

令和 4 年 5 月 9 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：2020～2021

課題番号：20K22804

研究課題名（和文）遺伝子改変T細胞治療を目的としたhTERT特異的T細胞受容体の機能評価

研究課題名（英文）Evaluation of immunological function of hTERT-specific transgenic T-cell receptor T cells for cancer immunotherapy

研究代表者

梶 喜一郎 (Kiichiro, Kaji)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70886407

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）：現在でも本邦における悪性腫瘍による死亡のうち5位に位置する肝臓がんの治療において、重要な問題である高い異所性再発率に対する有望な選択肢としてがん免疫療法が挙げられ、我々は遺伝子改変T細胞治療の可能性に着目した。本研究では腫瘍関連抗原の一つであるヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)由来の細胞傷害性T細胞エピソードを認識するT細胞レセプター(TCR)遺伝子を用いてTCR遺伝子改変T細胞(TCR-T)を作成した。作成したTCR-Tについて、培養細胞株、およびhTERTを発現したヒト肝癌由来細胞株を標的とした細胞傷害活性を検証し、そのhTERT特異的な細胞傷害活性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原特異的なTCR-Tの細胞傷害活性を示した本結果は、今後のTCR-T療法の基礎となる結果である。我々はすでに複数種類のhTERT特異的TCR遺伝子を同定し取得しており、今回の手法によって、より高い細胞傷害活性を示すTCR (Elite TCR) の選定を行うことができ、より効果的なTCR-T療法を目指すことが可能である。さらに今後、実際にヒトを対象とした臨床試験への応用を視野に免疫不全マウスへ肝癌細胞株を生着させた肝細胞癌治療動物モデルによるTCR-T療法の安全性と抗腫瘍効果を評価していく。そしてこの結果をもとにヒト臨床試験の施行を目指している。

研究成果の概要（英文）：In recent years, liver cancer is still the fifth leading cause of cancer death in Japan. The high recurrence rate of hepatocellular carcinoma (the most common type of primary liver cancer) is a crucial problem. Cancer immunotherapy is an attractive method to solve the problem, therefore, we focused on one of the gene-modified T cell therapy, T cell receptor (TCR) gene-transduced T (TCR-T) cells. We generated human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-specific TCR-T cells. A cytotoxicity assay showed antigen-specific cytotoxicity of hTERT-specific TCR-T cells.

研究分野：消化器病学

キーワード：遺伝子改変T細胞 hTERT 免疫療法 T細胞レセプター

1. 研究開始当初の背景

現在我が国で肝がんは悪性腫瘍部位別にみた死亡で第 5 位に位置し、その治療法として手術療法、局所凝固療法、化学療法、放射線療法、肝動脈塞栓療法、肝移植等、多様な治療法が実施されている。しかしその多くはウイルス性肝疾患やアルコール性肝疾患、また近年増加しつつある生活習慣病の一病型に位置付けらる非アルコール性脂肪性肝炎などといった背景肝疾患から発がんに至っており、肝がんはその高い異所性再発率にどう対応し治療を行っていくかが重要な問題であり新規治療法の開発が望まれてきた。アプローチの一つとして宿主免疫を利用したがん免疫療法の研究が行われてきた。免疫チェックポイント阻害薬は今や世界で広く認知されている代表的な治療法であり、T 細胞の遺伝子を改変することで抗腫瘍効果を発揮させる遺伝子改変 T 細胞治療も研究途上である。しかし、そのうちの chimeric antigen receptor (CAR)-T 療法は様々ながん種へ応用を試みられているものであるが、固形腫瘍への効果が課題となっている。他方、宿主のがん免疫活性化の手法の一つとして、腫瘍関連抗原のアミノ酸配列に基づいたペプチドをワクチンとして使用するペプチドワクチン療法がある。これまでに我々は、肝がんの特異的な腫瘍関連抗原由来のペプチドワクチンを複数種類同定し、これを用いた臨床試験を実施し、実際に α-フェトプロテイン (AFP) 由来のペプチドワクチンにおいて腫瘍の完全消失を含めた抗腫瘍効果が認められた。しかしペプチドワクチン療法は抗原特異的なリンパ球が患者個体内で誘導されるか否かが抗腫瘍効果の有無を規定しているが、誘導効率が低い(33.3%)という問題があった。また、AFP 高値を伴わない肝細胞癌も約 30-40%程度あることが知られており、AFP 以外の腫瘍関連抗原についても同様に遺伝子治療に有望な TCR を探索し同定する必要がある。このように改善の余地が多いがん免疫療法の分野において、腫瘍特異的な T 細胞受容体(TCR)遺伝子をリンパ球に遺伝子導入し、抗原特異的なリンパ球すなわち TCR 遺伝子改変 T 細胞(TCR-T)を作成したものをを用いる治療法は、ペプチドワクチン療法の問題点を解決し、固形腫瘍に対しても十分な治療効果をもたらすことが期待できる。

2. 研究の目的

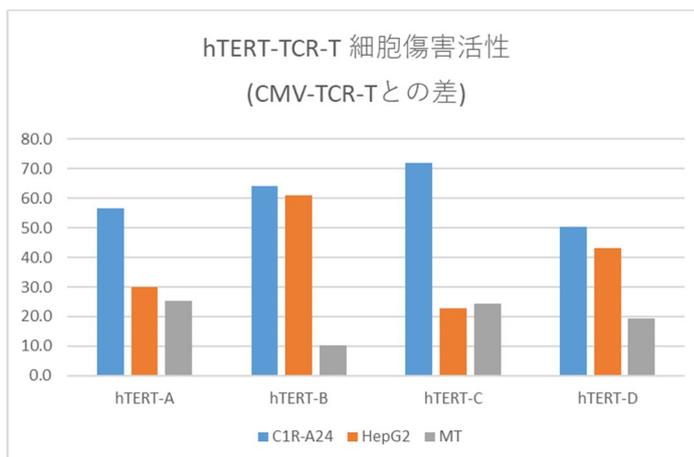
本研究では肝がんにおける腫瘍関連抗原を標的にした TCR-T 療法の開発を行うこととした。まず TCR-T の作成を行い、その細胞傷害性を評価することで抗原特異的な抗腫瘍効果が発揮されることの証明と、TCR の差異による細胞傷害活性の違いを検証し、がん免疫療法により有用と判断される TCR (Elite TCR) の選別を試みた。さらに、TCR-T の抗腫瘍効果および安全性を検証する実験系の確立のため、免疫不全マウスへ肝癌細胞株を生着させた肝細胞癌治療動物モデルの作成を目指した。

3. 研究の方法

肝がんの腫瘍関連抗原のうち、AFP 陰性の肝がんにも応用が可能なものとするべく、我々が先行研究にて入手したヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) を特異的に認識する TCR 遺伝子を用いた。目的の TCR 鎖と鎖遺伝子を自己切断ペプチドである P2A 配列を介して結合し、レトロウイルスベクターに挿入し TCR 発現ベクターを作成した。この機能を FACS にて解析し確認後、パッケージング細胞へ導入し TCR 発現レトロウイルスを作成し、これを健常ドナー由来 CD3 陽性 T 細胞に感染、培養させ、TCR-T を作成した。TCR-T の抗原特異的な細胞傷害活性の評価は、従来の細胞傷害性アッセイに用いられていた 51 クロミウムアッセイにかわり、標的細胞をラベル後に TCR-T と共培養を行い、共焦点蛍光顕微鏡にてタイムラプス撮影を行い、各タイムポイントごとに死細胞数をカウントして経時的な細胞傷害活性を測定した。さらに、標的細胞としては一般的な培養細胞株のほか、より生理的な肝細胞癌への傷害活性評価を目的に、我々が肝細胞癌外科切除検体より独自に取得した細胞株も用いた。

4. 研究成果

hTERT 特異的 TCR-T と、コントロールとしてのサイトメガロウイルス(CMV)抗原特異的 TCR-T の作成に成功した。これらを用いた細胞傷害性アッセイにより、hTERT 特異的 TCR-T が実際に hTERT 特異的に細胞傷害活性を示すことを確認した。しかしさらに複数種類の hTERT 特異的 TCR-T の作成およびその細胞傷害性の確認を行う必要があるがそこには至っておらず、今後研究を進めそれらの細胞傷害性を評価することで、Elite TCR を



絞り込み同定する．この Elite TCR を用いた TCR-T について肝細胞癌治療動物モデルにおける抗腫瘍効果の検討を行う．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------