

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02794

研究課題名(和文) 肝細胞癌におけるネオアンチゲンの同定と遺伝子改変T細胞による免疫療法の開発

研究課題名(英文) Identification of neoantigens in hepatocellular carcinoma and development of immunotherapy using genetically modified T cells

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) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌培養細胞を用いてネオアンチゲン、AFP、hTERT、MRP3由来のCTLエピトープを同定し、これらアミノ酸配列を認識するT細胞レセプター(TCR)遺伝子を取得した。これらを用いて遺伝子改変T細胞を作製し、細胞傷害活性を確認した。ペプチドワクチンを投与した患者検体を用いて、ワクチンによる免疫応答の新規誘導は患者の全生存期間の延長に寄与することを明らかにした。これらのエピトープ特異的な免疫応答はワクチン投与後10年の経過を経ても患者末梢血において検出が可能であり、TCRレパートリー情報を含む1細胞レベルのトランスクリプトーム解析を実施し、抗原特異的CTLの長期生存に重要な分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネオアンチゲンとは正常細胞にはなく、癌細胞に特異的に生じる遺伝子の変化に基づいた新しい癌の目印のことであり、免疫細胞の攻撃の標的となる。今回の研究では肝臓癌において、こうした目印が存在することを明らかにした。この目印を標的にして癌の治療を行う方法の一つとしてペプチドワクチンが想定されるが、本研究ではワクチンによって誘導されたリンパ球が、10年以上の長期にわたって体内に存在し、患者さんの予後に関係していること、そしてその長期生存に関わるメカニズムを明らかにした。これらの研究成果は、免疫を利用した新しい癌の治療方法の確立のために重要な知見をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using cultured hepatocellular carcinoma cells, we identified CTL epitopes derived from neoantigen, AFP, hTERT, and MRP3, and obtained T cell receptor (TCR) genes that recognize these amino acid sequences. These were used to generate genetically modified T cells, and their cytotoxic activity was confirmed. Using patient specimens treated with peptide vaccines, we found that the novel induction of immune responses by the vaccines contributed to prolonged overall survival of the patients. These epitope-specific immune responses were detectable in the peripheral blood of patients even after 10 years of vaccine administration. We performed single-cell level transcriptome analysis including TCR repertoire information and identified molecules important for the long-term survival of antigen-specific CTLs.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌 遺伝子改変T細胞 ネオアンチゲン ペプチドワクチン 免疫療法 エピトープ 1細胞解析 T細胞レセプター

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国におけるがん治療では、外科的切除、化学療法、分子標的薬などの多くの治療が行われている。進行がんでは主に分子標的薬や化学療法による治療が行われるが、生存期間の延長は望めるものの根治に至る症例は少ないのが現状である。したがってがんを根治させるには新たな治療戦略に基づいた新規治療法の開発が必要であり、宿主の免疫システムを利用した治療はその戦略候補の1つと考えられる。近年、がん治療の領域では免疫チェックポイント阻害薬が臨床応用され、革新的治療として注目されている。また、ネオアンチゲンの同定や遺伝子改変 T 細胞療法の開発など、免疫機構を利用した新たな治療法の開発が行われているが有効性は十分に証明されておらず、効果予測のバイオマーカーも確立されていないことから、その治療戦略の是非は未解決である。

2. 研究の目的

そこで本研究では肝がんにおけるネオアンチゲンを同定し、これを標的にした T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子改変 T 細胞療法の開発を行った。本治療法の抗腫瘍効果を証明し、こうした治療戦略が肝がんに対して有効であることの証明を試みた。また、ネオアンチゲンを標的とした免疫治療として、TCR 遺伝子改変 T 細胞を用いた手法に加えて、同抗原のアミノ酸配列に基づいたペプチドワクチンとして使用する方法も想定される。これまでに、我々は肝がんの特異的な腫瘍抗原由来のペプチドワクチンを用いた臨床試験を実施し、治療を受けた患者の臨床経過を長期にわたって追跡している。そこで、5年、10年と長期生存が得られた患者の末梢血リンパ球を用いて、ペプチドワクチンによって誘導された T 細胞の特徴について、TCR のレパトア解析を含めて実施することによって、TCR 遺伝子改変 T 細胞やペプチドワクチン誘導 T 細胞の体内での長期生存に関わる因子を同定することを試みた。さらに、肝がん治療における効果予測のバイオマーカーの確率を目的として、肝がん特異的抗原に関するエピトープに対する免疫応答や TCR のレパトア解析を実施した。

3. 研究の方法

本研究でははじめに当教室において肝がんと診断され、外科的切除を行った症例のうち、切除組織を用いて肝がん培養細胞の樹立が可能であったものを使用した。同肝がん培養細胞と、同一患者の末梢血リンパ球の全エクソーム解析を行い、これを正常コントロールとして肝がんの遺伝子変異部位を同定した。遺伝子変異部位を中心として前後 10 アミノ酸を同定し、解析ソフト (BIMAS) を用いて各 HLA 分子に結合する CTL エピトープのアミノ酸配列を予測してペプチドを作製した。

上記工程で作製したペプチドと末梢血リンパ球を用いて、肝がんの特異的であることを証明し、また免疫治療の標的として最適なものを選択するために、下記 (a) ~ (c) に記す複数の免疫学的手法を用いて CTL エピトープの同定を試みた。(a) ペプチドを用いたインターフェロンガンマ ELISPOT アッセイ・同アッセイの培養上清を用いた ELISA 法によるサイトカインの測定、(b) ペプチド特異的な細胞増殖能をみるための Proliferation アッセイ、(c) テトラマー染色とフローサイトメーターによる細胞表面マーカーのマルチカラー解析。これらの解析によって免疫治療により有用なエピトープの同定を試みた。また、ネオアンチゲン以外の肝がん特異的抗原に関するエピトープに対する免疫応答や TCR のレパトア解析も上記研究手法にて実施した。

ペプチド特異的 TCR 遺伝子のクローニングに関しては、これまでに我々が富山大学医学薬学

研究部免疫学講座との共同研究において確立した迅速 TCR クローニングシステムを用いて実施し、その特異性と細胞傷害活性をペプチドパルス培養細胞ならびに各種肝がん培養細胞を用いて検証した。

ペプチドワクチン投与によって誘導された特異的 T 細胞の長期経過の解析は、(a)ペプチドを用いたインターフェロンガンマ ELISPOT アッセイ、(b)テトラマー染色とフローサイトメーターによる細胞表面マーカーのマルチカラー解析、(c)末梢血単核球の 1 細胞トランスクリプトーム解析と TCR レパートア解析によって行った。

4 . 研究成果

肝がん培養細胞を用いて、免疫治療の標的となりうるネオアンチゲンおよび腫瘍関連抗原由来の T 細胞エピトープを同定し、これらアミノ酸配列を認識する T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子の取得を試みた。また、これらを用いて遺伝子改変 T 細胞を作製し、細胞障害活性を確認したが、ネオアンチゲンとして同定した抗原に対しては、抗原特異的な TCR 遺伝子の取得はできなかった。腫瘍関連抗原由来のものとしては、アルファフェトプロテイン (AFP)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、多剤耐性関連蛋白質 3 (MRP3) 由来のエピトープに特異的な TCR 遺伝子を取得することが可能であった。これらの TCR 遺伝子を用いて、遺伝子改変 T 細胞を作製し、肝がん培養細胞に対する細胞傷害活性を確認することができた。また、各種腫瘍関連抗原に対する免疫応答が肝がんの成因別によって、抗原の種類や強度が異なること、さらにこうした免疫応答に影響を与える宿主因子として脂肪酸が関与していることを明らかにした。

抗原特異的 T 細胞の長期生存に寄与する因子の研究では、ペプチドワクチンを投与した患者検体を用いて、ワクチンによる免疫応答の新規誘導は患者の全生存期間の延長に寄与することを明らかにした。これらのエピトープ特異的な免疫応答はワクチン投与後 10 年の経過を経ても患者末梢血において検出が可能であり、TCR レパートリー情報を含む 1 細胞レベルのトランスクリプトーム解析を実施し、抗原特異的 CTL の長期生存に重要な分子を同定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizukoshi E, Kaneko S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Immune cell therapy for hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13045-019-0742-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mizukoshi E, Kaneko S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20081823.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Seike T, Mizukoshi E, Yamada K, Okada H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Yamashita T, Sakai Y, Honda M, Harada K, Kaneko S.	4. 巻 55
2. 論文標題 Fatty acid-driven modifications in T-cell profiles in non-alcoholic fatty liver disease patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01679-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tamai T, Mizukoshi E, Kumagai M, Terashima T, Iida N, Kitahara M, Shimakami T, Kitamura K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Honda M, Fushimi K, Kaneko S.	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel -fetoprotein-derived helper T-lymphocyte epitope with strong immunogenicity in patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60843-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 水腰英四郎、玉井利克、金子周一
2. 発表標題 肝細胞癌に対する遺伝子改変T細胞療法の開発
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eishiro Mizukoshi, Hidetoshi Nakagawa, Tatsuya Yamashita, et al.
2. 発表標題 Cytotoxic effects of alpha fetoprotein-specific T cell receptor engineered T cells against hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第70回米国肝臓学会議(2019 AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水腰英四郎、玉井利克、金子周一
2. 発表標題 肝癌幹細胞を標的とした遺伝子改変T細胞療法の開発
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中河秀俊、水腰英四郎、金子周一
2. 発表標題 肝がんペプチドワクチン療法によって誘導・長期維持された腫瘍抗原特異的T細胞の機能解析と遺伝子発現プロファイル
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshikatsu Tamai, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko.
2. 発表標題 IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL AFP-DERIVED HTL EPITOPE IN PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidetoshi Nakagawa, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko.
2. 発表標題 Long-term presence of tumor specific CD8 T cells over 10 years after peptide vaccination in hepatocellular carcinoma patients.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting Digital Experience (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------