

氏名（本籍）	た だ よし たか 多 田 好 孝（兵庫県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第1093号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	<b>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</b>

論文審査委員 （主査）教授 安部 良  
嘱託教授 江角 浩安  
連携大学院 生命科学専攻 客員教授 中面 哲也  
准教授 中野 直子 准教授 水田 龍信

## 論文内容の要旨

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、そのうちのひとつとして「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 GPC3<sub>298-306</sub> (EYILSLEEL)と HLA-A\*02:01 拘束性ペプチド GPC3<sub>144-152</sub> (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 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 例の患者 PBMC から GPC3<sub>144-152</sub> 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 GPC3<sub>144-152</sub> ペプチド・IL-2・IL-15 で 14 日間刺激培養し、GPC3<sub>144-152</sub> ペプチド特異的 CTL を誘導した。誘導した CTL は GPC3<sub>144-152</sub> 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- $\gamma$  ELISPOT アッセイ、細胞傷害性試験を用いて GPC3<sub>144-152</sub> ペプチド特異性を評価し、樹立した CTL クローンが GPC3<sub>144-152</sub> 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、TCR- $\beta$  鎖遺伝子配列解析によって 3 株が異なる TCR- $\beta$  鎖を持ち、異なる機能親和性を示す 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- $\gamma$  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、最も高い機能親和性を持つ CTL クローンにおいて、GPC3 陽性がん細胞に対する IFN- $\gamma$  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、GPC3<sub>144-152</sub> 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 GPC3<sub>144-152</sub> ペプチドワクチン投与により GPC3<sub>144-152</sub> 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。

## 論文審査の結果の要旨

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、そのうちのひとつとして「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、現在の所、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試験を行ってきた。その結果、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 が誘導されることが確認され、そのうち、2 名の患者において腫瘍の退縮が認められた。

本研究では、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これら 2 例の患者の抹消血から GPC3 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。その結果、樹立されたすべての CTL クローンにおいて、GPC3 陽性のがん細胞株に対する、IFN- $\gamma$  産生能と細胞傷害活性が確認された。これらの結果から、GPC3 ペプチドワクチンにより著明な臨床効果を示し巣患者においては、ペプチドワクチン投与により高い機能親和性をもって GPC3 陽性がん細胞に対して細胞傷害活性を示す CTL が誘導されたことが明らかになった。

本論文の成果は、HCC に対する有効な免疫療法を確立する上で、重要な知見となりうる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと判定する。