでに、GPC3 の抗原性や同定した HLA-A*24:02 拘束性ペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆(EYILSLEEL)と HLA-A*02:01 拘束性ペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂(FVGEFFTDV)が自己免疫反応を引き起こす事なく GPC3 由来ペプチドに反応する CTL を誘導できることを証明してきた。[Motomura Y et al., 2006; Nakatsura T Motomura Y et al., 2008; Iwama T et al., 2013; Komori H et al., 2006; Nakatsura T et al., 2004].

HLA-A2 は全世界で最も頻度の高い HLA 型であり[Imanish T et al., 1992]、白人の約 50%[Ellis JM et al., 2000]、日本人の約 40%の人々が保有しているとされている[Sidney J et al., 1996; Yasuda N et al., 1976]。HLA-A2 を保有する白人のうち

90%以上の人々は HLA-A*02:01 を保有しているが[Ellis JM et al., 2000]、一方日本人においては、HLA-A*02:01、HLA-A*02:06、HLA-A*02:07 といった複数の HLA 型が存在しており、それぞれ 19%、14%、7%の割合になっている[Mehra NK et al., 2001]。そのため、ペプチド結合アッセイを行い HLA-A*02:01 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドが HLA-A*02:06 や HLA-A*02:07 にも結合することを確認した(data not shown)。

これらの結果を基にして、当研究室では進行 HCC 患者 33 例に対して GPC3 由来ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を実施した。HLA-A*24:02 陽性の患者には HLA-A*24:02 拘束性 GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチド、HLA-A*02:01 陽性の患者、HLA-A*02:06 陽性の患者、HLA-A*02:07 陽性の患者には HLA-A*02:01 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを投与した。この結果、GPC3 由来ペプチドワクチンの安全性とともに、ほぼすべての患者で、GPC3 由来ペプチドワクチン投与によって末梢血液中に GPC3 由来ペプチド特異的 CTL が誘導されることを確認した [Sawada Y et al., 2012; Yoshikawa T et al., 2011; Nobuoka D et al., 2013; Sawada Y et al., 2012]。さらに、ペプチドワクチンにより誘導された GPC3 由来ペプチド特異的 CTL の割合は OS と関連し、GPC3 由来ペプチド特異的 CTL が良く誘導された患者はあまり誘導されなかった患者と比較して OS の有意な延長がみられた [Sawada Y et al., 2012]。治療開始 2 ヶ月後の RECIST を用いた評価臨床効果判定では、33 例中 1 例で PR、19 例で無増悪 (stable disease: SD) と判定された。

臨床第 I 相試験の結果を受けて、さらなる研究を行うために新たな臨床試験である「GPC3 由来ペプチドワクチンの免疫学的有効性評価のための臨床試験」を実施した。この試験では、TIL を解析するためにペプチドワクチン投与の前後に肝生検を行った。この試験では、ペプチドワクチン投与後に著しい腫瘍の壊死が確認された症例が 1 例みられた [Sawada Y et al., 2013]。この患者は臨床第 I 相試験の PR 症例の患者と同じ HLA-A*02:07 を保有していた。

第2節 目的

本研究は、GPC3 ペプチドワクチン投与によって誘導された CTL が抗腫瘍効果に関与した可能性を示すため、ペプチドワクチン投与後著明な臨床効果を示した HLA-A*02:07 陽性の2例の患者末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell: PBMC) から GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、がん細胞傷害能を詳細に解析した。

第2章 方法

第1節 GPC3 由来ペプチドワクチン臨床試験と臨床研究倫理的配慮

進行肝 HCC 患者を対象とした GPC3 由来ペプチドワクチン臨床第 I 相試験 (2007 年–2009 年) と GPC3 由来ペプチドワクチンの免疫学的有効性評価のための臨床試験 (2011 年–2013 年) は国立がん研究センターにおいて実施された。これらの試験は国立がん研究センターの倫理委員会に承認を受け、実施に際しては、ヘルシンキ宣言の倫理内原則を遵守して、被験者の人権、福祉、および安全が最大限に確保されている。すべての患者は国立がん研究センター東病院において試験登録前にインフォームドコンセントを実施して、文章による同意を得た。これらの試験は UMIN 臨床試験登録システムに登録され実施された (UMIN-CTR number, 000001395, UMIN000005093)。

第2節 GPC3 由来ペプチドワクチン臨床第 I 相試験

臨床試験に登録された患者に対して、GMP グレードの HLA-A*24:02 拘束性ペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ (EYILSLEEL) または HLA-A*02:01 拘束性ペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ (FVGEFFTDV) (American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA) の溶液と不完全フロイントアジュバント (Incomplete Freund's adjuvant: IFA; Montanide ISA-51 VG; SEPPIC, Paris, France) をよく混合し、乳剤化したものを 0.3、1、3、10、30 mg/body のいずれかの量を 2 週間おきに 3 回皮内投与した [Sawada Y et al., 2012; Yoshikawa T et al., 2011]。

本研究では、HLA-A2 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチン 30mg/body を 2 週間おきに 3 回皮内投与した患者から得た PBMC を使用した。

第 3 節 GPC3 ペプチドワクチンの免疫学的評価のための臨床試験

臨床試験に登録された患者に対して、GMP グレードの GPC3 由来ペプチド (American Peptide Co) の溶液と IFA (SEPPIC) をよく混合し、乳剤化したものを 3 mg/body ずつ 2 週間おきに皮内投与し、可能な限りペプチドワクチン投与前と投与後にそれぞれ肝生検を行う試験として実施した。

本研究では、3mg/body の HLA-A2 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチン投与によりを 1 回投与した後、免疫反応と肝機能障害がおこり、回復した 4 週間後に 2 回目のペプチドワクチン投与をした結果、さらに強い免疫反応と肝機能障害が起こったため緊急入院となり、結果的に 2 回のみの投与となった患者から得た PBMC を使用した。

第 4 節 患者末梢血検体の採取

末梢血検体はワクチン投与前と投与後に採取し、投与後のサンプルは 2 週間おきに採取した。採取した末梢血は Ficoll-Hypaque を用いた密度勾配遠心法により PBMC を分離し、使用時まで液体窒素内にて凍結保存した。

第 5 節 免疫学的モニタリング

患者から採取した末梢血検体の免疫学的モニタリングは *ex vivo* IFN- γ ELISPOT アッセイを用いて行った。患者 PBMC500,000 個を IFN- γ ELISPOT アッセイ用プレートに入れ、10 μ g/mL の GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドまたは HIV₁₉₋₂₇ (TLNAWVKVV) ペプチドを添加して 20 時間刺激培養した。HIV₁₉₋₂₇ ペプチドで刺激培養した PBMC はネガティブコントロールとして使用し、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド刺激による IFN- γ スポット数から HIV₁₉₋₂₇ ペプチド刺激による IFN- γ ス

ポット数を差し引いたものを GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL 数として解析した。IFN- γ ELISPOT アッセイの方法については第 12 節で詳しく述べる。

第 6 節 がん細胞株

ヒト肺がん細胞株 1-87 (GPC3⁻, HLA-A*02:07⁺) と、ヒト肝細胞がん細胞株 JHH-7 (GPC3⁺, HLA-A*02:07) は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA) に非働化したウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA) を 10%、penicillin streptomycin L-glutamine (Gibco) を 1% 添加した培地を用い、5% CO₂、37°C の条件下にて培養した。

第 7 節 プラスミドベクターと遺伝子導入

発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と HLA-A*02:07 complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を含む pcDNA3.1 を用いて遺伝子導入を行った。HLA-A*02:07 cDNA を含む pcDNA3.1 (pcDNA3.1/HLA-A*02:07) は東京理科大学大学院生命科学研究科 安部良先生、鈴木利宙先生から譲渡して頂いた。ヒト肝細胞がん細胞株 JHH-7 に対して、FuGENE® HD (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いて遺伝子導入を行い、JHH-7/mock と JHH-7/HLA-A*02:07 を樹立した。樹立した細胞株は DMEM (Sigma) に非働化した FBS (Gibco) を 10%、penicillin streptomycin L-glutamine (Gibco) を 1%、さらに Geneticin (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) を 1 mg/mL 添加した培地を用い、5% CO₂、37°C の条件下にて培養した。

第 8 節 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL の誘導法

ex vivo IFN- γ ELISPOT アッセイによる免疫学的モニタリングにおいて、末梢血中に GPC3 特異的 CTL の増加が確認されたペプチドワクチン投与後の PBMC

2×10^6 個を 24well プレートに入れ、 $10 \mu\text{g/mL}$ の GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを添加し刺激培養した。培地は RPMI 1640 (Sigma) に熱失活させた FBS を 10%、penicillin streptomycin L-glutamine (Gibco) を 1% 添加した培地を用い、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドで刺激を加えた 2 日後にヒトインターロイキン (IL) -2 (NIPRO, Osaka, Japan) を 100 IU/mL 、ヒト IL-15 (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) を 10 ng/mL 添加し、14 日間培養した。

第 9 節 CD107a アッセイ

GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドで 14 日間刺激培養した PBMC からヒト CD8 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD8 陽性細胞を単離した。1-87 細胞は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド、またはヒト免疫不全ウイルス (HIV) 19-27 ペプチド $10 \mu\text{g/mL}$ とともに、室温で 2 時間静置し、細胞の HLA 分子上にそれぞれのペプチドを強制的に結合させた (ペプチド負荷した)。単離した CD8 陽性細胞はペプチド負荷した 1-87 細胞と 2:1 の割合で混合し、Allophycocyanin (APC) 標識された抗 CD107a 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) の存在下で 37°C にて 3.5 時間共培養した。3.5 時間後、細胞を PBS で洗浄し、Phycoerythrin (PE) 標識された抗 CD8 抗体 (Biolegend) と 4°C にて 20 分反応させた。反応後、細胞を PBS で 2 回洗浄したのち、フローサイトメトリー FACS Canto II (BD Biosciences) または FACS Aria (BD Biosciences) を用いて解析した。

第 10 節 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローン樹立法

FACS Aria cell sorter (BD Biosciences) を用いて、CD8 陽性 CD107a 陽性細胞を 1 細胞ずつソーティングした。ソーティングにより得られた細胞は、AIM-V (Gibco) に非働化ヒト血清 (Human AB Serum) を 10%、ヒト IL-2 (200 IU/mL)、ヒト IL-15 (10 ng/mL)、そして phytohemagglutinin-P (PHA) ($5 \mu\text{g/mL}$) (Wako Pure

Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を添加した培地で、フィーダー細胞と共に 14~21 日間培養した。フィーダー細胞には、100Gy の放射線照射を施した非自己(allogeneic: allo) PBMCs を用いた。

第 11 節 細胞傷害性試験

標的細胞をカルセイン-AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) 溶液を用いて 37 °C で 30 分間処理することにより蛍光標識し、標識した細胞を CTL クローンと 4-6 時間共培養した。この際、CTL クローンにより傷害された標的細胞は蛍光が消失するため、共培養前後の蛍光値をテラスキャン VPC システム (Minerva Tech, Tokyo, Japan) を用いて測定し、蛍光値の減少率を基に細胞傷害活性を下記に示す式を用いて算出した。

細胞傷害率 (%) = $\{1 - [(\text{サンプルの平均蛍光値} - \text{最大遊離コントロールの平均蛍光値}) / (\text{自然遊離コントロールの平均蛍光値} - \text{最大遊離コントロールの平均蛍光値})]\} \times 100\%$

第 12 節 IFN- γ ELISPOT アッセイ

IFN- γ ELISPOT キット (BD Biosciences) を用いて CTL の特異的 IFN- γ 産生を確認した。ELISPOT プレーットのウェルに PBS にて 200 倍希釈した抗 IFN- γ 抗体液を入れ、一晩 4 °C にて静置し、プレートを抗体でコーティングした。静置後、抗体液を除去し、RPMI に 10% の熱失活 FBS を添加した培地を添加し、室温で 2 時間静置することでブロッキングを行った。ブロッキング後、標的細胞と CTL クローンを入れ、37 °C で 20 時間共培養を行った。20 時間後、細胞液を除去し、PBS-T で 3 回洗浄したウェルに、PBS に 10% 熱失活 FBS を加えた溶液にて 250 倍希釈したビオチン化抗 IFN- γ 抗体液を添加し、室温で 2 時間反応させた。2 時間後、抗体液を除去し、PBS-T で 3 回洗浄したウェルに、PBS に 10% 熱失活

FBS を加えた溶液にて 100 倍希釈したストレプトアビジン-HRP 液を添加し、室温で 1 時間反応させた。1 時間後、ウェルを PBS-T で 4 回、PBS で 2 回洗浄し、AEC substrate kit (BD biosciences) を用いて発色させ、スポットを検出した。スポット数やスポットの面積は ELIPHOTO カウンター (Minerva Tech) を用いて計測した。

第 13 節 CTL クローンの表現型解析

CTL クローンは、PE 標識された抗 C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) と fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識された抗 CD45RA 抗体 (BD Biosciences) に 4°C にて 20 分反応させた。反応後、細胞を PBS で 2 回洗浄したのち、フローサイトメトリー FACS Canto II (BD Biosciences) を用いて解析した。

第 14 節 ペプチドタイトレーションアッセイ

10^{-5} M から 10^{-13} M まで段階的に希釈した濃度のペプチドをカルセイン-AM で蛍光標識した標的細胞に負荷させた。この標的細胞と CTL クローンを 1:10 (effector/target (E/T) = 10) になるように混合し、37°C にて 4 時間共培養した。それぞれのペプチド濃度における CTL クローンの細胞傷害活性を算出し、50% 細胞傷害活性を示すペプチド濃度をその CTL クローンの認識効率とした。

第 15 節 RNA 干渉

ヒト GPC3 特異的 small interfering ribo nucleic acid (siRNA) は二本鎖 RNA 化学合成サービス (Invitrogen) により得た。コントロール siRNA として Qiagen (Valencia, CA, USA) から購入した AllStras Neg. Control siRNA を使用した。3 種

類の GPC3 特異的 siRNA (下記) を用い、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて JHH-7/HLA-A*02:07 細胞へ導入した。

GPC3-specific siRNA No. 4149	5'-UUAUCAUCCAUCACCAGAGCCUCC-3'
GPC3-specific siRNA No. 4150	5'-GGAGGCUCUGGUGAUGGAAUGAUAA-3'
GPC3-specific siRNA No. 4151	5'-UAUAGAUGACUGGAAACAGGCUGUC-3'

GPC3 特異的 siRNA 配列

第 16 節 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

TRIzol® reagent (Invitrogen) を用い、GPC3 特異的 siRNA 処理、コントロール RNA 処理、または siRNA 未処理の JHH-7/HLA-A*02:07 から total RNA を抽出した。それぞれの Total RNA から PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を使用し、Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を合成した。cDNA に 10 × Ex Taq® Buffer (TaKaRa)、2.5 mM dNTP mixture (TaKaRa)、5 U Ex Taq® (TaKaRa)、さら GPC3 または β アクチン遺伝子特異的 PCR プライマー (次頁) を 10 μM 添加した。PCR は 96-well Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を使用し、72 °C 10 秒の後、98 °C 10 秒、64 °C 30 秒、72 °C 30 秒を 20 サイクル行った。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動した。

GPC3 specific forward primer	5'-AGCCAAAAGGCAGCAAGGAA-3'
GPC3 specific reverse primer	5'-AAGAAGAAGCACACCACCGA-3'
β-actin specific forward primer	5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
β-actin specific reverse primer	5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'

RT-PCR に使用したプライマー配列

第 17 節 TCR-β 鎖の配列解析

TRIzol® reagent (Invitrogen) を用い、CTL クローンから total RNA を抽出した。Total RNA から PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を使用し、TCR-β 鎖遺伝子の cDNA を合成した。この際、プライマーはオリゴ dT プライマーではなく、TCR-β 鎖定常領域 (BC) 特異的プライマー (5'-CACCAGTGTGGCCTTTTG-3') を使用した。

合成した cDNA を用いて PCR 法により T cell receptor beta variable (TRBV) 遺伝子ファミリーのスクリーニングを行った。cDNA 産物に 10 × pyrobest® Buffer II (TaKaRa)、2.5 mM dNTP mixture (TaKaRa)、5 U pyrobest® DNA polymerase (TaKaRa)、さらに 8 種類の TRBV 遺伝子ファミリー特異的センスプライマーセット(次頁, S1-S8)と 5'BC アンチセンスプライマーを 150 nM ずつ添加し、PCR を行った。PCR は 96-well Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用し、94 °C 2 分の後、94 °C 10 秒、57 °C 40 秒、72 °C 40 秒を 35 サイクル行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、8 種類のスクリーニングセットのうち陽性反応を示すプライマーセットを同定した。

次に、TRBV 遺伝子ファミリーを同定するため、陽性反応を示したプライマーセットに含まれる TRBV 遺伝子ファミリー特異的センスプライマーを個別に使用し、PCR を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、約 300-350bp 付近に確認されるバンドの有無から TRBV 遺伝子ファミリーを同定した。

最後に、TRBV 遺伝子の配列を確認するため、PCR 産物を精製し、Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて遺伝子配列解析を行った。得られた遺伝子配列から TRBV、T cell receptor beta joining (TRBJ)、さらに T cell receptor beta diversity gene (TRBD) アレルを IMGT databases (<http://www.imgt.org/>) を用いて同定した。

Sequences of primers for PCR amplification			
	2nd Mix	TRBV gene names※	Forward primer sequence (5'-3')
PCR forward primers (TCR-BV gene family -specific primers)	S1	TRBV9	ACAGCAAGTGACTCTGAGATGCTC
		TRBV5	ACAGCAAGTGACTCTGAGATGCTC
		TRBV25	GATCACTCTGGAATGTTCTCAAACC
	S2	TRBV10	CCAAGACACAAGGTCACAGAGACA
		TRBV20	GAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAG
		TRBV28	GTAACCCAGAGCTCGAGATATCTA
	S3	TRBV2	GGTCACACAGATGGGACAGGAAGT
		TRBV29	TCCAGTGTCAAGTCGATAGCCAAGTC
		TRBV7-3	ATGTAACCTCTCAGGTGTGATCCAA
	S4	TRBV27	GTGACCCAGAACCCAAGATACCTC
		TRBV7-1	GTGTGATCCAATTTTCAGGTCATAC
		TRBV12	GGTGACAGAGATGGGACAAGAAGT
	S5	TRBV11	CAGTCTCCCAGATATAGATTATAGAG
		TRBV19	CACTCAGTCCCCAAAGTACCTGTT
		TRBV30	GTCAGATCTCAGACTATTCATCAATGG
TRBV4		TACGCAGACACCAAGACACCTGGTCA	
S6	TRBV3	CCCAGACTCCAAAATACCTGGTCA	
	TRBV18	TGCAGAACCCAAGACACCTGGTCA	
	TRBV21	AAGGTCACCCAGAGACCTAGACTT	
	TRBV14	ATAGAAGCTGGAGTTACTCAGTTC	
S7	TRBV23	ACAAAGATGGATTGTACCCCGAA	
	TRBV6	GTGTCACTCAGACCCCAAATTC	
S8	TRBV24	GTTACCCAGACCCCAAGGAATAGG	
	TRBV13	CTGATCAAAGAAAAGGGAAACAGCC	
	TRBV15	CAAGATACCAGGTTACCCAGTTTG	
Reverse primer sequence (5'-3')	Screening and specifying-PCR (5'BC)		GGAACACGTTTTTCAGGTCCT

※TCR-BV gene names are in accordance with IMGT unique gene nomenclatures.

TRBV 遺伝子増幅のための PCR プライマー配列

[Harada Y et al., 2007; Tanaka-Harada Y et al., 2010]

第 18 節 統計解析

統計解析は Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。

第3章 結果

第1節 GPC3 ペプチドワクチン投与により臨床効果が認められた症例と腫瘍組織の免疫組織化学染色

GPC3 ペプチドワクチン臨床第 I 相試験において、HLA-A2 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを投与した HLA-A*02:07 陽性の患者 1 例で著明な臨床効果が認められた。

この患者では、ワクチン投与前の CT による画像診断において、鎖骨上リンパ節転移、骨転移、さらに 3 つの肝腫瘍が認められていたが(図 1A)、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンを 3 回投与後の画像診断では、鎖骨上リンパ節転移の著しい退縮、骨転移の壊死、3 つある肝腫瘍のうち 2 つの腫瘍の消失が認められた(図 1B)。

さらに残存する腫瘍の生検を行い、免疫染色したところ、この腫瘍は HLA-class I 陽性かつ GPC3 陽性の腫瘍であり、腫瘍内に多数の CD8 が浸潤していることが確認された(図 1C)。

第2節 免疫モニタリングによる GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL 誘導の評価

ワクチン投与前とワクチン投与後の患者 PBMC における GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドに対する免疫応答は、*ex vivo* IFN- γ ELISPOT アッセイにより解析した。

ワクチン投与前 (スポット数 11、スポット面積 0.07 mm²) と比較して、ワクチン 2 回投与後から IFN- γ スポットの数と面積が増加し、投与開始 10 週後に最大値 (スポット数 196、スポット面積 1.86 mm²) を示した(図 2)。

第3節 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ 特異的 CTL クローンの樹立

GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンによって誘導された GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL の能力について詳細な解析を行うため、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンを樹立した。CTL クローンの樹立には、*ex vivo* IFN- γ ELISPOT アッセイにおいて最大値を示したワクチン投与開始 10 週後の検体を使用した。

in vitro において GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドで 14 日間刺激培養した PBMC から、CD8 陽性細胞を単離した。単離した CD8 陽性細胞は、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷した HLA-A*02:07 陽性 1-87 細胞株と共培養し、CD107a 陽性となった CD8 細胞、すなわち GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドと HLA-A*02:07 複合体を認識して脱顆粒を起こした細胞を一細胞ずつソートし、培養して 1 細胞から増殖させることで CTL クローンを樹立した。

樹立した 3 つの CTL クローン 24-4-2、24-4-7、24-2-10 に対して IFN- γ ELISPOT アッセイと細胞傷害性試験を行い、機能を解析した。

樹立した CTL クローンはすべて、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド負荷 1-87 細胞株に対して IFN- γ 産生を認めたが、ペプチド負荷していない 1-87 細胞株に対しては IFN- γ 産生を認めなかった(図 3A)。さらに、これらの CTL クローンは GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド負荷 1-87 細胞株に対して細胞傷害活性を認めたが、ペプチド負荷していない 1-87 細胞株に対しては細胞傷害活性を認めなかった(図 3B)。これらの結果から、樹立した 3 つの CTL クローン 24-4-2、24-4-7、24-2-10 は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異性を持つことが示された。

第4節 CTL クローンの表現型解析

樹立した CTL クローンの表現型を解析するために、抗 CCR7 抗体と抗 CD45RA 抗体を用い、FACS にて解析した(図 4A)。3 つの CTL クローンのうち、24-4-2 と 24-4-7 はエフェクターメモリー T 細胞 (T_{EM}, CCR7⁻ CD45RA⁺)の表

現型を示したが、24-2-10は最終分化型エフェクターメモリー T 細胞 (T_{EMRA} , $CCR7^- CD45RA^+$)の表現型を示した(図 4B)。

第 5 節 TCR の親和性の評価

1-87 細胞株に段階的に希釈 (10^{-5} M から 10^{-13} M) した GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷し、各濃度のペプチド負荷細胞に対する CTL クローンの細胞傷害活性を解析することで、CTL クローンの持つ TCR の GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:07 複合体に対する親和性を評価した。50%細胞傷害活性を示すペプチド負荷濃度をその CTL クローンの認識効率と定義した。3つの CTL クローンの認識効率はそれぞれ、24-4-2 が 10^{-11} M、24-4-7 が 10^{-9} M、24-2-10 が 10^{-8} M であった(図 5)。この結果から、CTL クローン 24-4-2 は他のふたつの CTL クローンより高い親和性の TCR を持つことが示された。

第 6 節 CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する認識能の評価

HLA-A*02:07 陽性かつ GPC3 陽性のがん細胞株に対する CTL クローンの認識能を評価するため、GPC3 陽性肝細胞がん細胞株である JHH-7 に pcDNA3.1/HLA-A*02:07 または pcDNA3.1 を遺伝子導入し、HLA-A*02:07 強制発現がん細胞株 JHH-7/HLA-A*02:07 とコントロールがん細胞株 JHH-7/mock を作製した。作製したがん細胞の細胞表面上での GPC3 と導入した HLA-A*02:07 の発現をフローサイトメトリーにて確認した(図 6A, B)。

作製したがん細胞株に対する CTL クローンの認識能は IFN- γ ELISPOT アッセイと細胞傷害性試験により解析した。高親和性 TCR を持つ CTL クローン 24-4-2 は JHH-7/HLA-A*02:07 に対しては IFN- γ 産生を認めたが、JHH-7/mock に

対しては IFN- γ 産生を認めなかった(図 6C, D)。一方、CTL クローン 24-4-2 よりも TCR の親和性が劣る CTL クローン 24-4-7 と 24-2-10 では、JHH-7/HLA-A*02:07 に対する IFN- γ 産生は認められなかった(図 6C, D)。

細胞傷害活性も同様に、CTL クローン 24-4-2 では JHH-7/HLA-A*02:07 に対して細胞傷害活性を認めたのに対し、CTL クローン 24-4-7 と 24-2-10 では、細胞傷害活性は認められなかった(図 6D)。

この結果から、高親和性 TCR を持つ CTL クローンのみが内因性に GPC3 由来ペプチドを提示するがん細胞を認識できることが示唆された。

第 7 節 CTL クローン 24-4-2 の GPC3 特異性の確認

JHH7/HLA-A*02:07 に対する反応性が、HLA-A*02:07 を強制発現させたことによる非特異的反応ではないことを確認するため、siRNA を用いて JHH-7/HLA-A*02:07 の GPC3 ノックダウンを行った。ノックダウンの評価は RT-PCR によって行い、JHH-7/HLA-A*02:07 における GPC3mRNA の発現は 3 種類の GPC3-siRNA 処理全てにおいて明らかに減少していることを確認した(図 7A)。

GPC3-siRNA 処理またはコントロール siRNA 処理した JHH-7/HLA-A*02:07 に対する CTL クローン 24-4-2 の認識能を IFN- γ ELISPOT アッセイにて確認したところ、3 種類の GPC3-siRNA 処理全てにおいて IFN- γ 産生の有意な減少が確認された(図 7B, C)。

この結果から、CTL クローン 24-4-2 は GPC3 特異的に JHH-7/HLA-A*02:07 を認識していることが示された。また同時に、HLA-A2 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドはがん細胞内で GPC3 タンパクがプロテアソームにて分解される際に自然に産生され、HLA-A*02:01 だけでなく HLA-A*02:07 にも結合することで内因性に細胞表面に提示されるペプチドであることが示唆された。

第 8 節 CTL クローンの TCR-β 鎖の遺伝子配列解析

樹立した CTL クローンの TCR-β 鎖遺伝子の配列解析を行った。25 種類の TRBV 特異的センスプライマーを用いた PCR によって増幅し、増幅した PCR 産物を用いて遺伝子配列解析を行った。得られた遺伝子配列から IMGT データベースを用いて TRBV、TRBJ、TRBD 遺伝子を同定した(表 1)。この結果から、樹立した 3 つの CTL クローンは異なる TCR を持つことが確認された。

第 9 節 CTL クローン 24-4-2 の HLA-A*02:07 拘束性の確認

今回樹立した CTL クローン 24-4-2 が GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:07 複合体と同様に、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:01 複合体や GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:06 複合体に対しても認識能を示すかを確認するため、HLA-A*02:01、HLA-A*02:06、HLA-A*02:07、HLA-A*24:02 のそれぞれが陽性である健常人 PBMC に GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷し IFN-γ ELISPOT アッセイにて解析した。以前当研究室において樹立した HLA-A*02:01 拘束性 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローン[Yoshikawa T et al., 2011]をコントロールとして用いた。

この結果、HLA-A*02:01 拘束性 CTL クローンは GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:01 複合体のみを、樹立した CTL クローン 24-4-2 は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A*02:07 複合体のみを認識し、他の GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド-HLA-A2 複合体への交差性は示さなかった(図 8)。このことから、CTL クローン 24-4-2 は HLA-A*02:07 拘束性であることが示された。

第 10 節 著しい腫瘍の退縮が認められた他の患者 PBMC を用いた CTL クローンの樹立

GPC3 由来ペプチドワクチンの免疫学的有効性評価のための臨床試験において、ペプチドワクチン 2 回投与後に著しい腫瘍の壊死が認められた HLA-A*02:07 陽性患者 PBMC を用いて、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンの樹立を試みた。この患者は、ペプチドワクチン投与前の CT 画像診断において、肝内多発病変が認められた(図 9A)。この臨床試験では 2 週間間隔でペプチドワクチンを投与する予定としていたが、この患者は 1 回目の投与後に免疫反応と肝機能障害がみられ、ペプチドワクチンの投与を 1 回スキップしているため、1 回目投与と 2 回目投与の間に 4 週間の間隔があった。その後状態が回復したため 2 回目の投与を行ったが、さらに強い免疫反応と肝機能障害が起り、緊急入院となった。その際の CT 画像診断では、肝内多発病変の多くが壊死している一方で、右心房内の腫瘍栓が増大していることが確認された(図 9B)。入院後、免疫反応と肝機能障害は軽快したが、腫瘍栓の増大による循環不全が原因となり、ペプチドワクチン 2 回目投与から 30 日後に死亡した。死後病理解剖を行った結果、ほとんどの肝腫瘍は壊死していた一方で、正常肝組織の壊死は認められなかった。また、右心房は腫瘍栓で詰まっていた。免疫染色にて確認したところ、壊死した腫瘍のまわりに一部残存していた腫瘍細胞には GPC3 の発現が認められ、その辺縁にのみ大量の CD8 陽性細胞の浸潤が確認された(図 9C)。

この患者は、免疫学的モニタリングによって、ペプチドワクチン投与による末梢血中の GPC3 特異的 CTL の頻度の上昇が確認されたため(図 10A)、ペプチドワクチン 1 回目投与から 3 週間後の PBMC を用いて 2 つの GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンを樹立した (図 10B)。しかし、これらの CTL クローン

は GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異性を示したものの、内因性に GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを提示する JHH-7/HLA-A*02:07 に対しては反応性を示さなかった(図 10C)。

第4章 考察

ペプチドワクチンの臨床試験は世界中で実施されているが、ワクチン投与後の CTL に関して個別に機能解析まで行った報告はほとんどない。しかし、ペプチドワクチンによって誘導された CTL ががん細胞傷害能を持つことや、腫瘍局所に浸潤することを明らかにすることは重要であり、これらと臨床効果の関連をしらべることはペプチドワクチンの有効性評価につながると考えられる。本研究では、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した進行肝細胞がんの患者の PBMC から GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、ペプチドワクチン投与によってがん細胞傷害能を持つ CTL が誘導されていたことを明らかにした。

抗原由来ペプチドや CTL の誘導が可能なペプチドは、必ずしも抗原を発現するがん細胞の MHC 上に提示されているとは限らない[Purbhoo MA et al., 2007; Nakatsugawa M et al., 2011; Guo Y et al., 2011]。そこで、抗原発現がん細胞に対する抗原由来ペプチド特異的 CTL の細胞傷害活性の確認は大変重要である。

本研究では、樹立した GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンが GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷した 1-87 細胞に加えて、GPC3 陽性肝細胞がん細胞株である JHH-7/HLA-A*02:07 細胞に対しても細胞傷害活性を示すことを確認している。この結果は、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドが GPC3 発現がん細胞内のプロテアソーム分解により自然に産生され、HLA-A*02:07 と結合することで、細胞表面に提示されるペプチドであることを示している。このことから、実際の患者体内に存在していた HCC においても同様に GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドが提示されていた可能性が示唆される。

今回臨床第 I 相試験の患者 PBMC から樹立した 3 つの CTL クローンは、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド負荷 1-87 細胞や JHH-7/HLA-A*02:07 細胞に対して、それぞれの機能親和性に見合った IFN- γ 産生能や細胞傷害活性を示した。この結果は、

末梢血中には様々な機能親和性を有する CTL が存在するが、内因性に抗原由来ペプチドを提示するがん細胞を傷害することができるのは、高い機能親和性を持つものだけであることを示している。マウス腫瘍モデルやヒトがん細胞を認識する T 細胞集団において、標的認識と T 細胞の機能親和性の間に相関があることは、すでにいくつか報告がなされているが[McKee MD et al., 2005]、今回の結果もこの報告と同様の傾向であった。

抗原由来ペプチド特異的 CTL の抗原由来ペプチド-MHC class I 複合体に対する認識能は TCR の親和性に影響を受けると考えられている。TAA 由来ペプチド特異的 CTL の TCR を解析したいくつかの報告では、TRBV 遺伝子ファミリーを用いて解析を行っている[Harada Y et al.,2007; Tanaka-Harada Y et al., 2010; Morimoto S et al., 2012; Valmori D., 2000; Mandruzzato S et al, 2002; Zhou J et al., 2004; Akiyama Y et al., 2009]。しかし、これらの研究の多くは CD8 陽性 TAA テトラマー陽性 T 細胞における TCR の種類の割合を解析している。このような定量的研究も大変重要であるが、この解析では、TAA テトラマー陽性 T 細胞が内因性に TAA 由来ペプチドを提示するがん細胞への細胞傷害能を確認することはできない。加えて、WT-1 や MAGE といった TAA に対する CTL は、テトラマーを用いることで容易に検出できるが、GPC3 特異的 CTL は末梢血中での頻度が少ないため、GPC3 由来ペプチドワクチン投与前患者の PBMC では検出することができなかった [Sawada Y et al., 2012; Yoshikawa T et al., 2011]。GPC3 由来ペプチドワクチン投与前と投与後の患者における GPC3 デキストラマー陽性 T 細胞の TCR の種類を解析するためには、*ex vivo* でより高感度に検出できる新たなシステムの構築が必要となる。本研究では、樹立した 3 つの GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローンの TCR-β 鎖の解析を行い、これらの CTL クローンの TCR が異なる TRBV、TRBD、TRBJ 遺伝子から構成されていることを確認した。この結果から、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンにより複数の異なる

GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL が患者体内で誘導されたと考えられる。

HLA-A*02:07 と HLA-A*02:01 は 99 番目の残基の非保存的変化(Y→C)のみの一つの違いにより分類されている。99 番目の残基は、X 線結晶解析によりペプチドリガンドの 3 番目の残基であり、D ポケットを形成する残基の一つであることが同定されている[Saper MA et al., 1991; Madden DR et al., 1993; Sidney J et al., 1997]。当初 HLA-A*02:07 は HLA-A2 サブタイプに含まれていなかったが、HLA-A*02:07 と他の HLA-A2 サブタイプの交差反応性が機能レベルで検出され[Rivoltini L et al., 1996; Sidney J et al., 1997]、さらに HLA-A*02:07 が他の HLA-A2 サブタイプに結合するペプチド群と結合することが確認されたことにより[Sidney J et al., 1997]、HLA-A2 サブタイプとして認識されるようになった[Sette A et al., 1998]。本研究や臨床試験に使用した GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドに関しても、結合力に差は認められるが、HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07 のすべてに対して結合することを、ペプチド結合アッセイによって確認している。

Ito M らや Nonaka Y らは HLA-A*02:07 陽性患者の TIL から樹立した HLA-A2 拘束性 CTL ラインが、HLA-A*02:07 陽性がん細胞だけでなく HLA-A*02:01 や HLA-A*02:06 陽性のがん細胞株に対しても有意な細胞傷害活性を示したことを報告している[Ito M et al., 2001; Nonaka Y et al., 2002]。このことから、HLA-A*02:07 陽性 HCC 患者 PBMC から樹立した GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL クローン 24-4-2 も同様に HLA-A*02:07 だけでなく HLA-A*02:01 や HLA-A*02:06 に対しても反応を示すかを確認したが、今回樹立したこの CTL クローンでは HLA-A*02:01 や HLA-A*02:06 に対する反応性は示さなかった。

今回使用した臨床第 I 相試験の患者腫瘍組織には CD8 陽性細胞が多く浸潤していることが免疫染色により確認されているが[Sawada Y et al., 2012]、これらの浸潤した CD8 陽性細胞が GPC3 由来ペプチド特異的な CTL であるかどうかの証明はできていなかった。そこで、がん浸潤している CD8 陽性細胞の GPC3

特異性を解析するために、ペプチドワクチン投与前後で肝生検を行う新たな臨床試験を実施した。今回の研究に検体を使用した患者は、肝腫瘍はほとんど壊死していたことが確認されたものの、右心房内腫瘍栓の増大によるものと思われる状態の悪化により、ペプチドワクチン2回目投与から30日後に死亡した。状態悪化に伴い試験を中止せざるを得ず、ワクチン投与後の肝生検が実施できなかったため、TILの解析を行うことができなかった。しかし、この患者は死後病理解剖を行い、壊死していた腫瘍組織内にCD8が浸潤していることを確認した。

この患者のPBMCから樹立したGPC3₁₄₄₋₁₅₂ペプチド特異的CTLクローンはJHH-7/HLA-A*02:07に反応を示さなかった。原因として、特異的CTLの割合が最大であった2回投与2週間後のPBMCのサンプルの残余がなく、特異的CTLの割合の少ない1回投与3週間後のPBMCを誘導に用いたため、樹立できるCTLクローンの種類が限定されてしまったことが考えられる。特異的CTLの頻度が高いPBMCを使用していたら、異なる種類のCTLクローンが樹立でき、その中にはGPC3陽性がん細胞を傷害できるものも存在した可能性もある。また、この患者は急激な抗腫瘍効果を示しており、この効果を担ったCTLは体内ですでに疲弊しきってしまい、認識能や増殖能が低下し、能力を発揮できなかった可能性もある。

HLA-A*02:07を持つ人は東アジア、東南アジア、北インドに多いことが報告されている[Mehra NK et al., 2001; Krausa P et al., 1995; Chang CX et al., 2013; Chen KY et al., 2012]。南中国においては、HLA-A*02:07を保有する人の割合はHLA-A2の主要なサブタイプであるHLA-A*02:01を保有する人の割合よりも高いという報告もある[Shieh DC et al., 1996; Cheng LH et al., 2005]。加えて、日本、中国、インド、香港、台湾、韓国を含む東南アジアでは、全世界の肝臓がん患者のうちの75%が集まっていると報告されており[Mohana Devi S et al., 2013]、こ

これらの報告と本研究の結果をまとめると、HLA-A*02:07を保有する人の割合は、全世界では決して多くないものの、HCC患者の多い東南アジア地域では比較的割合が多く、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンの良い対象となると考えられる。

本研究では、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示した2人のHLA-A*02:07陽性患者はGPC3₁₄₄₋₁₅₂ペプチドワクチン投与によりGPC3₁₄₄₋₁₅₂ペプチド特異的CTLが誘導され、特に臨床第I相試験の患者においては、ペプチドワクチンによって、高い機能親和性をもち、GPC3陽性がん細胞に対して細胞傷害活性を示すCTLが誘導されたことを証明した。しかし、今回樹立したCTLクローンのような*in vitro*において細胞傷害活性を示すCTLが、患者がん組織中においてもきちんと細胞傷害を起こしていたかという点は確認されておらず、GPC3由来ペプチドワクチンの免疫学的有効性を証明するには末梢血だけでなく、腫瘍組織に浸潤したCTLについても更なる研究が必要であると考えられる。

第 5 章 参考文献

- Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. (2009) Hepatocellular carcinoma – epidemiological trends and risk factors. *Digestive Diseases*, 27(2), 80–92.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2). 69-90.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127 (12), 2893-2917.
- El-Serag HB, Rudolph KL (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7), 2557-2576.
- Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR, Forman D (2010) Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2918-2927.
- Ryder RW, Whittle HC, Sanneh AB, Ajdukiewicz AB, Tulloch S, Yvonne B (1992) Persistent hepatitis B virus infection and hepatoma in The Gambia, West Africa. A case-control study of 140 adults and their 603 family contacts. *American Journal of Epidemiology*, 136, 1122–1131.
- Chang MH, Shau WY, Chen CJ, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Hsu HM, Chen HL, Hsu HY, Chen DS (2000) Hepatitis B vaccination and hepatocellular carcinoma rates in boys and girls. *The Journal of the American Medical Association*, 284, 3040 –3042.
- Ghebranious N, Sell, S (1998) Hepatitis B injury, male gender, aflatoxin, and p53 expression each contribute to hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 27, 383-391.
- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005) IKKbeta couples

hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121, 977-990.

- Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R (2004) Primary liver cancer. Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127, S5-S16.
- Yang W, Lu Y, Xu Y, Xu L, Zheng W, Wu Y, Li L, Shen P (2012) Estrogen represses hepatocellular carcinoma (HCC) growth via inhibiting alternative activation of tumor-associated macrophages (TAMs). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40140-40149.
- Schafer DF, Sorrell MF (1999) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 353, 1253-1257.
- Yoshizawa H (2002) Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection in Japan: projection to other countries in the foreseeable future. *Oncology*, 62 Suppl 1, 8-17.
- Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu HM, Wu TC, Kong MS., Liang DC, Shau WY, Chen DS (1997) Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 336, 1855-1859.
- Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Von Overbeck J, Lloyd AR, Marinou G, Kaldor JM (2001) Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 34, 809-816.
- Bruno S, Battezzati PM, Bellati G, Manzin A, Maggioni M, Crosignani A, Borzio M, Solfrosi L, Morabito A, Ideo G., Podda M (2001) Long-term beneficial effects in sustained responders to interferon-alfa therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 34, 748-755.
- Au JS, Pockros PJ (2013) New therapeutic approaches to hepatitis C virus. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(1), 78-88.

- Xiao F, Fofana I, Heydmann L, Barth H, Soulier E, Habersetzer F, Doffoël M, Bukh J, Patel AH, Zeisel MB, Baumert TF (2014) Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathogens*, 10(5), e1004128.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *The New England Journal of Medicine*, 348, 1625-1638.
- Lai MS, Hsieh MS, Chiu YH, Chen TH (2006) Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma : A cohort study in high prevalence area of hepatitis virus infection. *Hepatology*, 43, 1295-1302.
- Bugianesi E (2007) Non-alcoholic steatohepatitis and cancer. *Clinics In Liver Disease*, 11, 191-207.
- Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M. (2003) Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after epatectomy. *Journal of Hepatology*, 38, 200-207.
- Lau WY, Lai EC (2009) The current role of radiofrequency ablation in the management of hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Annals of Surgery*, 249(1), 20-25.
- Kim YS, Lim HK, Rhim H, Lee MW, Choi D, Lee WJ, Paik SW, Koh KC, Lee JH, Choi MS, Gwak GY, Yoo BC. (2013) Ten-year outcomes of percutaneous radiofrequency ablation as first-line therapy of early hepatocellular carcinoma: analysis of prognostic factors. *Journal of Hepatology*, 58(1), 89-97.
- Mima K, Hayashi H, Imai K, Kuroki H, Nakagawa S, Okabe H, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H (2013) High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic*

Sciences, 20(4), 429-434.

- Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y (2006) Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology*, 131(2), 461-469.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 359, 378-390.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z (2009) Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, 10, 25-34.
- Kim HY, Park JW (2011) Molecularly targeted therapies for hepatocellular carcinoma: Sorafenib as a Stepping Stone. *Digestive Diseases*, 29(3), 303-309.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA (2004) BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), 7099-7109.

- Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM (2006) Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods in Enzymology*, 407, 597-612.
- Keating GM, Santoro A (2009) Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs*, 69(2), 223-240.
- Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S (2005) Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of MCL-1 through inhibition of translation. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 35217-35227.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S (2006) Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 835–844.
- Morimoto M, Numata K, Kondo M, Hidaka H, Takada J, Shibuya A, Kobayashi S, Ohkawa S, Okuse C, Morita S, Taguri M, Tanaka K (2011) Higher discontinuation and lower survival rates are likely in elderly Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving sorafenib. *Hepatology Research*, 41, 296-302.
- Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y (2012) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatology Research*, 42(6), 523-542.
- Yamamoto J, Okada S, Shimada K, Okusaka T, Yamasaki S, Ueno H, Kosuge T (2001) Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical

resection. *Hepatology*, 34, 707-713.

- Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Teratani T, Obi S, Yamashiki N, Yoshida H, Akamatsu M, Kawabe T, Omata M (2006) Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers. *Hepatology*, 44, 1518-1527.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254(5038), 1643-1647.
- Dermime S, Armstrong A, Hawkins RE, Stern PL (2002) Cancer vaccines and immunotherapy. *British Medical Bulletin*, 62,149-162.
- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z (2013) NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, 10(3), 230-252.
- Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M (2013) NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Frontiers in Immunology*, 4, 409.
- Latha TS, Reddy MC, Durbaka PV, Rachamalla A, Pallu R, Lomada D (2014) $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immune Responses in Disease and Therapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 571.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME (2011) Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 17, 4550–4557.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006) Cancer regression in

patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, 314, 126-129.

- Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114, 535-546.
- Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA (2011) Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 917-924.
- Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA (2012) B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 119(12), 2709-2720.
- Kenderian SS, Ruella M, Gill S, Kalos M (2014) Chimeric Antigen Receptor T-cell Therapy to Target Hematologic Malignancies. *Cancer Research*, 74(22), 6383-6389.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England*

Journal of Medicine, 365(8), 725-733.

- Hailemichael Y, Overwijk WW (2014) Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53, 46-50.
- Yamada A, Sasada T, Noguchi M, Itoh K (2013) Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Science*, 104(1), 15-21.
- Ohtake J, Ohkuri T, Togashi Y, Kitamura H, Okuno K, Nishimura T (2014) Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunology Letters*, 161(1), 20-30.
- Greten TF, Manns MP, Korangy F (2006) Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 45(6), 868-878.
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S (2011) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 53, 1206-1216.
- Breous E, Thimme R (2011) Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 54(4), 830–834.
- Butterfield LH (2007) Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss Medical Weekly*, 137(5-6), 83-90.
- Greten TF, Forner A, Korangy F, N'Kontchou G, Barget N, Ayuso C, Ormandy LA, Manns MP, Beaugrand M, Bruix J (2010) A phase II open label trial evaluating safety and efficacy of a telomerase peptide vaccination in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 10, 209.
- 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, Nishimura Y (2003) Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 16-25.

- Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J (2003) Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 125, 89-97.
- De Cat B, Muyldermans SY, Coomans C, Degeest G, Vanderschueren B, Creemers J, Biemar F, Peers B, David G (2003) Processing by proprotein convertases is required for glypican-3 modulation of cell survival, Wnt signaling, and gastrulation movements. *Journal of Cell Biology*, 163, 625-635.
- Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y (2004) Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clinical Cancer Research*, 10(19): 6612–6621.
- Toretsky JA, Zitomersky NL, Eskenazi AE, Voigt RW, Strauch ED, Sun CC, Huber R, Meltzer SJ, Schlessinger D (2001) Glypican-3 expression in Wilms tumor and hepatoblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 23(8), 496–499.
- Stadlmann S, Gueth U, Baumhoer D, Moch H, Terracciano L, Singer G (2007). Glypican-3 expression in primary and recurrent ovarian carcinomas. *International Journal of Gynecological Pathology*, 26, 341-344.
- Maeda D, Ota S, Takazawa Y, Aburatani H, Nakagawa S, Yano T, Taketani Y, Kodama T, Fukayama M.(2009) Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Modern Pathology*, 22(6), 824–832.
- Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, Roncalli M, Diamantis EK., Terracciano LM (2008) Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and

neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *American Journal of Clinical Pathology*, 129, 899-906.

- Saikali Z, Sinnett D (2000) Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *International Journal of Cancer*, 89(5), 418–422.
- Boily G, Ouellet S, Langlois S, Larivière M, Drouin R, Sinnett D (2007) In vivo footprinting analysis of the Glypican 3 (GPC3) promoter region in neuroblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769(3), 182-193.
- Aviel-Ronen S, Lau SK, Pintilie M, Lau D, Liu N, Tsao MS, Jothy S (2008) Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 21(7), 817–825.
- Filmus J, Shi W, Wong ZM, Wong MJ (1995) Identification of a new membrane-bound heparan sulphate proteoglycan. *Biochemical Journal*, 311, 561-565.
- Filmus J, Selleck SB (2001) Glypicans: proteoglycans with a surprise. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(4), 497–501.
- Mayor S, Riezman H (2004) Sorting GPI-anchored proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 110-120.
- Mertens G, Van den Schueren B, Van Den Berghe H, David G (1996) Heparan sulfate expression in polarized epithelial cells: the apical sorting of glypican (GPI-anchored proteoglycan) is inversely related to its heparan sulfate content. *Journal of Cell Biology*, 132, 487-497.
- Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY., Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D (1996) Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nature Genetics*, 12, 241-247.

- Pellegrini M, Pilia G, Pantano S, Lucchini F, Uda M, Fumi M, Cao A, Schlessinger D, Forabosco A (1998) Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Developmental Dynamics*, 213(4), 431-439.
- Capurro M, Martin T, Shi W, Filmus J (2014) Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 7), 1565–1575.
- Capurro MI, Shi W, Filmus J (2012) LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the GPC3–Hedgehog complex. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 14), 3380–3389.
- Filmus J, Capurro M. (2014) The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix Biology*, 35, 248-52.
- Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, Miyazono K, Kodama T, Makuuchi M, Aburatani H (2003) Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *International Journal of Cancer*, 103(4), 455–465.
- Grisaru S, Cano-Gauci D, Tee J, Filmus J, Rosenblum ND (2001) Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 231(1), 31-46.
- Paine-Saunders S, Viviano BL, Zupicich J, Skarnes WC, Saunders S (2000) glypican-3 controls cellular responses to Bmp4 in limb patterning and skeletal development. *Developmental Biology*, 225(1), 179-187.
- Iglesias BV, Centeno G, Pascuccelli H, Ward F, Peters MG, Filmus J, Puricelli L, de Kier Joffe EB (2008) Expression pattern of glypican-3 (GPC3) during human embryonic and fetal development. *Histology and Histopathology*, 23, 1333-1340.
- Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, Filmus J (2005) Glypican-3 promotes the growth

of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Research*, 65(14), 6245–6254.

- Capurro MI, Xu P, Shi W, Li F, Jia A, Filmus J (2008) Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Developmental Cell*, 14(5), 700–711.
- Nakatsura T, Nishimura Y (2005) Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs*, 19, 71-77.
- Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T (2009) Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. *International Journal of Oncology*, 34: 649-656.
- Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T (2009) Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Science*, 100, 1403-1407.
- Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, Matsuyoshi H, Hirata S, Monji M, Komori H, Fukuma D, Baba H, Nishimura Y (2006) 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 Research*, 66(4), 2414-2422.
- Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T (2008) HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induces specific CTLs: preclinical study using mice. *International Journal of Oncology*, 32(5), 985-990.
- Iwama T, Horie K, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shimomura M, Sawada Y, Nakatsura

- T (2013) Identification of an H2-Kb or H2-Db restricted and glypican-3-derived cytotoxic T-lymphocyte epitope peptide. *International Journal of Oncology*, 42(3), 831-838.
- Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, Fukuma D, Yokomine K, Harao M, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, Sato N, Baba H, Nishimura Y (2006) Identification of HLA-A2- or HLA-A24- restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 12, 2689–2697.
 - Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, Furukawa Y, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. (2004) Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clinical Cancer Research*, 10, 8630-8640.
 - Imanish T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K and Gojobori T (1992) Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: HLA 1991. Vol.1. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds.) *Oxford University press, Oxford*, pp1065-1220.
 - Ellis JM, Henson V, Slack R, Ng J, Hartzman RJ, katovich Hurley C (2000) Frequencies of HLA-A2 alleles in five U.S. population groups. Predominance Of A*02011 and identification of HLA-A*0231. *Human Immunology*, 61(3), 334-340.
 - Sidney J, Grey HM, Kubo RT, Sette A (1996) Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunology Today*, 17(6), 261-266.
 - Yasuda N, Tsuji K, Aizawa M, Itakura K, Inou T, Matsukura M, Yoshida T, Fukunishi T, Orita K, Nomoto K, Ito M (1976) HLA antigens in Japanese

populations. *The American Journal of Human Genetics*, 28(4), 390–399.

- Mehra NK, Jaini R, Rajalingam R, Balamurugan A, Kaur G (2001) Molecular diversity of HLA-A*02 in Asian Indians: predominance of A*0211. *Tissue Antigens*, 57(6), 502-507.
- Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, Shirakawa H, Kuronuma T, Motomura Y, Mizuno S, Ishii H, Nakachi K, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Takayama T, Yamao K, Uesaka K, Furuse J, Kinoshita T, Nakatsura T (2012) Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clinical Cancer Research*, 18(13), 3686-3696.
- Yoshikawa T, Nakatsugawa M, Suzuki S, Shirakawa H, Nobuoka D, Sakemura N, Motomura Y, Tanaka Y, Hayashi S, Nakatsura T (2011) HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells. *Cancer Science*, 102, 918-925.
- Nobuoka D, Yoshikawa T, Sawada Y, Fujiwara T, Nakatsura T (2013) Peptide vaccines for hepatocellular carcinoma. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(1), 210-212.
- Sawada Y, Sakai M, Yoshikawa T, Ofuji K, Nakatsura T (2012) A glypican-3-derived peptide vaccine against hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology*, 1(8), 1448-1450.
- Sawada Y, Yoshikawa T, Fujii S, Mitsunaga S, Nobuoka D, Mizuno S, Takahashi M, Yamauchi C, Endo I, Nakatsura T (2013) Remarkable tumor lysis in a hepatocellular carcinoma patient immediately following glypican-3-derived peptide vaccination: An autopsy case. *Human vaccines & immunotherapeutics*,

9(7), 1228-33.

- Harada Y, Kawase I (2007) Single cell-based T cell receptor gene analysis reveals existence of expanded WT1 (Wilms' tumor gene) product-specific T cell clones in leukemia patients but not healthy volunteers. *Medical Journal of Osaka University* 50, 1-12.
- Tanaka-Harada Y, Kawakami M, Oka Y, Tsuboi A, Katagiri T, Elisseeva OA, Nishida S, Shirakata T, Hosen N, Fujiki F, Murao A, Nakajima H, Oji Y, Kanda Y, Kawase I, Sugiyama H (2010) Biased usage of BV gene families of T-cell receptors of WT1 (Wilms' tumor gene) -specific CD8⁺ T cells in patients with myeloid malignancies. *Cancer Science*, 101, 594-600.
- Purbhoo MA, Li Y, Sutton DH, Brewer JE, Gostick E, Bossi G, Laugel B, Moysey R, Baston E, Liddy N, Cameron B, Bennett AD, Ashfield R, Milicic A, Price DA, Classon BJ, Sewell AK, Jakobsen BK (2007) The HLA A*0201-restricted hTERT(540-548) peptide is not detected on tumor cells by a CTL clone or a high-affinity T-cell receptor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(7), 2081-2091.
- Nakatsugawa M, Horie K, Yoshikawa T, Shimomura M, Kikuchi Y, Sakemura N, Suzuki S, Nobuoka D, Hirohashi Y, Torigoe T, Harada K, Takasu H, Sato N, Nakatsura T (2011) Identification of an HLA-A*0201 -restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from the lung carcinoma antigen, Lentsin. *International Journal of Oncology*, 39, 1041-1049.
- Guo Y, Zhu Y, Sun S (2011) Identification and functional studies of HLA-A0201 restricted CTL epitopes in the X protein of hepatitis B virus. *Acta virologica*, 55(2), 107-115.
- McKee MD, Roszkowski JJ, Nishimura MI (2005) T cell avidity and tumor recognition: implications and therapeutic strategies. *Journal of Translational Medicine*, 3, 35.

- Morimoto S, Oka Y, Tsuboi A, Tanaka Y, Fujiki F, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Nakata J, Nakae Y, Maruno M, Myoui A, Enomoto T, Izumoto S, Sekimoto M, Kagawa N, Hashimoto N, Yoshimine T, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. (2012) Biased usage of T cell receptor β -chain variable region genes of Wilms' tumor gene (WT1)-specific CD8⁺ T cells in patients with solid tumors and healthy donors. *Cancer Science*, 103(3), 408-414.
- V Valmori D, Dutoit V, Liénard D, Lejeune F, Speiser D, Rimoldi D, Cerundolo V, Dietrich PY, Cerottini JC, Romero P. (2000) Tetramer-guided analysis of TCR beta-chain usage reveals a large repertoire of melan-A-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *The Journal of Immunology*, 165(1), 533-538.
- Mandruzzato S, Rossi E, Bernardi F, Tosello V, Macino B, Basso G, Chiarion-Sileni V, Rossi CR, Montesco C, Zanovello P (2002) Large and dissimilar repertoire of Melan-A/MART-1-specific CTL in metastatic lesions and blood of a melanoma patient. *The Journal of Immunology*, 169(7), 4017-4024.
- Zhou J, Dudley ME, Rosenberg SA, Robbins PF (2004) Selective growth, in vitro and in vivo, of individual T cell clones from tumor-infiltrating lymphocytes obtained from patients with melanoma. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7622-7629.
- Akiyama Y, Maruyama K, Tai S, Komiyama M, Iizuka A, Takikawa M, Ohshita C, Yamamoto A, Yamazaki N, Kiyohara Y, Yamaguchi K (2009) Characterization of a MAGE-1-derived HLA-A24 epitope-specific CTL line from a Japanese metastatic melanoma patient. *Anticancer Research*, 29(2), 647-55.
- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC (1991) Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 219(2), 277-319.

- Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC (1993) The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75(4), 693-708.
- Sidney J, del Guercio MF, Southwood S, Hermanson G, Maewal A, Appella E, Sette A (1997) The HLA-A0207 Peptide Binding Repertoire is Limited to a Subset of the A0201 Repertoire. *Human Immunology*, 58(1), 12-20.
- Rivoltini L, Loftus DJ, Barracchini K, Arienti F, Mazzocchi A, Biddison WE, Salgaller ML, Appella E, Parmiani G, Marincola FM (1996) Binding and presentation of peptides derived from melanoma antigens MART-1 and glycoprotein-100 by HLA-A2 subtypes: implications for peptide-based immunotherapy. *The Journal of Immunology*, 156, 3882–3891.
- Sette A, Sidney J (1998) HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. *Current Opinion in Immunology*, 10(4), 478-482.
- Ito M, Shichijo S, Tsuda N, Ochi M, Harashima N, Saito N, Itoh K (2001) Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 61(5), 2038-2046.
- Nonaka Y, Tsuda N, Shichijo S, Ito M, Maeda Y, Harada M, Kamura T, Shigemori M, Itoh K. (2002) Recognition of ADP-ribosylation factor 4-like by HLA-A2-restricted and tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes from patients with brain tumors. *Tissue Antigens*, 60(4), 319-327.
- Krausa P, Brywka M 3rd, Savage D, Hui KM, Bunce M, Ngai JL, Teo DL, Ong YW, Barouch D, Allsop CE (1995) Genetic polymorphism within HLA-A*02: significant allelic variation revealed in different populations. *Tissue Antigens*, 45(4), 223–231.
- Chang CX, Tan AT, Or MY, Toh KY, Lim PY, Chia AS, Froesig TM, Nadua KD, Oh HL, Leong HN, Hadrup SR, Gehring AJ, Tan YJ, Bertoletti A, Grotenbreg GM

(2013) Conditional ligands for Asian HLA variants facilitate the definition of CD8 (+) T-cell responses in acute and chronic viral diseases. *European Journal of Immunology*, 43(4), 1109-1120.

- Chen KY, Liu J, Ren EC (2012) Structural and functional distinctiveness of HLA-A2 allelic variants. *Immunologic Research*, 53 (1-3), 182-190.
- Shieh DC, Lin DT, Yang BS, Kuan HL, Kao KJ (1996) High frequency of HLA-A*0207 subtype in Chinese population. *Transfusion*, 36(9), 818-821.
- Cheng LH, Jin SZ, Gao SQ, Li Z, Zou HY, Wang DM, Wu GG (2005) Difference in HLA-A* 02 allele distribution between Han populations in south and north China. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 25(3), 321–324.
- Mohana Devi S, Balachandar V, Arun M, Suresh Kumar S, Balamurali Krishnan B, Sasikala K (2013) Analysis of genetic damage and gene polymorphism in hepatocellular carcinoma (HCC) patients in a South Indian population. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(3), 759-767.

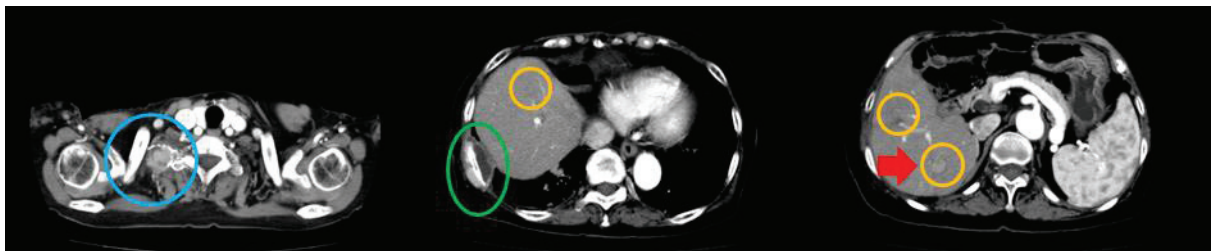
第6章 図表

図1

A



B



C

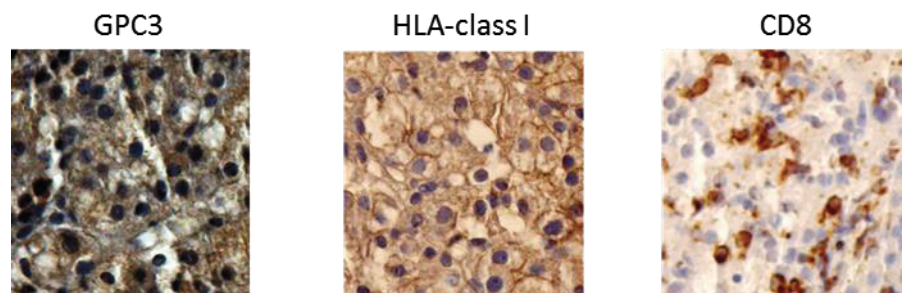


図1: GPC3 ペプチドワクチン臨床第I相試験におけるPR症例

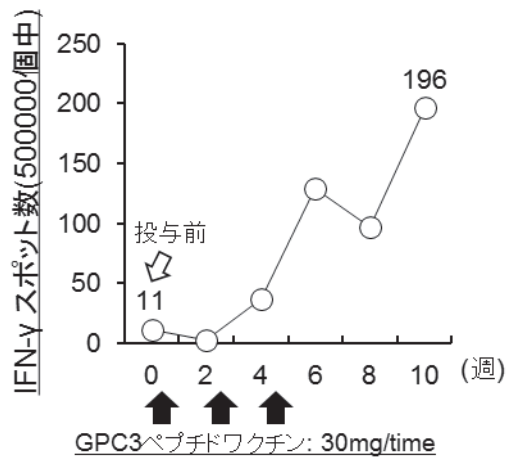
A: ワクチン投与前のCT画像診断結果。鎖骨上リンパ節転移(青枠内)、骨転移(緑枠内)、三つの肝腫瘍(オレンジ枠内)が確認された。

B: ワクチン3回投与から1ヵ月後のCT画像診断結果。鎖骨上リンパ節転移(青枠内)の縮小、骨転移(緑枠内)の壊死、三つの肝腫瘍(オレンジ枠内)のうち2つの腫瘍の消失が確認された。残り1つの肝腫瘍(赤矢印)はほとんど大きさの変化が見られなかった。

C: 残存腫瘍の免疫染色結果。Bにおいて残存が確認された腫瘍(赤矢印)を生検し、免疫染色を行った。免疫染色はGPC、HLA-class I、CD8に対して行った。観察は400倍で行った。

図 2

A



B

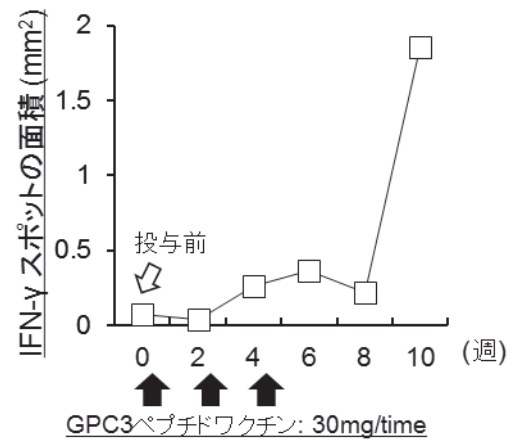
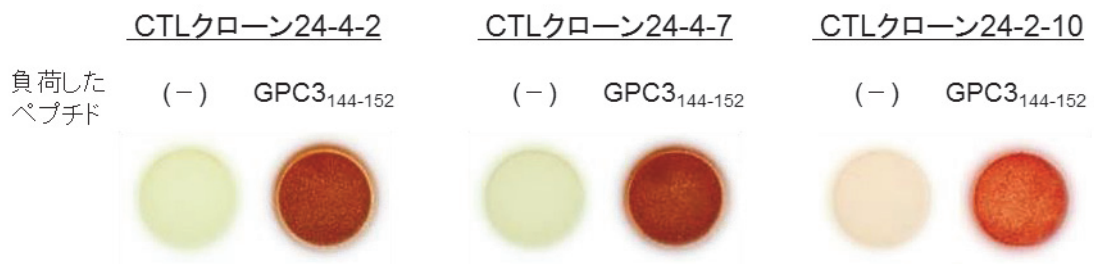


図 2: PR 症例における PBMC 中 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL の推移

免疫学的モニタリングによるペプチドワクチン投与前と投与後の PBMC 中 GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL 数の確認。免疫学的モニタリングは *ex vivo* IFN- γ ELISPOT アッセイにより行い、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドに対する IFN- γ スポットを GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異的 CTL 数として推移を確認した。A は IFN- γ スポット数、B は IFN- γ スポットの面積の推移を示す。

図 3

A



B

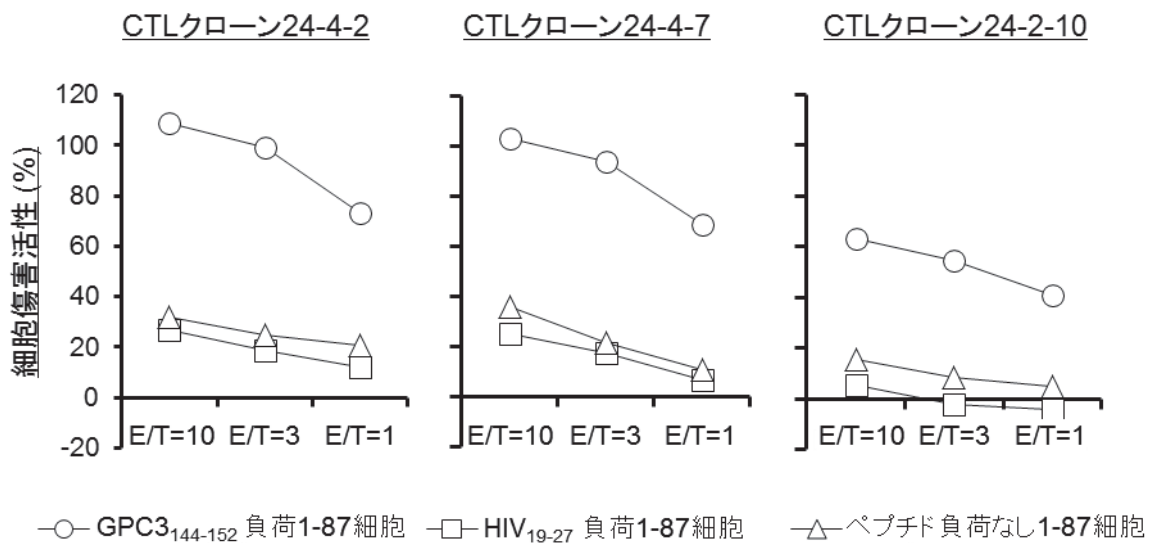


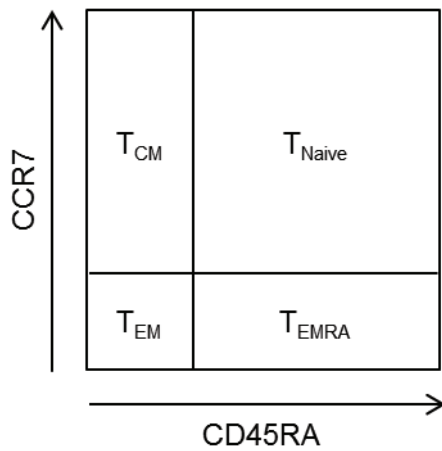
図 3: 樹立した 3 つの CTL クローンの GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチド特異性の評価

A: 各 CTL クローンをを用いた IFN- γ ELISPOT アッセイ結果。標的細胞として HLA-A*02:07 陽性がん細胞株 1-87 に GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷したもの、ペプチドを負荷しないものを使用した。アッセイは E/T=1 にて行った。

B: 各 CTL クローンをを用いた細胞傷害性試験結果。標的細胞として HLA-A*02:07 陽性がん細胞株 1-87 に GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷したもの、ペプチドを負荷しないもの、さらにコントロールペプチドとして HIV₁₉₋₂₇ ペプチドを負荷したものを使用した。アッセイは E/T=10, 3, 1 にて行った。

図 4

A



B

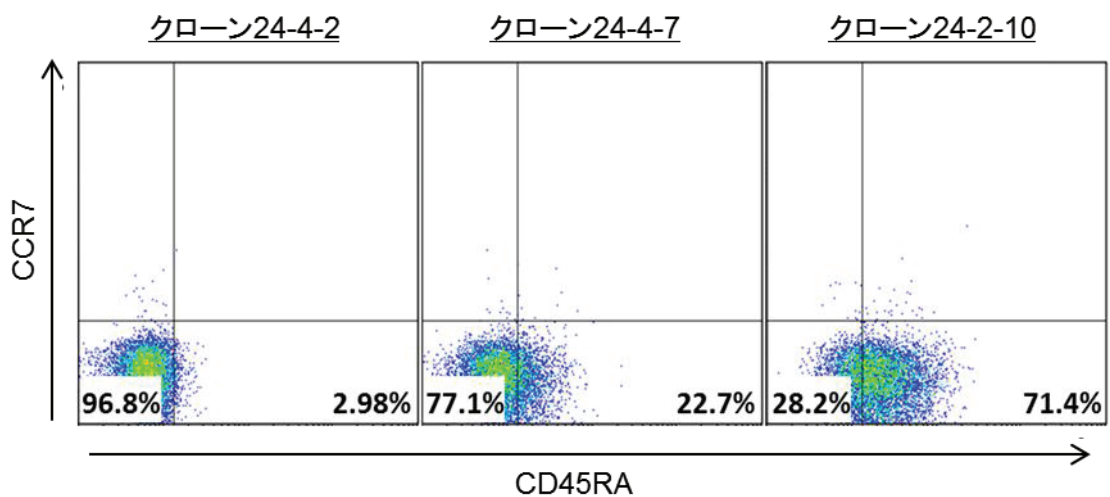


図 4: 樹立した CTL クローンの表現型解析

A: CCR7 と CD45RA を用いた CTL の表現型解析方法。CCR7⁺CD45RA⁺細胞をナイーブ T 細胞 (T_{Naive})、CCR7⁺CD45RA⁻細胞をセントラルメモリーT 細胞 (T_{CM})、CCR7⁻CD45RA⁻細胞をエフェクターメモリーT 細胞 (T_{EM})、CCR7⁻CD45RA⁺細胞を最終分化型エフェクターメモリー T 細胞 (T_{EMRA}) と分類した。

B: 各 CTL クローンの表現型解析結果。

図 5

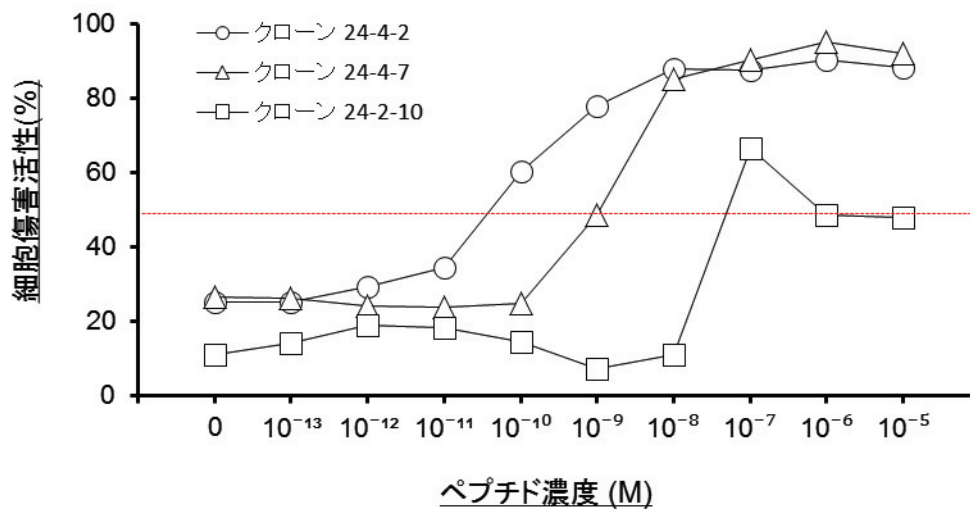
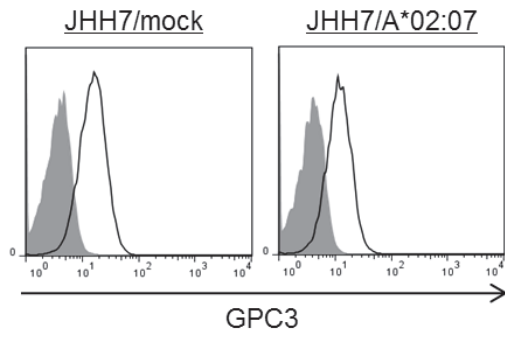


図 5: CTL クローンの機能親和性の評価

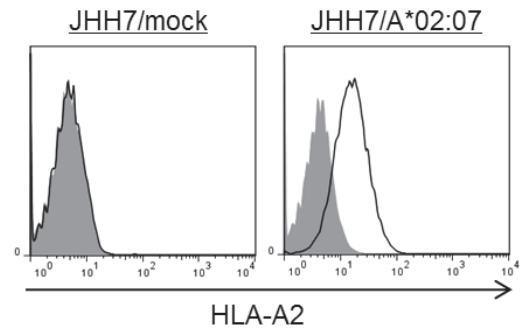
ペプチドタイトレーションアッセイ結果。10⁻⁵M から 10⁻¹³M まで段階的に希釈したペプチドをそれぞれ負荷した 1-87 細胞に対する各 CTL クローンの細胞傷害活性を確認した。50%細胞傷害活性 (赤点線) を示すペプチド濃度を各 CTL クローンの認識効率と定義した。アッセイは E/T=1 にて行った。

図 6

A



B



C



D

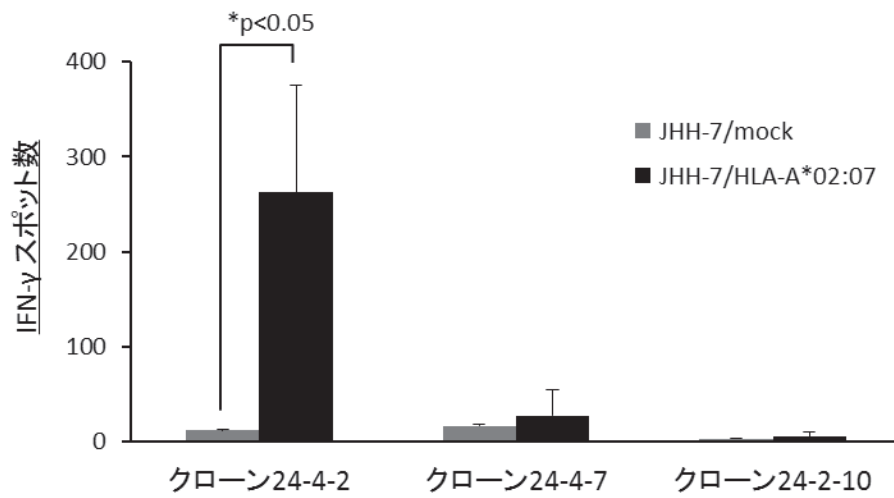


図 6 (続き)

E

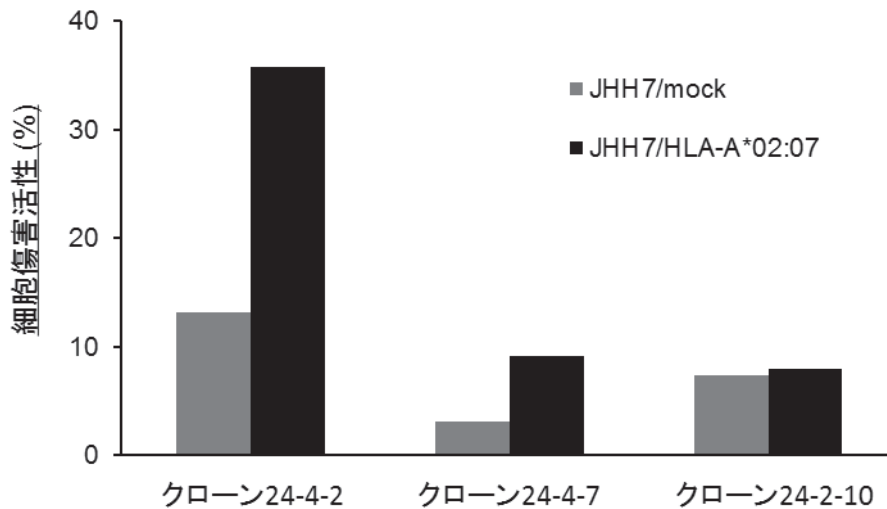


図 6: CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する認識能の評価

A: JHH-7/mock と JHH-7/HLA-A*02:07 の GPC3 発現確認結果。どちらの細胞も同等の GPC3 の発現が確認された。黒線が染色サンプル結果、灰色が 2 次抗体のみのコントロール結果を示す。

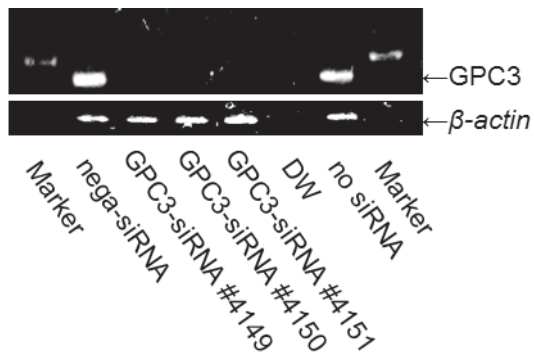
B: HH-7/mock と JHH-7/HLA-A*02:07 の HLA-A2 発現確認結果。HLA-A*02:07 を強制発現させた JHH-7/HLA-A*02:07 においてのみ HLA-A2 の発現が確認された。黒線が染色サンプル結果、灰色がアイソタイプコントロール結果を示す。

C, D: 各 CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する IFN- γ ELISPOT アッセイ結果。灰色が JHH-7/mock に対する IFN- γ スポット数、黒が JHH-7/HLA-A*02:07 に対する IFN- γ スポット数を示す。アッセイは E/T=1 にて行った。C は代表例、D は 3 回試行した結果のまとめ。

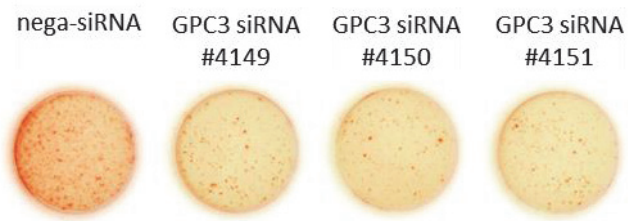
E: 各 CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する細胞傷害性試験結果。アッセイは E/T=3 にて行った。

図 7

A



B



C

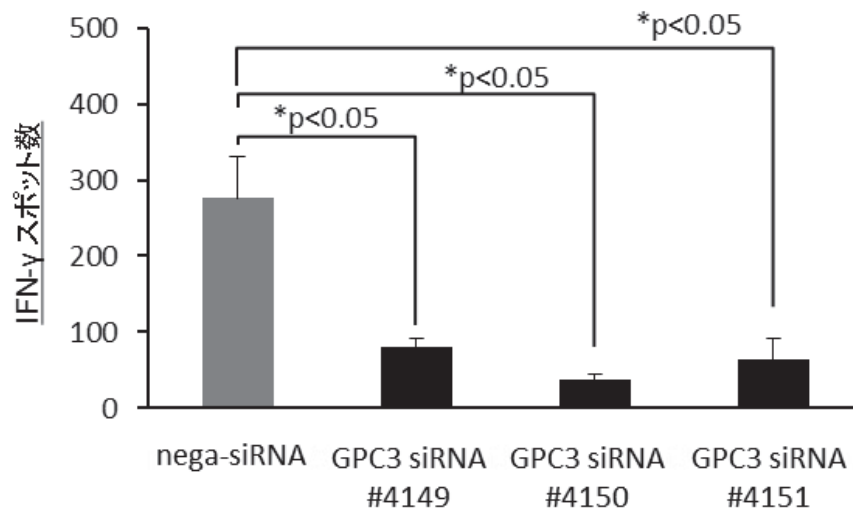


図 7: CTL クローン 24-4-2 の GPC3 特異性の解析

A: 3 種類の GPC3-siRNA による GPC3 ノックダウンの確認。ノックダウンの効果の確認は RT-PCR により行った。B-アクチンはポジティブコントロールとして用いた。

B, C: GPC3 ノックダウンした JHH-7/HLA-A*02:07 に対する CTL クローン 24-4-2 の IFN- γ ELISPOT アッセイ結果。アッセイは E/T=1 で B は代表例。C は 3 回試行した結果のまとめ。評価は E/T=1 で行った。

図 8

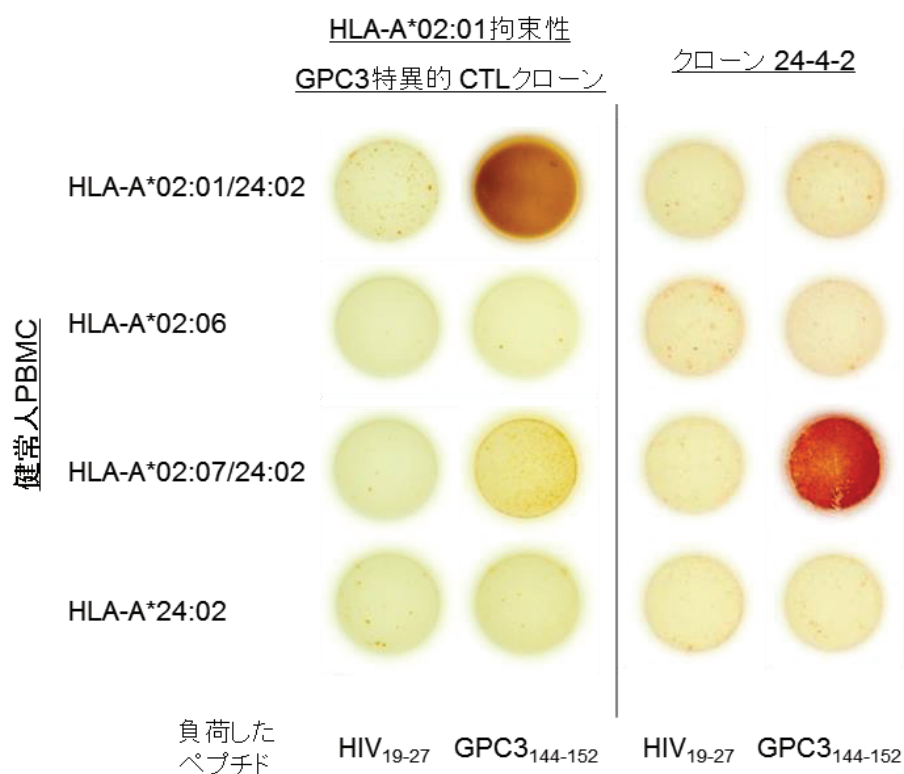
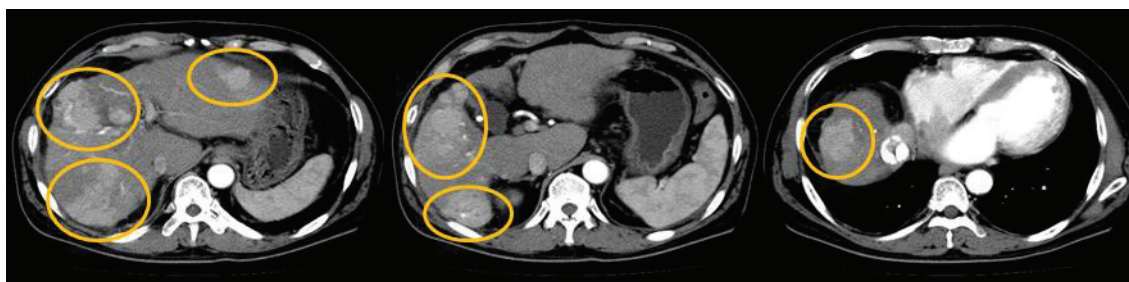


図 8: CTL クローン 24-4-2 の他の HLA-A2 分子への交差性の評価

ペプチド負荷した健康人PBMCに対するCTLクローン24-4-2のIFN- γ ELISPOTアッセイ結果。健康人PBMCはそれぞれHLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*24:02陽性の健康人PBMCを用いた。ネガティブコントロールとしてHIV₁₉₋₂₇ペプチドを負荷したPBMCを用いた。また、対比のためにHLA-A*02:01拘束性GPC3特異的CTLを用いた。アッセイはE/T=0.2にて行なった。

図 9

A



B



C

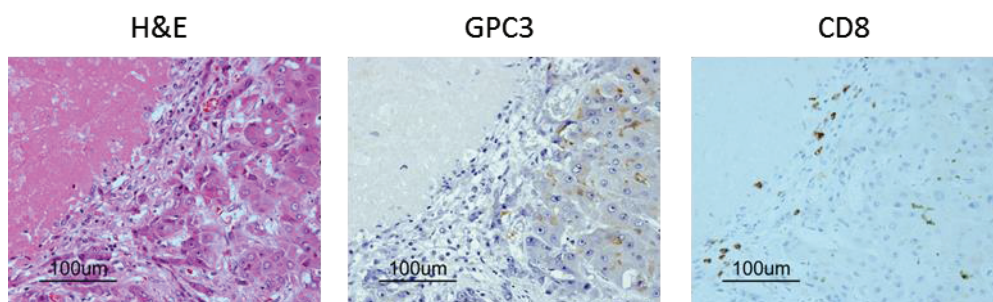


図 9: GPC3 ペプチドワクチンの免疫学的有効性評価のための臨床試験において著しい腫瘍の壊死が認められた症例

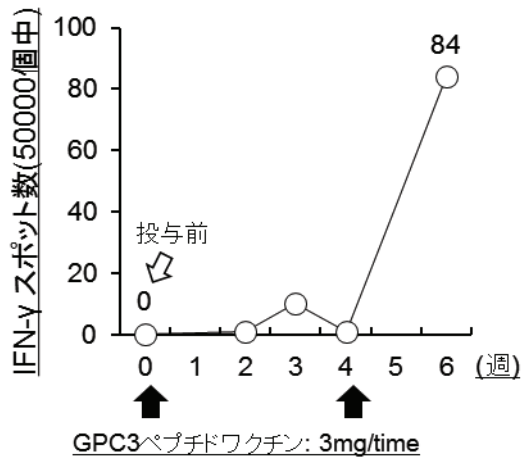
A: ワクチン投与前の CT 画像診断結果。肝臓内に多数の腫瘍(オレンジ枠内)が認められた。

B: ワクチン 2 回投与後の CT 画像診断結果。肝内多発病変(オレンジ枠内)のほとんどで壊死が認められた。一方、右心房内腫瘍栓(赤矢印)の増大が認められた。

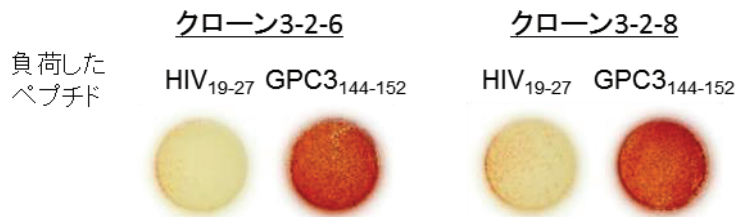
C: ワクチン 2 回投与後の腫瘍組織の免疫染色結果。GPC3、CD8、H&E 染色の結果を示す。観察は 100 倍で行った。

図 10

A



B



C

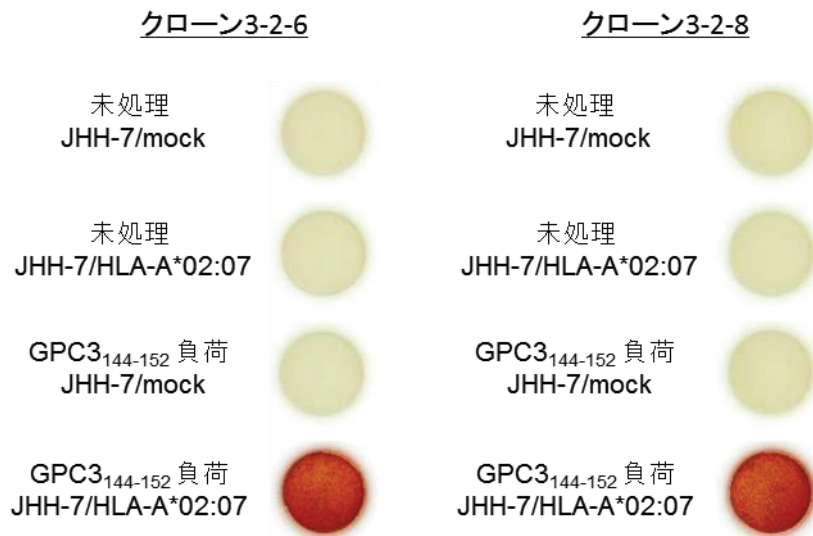


図 10: 他患者 PBMC から新たに樹立した CTL クローンの機能評価

A: 図 9 で示した患者の免疫学的モニタリング結果。ペプチドワクチン 1 回投与 3 週間後の PBMC は CTL クローンの樹立に用いた。

B: 樹立した CTL クローンを用いた IFN- γ ELISPOT アッセイ結果。GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷した 1-87 を標的細胞として使用し、コントロールとして HIV₁₉₋₂₇ ペプチドを負荷した 1-87 を用いた。アッセイは E/T=1 で行った。

C: B で示した CTL クローンの GPC3 陽性がん細胞株に対する IFN- γ ELISPOT アッセイ結果。JHH-7/mock と JHH-7/HLA-A*02:07 を標的として用いた。ポジティブコントロールとして GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを負荷した JHH-7/HLA-A*02:07 を使用した。アッセイは E/T=1 で行った。

表 1

No.	TRBV	TRBJ	TRBD
クローン24-4-2	18*01	1-2*01	1*01
クローン24-4-7	7-3*01	2-7*01	1*01
クローン24-2-10	7-6*01	2-1*01	2*01

表 1: CTL クローンの TCR- β 鎖遺伝子配列解析結果

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究の機会を与えてくださり、終始多大な御指導・御鞭撻を賜りました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 中面哲也分野長、東京理科大学大学院生命科学研究科 安部良教授に深く感謝いたします。

本論文の副査を務めて頂き、論文作成にあたり適切なお助言を頂きました東京理科大学大学院生命科学研究科 江角浩安教授、中野直子准教授、水田龍信准教授に深く感謝いたします。

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 吉川聡明博士、下村真菜美氏には、実験及び論文作成において多くの親身な御指導を賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

東京理科大学大学院生命科学研究科 鈴木利宙助教には pcDNA3.1/HLA-A*02:07 を供与して頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

横浜市立大学医学部消化器・腫瘍外科学講座 澤田雄医師には、臨床試験データを提供して頂き、また論文作成において多くの親身な御指導を賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

福井大学大学院医学系研究科病態制御医学講座 大藤和也医師、東京女子医科大学大学院医学研究科消化器外科学 吉村麻友子医師には、臨床の知識を教えて頂き、また論文作成において多くの親身な御指導を賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

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の皆様には、日々の議論、助言、実験指導などを通して、本研究および研究生活を支えて頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、経済的にも精神的にも惜しみない援助をして下さいました家族に心から感謝の意を表します。

平成 27 年 2 月 26 日

多田 好孝