

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02899

研究課題名（和文）肝細胞がんにおける多細胞間相互作用の解明による新規がん免疫療法開発の基盤研究

研究課題名（英文）Fundamental research for the development of novel cancer immunotherapy by elucidating multicellular interactions in hepatocellular carcinoma

研究代表者

水腰 英四郎（Mizukoshi, Eishiro）

金沢大学・附属病院・特任教授

研究者番号：90345611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：肝がんにおいて、抗原特異的T細胞に影響を与える因子を明らかにすることによって、新規免疫療法開発につながるための研究を実施した。本研究では以下の成果が得られた。1）抗原特異的T細胞レセプター（TCR）を有する遺伝子改変T細胞の作製方法を確立した。2）長期生存が得られた患者の末梢血リンパ球を用いて、単細胞発現遺伝子解析を実施し、肝癌に特異的なTCRを有するT細胞の免疫記憶や疲労抵抗性に関与する分子を同定した。3）T細胞と他の免疫細胞の相互間作用に関する研究において、C型肝炎ウイルス排除後に生じる肝がんに対するT細胞の免疫応答の変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原特異的T細胞レセプター（TCR）を有する遺伝子改変T細胞の作製方法を確立したことにより、今後本技術を用いたT細胞輸注療法による免疫治療の開発が加速する。また、長期生存が得られたがん患者の腫瘍に特異的なT細胞の性質を規定する分子を同定したことにより、同分子を標的とした新規免疫治療の開発が可能となる。これらの治療開発により、肝がん患者の予後が改善できる可能性があるとともに、他の難治がんへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Research was conducted to clarify factors affecting antigen-specific T cells in liver cancer, leading to the development of novel immunotherapy. The following results were obtained: 1) A method was established to generate genetically engineered T cells with antigen-specific T cell receptors (TCRs); 2) Single-cell gene expression analysis was performed using peripheral blood lymphocytes from patients with long-term survival, and molecules involved in immune memory and fatigue resistance of T cells with TCRs specific to hepatocellular carcinoma (HCC) were identified; 3) In a study on the interaction between T cells and other immune cells, we identified changes in the immune response of T cells to HCC that occur in the body after hepatitis C virus elimination.

研究分野：消化器病学

キーワード：T細胞 肝細胞癌 単一細胞解析 免疫細胞プロファイル 遺伝子改変T細胞 T細胞レセプター 免疫治療 ペプチド

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

近年のがん治療における免疫チェックポイント阻害薬やキメラ抗原受容体(CAR-)T細胞療法の成功は、腫瘍の排除には抗原特異的 T 細胞の働きが重要であることを研究者に再認識させることになった。同時に、これらの治療が有効でない患者や腫瘍の解析から、治療効果をより高めるためには免疫抑制細胞の制御が必要であり、その技術開発のために腫瘍微小環境研究が注目されるようになった。申請者らはこれまでの基盤研究において、肝がん患者の抗腫瘍免疫応答に関する研究を長年にわたって実施してきた。これら一連の研究から、肝がんの完全治癒を導く宿主免疫応答を成立させるためには単に抗原特異的 T 細胞を誘導するだけでなく、免疫抑制細胞を含む様々な細胞と T 細胞の相互作用機序およびこれに影響を与える背景肝因子を明らかにし、抗原特異的 T 細胞の質と機能をコントロールする必要があると考えるに至った。しかしながら、肝がんにおける腫瘍微小環境を構成する細胞の種類、これらの細胞と抗原特異的 T 細胞の細胞間相互作用の詳細な分子機序、それに影響を与える背景肝因子の全貌は未だ明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

腫瘍微小環境を構成し、抗腫瘍免疫に関与する未知の細胞や背景肝因子を同定するとともに、抗原特異的 T 細胞との細胞間相互作用を明らかにすることによって、肝がんに対する新規免疫療法開発の基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

抗原特異的 T 細胞と各種免疫細胞との細胞間相互作用を解析するためのツールとなる、抗原特異的 T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子改変 T 細胞を作製する。これまで作製に成功しているアルファフェトプロテイン (AFP) 特異的 TCR に加え、ヒトテロメラーゼ逆転写因子 (hTERT)、多剤耐性関連蛋白質 3 (MRP3) 特異的 TCR を用いた TCR 遺伝子改変 T 細胞を作製する。

ヒト臨床検体 (末梢血リンパ球および肝・肝癌組織浸潤リンパ球) を用いた単細胞発現遺伝子解析を実施し、得られた遺伝子情報を用いて免疫チェックポイント分子、サイトカイン、ケモカイン、TCR 等の免疫システムに関連する分子を中心に抗原特異的 T 細胞の性質を同定する。また、得られた細胞間ネットワーク解析情報と併せて細胞間相互作用を同定する。

上記解析と並行して、各種免疫細胞が発現する免疫関連分子に関して、FACS を用いた多重染色解析を実施し、肝癌に関連した免疫細胞プロファイルを同定し、背景肝因子と免疫細胞プロファイルとの関連を明らかにする。

4. 研究成果

AFP、hTERT、MRP3 特異的 TCR を有する TCR 遺伝子改変 T 細胞を作製し、作製された TCR 遺伝子改変 T 細胞は、抗原特異的に肝がん培養細胞や他のがん腫であっても AFP や hTERT を発現する培養細胞に対して細胞傷害活性を発揮した。一方、これらの抗原を発現していない細胞ならびに抗原は発現していても HLA-A24 分子を有していない細胞には細胞傷害活性を示さず、確立したアッセイ系が抗原特異的かつ HLA 特異的に細胞傷害活性を評価できることを確認した。さらに、こうした TCR 遺伝子改変 T 細胞のゲノム編集を実施し、機能強化した T 細胞を作製するための準備段階として、マウス T 細胞を使用して、T 細胞の免疫記憶や疲労抵抗性に係る遺伝子の発現を調節する技術の開発を行った。これらの技術は治療への応用が可能であるとともに、今後細胞間相互作用を明らかにするための研究ツールとして使用が可能である (特願 2022-157443)。

臨床検体を用いた T 細胞の研究では、長期生存が得られた肝癌患者の末梢血リンパ球を用いて、単細胞発現遺伝子解析を実施し、同時に各 T 細胞がもつ TCR の遺伝子配列を同定することによって、肝癌に特異的な TCR を有する T 細胞に特徴的な発現遺伝子パターンを

同定した。これらの特徴的な発現遺伝子の中には、T細胞の免疫記憶や疲労抵抗性に関与する分子が含まれていることを明らかにした (Nature Communications 13:3123, 2022.)。具体的な成果として、網羅的遺伝子発現解析とパスウェイ解析を行ったところ、長期間にわたって末梢血に存在する抗原特異的 T 細胞では、Src ファミリーチロシンキナーゼとともに、ITIM モチーフを持つ抑制性膜分子のアップレギュレーションが示され、これはエフェクターサイトカインをダウンレギュレーションする可能性があった。抗原特異的 CD8+ T 細胞の長期にわたる解析では、IL7R と SELL の発現、JUN、JUNB、FOS を含む AP-1 転写ファミリーのアップレギュレーションなど、典型的なメモリー表現型や幹細胞様の性質が見られ、これらは T 細胞の疲弊に対する抵抗性に寄与している可能性があった。これらの細胞はまた、NOSIP の発現を上昇させ、これも記憶形成につながっていることが示唆された。このような経時的な抗原特異的 T 細胞の表現型の変化から、メモリー形成は長期にわたって徐々に起こることが示唆された。約 5 年の追跡データでは、AP-1 転写因子の発現増加を伴う活発な増殖が示され、これが抗原特異的 CD8+ T 細胞の記憶形成に寄与している可能性が示唆された。これらの T 細胞はまた、CCNA2、CDK1 および HIST1H3H を含む有糸分裂促進遺伝子によってより直接的に特徴づけられ、静止した長寿命の T 細胞ではなく、絶え間ない増殖と自己複製を示唆していた。がんの特異的な耐久性のある T 細胞機能は、CTL 誘導率が低いという欠点を克服するために、これらの TCR 遺伝子を用いた TCR-T 細胞療法への応用の可能性が示唆された。

また、T 細胞と他の免疫細胞の相互間作用に関する研究において、C 型肝炎ウイルス排除後に生体に生じる肝がんに対する T 細胞の免疫応答の変化を解析し、各種 T 細胞や MDSC ならびに Treg といった免疫抑制細胞との細胞間相互作用の一端を明らかにし、論文として報告した (International Journal of Molecular Sciences 23:11623, 2022.)。具体的には、HLA-A24 陽性 C 型肝炎ウイルス感染患者 47 人を対象に、19 種類の肝細胞癌関連腫瘍関連抗原 (TAA) 由来ペプチドに対する免疫応答と宿主免疫細胞のプロフィールを、DAA 投与前と投与 24 週後に比較した。また、さまざまな免疫応答と免疫細胞の表現型変化との関係も検討した。DAA による治療により、TAA に対する 4 種類の免疫応答が誘導され、宿主免疫細胞のプロファイルが著しく変化した。特に、DAA による PD-1+CD4+ および PD-1+CD8+ T 細胞の頻度の減少は、TAA に対する免疫応答の増強と関連していた。HCV F 蛋白質は、PD-1+T 細胞の頻度増加の一因であることが同定され、DAAs による除菌後は減少する可能性が示された。DAAs は、PD-1 発現 CD4+ および CD8+ T 細胞の頻度を減少させることにより、HCC に対する患者の免疫応答を変化させた。これらの結果からは、肝がんにおける T 細胞の性質には、肝炎ウイルス関連蛋白質を含め、様々な背景肝因子が関与していることが示唆された。肝がんの免疫治療では、こうした背景肝に特有の免疫制御因子を明らかにすることで、より効果的な治療方法の開発につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Li S, Mizukoshi E, Kawaguchi K, Miura M, Nishino M, Shimakami T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Honda M, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Alterations in Hepatocellular Carcinoma-Specific Immune Responses Following Hepatitis C Virus Elimination by Direct-Acting Antivirals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 11623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231911623.	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 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 3123
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 -

1. 著者名 Seike Takuya, Boontem Piyakarn, Yanagi Masahiro, Li Shihui, Kido Hidenori, Yamamiya Daisuke, Nakagawa Hidetoshi, Okada Hikari, Yamashita Tatsuya, Harada Kenichi, Kikuchi Mitsuru, Shiraishi Yoshitake, Ozaki Noriyuki, Kaneko Shuichi, Yamashita Tetsumori, Mizukoshi Eishiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Hydroxynonenal Causes Hepatocyte Death by Disrupting Lysosomal Integrity in Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 925 ~ 944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2022.06.008	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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奏効例におけるワクチン特異的・非特異的 CD8 陽性 T 細胞の挙動と遺伝子発現解析。
3. 学会等名 第58回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 李師慧、川口和紀、水腰 英四郎.
2. 発表標題 C 型肝炎患者の DAAs 治療前後における抗腫瘍免疫応答と免疫細胞プロファイルの変化.
3. 学会等名 第58回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中河 秀俊, 水腰 英四郎, 山下 太郎
2. 発表標題 肝細胞癌に対するペプチドワクチン投与症例における抗原特異的細胞傷害性T細胞の表現型と予後の関連
3. 学会等名 第27回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞傷害性 T 細胞及びその作製方法	発明者 水腰英四郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-157443	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------