

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460984

研究課題名(和文)細胞傷害性T細胞レセプターを用いた肝細胞癌免疫治療に関する基礎的検討

研究課題名(英文)Basic study of immunotherapy for hepatocellular carcinoma by cytotoxic T cell receptor

研究代表者

水腰 英四郎(MIZUKOSHI, EISHIRO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90345611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝細胞癌患者に対する癌免疫療法の1つとして、細胞傷害性T細胞レセプターを用いることによって、より効率的かつ強力に癌免疫を誘導できる手法の開発を行った。

本研究結果として、ペプチドワクチンを投与した患者において誘導される癌抗原に特異的な細胞傷害性T細胞の特徴を明らかにした。また、肝細胞癌の免疫治療に有用と思われるT細胞レセプターの候補を取得し、同レセプターを用いた癌免疫療法の臨床試験を行うための基盤情報を整備した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop an immunological method to induce a stronger and more efficient cancer immunity using cytotoxic T cell receptor as a cancer immunotherapy for hepatocellular carcinoma patients.

We characterized the cancer antigen-specific cytotoxic T cells induced by peptide vaccine in hepatocellular carcinoma patients. In addition, we could obtain some candidates of cytotoxic T cell receptors useful for immunotherapy of hepatocellular carcinoma and equipped the basic informations to perform clinical studies using the cytotoxic T cell receptors.

研究分野：消化器内科

キーワード：癌免疫療法 T細胞レセプター ペプチドワクチン 肝細胞癌 TCR改変T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本における肝癌治療では、外科的切除・肝移植・ラジオ波焼灼療法・肝動脈塞栓療法・化学療法などの多くの治療がガイドラインに従って選択されている。しかしながら、肝癌による我が国の死亡者数は年間3万人を超えており、その治療成績は十分とは言えない。その理由の1つは、肝癌の特徴である異時性・多中心性発癌による他部位再発のため、治療後再発が高率に生じるからである。また進行癌に対しては分子標的薬を含めた化学療法が行われているが、その治癒率は低い。したがって、肝癌による死亡者数を減少させるためには既存の治療とは異なった、新規の抗腫瘍効果を有する治療方法の開発が必要である。一方、癌に対する新しい治療として免疫療法が脚光を浴びてきている。特に腫瘍抗原特異的 TCR を用いた治療や PD-1 ならびに CTLA-4 に代表される免疫チェックポイント分子に対する抗体療法が臨床応用され、数種の癌において効果が示されている。こうした癌免疫療法は肝癌に対しても抗腫瘍効果が期待できると考えられる。これまでに我々は、肝癌に対する免疫療法の確立を目的として、DNA microarray や SAGE を用いた癌抗原のスクリーニング免疫学的手法を用いた抗原とエピトープの同定 肝癌動物モデルでの検証 ペプチドワクチンの開発と臨床応用といった研究手法を確立し、肝癌に特異的な 14 種類の抗原とその細胞傷害性 T 細胞 (CTL) エピトープを 47 種類同定した。さらにこれらを用いて肝癌患者の免疫反応の解析を行い、同患者では抗腫瘍免疫が存在し、体外で反応を増強できることを明らかにした。また、肝癌の局所療法によって生体内での抗腫瘍免疫が増強することを見出し、樹状細胞療法やペプチドワクチンの開発を行ってきた。ペプチドワクチンを用いた臨床研究ではそれぞれのワクチンの安全性とエピトープに特異的な CTL の誘導が確認できた。再発予防を目的とした臨床研究ではワクチンを投与した症例において、治療後長期にわたって再発がみられない症例を認めた。また AFP 由来のペプチドワクチンを用いた進行肝癌症例では、ワクチンのみの投与にて腫瘍の完全消失や長期にわたって腫瘍の進展が抑制された症例を認めた。しかし、一方で進行肝癌症例ではペプチドワクチンによる CTL の誘導効率が悪いこと、CTL が誘導されても、抗腫瘍効果の発現までには時間がかかること、適切なワクチンの効果判定基準がないことなど、ペプチドワクチンによる治療の欠点が明らかになった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、ワクチンによる抗腫瘍免疫の誘導の必要性がない免疫治療として、肝癌に特異的な腫瘍関連抗原エピト

プを認識する CTL の TCR をクローニングし、T 細胞に導入することによって作製した TCR 改変 T 細胞を用いた肝癌免疫療法の開発のための基礎研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究は以下に示す 3 段階のステップで行った。

1) ペプチドワクチン投与患者における免疫反応の解析： これまでに我々が明らかにしてきた肝癌に特異的な腫瘍関連抗原 14 種類とその CTL エピトープ 47 種類の中から、実際にペプチドワクチンとして肝癌患者に投与したもの (5 種類の腫瘍関連抗原と同抗原由来の 6 種類のペプチド) について、その免疫応答を測定した。具体的な腫瘍関連抗原はヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、アルファフェトプロテイン (AFP)、コンドロイチン-グルクロン酸 C5 エピメラーゼ (SART2)、Prp24p ヒト相同体 RNA 結合核蛋白 (SART3)、多剤耐性関連蛋白 3 (MRP3) であり、同抗原由来のエピトープとして AFP からは 2 種類、その他の抗原からは 1 種類ずつを選択し、そのアミノ酸配列をもつペプチドをワクチンとして肝癌患者に投与する臨床試験を実施した。同試験において得られた研究試料を用いて検討を行った。

2) ペプチドワクチンによって誘導された CTL の TCR のクローニングと機能解析： 1) の検討において同定した検出法を用いて、TCR のクローニングを行った。テトラマーアッセイ法もしくは Cytokine secretion アッセイ法にて検出したエピトープ特異的 CTL をソーティングし、single cell レベルでクローニングと機能解析までを行う手法を用いた。また本研究ではペプチドワクチンを施行した肝癌患者におけるペプチド特異的 TCR の解析だけではなく、こうした TCR をもつ CTL が、ペプチドワクチン未治療の肝癌患者や健常者においても存在するかを検証した。

3) クローニングした TCR を用いた癌免疫療法の開発のための基礎的検討： 2) の検討において、細胞傷害活性を認めた TCR を用いて以下の検討を行った。(A) 肝癌患者末梢血リンパ球への TCR 遺伝子導入方法とその導入効率の検討を行った。(B) TCR 遺伝子を導入するための細胞選択方法の検討を行った。(C) TCR 遺伝子導入細胞の phenotype 解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究では以下に示す成果を得た。

1) これまでにペプチドワクチン療法を施行した肝癌患者における免疫反応を解析し、

その誘導効率と誘導された CTL の特徴を明らかにした。また TCR のクローニングに最も適した CTL の検出方法を確立した。

2) 1)の検討において同定した検出法を用いて、TCR のクローニングを行い、免疫治療に有用と考えられる数種類の TCR を取得した。またクローニングの際には1つのエピトープに対して複数の TCR が検出されたものに関しては、TCR のレパトリーについても検討を行い、ペプチドワクチンの治療効果との関連性を明らかにした。クローニングした TCR に関しては、発現ベクターによりリンパ球に発現させ、機能解析として相当するエピトープを発現した細胞を標的として TCR 改変 T 細胞の傷害活性を確認した。

3)2)の検討において、細胞傷害活性を認められた TCR を用いて以下の成果を得た。(A)肝癌患者末梢血リンパ球への TCR 遺伝子導入方法の確立。(B)TCR 遺伝子を導入するための細胞選択方法の確立。(C)TCR 遺伝子導入細胞の phenotype 情報の取得。上記(A)~(C)の検討により、TCR 改変 T 細胞を用いた肝癌免疫療法の臨床試験を行うための TCR 候補とその導入方法を確立した。

#### 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4件)

水腰英四郎, 中河秀俊, 金子周一. 細胞傷害性 T 細胞レセプターを用いた肝細胞癌免疫療法の開発. *BIO Clinica*. 2016 31:90-6. (査読なし)

Mizukoshi E, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Iida N, Fushimi K, Kaneko S. Phase I trial of multidrug resistance-associated protein 3-derived peptide in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2015 Dec 1;369(1):242-9. doi: 10.1016/j.canlet.2015.08.020. (査読あり)

Mizukoshi E, Nakagawa H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Fushimi K, Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A, Kaneko S. Immunological features of T cells induced by human telomerase reverse transcriptase-derived peptides in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2015 Aug 10;364(2):98-105. doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.031. (査読あり)

Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Ozawa T, Hamana H, Nagai T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. A novel

cloning and expression system yields and validates TCR molecules from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nat Med*. 2013 Nov; 19 (11):1542-6. doi: 10.1038/nm.3358.

(査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

中河秀俊, 水腰英四郎, 金子周一. *Modern Immunology* からみた肝病態、第51回日本肝臓病学会総会、2015年5月22日 熊本

水腰英四郎 他. 肝細胞癌に対する免疫療法の開発 第101回日本消化器病学会総会 2015年4月23日 仙台

水腰英四郎 他. Analysis of immune responses in patients vaccinated with alpha-fetoprotein-derived peptides in the treatment of hepatocellular carcinoma. 第65回米国肝臓学会 2014年11月10日 ポストン

水腰英四郎 他. 樹状細胞を用いた免疫療法による肝細胞癌ラジオ波焼灼療法後再発の予防 第50回日本肝臓学会総会 2014年5月30日 東京

水腰英四郎 他. ヒテロメラーゼ逆転写酵素由来ペプチドワクチンを用いた肝細胞癌の局所療法後再発抑制の試み

第40回日本肝臓学会西部会 2013年12月6日 岐阜

水腰英四郎 他. Phase I Trial of Alpha-Fetoprotein-Derived Peptides in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. 第64回米国肝臓学会 2013年11月5日 ワシントンDC

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞傷害性 T 細胞の作製方法  
発明者: 水腰英四郎 他 5 名  
権利者: 国立大学法人金沢大学、富山大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-209372  
出願年月日: 平成 27 年 10 月 23 日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水腰 英四郎 (MIZUKOSHI EISHIRO)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：90345611

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：