

平成23年3月

吉川聡明 学位論文審査要旨

主査	岡田	太
副主査	佐藤	建三
同	林	眞一

主論文

HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells

(ペプチドワクチンにより誘導されたHLA-A2拘束性グリピカン3特異的CTLクローンは高親和性であり癌細胞傷害性を示した)

(著者：吉川聡明、中津川宗秀、鈴木史朗、白川博文、信岡大輔、酒村智子、本村裕、田中ゆきえ、林眞一、中面哲也)

平成23年 Cancer Science 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

HLA-A2-restricted glypican-3 peptide-specific CTL clones induced by peptide vaccine show high avidity and antigen-specific killing activity against tumor cells

(ペプチドワクチンにより誘導されたHLA-A2拘束性グリピカン3特異的CTLクローンは高親和性であり癌細胞傷害性を示した)

現在までに世界中で様々な癌抗原のペプチドワクチン療法が試みられているが、免疫学的モニタリングと臨床効果の相関がみられないことや、ペプチドに対して低親和性の細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導されることや、使用したペプチドが癌細胞にはほとんど提示されていないことなども報告されている。中面らは肝細胞癌 (HCC) に特異的に高発現する遺伝子としてGlypican-3 (GPC3) を同定した。GPC3は、正常組織においては胎生期の肝臓あるいは免疫学的に隔離された胎盤でしか発現がみられなく、副作用の少ない理想的な腫瘍拒絶抗原になり得ることを確認した。本研究では、進行肝細胞癌を対象としたGPC3ペプチドワクチン臨床第 I 相試験を行い、ワクチン投与前後の患者末梢血単核球 (PBMC) を使用し免疫学的モニタリングによりワクチンの免疫学的効果を解析すること、及びGPC3ペプチド特異的CTLの機能解析を目的とした。

方 法

HLA-A2の進行肝細胞癌患者14名にGPC3144-152 (FVGEFFTDV) ペプチドワクチンを投与した。投与量は0.3 mg、1 mg、3 mg、10 mg、30 mgの5段階とし、2週間毎にワクチン投与及び採血を行った。採血から得られたPBMCを以下の解析に使用した。Ex vivo IFN- γ ELISPOT assayを行い、PBMC中のGPC3特異的CTLの頻度をワクチン投与前後で比較した。また、ワクチン投与後のPBMCをGPC3ペプチドとIL-2で刺激し、GPC3ペプチド特異的CTLを誘導した。Dextramerソート、Ex vivo Dextramerソート、CD107aソートの3通りの方法から、FACS Ariaを使用したシングルセルソートによりCTLクローンを作製した。CTLクローンの機能解析として、GPC3-Dextramer再解析、癌細胞株をターゲットに用いたIFN- γ ELISPOT assay、及び細胞傷害性試験を行った。

結 果

Ex vivo IFN- γ ELISPOT assayにおいて、GPC3特異的CTLの頻度はワクチン投与前 (平均

値6.5、範囲0-43)と比較して、ワクチン投与後(平均値96、範囲5-441)で増加していた。患者14名中12名(86%)でGPC3特異的CTLの頻度の増加が認められた。また、ワクチン投与後のGPC3特異的CTLの頻度とワクチン投与量の間には正の相関が認められた。さらに、患者3名(A2-9、A2-14、A2-8)のPBMCから3通りの方法でCTLクローンを樹立した。GPC3-Dextramer再解析により、樹立したCTLクローンのGPC3ペプチド特異性が認められた。また、その親和性はそれぞれA2-9:10⁻¹⁰ M、A2-14:10⁻¹⁰ M、A2-8:10⁻¹¹ Mであり高親和性であった。これらのCTLクローンはHLA-A*02:01陽性、GPC3陽性肝癌細胞株に対してIFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。しかし、GPC3弱陽性のメラノーマ細胞株526mel1に対しては、最も高親和性であるA2-8クローン(10⁻¹¹ M)のみがIFN- γ 産生及び細胞傷害性を示した。さらに、CTLクローンのIFN- γ 産生及び細胞傷害性は、抗HLA-A2抗体、抗HLA-class I抗体により抑制された。また、GPC3-siRNA導入により肝癌細胞株HepG2のGPC3発現量を低下させることでCTLクローンのIFN- γ 産生は抑制された。

考 察

GPC3-siRNA導入による解析から、GPC3特異的CTLクローンは癌細胞から内因性に提示されたGPC3に由来するペプチドを認識し、細胞を傷害しうることが示唆された。Dextramerソートにより樹立したCTLクローンは、GPC3陽性の肝癌細胞株を傷害したが、GPC3弱陽性の526mel1は認識できなかった。より高い親和性のCTLクローンを樹立するためにCD107aソートを行い、Dextramerソートよりもさらに親和性が高く、526 mel1も傷害できるCTLクローンが樹立された。このことより、GPC3発現量の低い癌細胞を傷害するには、より高い親和性が必要であると考えられた。

結 論

GPC3ペプチドワクチンの投与により、患者末梢血中のGPC3特異的CTLの頻度の増加が確認され、そこには投与量依存性も認められた。さらに樹立したCTLクローンの解析により、GPC3特異的CTLはGPC3ペプチドに対して高親和性であり、HLA-class I拘束性かつGPC3特異的に癌細胞を傷害しうることが示された。