

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22760

研究課題名(和文)HLA-Eを介した肝がん免疫反応の解析と治療開発

研究課題名(英文)Antitumor immunity mediated by HLA-E in hepatocellular carcinoma

研究代表者

中河 秀俊(Nakagawa, Hidetoshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90743469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで十分に解明できていなかったHLA-Eを介した免疫応答につき本研究を通じ次のことを発見同定した。手術標本の検討では一部の肝癌細胞に発現がみられるが、主に腫瘍浸潤免疫細胞に発現がみられ、末梢血の検討では、免疫細胞全般でHLA-Eが発現していた。さらに解析することでHLA-Eを認識するT細胞受容体の候補を同定した。肝がんに対する免疫療法症例の検討では、HLA-Eのハプロタイプが0101/0101の場合、無増悪生存期間が短い傾向にあった。これらの結果は、HLA-Eと特定の免疫細胞集団との相互作用が、肝癌の進行および免疫療法への応答に影響を与える可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで十分に解明されていなかったHLA-Eを介した免疫応答を解析することで、がん治療のみならず、自己免疫疾患の理解の新たな側面を明らかにした。本研究で明らかになったHLA-Eハプロタイプとがん免疫療法の治療効果の関連や、HLA-Eを認識するCD8陽性T細胞の存在、またそのT細胞受容体の同定から、免疫制御の観点からHLA-Eが重要な役割を担っていると考えられた。今後の展開として得られたT細胞受容体の機能解析をすすめ、新たな免疫療法のツールとして利用することを目指す。

研究成果の概要(英文)：This study has identified and uncovered aspects of the immune response mediated by HLA-E, which had not been fully elucidated until now. Examination of surgical specimens revealed HLA-E expression in some hepatocellular carcinoma cells, but primarily in tumor-infiltrating immune cells. Furthermore, in the examination of peripheral blood, HLA-E was expressed in immune cells in general. Further analysis led to the identification of candidate T cell receptors that recognize HLA-E.

In the examination of cases of immunotherapy for liver cancer, it was observed that when the HLA-E haplotype is 0101/0101, there is a trend towards a shorter progression-free survival period. These results suggest that the interaction between HLA-E and a specific group of immune cells may affect the progression of liver cancer and the response to immunotherapy.

研究分野：免疫学

キーワード：HLA-E 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬や遺伝子改変 T 細胞輸注療法といった新規免疫治療の登場によりがん治療は大きく様変わりした。肝がんの分野でも抗 PD-L1 抗体と抗 VEGF 抗体の併用療法が既存の化学療法に対して有意に生存期間を延長させることが証明された(IMbrave150 study)。さらに次の戦略として、既存の免疫チェックポイント阻害薬に対する耐性の機序の解析とこれを克服する治療戦略が研究されている。

非古典的 MHC class I の一つである HLA-E(マウスでは Qa-1)が免疫療法後に腫瘍細胞に誘導される現象が注目されている(Manguso et al. Nature 2017)。腫瘍細胞に発現した HLA-E は T 細胞や NK 細胞上の抑制性受容体 NKG2A を介して抗腫瘍免疫を抑え、免疫回避を行うと考えられる。しかしながらヒトでの HLA-E の機能についてはまだわかっていないことが多い。そこで下記の検証を通して、HLA-E の免疫応答における役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

- A 手術検体での HLA-E 発現の検討
- B 免疫細胞における HLA-E 発現の検討
- C HLA-E を認識する TCR の同定
- D HLA-E アレルの差異と肝がん免疫治療の治療効果の検討

3. 研究の方法

- A 手術検体での HLA-E 発現の検討
外科切除標本を抗 HLA-E 抗体を用い免疫組織化学染色を行い、評価する
- B 免疫細胞における HLA-E 発現の検討
肝がん患者の末梢血単核球を single cell RNAseq 解析を行い、HLA-E 発現細胞の同定を行う。さらに HLA-E 拘束性 CD8 陽性 T 細胞が Helios 陽性であることを criteria として同定し、KIR や CD122 発現を検討する。
- C HLA-E を認識する TCR の同定
Helios 陽性 HLA-E 拘束性 CD8 陽性 T 細胞の single cell TCRseq データから TCR 配列を抽出し、HLA-E を認識する TCR の候補を挙げる。
- D HLA-E アレルの差異と肝がん免疫治療の治療効果の検討
HLA-E の遺伝子多型は 107 番コドンのアミノ酸が異なる 2 種類(107R: *0101, 107G: *0103)のみで構成されていることが知られており、HLA-E ハプロタイプと自然流産との関連も報告され、免疫制御との深い関連が示唆されている。本研究では肝がんに対するアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法を施行した患者に対して、HLA-E*0101 と HLA-E*0103 を分離する ARMS(amplification refractory mutation system)-PCR を用いた遺伝子型の同定法を用いて HLA-E ハプロタイプを決定し、その予後との相関を見る。

4. 研究成果

A 手術標本での HLA-E 発現

肝細胞癌外科切除標本 10 例の検討では、肝細胞癌自体の HLA-E 発現が確認された。しかしながら肝細胞癌細胞自体に HLA-E 発現がみられたのは 1 例/10 例であった。肝細胞癌自体の HLA-E 発現がみられない症例でも、浸潤炎症細胞で HLA-E が強く発現していた(Fig.1A-B)。

B リンパ球の HLA-E 発現とその受容体発現

これをさらに検証するために肝細胞癌由来の末梢血リンパ球の TCR 配列と遺伝子発現を解析したシングルセル RNAseq データを用い、HLA-E 発現をみた。その結果末梢血リンパ球に含まれ

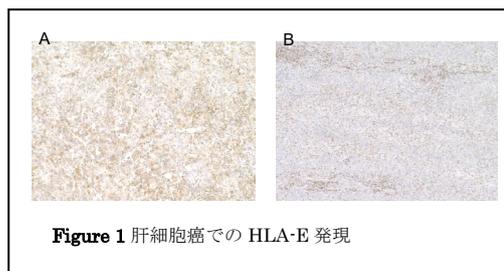


Figure 1 肝細胞癌での HLA-E 発現

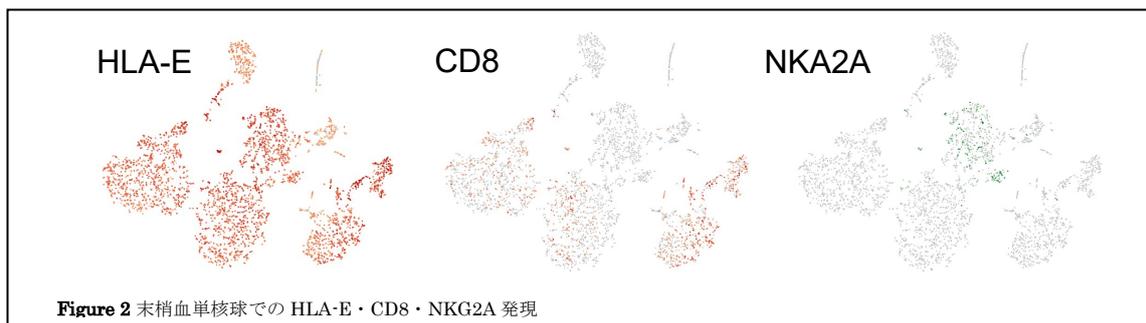


Figure 2 末梢血単核球での HLA-E・CD8・NKG2A 発現

る分画のほぼすべてで HLA-E の発現が認められた。一方で HLA-E の主な受容体である NKG2A 発現はほぼ NK 細胞に限られていた (Fig. 2)。その一方で HLA-E を認識する TCR 受容体の同定は難しいが、マウスの Qa-1b 拘束性 T 細胞の解析で、CD8 陽性、Helios 陽性であると考えられている。この基準を人にも応用し、CD8A、Helio 陽性 T 細胞を抽出した。この細胞集団は、KIR(キラー抑制性受容体)陽性 CD122 陽性でもあり、マウスのいわゆる CD8 陽性制御性 T 細胞の特徴とよく一致した (マウスでの CD8 陽性制御性 T 細胞は CD122 陽性 Ly49 陽性 Helios 陽性、Ly49 はヒトの KIR に相当) (Fig. 3)。

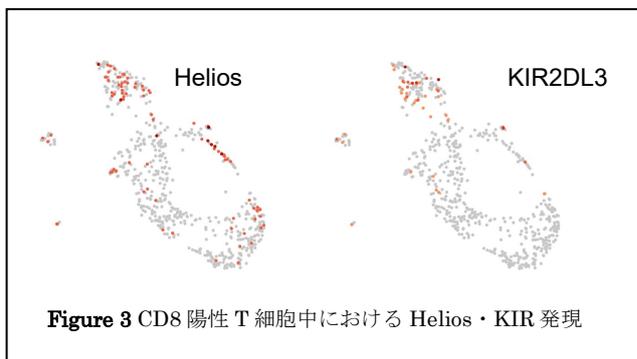


Figure 3 CD8 陽性 T 細胞中における Helios・KIR 発現

C HLA-E を認識する TCR

抽出した CD8A、Helio 陽性 T 細胞の TCR 配列を解析すると、重複した配列は見られなかった。Clonal expansion に乏しい所見であるがこれはマウスでの検討とも一致している(出版準備中)。しかし同一症例の別の時点 (5 年間の間隔あり) で採取した末梢血リンパ球の解析で同様の解析を行うと、同一の TCR 配列が CD8A、Helio 陽性 T 細胞中に見られることが判明した。この TRAV29/TRBV5-4 TCR は HLA-E を認識する TCR として有力候補と考えられた。この T 細胞は

KIR+Helios+であり当初想定した腫瘍特異的 T 細胞というよりは、制御性 T 細胞の特徴を備えていると考えられた。

D HLA-E アレルによる肝がん免疫療法の抗腫瘍効果の違い

HLA-E は他の MHC 分子とは異なり多型が少なく、基本的に HLA-E*0103 と HLA-E*0101 のみが報告されている。その差異もわずかに塩基・一アミノ酸配列の違いである。しかしながらこの多型部位はペプチド結合ポケットに存在しており、ペプチドドームの違いから免疫応答の違いを生み出しているものと推察される。そこで、肝がん免疫治療(アテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法)における HLA-E のアレルを検討し、その治療効果・予後との関連を検証した。

対象は切除不能肝がんに対するアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法を施行した 84 例。年齢中央値は 73 歳。HLA-E 遺伝子の多型はゲノム配列を解析することでタイピングを行った。解析の結果 HLA-E*0101/0101 が 9 例、HLA-E*0101/0103 が 40 例、HLA-E*0103/0103 が 35 例であった。

0101 homo が少ない結果だったが、一般人口で報告されている頻度と一致した傾向を示した。無増悪生存期間(PFS)を評価すると、HLA-E*0101/0101 の症例は他に比べ、PFS が短い傾向にあった。

E 今後の展開

本研究を通し、HLA-E/ペプチドを認識している可能性のある TCR 配列を同定できた。本 TCR を用いた遺伝子改変 T 細胞の作成に取り掛かっており、この細胞を effector として in vitro の suppression assay を計画している。標的は CD4 T 細胞とし、その増殖抑制を観察する。またこの際標的細胞の HLA-E アレルを変化させることで、反応性の変化を観察する。

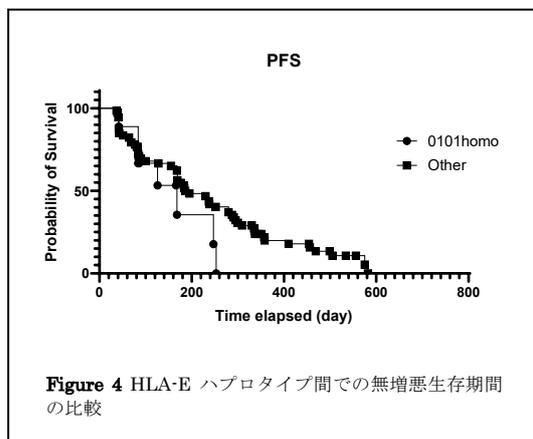


Figure 4 HLA-E ハプロタイプ間での無増悪生存期間の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Mizukoshi Eishiro, Nakagawa Hidetoshi, Tamai Toshikatsu, Kitahara Masaaki, Fushimi Kazumi, Nio Kouki, Terashima Takeshi, Iida Noriho, Arai Kuniaki, Yamashita Tatsuya, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Honda Masao, Kaneko Shuichi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Peptide vaccine-treated, long-term surviving cancer patients harbor self-renewing tumor-specific CD8+ T cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30861-z | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hidetoshi Nakagawa, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko |
| 2. 発表標題 TUMOR-SPECIFIC T CELLS INDUCED BY PEPTIDE VACCINES CONTRIBUTE TO PROLONGED SURVIVALS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS |
| 3. 学会等名 AASLD2021（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hidetoshi Nakagawa, Yuta Tamaru, Kouki Yamagata and Eishiro Mizukoshi |
| 2. 発表標題 TUMOR-SPECIFIC IMMUNITY, NOT IRRELEVANT IMMUNITY, CONTRIBUTES TO PROLONGED SURVIVAL IN PEPTIDE-VACCINATED PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA |
| 3. 学会等名 AASLD2022（国際学会） |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|