

特集：特異抗原をターゲットとした Immunotherapy

総 説

新規癌胎児性抗原 Glypican-3 の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用

西村 泰治, 中面 哲也, 千住 寛

Usefulness of a novel oncofetal antigen, Glypican-3, for diagnosis and immunotherapy of hepatocellular carcinoma

Yasuharu NISHIMURA, Tetsuya NAKATSURA and Satoru SENJU

Department of Immunogenetics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

(Received July 15, 2008)

summary

We identified glypican-3 (GPC3), as a novel oncofetal antigen, overexpressed specifically in hepatocellular carcinoma (HCC) and melanoma in humans by utilizing genome-wide cDNA microarray analyses of HCC tissues and normal fetal and adult tissues. We also found that GPC3 is a novel tumor marker for HCC and melanoma, and 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 H-2K^d-restricted GPC3 298-306 peptide thus seemed to be useful for the immunotherapy of HLA-A24⁺ patients with HCC and melanoma. 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. 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. We have recently started a phase I clinical trial of GPC3 peptide vaccine-based immunotherapy of patients with advanced HCC.

We have also succeeded in inhibition of growth of tumors expressing mouse GPC3 by immunization of mice with dendritic cells differentiated in vitro from mouse embryonic stem cells and pulsed with the GPC3 peptides. Our study raises the possibility that these GPC3 peptides may therefore be applicable to cancer immunotherapy for a large number of patients with HCC and melanoma.

Key words——肝細胞癌 (HCC) ; 癌特異抗原 ; Glypican-3 (GPC3) ; 癌免疫療法 ; ES-DC

抄 録

ヒトの肝細胞癌組織と正常組織における cDNA マイクロアレイ解析により、肝細胞癌に高発現する遺伝子として Glypican-3 (GPC3) を同定した。GPI アンカー膜蛋白質である GPC3 は、肝細胞癌患者の約 40% の血清中に検出される新規癌胎児性抗原であり、 α フェト蛋白、PIVKA-II につぐ肝細胞癌の第 3 の腫瘍マーカーとして有用であることを示した。また、マウスに GPC3 ペプチドを負荷した樹状細胞を投与した後に、マウス GPC3 を発現する癌細胞株を移植すると、自己免疫現象を伴うことなく著明な腫瘍の増殖抑制と生存期間の延長を誘導できた。さらに、HLA-A2 トランスジェニックマウスや、癌患者の血液検体を利用して、HLA-A2 あるいは A24 によりヒト・キラー T 細胞に提示される GPC3 ペプチドを同定した。これらのペプチドで癌患者のリンパ球を刺激することにより、GPC3 発現ヒト肝細胞癌細胞株を傷害するヒト・キラー T 細胞を誘導できた。これらの GPC3 ペプチドを用いた、肝細胞癌の免疫療法に関する臨床試験を開始した。また、我々はマウス胚性幹 (ES) 細胞から樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を開発し、マウス GPC3 を発現する ES-DC をマウスに免疫したところ、GPC3 発現マウス癌細胞株に対する in vivo 抗腫瘍効果の誘導が観察された。

はじめに

癌細胞にのみ発現する抗原を免疫することにより、癌細胞を攻撃して破壊する T 細胞を誘導する免疫療法を確立するために、様々な癌抗原ワクチンの開発が試みられている。従来、正常組織に発現を認めず癌細胞に特異的に高発現する癌抗原を同定することは困難であったが、cDNA マイクロアレイ解析による癌組織と正常組織におけるゲノムワイドの遺伝子発現プロファイル解析により、癌特異抗原の同定が飛躍的に進んだ。我々は、この手法を用いて多数の癌特異抗原を同定し、これを用いた癌免疫療法の臨床試験を開始している。本稿では、肝細胞癌に高発現する新規癌胎児性抗原である Glypican-3 (GPC3) の発見と、その癌免疫療法への応用について紹介する。

さらに、筆者らは、細胞ワクチンとして用いる樹状細胞の供給源として胚性幹 (ES) 細胞に着目し、ES 細胞由来の樹状細胞 (ES-DC) を用いた免疫療法の開発に関する基礎研究を行っている。本稿では、マウスの腫瘍モデルを用いた ES 細胞から分化誘導した ES-DC による腫瘍免疫の誘導に関する研究成果、ならびに、最近開発したヒト ES-DC の分化誘導法についても紹介する。

I. 肝細胞癌 (HCC) に対する免疫療法の現況

肝細胞癌 (HCC) の患者数は、欧米およびアジア諸国において依然として増加している。HCC 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、B 型および C 型肝炎と、それに引き続いて発症する肝硬変から発生する、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ている。

慢性肝炎、肝硬変患者における HCC の発症予防や、HCC 術後における術後化学療法は、いまだ開発途上にある。HCC に対する免疫療法についても、1990 年代より lymphokine-activated killer (LAK) cells, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), peripheral blood mononuclear cell (PBMC) を用いた養子免疫療法、DC ワクチン療法、 α フェト蛋白質由来のペプチドワクチン療法などが試みられている。また HCC において高発現する癌特異的抗原も複数報告されており、各施設でその有用性が検討されている¹⁾。

II. 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) の発見

1. cDNA マイクロアレイ解析による HCC 特異的な癌胎児性抗原の発見

我々は、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らとの共同研究により、癌部と非癌部における cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾を用いて肝細胞癌 (HCC) 特異的に高発現する遺伝子として Glypican-3 (GPC3) を同定した³⁾。図 1A に示すように、GPC3 は正常な肝細胞と比較して HCC の約 80% の症例の HCC 組織において高発現しているが、成人の正常組織には、ほとんど発現していない。いっぽう GPC3 は胎盤や胎児期の肝臓、肺あるいは腎臓に高発現しており、いわゆる癌胎児性抗原 (Carcinoembryonic antigen あるいは Oncofetal antigen) の範疇に入る蛋白質である。

2. GPC3 の構造と機能

膜結合型糖蛋白質である Glypican ファミリーは、現在までのところ 6 種類が報告されている⁴⁾。GPC3 は、580 アミノ酸からなる 60 kD のコア蛋白質にヘパラン硫酸糖鎖修飾が加わった膜蛋白質で、C 末端が GPI アンカーにより形質膜に結合している。Pilia らは、X 染色体 (Xq26) 連鎖疾患である巨人症の一つである、Simpson-Golabi-Behmel 症候群において、GPC3 の遺伝子変異を報告している。また、GPC3 ノックアウトマウスでも、Simpson-Golabi-Behmel 症候群と同様に体の巨大化などの表現型を示すことが報告されている。

GPC3 は、ある種の腫瘍細胞では増殖を抑制したり、あるいはアポトーシスの誘導に関連があると報告されている⁵⁾。近年、GPC3 コア蛋白質が直接 Wnt と結合することにより、Wnt シグナルを活性化し、肝細胞癌の増殖を促進することが報告されている⁶⁾。

III. HCC 癌組織における GPC3 の発現と腫瘍マーカーとしての有用性

我々は、GPC3 遺伝子の発現量の差が、その遺伝子産物である蛋白質量の差として反映されているか否かについて RT-PCR 法、ならびに組織切片における免疫組織化学的解析を用いて確認した (図 1B, C)。その結果、GPC3 は蛋白質レベルにおいても、胎児期の肝臓組織に発現するが出生後発現なくなり、HCC において再び発現することを確認し

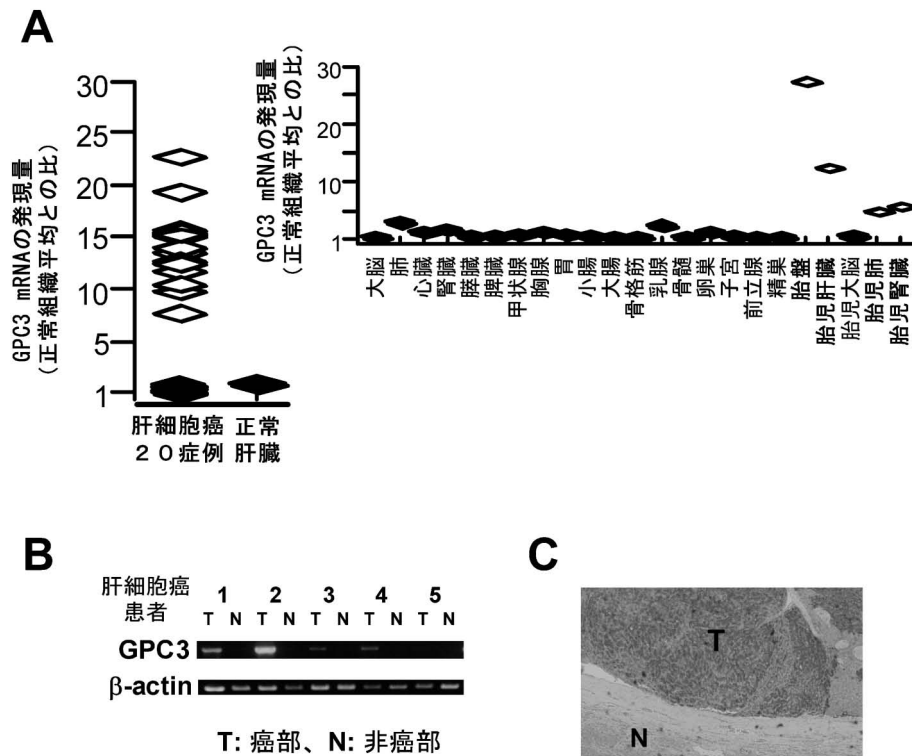


図1 HCC 20 症例の癌部、非癌部および多様な正常臓器における GPC3 遺伝子発現の cDNA マイクロアレイ解析データ²⁾と HCC 組織における GPC3mRNA および蛋白質の発現

A: HCC 患者 20 症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、さらに胎生期の 4 臓器を含む 23 臓器の正常組織において、各遺伝子の発現プロファイルを解析した。GPC3 は、肝臓癌患者 20 症例中 16 症例で癌部/非癌部の発現の比が 5 以上 (平均 396.2) で、胎盤や胎生期の肝臓および腎臓に発現する以外は、ほとんどの成人の正常臓器に発現を認めない、癌胎児性抗原をコードする遺伝子であった。B: HCC 組織の癌部 (T) と非癌部 (N) における GPC3 mRNA の発現の有無を RT-PCR 法にて検討したところ、癌部においてのみ GPC3 の発現を認めた。C: HCC 組織切片における GPC3 蛋白質の発現を、抗 GPC3 抗体を用いた免疫組織学的解析により確認した。

た。

さらに HCC 患者の約 40% の血清中に可溶性 GPC3 が検出されるが、健康人、慢性肝炎、その他の肝疾患では全く検出されず、HCC の血清腫瘍マーカーとして有用であることを発見した³⁾。また HCC の外科的な治療後に、血清 GPC3 が消失あるいは減少することから、治療効果の判定などの臨床への応用が期待される。

IV. 癌免疫療法のターゲットとしての GPC3 の有用性

1. マウスにおける抗腫瘍免疫の解析

発現の組織特異性が優れていることから、我々は癌胎児性抗原 GPC3 が、理想的な腫瘍拒絶抗原になり得るかどうかについてマウスを用いて検討した。日本人の約 60% が所有する 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、非常に類似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、アミノ酸配列のレベルで 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 および K^d のいずれにも結合すると予測される GPC3 由来のペプチドを合成した。このペプチドを骨髄由来樹状細胞に負荷し、BALB/c マウスに免疫して解析することにより、K^d 分子に結合して細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に提示される K^d 拘束性 CTL エピトープペプチドを同定した⁷⁾。

このエピトープペプチドを負荷した骨髄由来樹状細胞ワクチンを腹腔内に予防的に投与した BALB/c マウスでは、コントロール群に比べてマウス GPC3 遺伝子を強制発現させたマウス大腸癌細胞株の増殖は著明に抑制され、さらにマウスの生存期間の延長が確認された⁷⁾。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。

2. HCC 患者における GPC3 特異的 CTL の誘導

日本人の HLA-クラス I 対立遺伝子のうち、HLA-A24 (A*2402) は日本人の約 60% が所有し、

HLA-A2 (*A*0201*) は約 20% が所有する, ありふれた対立遺伝子である. そこでヒトとマウスの 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 種類選択した. これらのペプチドを HLA-A2 トランスジェニックマウス (HLA-A2 Tgm) に免疫した後に, ELISPOT アッセイにより最も強く GPC3 特異的 CTL を誘導出来るエピトープペプチドを探索することにより, ペプチド A2-3; GPC3₁₄₄₋₁₅₂ を同定した. さらに, この GPC3 A2-3 ペプチドを負荷した BM-DC にて 2 回免疫した HLA-A2 Tgm では, 重要臓器 (脳, 皮膚, 心, 肺, 肝, 腎) において自己免疫反応は生じておらず, その安全性が示唆された.

HLA-A2 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ と, H-2K^d (≡HLA-A24) 拘束性 CTL エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ を用いて, HLA-

A2 または HLA-A24 陽性の HCC 患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を刺激して, ペプチド特異的 CTL の誘導を試みた. その結果, GPC3₁₄₄₋₁₅₂ ペプチドを用いて HLA-A2 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 10 名中 5 名の PBMC より, また, GPC3₂₉₈₋₃₀₆ ペプチドを用いて HLA-A24 陽性 GPC3 陽性 HCC 患者 12 名中 6 名の PBMC より, 各 CTL エピトープに特異的な CTL を誘導できた⁸⁾ (表 1).

さらに, 重症混合型免疫不全をもつことより, ヒトの細胞を拒絶できない NOD/SCID マウスに GPC3 遺伝子を強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下移植して生着させた. その後に, HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ で刺激することにより, HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト GPC3 特異的 CTL 株を静脈注射により養子免疫した. GPC3 エピトープペプチドで誘導した CTL 株を投与した

表 1 HLA-A2 あるいは A24 陽性 HCC 患者 (それぞれ Pt-A2, Pt-A24) の約 50% において, GPC3 特異的な CTL が誘導された.

患 者	年 令	性 別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A2-1	80	F	IIIa	+	+	+
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	IIIa	+	+	-
Pt-A2-8	73	M	II	ND	ND	+
Pt-A2-9	68	F	IIIa	+	+	-
Pt-A2-10	54	M	II	+	+	-
患 者	年 令	性 別	癌の進行度 ¹⁾	GPC3 の発現 ²⁾	HLA の発現 ³⁾	CTL の誘導 ⁴⁾
Pt-A24-1	60	M	IVa	+	+	+
Pt-A24-2	57	M	IVa	+	+	-
Pt-A24-3	75	F	IIIa	+	+	+
Pt-A24-4	59	M	IIIa	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	IIIa	+	+	+

1) TNM 分類を用いた.

2) 免疫染色を用いて, 腫瘍周囲の正常組織と比較して発現を確認した.

3) 免疫染色により膜が染色された場合に, 発現ありと判断した.

4) GPC3 発現 HCC 細胞株 HepG2 に対する細胞傷害活性が, E/T 比 20 で 20% 以上観察された場合に, CTL を誘導できたと判断した.

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観察された⁸⁾ (図 2)。

現在、国立癌センター東病院にて HLA-A2 あるいは -A24 陽性の HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床第 1 相試験を展開中である。

V. 樹状細胞ワクチンを作製するための材料としての ES 細胞の有用性

現在、樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法には、アフエーシス (成分採血) により分離した末梢血白血球中の単球を GM-CSF 等のサイトカインを加えて培養し、分化誘導することにより作製された樹状細胞が用いられている。しかしながら、この方法には、アフエーシス操作に伴う患者への負担、さらに、末梢血白血球から分離される単球の数や単球か

ら樹状細胞への分化誘導効率に個人差があるため、樹状細胞の収量が不安定であることなど、医療技術として広く普及するにはいくつかの問題がある。

筆者らは、ES 細胞を材料にして細胞ワクチンとして用いる樹状細胞を作製することを考え、数年前に研究を開始した。ES 細胞は、適切な条件の下で培養することにより、未分化な状態を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、樹状細胞の材料として ES 細胞を用いることが可能になれば、材料をいくらでも増やすことができることになり、細胞ドナーへ新たな負担をかけることなく大量の樹状細胞を作製できる。また、ES 細胞は、電気穿孔法あるいはリポフェクション等により、ウイルスベクターを使用することなく、遺伝子導入を行うことが可能であり、さらに、遺伝子導入細胞のクローンを作製することも可能である。そこで、ES 細胞の段階で遺伝的改変を行い、適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択し、これを樹状細胞に分化誘導すれば、樹状細胞の遺伝的改変を容易に行うことができる。これにより、抗原分子あるいは各種の免疫制御分子を人為的に発現させるなど、機能を様々に修飾した樹状細胞を作製することができるという利点もある。

VI. マウス ES 細胞からの樹状細胞の作製法

筆者らは、まず、マウスの ES 細胞から樹状細胞を分化誘導する方法の開発に取り組んだ。そして、OP9 細胞 (正常な M-CSF 遺伝子を欠損した op/op マウスに由来する骨髓ストローマ細胞株) と共培養することにより、マウス ES 細胞から血液細胞への分化誘導を行う仲野らの方法⁹⁾を参考にして、マウス ES 細胞から樹状細胞を作製する培養プロトコルを確立した¹⁰⁾。

まず、ES 細胞の中胚葉性細胞への分化を促すために、ES 細胞を単層培養している OP9 細胞とともに 5-6 日間培養する。この結果、ほとんどの ES 細胞が、中胚葉系細胞へ分化する。次に、分化した細胞をトリプシン/EDTA を用いて培養プレートから回収し、新たに準備した OP9 細胞上で GM-CSF の存在下で 5-6 日間培養する。この結果誘導される ES 細胞由来のミエロイド系の細胞を細菌培養用のペトリディッシュに移し、さらに GM-CSF の存在下で培養を続けると 7-10 日目頃より不規則な樹状突起を有する浮遊性の細胞が出現する。この細胞は、マウスの骨髓細胞から GM-CSF を用いて分化

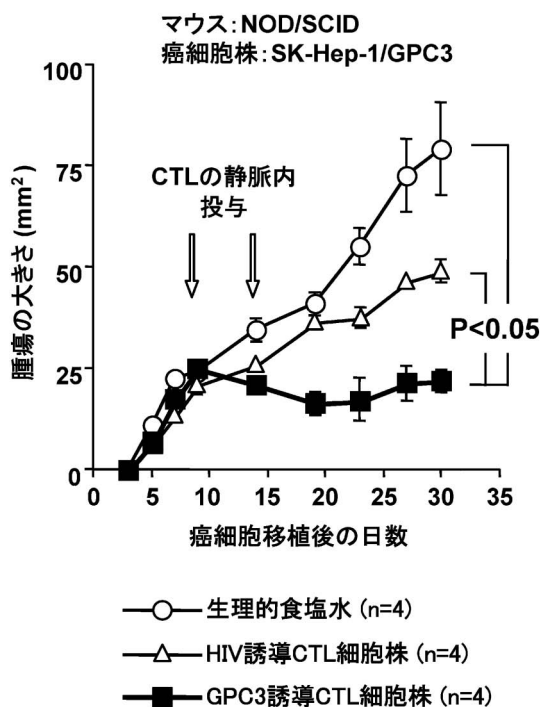


図 2 免疫不全マウスに移植した GPC3 発現ヒト HCC 細胞株に対するヒト CTL 養子免疫療法の有効性

NOD/SCID マウスの背部の皮下に、ヒト HCC 細胞株 SK-Hep-1 に GPC3 遺伝子を強制発現させた SK-Hep-1/GPC3 を 1×10^7 個移植し、移植後 9 日目に 5×5 mm の大きさになった時点と、その 5 日後 (移植後 14 日目) に CTL を 8×10^7 個、計 2 回静脈内に投与した。HCC 患者の PBMC を GPC3 エピト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 エピトープペプチドで誘導した CTL 投与群 (△)、生理食塩水のみを投与した群 (○) の間で比較すると、GPC3 特異的 CTL 投与群ではコントロール群に比べ、有意に腫瘍の増殖が抑制されていた。

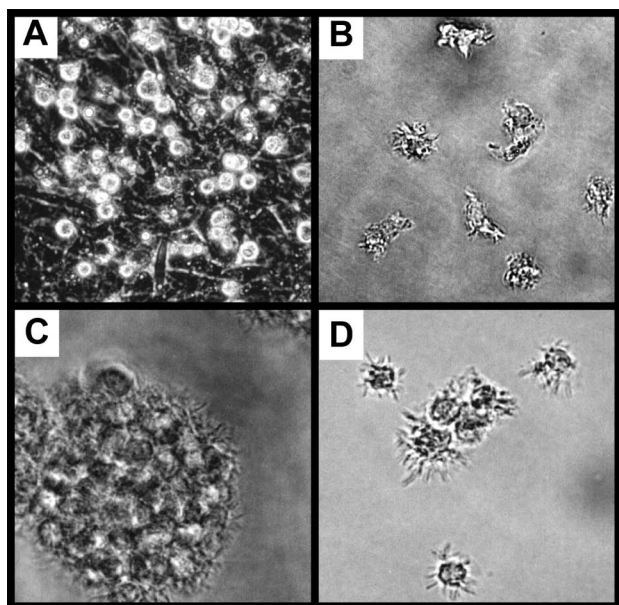


図3 マウス ES-DC の分化にともなう細胞形態の変化

A : OP9 細胞上で ES 細胞から分化した血球系細胞, B : 分化細胞をペトリディッシュへ植え継いだ後に出現した ES-DC, C : IL-4, TNF- α , 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC, D : IL-4, LPS, 抗 CD40 抗体を同時に加えて成熟した ES-DC.

誘導した樹状細胞と同等の抗原提示機能と T 細胞刺激活性を有しており, また, 形態および表面マーカー等から, ミエロイド系樹状細胞に相当すると考えられる. これをさらに TNF- α , IL-4, 抗 CD40 抗体, LPS 等で刺激すると, 著明な樹状突起を有し, より強力な T 細胞刺激活性を有する成熟樹状細胞が誘導される. この ES 細胞由来の樹状細胞を, ES-DC と名付けた. 図 3 に OP9 細胞の上に出現した ES 細胞由来の浮遊細胞から ES-DC への分化に伴う細胞形態の変化を示す.

VII. GPC3 遺伝子を強制発現させたマウス ES-DC による抗腫瘍免疫の誘導

筆者らは, 図 4 に示す遺伝子導入 ES-DC を作製する手順により, モデル腫瘍抗原として OVA (卵白アルブミン) 抗原を発現する ES-DC を作製した. この OVA 発現 ES-DC をマウス個体に移入することにより, OVA 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞を感作することができた. また, この ES-DC を *in vitro* でマウスの脾臓由来の T 細胞と共培養して刺激した場合も, OVA 抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化することができた. さらに, この樹状細胞を投与することにより OVA 抗原に対して感作したマウスは, OVA を発現するマウス腫瘍細胞 (MO4) を移植した場合に, これを拒絶することが

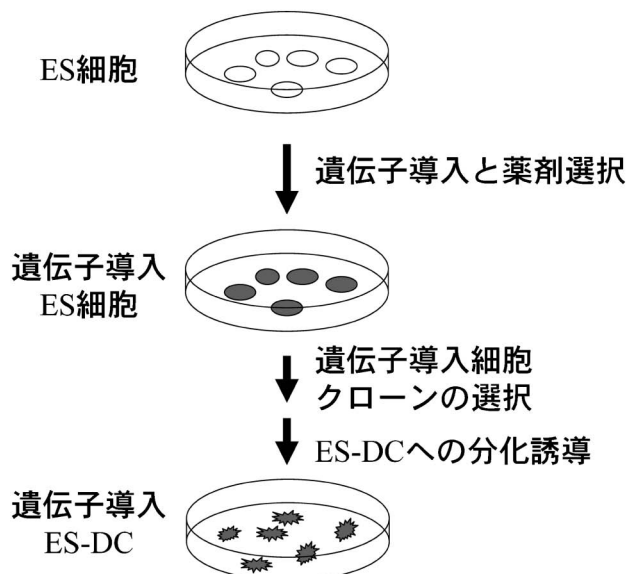


図4 遺伝子導入 ES-DC の作製手順

まず, リポフェクションあるいは電気穿孔法により, 未分化状態にある ES 細胞へ, 抗原あるいは免疫制御分子等の遺伝子発現ベクターを導入する. ベクターに付加している薬剤耐性遺伝子に合わせて G418 あるいはジェーロマイシン等の薬剤を加えて培養すると, ベクターが導入された ES 細胞のクローンがコロニーとして出現する. 複数の ES 細胞クローンを単離し, その中から適切な遺伝子改変 ES 細胞クローンを選択して増殖させる. 樹立した遺伝子導入 ES 細胞クローンを ES-DC に分化誘導することにより, 遺伝子導入 ES-DC をいくつでも作製することができる.

できた¹¹⁾.

ES-DC による免疫療法では, モデル抗原である OVA を用いた場合だけでなく, 腫瘍細胞に自然に発現している腫瘍抗原を標的とした抗腫瘍免疫応答の誘導も可能である. Glypican-3 は, 筆者らがヒトの肝細胞がんおよびメラノーマに発現する新規癌胎児性抗原として同定したものである. 前述の方法を用いて ES-DC に Glypican-3 を強制発現させたものをマウス個体に予防的に投与することにより, 図 5 に示すようにマウスの皮下に移植された, Glypican-3 を自然に発現するマウスメラノーマ細胞 B16-F10 の増殖を著明に抑制し, さらにマウスの生存期間を延長することが可能であった¹²⁾.

VIII. 抗原とケモカインを同時に発現するマウス ES-DC を用いた抗腫瘍免疫応答の誘導

筆者らは, ES-DC に T 細胞の遊走を促すケモカインを発現させることにより, 生体移入した ES-DC がリンパ性臓器へ遊走できなくても, ES-DC が存在する場所へ T 細胞が集まり, その場所で ES-DC から T 細胞へ抗原刺激が伝えられ, 抗原特異的な T 細胞を活性化する効果を高めることがで

皮下移植されたB16-F10メラノーマ細胞株を用いた予防実験

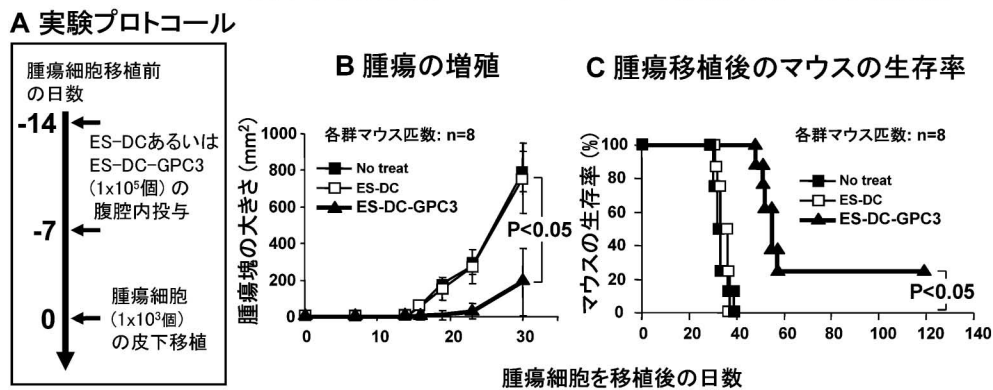


図5 肝細胞癌の新規癌胎児性抗原 Glypican-3 を発現する ES-DC による抗腫瘍効果の誘導

マウス ES 細胞にマウス GPC3 遺伝子を導入して発現させ、ES-DC (ES-DC-GPC3) を分化誘導した。A；遺伝子改変を加える前の ES-DC (□)，あるいは ES-DC-GPC3 (▲) をマウスの腹腔内に 7 日間隔で 2 回投与した。そして、2 回目の投与から 7 日後に、これらのマウスと未処置対照群マウス (■) の皮下に、GPC3 遺伝子を自然に発現するメラノーマ細胞 (B16-F10) を移植し、B；その後の腫瘍の大きさの変化と、C；マウスの生存期間を観察した。

皮下移植されたMO4メラノーマ細胞株を用いた予防実験

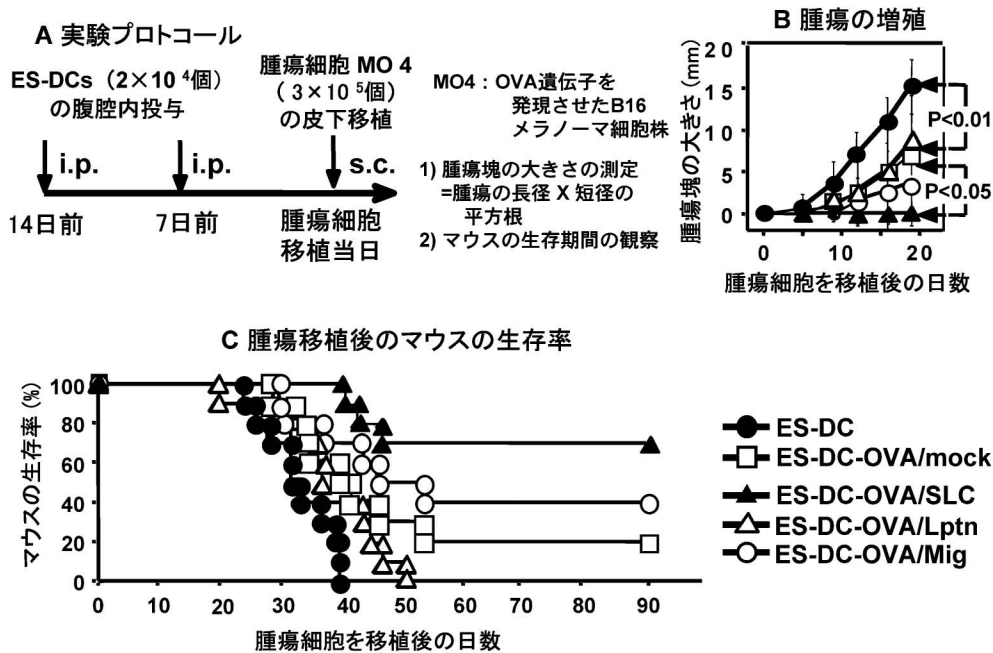


図6 導入遺伝子由来のケモカインとモデル腫瘍抗原 OVA を同時に発現する ES-DC による抗腫瘍効果の増強

マウス ES 細胞への遺伝子導入とクローンの選択を 2 回繰り返すことにより、モデル腫瘍抗原として OVA 抗原と、T 細胞の遊走を誘導するケモカイン (SLC, Lymphotactin, あるいは Mig) の遺伝子を同時に発現する ES-DC (それぞれ ES-DC-OVA/SLC ▲, ES-DC-OVA/Lptn △, ES-DC-OVA/Mig ○) を作製した。A；これらの遺伝的改変 ES-DC (▲, △, ○)，遺伝子改変を加える前の ES-DC (●)，あるいは OVA のみを発現する ES-DC (ES-DC-OVA/mock □) をマウス腹腔内に 7 日間隔で 2 回投与した。そして、2 回目の投与から 7 日後に、OVA 遺伝子を強制発現させた腫瘍細胞 (MO4) を皮下に移植し、B；その後の腫瘍の大きさの変化と、C；マウスの生存期間を観察した。

きるのではないかと考えた。

これを検証するために、前述した OVA 遺伝子を導入したマウス ES 細胞に、さらに、T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインの遺伝子を導入し、この ES 細胞から OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC を作製した。T 細胞に対する遊走活性を有するケモカインとして、生理的に存在する樹状

細胞からは産生されない、SLC (CCL21)，Mig (CXCL9)，および Lymphotactin (XCL1) の遺伝子をそれぞれ導入し、各々の効果を比較した。その結果、この 3 種類のケモカインのいずれについても、OVA を単独で発現する ES-DC よりも、OVA とケモカインを同時に発現する ES-DC の方が、より効果的に T 細胞を活性化することがわかった¹¹⁾。さ

らに, SLC あるいは Mig を OVA と同時に発現する ES-DC は, OVA 単独発現の ES-DC よりも, 抗腫瘍効果の誘導においても優れていた (図 6). 特に SLC の共発現により, 最も強い抗腫瘍免疫の増強効果が得られた.

IX. アロマウス ES-DC を利用した腫瘍免疫の誘導および ES-DC の自己免疫疾患予防への応用

ES-DC を臨床応用しようとする場合, ES 細胞ドナーとレシピエントの間の HLA を初めとする遺伝的多型の差異に起因する組織不適合性の問題を解決する必要がある. しかしながら, マウスを用いた実験では, ES 細胞ドナーとレシピエントが同系でなくとも, MHC のアリルを一部共有していれば, 共有された MHC クラス I 分子に提示された抗原により, 抗原特異的な T 細胞を活性化し, 抗腫瘍免疫効果も得られることを観察している¹³⁾. 筆者らは, ES-DC 技術の応用として, 抗腫瘍免疫療法だけでなく, 免疫抑制分子と自己免疫疾患の標的となる自己抗原を同時に強制発現させた ES-DC による, 自己免疫疾患の予防にも成功している^{14,15)}.

X. ヒト ES 細胞からの樹状細胞の作製

筆者らは, ES-DC の臨床応用をめざして, ヒトの ES 細胞から ES-DC を分化誘導する方法を開発した. ヒトの ES 細胞は, マウスの ES 細胞に比べて上皮性の細胞に分化しやすい傾向があるが, マウスの場合と同様に OP9 細胞をフィーダー細胞として用いることにより, 血液細胞を含む中胚葉系細胞への分化を誘導することが可能であった¹⁶⁾. 筆者らのヒトの ES-DC 分化誘導法では, 培養系へ GM-CSF, M-CSF, および IL-4 を添加することにより効率良い分化誘導が可能であった. ヒト ES-DC もマウス ES-DC と同様に, タンパク質抗原をプロセスして T 細胞へ提示する活性や, アロ MLR 刺激活性など, 樹状細胞としての機能を備えていた. また, マウス ES-DC の場合と同様の手法で, ヒトの遺伝子改変 ES-DC を作製することも可能であった.

おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは, HCC の免疫療法のあらたなターゲットとして, その臨床試験の結果が期待される. 癌の免疫逃避に対抗するためには, 多様な癌拒絶抗原のレパトリーを確立することが望まれる. GPC3 がその 1 つとして, HCC の

再発および発症防止に寄与することを期待したい.

最近, ES 細胞で発現している数種類の遺伝子をマウスあるいはヒトの線維芽細胞等の体細胞に導入することにより, ES 細胞と同等の多分化能を有する iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を作製できることが報告された^{17,18)}. iPS 細胞の作製には, ES 細胞の場合とは異なり, ヒト胚の滅失を必要としないという利点がある. さらに, iPS 細胞は, 皮膚線維芽細胞など, 比較的侵襲性の低い方法で採取できる細胞からも作製できるため, 治療の対象となる患者自身など任意のドナーから作製することが可能である. ES 細胞から樹状細胞を作製する技術を iPS 細胞へ適用できれば, 倫理的な問題を回避し, かつ, 患者本人への負担を大幅に軽減しつつ治療に必要な樹状細胞を作製することが可能となる. 著者らは, 現在 iPS 細胞から樹状細胞を作製する研究も開始している.

文 献

- 1) Butterfield, L. H. : Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **127** : S232-241, 2004.
- 2) Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., et al. : Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*. **61** : 2129-2137, 2001.
- 3) Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., et al. : Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **306** : 16-25, 2003.
- 4) Veugelers, M., De Cat B., Ceulemans, H., et al. : Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem*. **274** : 26968-26977, 1999.
- 5) Gonzalez, A. D., Kaya, M., Shi, W., 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*. **141** : 1407-1414, 1998.
- 6) Capurro, M. I., Xiang, Y. Y., Lobe, C. et al. : Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. **65** : 6245-6254, 2005.
- 7) Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., et al. :

- 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.
- 8) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., et al. : 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.
- 9) Nakano, T., Kodama, H., Honjo, T. : Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* **265** : 1098–1101, 1994.
- 10) Senju, S., Hirata, S., Matsuyoshi, H., et al. : Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* **101** : 3501–3508, 2003.
- 11) Matsuyoshi, H., Senju, S., Hirata, S., et al. : Enhanced priming of antigen-specific CTL in vivo by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing chemokine along with antigenic protein. *J. Immunol.* **172** : 776–786, 2004.
- 12) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., et al. : 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** : 2414–2422, 2006.
- 13) Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Hirata, S., et al. : Cancer prevention with semi-allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335** : 5–13, 2005.
- 14) Hirata, S., Senju, S., Matsuyoshi, H., et al. : Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1. *J. Immunol.* **174** : 1888–1897, 2005.
- 15) Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., et al. : Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol.* **178** : 918–925, 2007.
- 16) Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., et al. : Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* **25** : 2720–2729, 2007.
- 17) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 1–12, 2007.
- 18) Yu, J., Vodyanik, MA., Smuga-Otto, K., et al. : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318** : 1917–1920, 2007.