

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830112

研究課題名(和文) 肝臓に対する樹状細胞ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of dendritic cell-based immunotherapy for hepatocellular carcinoma

## 研究代表者

北原 征明 (KITAHARA, MASAOKI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：70632660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓癌は根本的な治療を行っても再発を繰り返す特徴があり、この再発に対する予防的治療を開発することが必要である。生体内に存在する免疫細胞を用いた治療が期待されているが、肝臓癌患者の治療に用いる免疫細胞をどのように調整するかは明らかとなっていない。本研究にて、肝臓癌患者の血液に由来する樹状細胞と呼ばれる免疫細胞の特徴と治療に用いるための最適な誘導法が明らかとなった。また、その手法を用いて肝細胞癌患者に対するラジオ波焼灼療法(癌を熱で焼灼する治療)と組み合わせた免疫治療の臨床試験を開始した。

研究成果の概要(英文)：Although some therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) exist, tumor recurrence rate are extremely high in these patients after curative treatment. Among many strategies for HCC recurrence, dendritic cell (DC) based immunotherapy is promising cancer therapy. The success of this therapy depends on the function of induced DCs, but there has been no consensus on optimal conditions for DC preparation in vitro for immunotherapy of HCC patients. To address relevant issues, we evaluated the procedure to induce DCs that efficiently function in HCC patients. Using this methods, we have developed the dendritic cell-based immunotherapy combined with radiofrequency ablation for HCC and started clinical trial.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝臓癌 免疫細胞療法 樹状細胞

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における肝細胞癌(肝癌)の年間死亡数は3万人を越え、更に増加傾向にあり、その最大の理由は、異時性・多中心性発癌という肝癌の特徴にある。肝癌の治療として、手術療法、経皮的ラジオ波焼灼療法、経肝動脈腫瘍塞栓療法をはじめとする局所療法、抗がん剤を用いた化学療法が施行されているが、根治的な局所治療を行っても、特にC型肝炎関連では5年以内に約70-80%の症例で再発をきたすため、長期的な癌再発制御を考慮した新たな治療の開発が急務である。

近年、癌に対する新しい治療として、癌特異的抗原を認識して癌細胞を攻撃するリンパ球、およびその抗原提示細胞であり宿主の免疫機能を調整する樹状細胞を利用した癌特異的免疫療法が行われ、一部の症例では癌の進展阻止が得られると報告されており、肝癌に対しても上記の標準治療を打破する手法として、これまでに多くの免疫療法が試みられてきたが、その成績は満足のいくものではない。

我々はこれまでに、肝癌に特異的な腫瘍抗原エピトープを同定し、その抗原エピトープのアミノ酸配列を含む合成ペプチドを患者皮下に直接投与する、がんペプチドワクチン療法を臨床試験として実施し、その安全性や、肝癌に特異的な抗原エピトープに対する免疫反応が誘導できることを確認してきた。また、肝癌に対する局所治療(経皮的ラジオ波焼灼療法、経肝動脈腫瘍塞栓療法)と併用して、治療局所に人工的に患者末梢血単核球より誘導した樹状細胞を投与することにより、癌抗原を取り込んだ樹状細胞によって、強い抗腫瘍免疫が誘導できる樹状細胞療法を独自に確立し、臨床試験を実施してきた。しかしながら、いずれの治療も抗腫瘍効果を認めたのは一部の症例であり、その要因として、投与する腫瘍抗原ペプチドおよび樹状細胞の調整法や、背景肝による免疫応答の違い

(ウイルス性肝炎や非B非C型、脂肪性肝炎等)が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌に対する根治的な局所治療後の再発を抑制する目的で、免疫細胞療法の開発を行う。強力な抗原提示細胞である樹状細胞に着目し、肝癌患者における抗腫瘍免疫を効率的かつ強力に誘導する樹状細胞の誘導法を確立し、更なる治療効果の向上のため、これまでに同定してきた肝癌に特異的な腫瘍抗原とこの樹状細胞を組み合わせる、樹状細胞ワクチン療法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝癌患者における樹状細胞の特徴と機能の解析

肝癌患者および健常者の末梢血単核球から誘導した樹状細胞を用い、その表面マーカーおよび機能的特徴に関して比較検討した。

具体的には、末梢血単核球から得られたCD14陽性の接着細胞を分離し、GM-CSFとIL-4を含む培養液中で7日間培養した。誘導過程において、その成熟に寄与すると報告されているサイトカイン(IL-1, IL-6, TNF, PGE2)またはOK-432を用いて追加刺激を行った。誘導されたCD14陰性、lin1陰性、HLA-DR陽性の樹状細胞に関して、以下の項目を検討した。

細胞表面マーカーを各抗体を用いてフローサイトメトリー法にて検出した。

抗原貪食能を蛍光標識されたデキストランを用いて検出した。

サスペンションアレイにてサイトカインおよびケモカインの定量を行った。

異系リンパ球混合培養試験でリンパ球増殖反応を評価した。

## (2) 誘導された樹状細胞への腫瘍抗原遺伝子導入

これまでに我々が同定し、臨床試験に用いてきた腫瘍抗原ペプチドのうち、hTERT461(ヒトテロメラーゼ逆転写酵素：HLA-A24 拘束性)を選択し、その mRNA をエレクトロポレーション法にて樹状細胞へ導入する手順の最適化(細胞融合遺伝子導入装置を用い、最適な電圧、電気容量、細胞数の検討)を行った。

最終的に腫瘍細胞に対する細胞傷害性アッセイを行い、細胞傷害性 T 細胞が誘導されることを確認した。

## (3) 肝癌患者における肝癌治療後の樹状細胞ワクチン療法の開発(臨床試験)

上記の検討により、肝癌に特異的な抗腫瘍免疫を最も誘導できると想定される手法を用いて、経皮的ラジオ波焼灼療法後の再発予防を目的とした臨床試験を開始した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝癌患者における樹状細胞の特徴と機能の解析

C 型肝炎関連の肝細胞癌患者 14 例、非感染者 14 例の末梢血単核球から接着細胞を分離し GM-CSF, IL-4 を含む培地中で 5 日間培養し、樹状細胞を誘導した。得られた樹状細胞に対し、種々の免疫賦活物質を添加刺激して更に 2 日間培養した

GM-CSF, IL-4 を用いた培養により誘導された細胞は、CD14 陰性、Lin1 陰性、HLA-DR 陽性の特徴を示す未熟な樹状細胞であった。肝細胞癌患者由来の樹状細胞では、非感染者と比較し、誘導された CD14 陰性 HLA-DR 陽性樹状細胞の割合、樹状細胞サブセットにおける CD11c 陽性のミエロイド樹状細胞の割合、およびサイトカイン(IL-12p40)産生能は同等であり、CD86 の発現、抗原貪食能は有意に向上したが、リンパ球刺激能は有意に低下した。

次に肝細胞癌患者由来樹状細胞において添加刺激による変化を比較検討した。CD14 陰性 HLA-DR 陽性樹状細胞の割合、CD80 および CD86 の発現は、いずれの添加刺激においても非添加群と比較し有意に上昇したが、抗原貪食能は有意に低下した。サイトカイン(IL-12p40 および IFN- $\gamma$ )産生能、リンパ球刺激能は OK-432 添加群において他群と比較し有意に上昇した。OK-432 添加樹状細胞において高いリンパ球刺激能を認めたことから、異系リンパ球との混合培養上清中のサイトカイン測定を行った。培養上清中の IL-2, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, MIP1 は非添加群と比較し、OK-432 添加群のみで有意に高値であった。さらに OK-432 添加樹状細胞と異系リンパ球の混合培養を行うことで、上記 6 種に IL-4, IL-10, IL-17 を加えた 9 種のサイトカインが培養上清中で有意に高値となった。

C 型肝炎関連肝細胞癌患者の末梢血単核球から誘導される樹状細胞の特徴と共に、同患者に適した樹状細胞の誘導法が明らかとなった。OK-432 添加刺激樹状細胞は、肝細胞癌に対する新たな免疫細胞療法の開発に寄与する可能性が示唆されたことから、今後の臨床試験へ用いる方針とした。また同内容については、後述の雑誌論文で報告した。

### (2) 誘導された樹状細胞への腫瘍抗原遺伝子導入

hTERT461 をコードする mRNA に関して、ペプチド産生能の高い mRNA 配列を探索するため、ペプチド発現確認系の検討を行った。ELISA 法による検出系を構築し、ペプチドを高感度(定量限界約 1 pg/ml)に定量出来ることを見出した。

hTERT461 を発現する mRNA を設計し、(1)にて結果の得られた樹状細胞へエレクトロポレーション法にて遺伝子導入するための条件(細胞数、電圧)の最適化を行った。

上記(1)の手法にて誘導した樹状細胞に対し、hTERT461 ペプチド発現 mRNA および陰性対照として GLP-1 ペプチド発現 mRNA を導入し、細胞傷害性を評価するも、明らかな陰性対照との差を見出すことが出来なかった。細胞傷害性も弱く、同時に測定したサイトカイン (IFN ) 産生も陰性対照との有意差が認められず、同細胞を臨床試験に用いることは断念した。

### (3) 肝癌患者における肝癌治療後の樹状細胞ワクチン療法の開発 (臨床試験)

臨床試験に用いる樹状細胞に関しては、研究成果(1)で得られた手法を用い、腫瘍抗原においてはエレクトロポレーション法による mRNA 導入は行わず、ペプチド添加刺激を用いた。hTERT461 の他、我々がこれまでに肝癌に特異的な腫瘍抗原エピトープとして同定したアミノ酸配列を含むペプチドを計6種類 (SART2, SART3, MRP3A, AFP2 種) 使用した。

試験の対象は、手術療法により根治不可能で、ラジオ波焼灼療法が適応となる肝細胞癌患者とした (目標症例数 10, 単群デザイン, 無対照, ランダム化無し, 非盲検)。再発抑制効果を期待し、同治療後に腫瘍抗原エピトープをもつペプチドで刺激した樹状細胞を同治療終了後、4 週目、6 週目、8 週目と計3回にわたって皮下投与し、その安全性と腫瘍抗原特異的免疫反応の誘導の観察を評価項目とした。

樹状細胞の培養は全て「金沢大学附属病院トランスレーショナルリサーチセンター細胞調整システム室」にて行う方針とした。患者ごとに使用するペプチドの選択は、エリスポットアッセイ法にて治療1週前および2週後にそれぞれ患者末梢血 (ヘパリン添加) 50ml を採取し、6種類のペプチドに対する特異的な免疫反応の誘導を判定し、治療後に免疫反応の増強を認めたペプチドを選択した。

本臨床試験では、患者末梢血由来の樹状細胞を利用するため、再生医療等安全性確保法では、「第三種再生医療等技術」に分類される。そのため認定再生医療委員会を経て、厚生労働省への再生医療等提供計画書の申請届出を行い、前述の培養施設に関しても新法に沿った申請届出を行った。

本報告書作成時までに2症例で細胞投与を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

— 北原征明, 水腰英四郎, 中本安成, 向田直史, 松島, 金子周一, Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma, International Immunopharmacology, 査読有, Vol.21, No.2, pp.346-353, 2014, DOI:10.1016/j.intimp.2014.05.023

[学会発表](計1件)

北原征明, OK432-Stimulated Monocyte-Derived Dendritic Cell Injection into HCC after RFA, The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016, 2016年2月22日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北原 征明 (KITAHARA, masaaki)

金沢大学, 大学病院, 助教

研究者番号: 70632660