

氏名（本籍）	いわ ま たつ あき 岩 間 達 章（千葉県）
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	甲第1090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	肝細胞がんが発現する GPC3 を標的とした ペプチドワクチン療法の開発

論文審査委員（主査）教授 安部 良
教授 後飯塚 僚 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 小園 晴生

論文内容の要旨

肝臓がんの罹患率および死亡率は、世界的に非常に高く新たな治療法の開発が期待されている。肝臓がんの大半は肝細胞がん（HCC）である。グリピカン3（Glypican-3: GPC3）はHCCやメラノーマ、卵巣がんが発現するが、胎盤や胎児期の肝臓を除く正常組織では発現しないことが知られている。このことから、GPC3はHCCを標的とした免疫療法を行うにあたって理想的な腫瘍関連抗原（TAA）と考えられる。

がん抗原ペプチドをワクチンとして投与するペプチドワクチン療法は、有望な免疫療法の1つとして期待されている。最近、CD8⁺T細胞が認識するGPC3のT細胞エピトープ（抗原決定基）として、HLA-A*24:02およびHLA-A*02:01拘束性ペプチドが同定され、これらのペプチドを用いた臨床試験が行われた。その結果、GPC3ペプチドワクチンの安全性、ペプチド特異的細胞傷害性T細胞（CTL）の生体内での増加、生存期間の延長が確認された。しかしながら、抗腫瘍効果が認められたのは一部の患者に限定的なものであった。したがって、GPC3ペプチドワクチンの効果を高めるために、何らかの改善が必要と考えられる。

近年、短期間でHCCを発症する非アルコール性肝炎マウスモデル（STAMマウス）が開発された。このマウスのHCCにはGPC3が発現する。それ故に、GPC3ペプチドワクチンの効果を判定するために有用なモデルと考えられる。STAMマウスは背景がB6マウスであり、bハプロタイプのMHCクラスIを発現する。しかしながら、これらのGPC3由来CTLエピトープ

プは同定されていない。したがって、bハプロタイプのMHC-I拘束性CTLエピトープを同定することができれば、自然発症HCCに対するペプチドワクチンの効果判定を可能にするモデルを構築することができる。

本研究では、ソフトウェアを用いてH2-K^bまたはH2-D^bに結合ペプチドを予測・選出後、候補ペプチドの結合アッセイを実際に行って結合力を評価した。これに基づいて選出した11種のペプチドをB6マウスにワクチン投与し、ペプチド特異的CTL誘導能を検討した。その結果、mGPC3-1 (AMFKNNYPSL) がペプチド特異的CTLを誘導できることが明らかとなった。さらにmGPC3-1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)株を樹立してGPC3発現がん細胞株と共培養を行ったところ、mGPC3-1特異的CTLは、GPC3を内因性に発現するがん細胞株に対してIFN- γ を産生した。これにより、mGPC3-1がMHC-I分子によって提示され、実際にCTLに認識されるT細胞エピトープであることが明らかになった。本研究により同定されたGPC3T細胞エピトープはGPC3ペプチドワクチンの生体内効果を判定する為に有用と考えられる。

最近、マウスモデルを用いた解析で、IFA混合ペプチドワクチンはCTLの低応答を引き起こすことが報告された。ペプチドワクチンによる抗腫瘍効果を改善するには、IFA以外の他のワクチン法を応用することが望ましいと考えられる。また、進行肝細胞がん患者を対象としたGPC3ペプチドワクチンの第1相臨床試験では、IFA混合GPC3ペプチドワクチンが用いられており、効果の改善の為に新しいワクチン法を早急に開発することが望まれる。

近年、抗原ペプチドにリポソームを結合したワクチンが、ウイルス感染防御やモデル抗原発現がん細胞に対する抗腫瘍効果を発揮することが報告された。このことから、ペプチド結合リポソームはIFA混合ペプチドワクチンに代わる新たながんペプチドワクチン法の選択肢になると考えられる。我々はGPC3ペプチド結合リポソームを作製し、それをマウスに投与することによりGPC3ペプチド特異的CTL誘導能および抗腫瘍効果の検討を行った。GPC3ペプチド結合リポソームとToll様受容体9(TLR9)のアゴニストを共にマウスへ投与して、ペプチド特異的CTLが誘導されるかを評価した。その結果、HLA-A2拘束性エピトープおよびH2-K^b/D^b拘束性エピトープどちらを用いた場合においてもペプチド特異的CTLの誘導が観察された。また、IFA混合GPC3ペプチドワクチンを投与した場合に比較して、GPC3ペプチド結合リポソームワクチンは、CTL誘導効率が高いことが明らかになった。また、この誘導効果の増強にはペプチドとリポソームの結合が重要であった。さらにHLA-A2トランスジェニックマウスを用いた解析により、GPC3結合リポソームワクチンは、ペプチドを結合していないリポソームに比べ、腫瘍の成長が著しく抑制されることを明らかにした。しかしながら、腫瘍の生着を完全に防ぐことはできなかった。

以上まとめると、GPC3ペプチド結合リポソームワクチンは、生体内で効率よくペプチド

特異的 CTL を誘導し、その誘導効率は従来の IFA 混合 GPC3 ペプチドワクチンよりも高いことが明らかとなった。また、腫瘍の成長を抑制する効果に優れることが明らかになった。これらの観察は GPC3 ペプチド結合リポソームワクチンが IFA 混合ペプチドワクチンに代わる新しいがんペプチドワクチンになる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

肝臓がんの罹患率および死亡率は、世界的に非常に高く新たな治療法の開発が期待されている。肝臓がんの大半は肝細胞がん (HCC) である。グリピカン 3 (Glypican-3: GPC3) は HCC やメラノーマ、卵巣がんに発現するが、胎盤や胎児期の肝臓を除く正常組織では発現しないことが知られている。このことから、GPC3 は HCC を標的とした免疫療法を行うにあたって理想的な腫瘍関連抗原 (TAA) と考えられる。

がん抗原ペプチドをワクチンとして投与するペプチドワクチン療法は、有望な免疫療法の 1 つとして期待されており、GPC3 陽性 HCC に対してもペプチドを用いた臨床試験が行われた。その結果、GPC3 ペプチドワクチンの安全性、ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生体内での増加、生存期間の延長が確認された。しかしながら、抗腫瘍効果が認められたのは一部の患者に限定的なものであった。

本研究では、GPC3 ペプチドワクチンの効果を高めるために、短期間で HCC を発症する非アルコール性肝炎マウスモデル (STAM マウス) を用いて、GPC3 を発現する HCC に対して、より安定で、かつ強力な CTL を誘導するワクチン法の開発を目指した。

進行肝細胞がん患者を対象とした GPC3 ペプチドワクチンの第 1 相臨床試験では、IFA 混合 GPC3 ペプチドワクチンが用いられている。最近、マウスモデルを用いた解析で、IFA 混合ペプチドワクチンは CTL の低応答を引き起こすことが報告された。このことから、ペプチドワクチンによる抗腫瘍効果を改善するには、IFA 以外の他のワクチン法を応用することが望ましいと考えた。

近年、抗原ペプチドにリポソームを結合したワクチンが、ウイルス感染防御やモデル抗原発現がん細胞に対する抗腫瘍効果を発揮することが報告された。そこで、ペプチド結合

リポソームは IFA 混合ペプチドワクチンに代わる新たながんペプチドワクチン法の選択肢になると考え、GPC3 ペプチド結合リポソームを作製し、それをマウスに投与することにより GPC3 ペプチド特異的 CTL 誘導能および抗腫瘍効果の検討を行った。GPC3 ペプチド結合リポソームと Toll 様受容体 9 (TLR9) のアゴニストを共にマウスへ投与したところ、IFA 混合 GPC3 ペプチドワクチンを投与した場合に比較して、GPC3 ペプチド結合リポソームワクチンは、CTL 誘導効率が高いことが明らかになった。さらに HLA-A2 トランスジェニックマウスを用いた解析により、GPC3 結合リポソームワクチンは、ペプチドを結合していないリポソームに比べ、腫瘍の成長が著しく抑制されることを明らかにすることができた。これらの結果は、GPC3 ペプチド結合リポソームワクチンが IFA 混合ペプチドワクチンに代わる新しいがんペプチドワクチンになる可能性を示唆するものである。

この研究は、難治性の HCC に対する有効な免疫療法の開発につながるものと期待されることから、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。