

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590723

研究課題名（和文） ペプチドワクチンを用いた肝細胞癌免疫療法の開発

研究課題名（英文） Development of immunotherapy for hepatocellular carcinoma by peptide vaccine

研究代表者

水腰 英四郎（MIZUKOSHI EISHIRO）

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：90345611

研究成果の概要（和文）：本研究では肝細胞癌の免疫療法に有用と考えられるペプチドワクチンの開発を行った。その結果、以下に記載する成果が得られた。1）肝細胞癌が発現するアルファフェトプロテイン（AFP）とヒトテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）におけるヘルパーT細胞エピトープを同定した。2）同エピトープに対する免疫反応が肝細胞癌患者の末梢血リンパ球において確認された。3）同エピトープのアミノ酸配列をもつペプチドワクチンを開発した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we tried to develop immunotherapy for hepatocellular carcinoma (HCC) by peptide vaccine. The following results were obtained from this study. 1) The helper T cell (HTL) epitopes in AFP and hTERT were identified. 2) Immune responses against these HTL epitopes in peripheral blood mononuclear cells of HCC patients were observed. 3) Peptide vaccines encoding amino acid sequences in the HTL epitopes were developed based on the above results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ELISPOT アッセイ、ヘルパーT細胞、ペプチド、ワクチン、免疫治療、肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

現在、日本における肝細胞癌（肝癌）の治療では、ガイドラインが作成され、肝癌の病期や肝臓の機能によって、手術・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選択されている。しかしながら、治療の選択肢がこのように多くあるにも関わらず、肝癌による死亡者数は年間3万人を超え、さらに増加傾向にある。その理由の1つは、例え早期に癌を発見し、最適の治療を

行ったとしても、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ためである。したがって、肝癌による死亡者数の減少には治療後再発の抑制効果を兼ね備えた新たな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、近年、癌特異的抗原を認識し癌細胞を攻撃するリンパ球や宿主の免疫機能を調節する樹状細胞を用いた癌特異的免疫治療が行われ、一部

の症例では癌の消失や進行癌の進展阻止が得られることが報告されている。こうした抗原特異的な癌免疫療法は癌再発に対しても抑制効果が期待されることから、治療後再発を繰り返す肝癌の治療方法としては理想的である。しかしながら肝癌ではいまだこうした癌特異的免疫療法は確立されていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、肝癌に対する免疫治療法の確立を目的として、多くの基礎的な研究を行ってきた。これまでの研究成果からは、肝癌に対する細胞障害性 T 細胞 (CTL) による抗腫瘍免疫が存在すること、肝癌の治療である肝動脈塞栓療法、ラジオ波焼灼療法によって生体内での CTL による抗腫瘍免疫が増強することを見出し、肝癌局所治療を行った部位へ人工的に患者樹状細胞を投与することにより、さらに強い抗腫瘍免疫が誘導できる樹状細胞療法を確立してきた。

これらの研究結果は他の癌での報告と同様に肝癌患者においても免疫療法が有用であることを示唆しており、正しい方法でより強力な抗腫瘍免疫を誘導することができれば、肝癌に対する新しい治療法の確立につながると考えられる。一方、我々や他の研究者の最新の研究成果からは、こうした人工的に誘導された抗腫瘍免疫は、通常一過性の反応に過ぎず、治療後長期にわたって再発を繰り返す肝癌の再発を完全に抑制することは困難であることが明らかになってきた。

そこで本研究では、肝癌患者における抗腫瘍免疫をより効率的かつ強力に誘導し、一旦誘導できた抗腫瘍免疫が長期にわたって維持できる手法を確立し、肝細胞癌治療後の再発制御を目的とした癌免疫療法の開発を行いたいと考えた。抗腫瘍免疫反応を維持させるための方法にはいくつかの手法が考えられるが、本研究では特に、ヘルパー T 細胞 (HTL) のエピトープをもつペプチドワクチンを利用した手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下に示す 3 段階の方法で遂行した。

1) 肝癌特異的腫瘍抗原における HTL エピトープの同定

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 種類のアミノ酸配列から HTL エピトープとなりそうな配列部位を予測した。この予測には、コンピュータソフト (TEPITOPE) を用いるとともに、日本人に多いとされる HLA-class II 分子である、HLA-DRB1*0101, 0401, 0404, 0405, 0410, 0802, 0901, 1101, 1302, 1501, 1502 の結合モチーフを考慮して、できるだけ多くの

HLA-class II 分子に結合することが予想される 15~20 個のアミノ酸配列を選択した。こうして選択されたアミノ酸配列をもつペプチドを人工的に合成し、はじめに末梢血リンパ球を用いて、enzyme-linked immunospot (ELISPOT) アッセイ法によりペプチドのスクリーニングを行った。スクリーニングで陽性反応を認めたペプチドは、さらにリンパ球を HTL と CTL の分画に分けて解析を行い、同反応が HTL 由来であるかを確認した。次にペプチドを FITC でラベリングし、各 HLA-class II 分子を持つ細胞を用いて、ペプチドの結合実験を行い、エピトープを同定した。

2) 肝癌患者における HTL を介した抗腫瘍免疫反応の解析

1) において同定されたエピトープのアミノ酸配列を持つペプチドを用いて、肝癌患者末梢血リンパ球における免疫反応を ELISPOT アッセイ法にて測定した。

3) 肝癌患者における抗腫瘍免疫増強・維持をもたらす HTL エピトープを用いた癌免疫療法の開発

2) の検討において陽性反応を認めたペプチドをワクチンの候補として選定した。選定したものをを用いて、proliferation アッセイを行い、ワクチンとして使用した際の免疫原性の強さを検討した。一方、ワクチンとしての免疫誘導効果を検証するために、HLA-DR トランスジェニックマウスを用いた実験を予定していたが、上記ペプチドの選定に時間を要したこと、動物モデルの作製と購入が予定通りに進まなかったことから、同検討は本研究期間において施行できなかつた。またこのため、本研究の最終段階で行う予定としていた臨床試験も遂行できなかつた。

4. 研究成果

1) 肝癌特異的腫瘍抗原における HTL エピトープの同定

アルファフェトプロテイン (AFP) とヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) のアミノ酸配列からヘルパー T 細胞 (HTL) のエピトープとなりそうな配列部位についてコンピュータソフト (TEPITOPE) を用いて予測し、このうち日本人に多いとされる HLA-class II 分子の結合モチーフをもつペプチドを作製し、ELISPOT アッセイ法、HLA-class II 分子への結合実験により、HTL エピトープを含むと考えられるペプチドを同定した。

2) 肝癌患者における HTL を介した抗腫瘍免疫反応の解析

上記ペプチドを用いて、AFP 由来ペプチドと hTERT 由来ペプチドに対してそれぞれ 50 例の

肝癌患者の末梢血リンパ球における免疫反応を解析し、それぞれのペプチドに対して陽性反応を示す患者の頻度、その臨床的特徴を明らかにした。また、これらのペプチドに対する免疫応答を増強する、肝癌の治療方法を同定した。

以下にhTERT由来のペプチドに関する結果を示す。

表1 肝癌患者における免疫反応陽性率

Peptide No.	陽性数 (n)	陽性率 (%)
1	8	16
2	4	8
3	3	6
4	5	10
5	3	6
6	1	2
7	5	10
8	3	6
9	4	8
10	8	16
11	0	0
12	2	4
13	6	12
CMV	22	44
PMA	50	100

作製したhTERT由来ペプチドに対する肝癌患者末梢血リンパ球の免疫反応陽性率は0から16%であった。一方、サイトメガロウイルス由来のペプチド（表中のCMV）に対する陽性率は44%と、hTERTに比べ高率であった。

一方、同様の検討をC型肝炎ウイルス陽性の肝癌非合併患者（非担癌患者）で行ったところ、以下の表2に示すごとく、ペプチドに対する陽性率は肝癌患者に比べ、低かった。

表2 非担癌患者における免疫反応陽性率

Peptide No	陽性数 (n)	陽性率 (%)
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1	6
5	0	0

6	1	6
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	1	6
11	0	0
12	0	0
13	0	0
CMV	0	0
PMA	13	86

さらに同様な検討を、健常人（C型肝炎ウイルスの感染もなく、肝癌の合併もない人）で行ったところ、以下の表3に示す結果が得られた。

表3 健常人における免疫反応陽性率

Peptide No	陽性数 (n)	陽性率 (%)
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1	10
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	1	10
10	0	0
11	1	10
12	0	0
13	0	0
CMV	4	40
PMA	8	80

表3に示す如く、hTERT由来の一部のペプチドでは健常人においても免疫反応が認められた。表1～3の結果より、健常人やHCV陽性非担癌患者において、陽性反応を認めず、肝癌患者においてのみ高率に陽性反応を認めるペプチド、すなわち、肝癌に特異的と考えられる免疫反応の標的となるペプチドは、ペプチドNo. 1、7、10、13と考えられた。同様な検討はAFP由来のペプチドにおいても行った。

3) 肝癌免疫治療に有用なペプチドの選定

次に肝癌患者の末梢血リンパ球において高頻度に免疫反応が認められるエピトープをもつペプチドのHLA拘束性、細胞障害活性、T細胞をペプチドで刺激した際の各種サイトカイン産生能や増殖能を測定し、肝癌免疫治療への応用が可能と考えられるペプチドをAFPとhTERTにつき、それぞれ1個ずつ選定

した。このうち、hTERT 由来ペプチドでは表 1 のペプチド No. 1 相当するペプチドが最も免疫原性が強いペプチドの 1 つとして考えられた。HLA 拘束性の検討では、同ペプチドは日本人に多いとされる、HLA-DRB1*0405 と HLA-DRB1*0901 に結合し、HTL に認識されていることが明らかとなった。

今後は、上記検討により選択された、hTERT と AFP 由来のそれぞれのペプチドを用いた、肝細胞癌に対する有効性と安全性を動物モデルにおいて検証するとともに、将来的にはヒトでの臨床試験を行うことによって、肝癌免疫治療への応用について検討したいと考えている。

また、本研究の最後に、これらのペプチドとこれまでに同定した HLA-class I 拘束性のペプチドを人工的に結合し、ロングペプチドとして生体に投与するための条件設定を行った。今後はこのような人工的なハイブリッドペプチドの応用についても検討していく予定である。

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 6 件)

1) 山下太郎, 水腰英四郎 (他 15 名、12 番名) Discrete nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.

Hepatology, 57, 1484-1497, 2013, 査読有
doi: 10.1002/hep.26168.

2) 水腰英四郎, 山下竜也 (他 8 名、1 番目) Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.

Hepatology, 57, 1448-1457, 2013, 査読有
doi: 10.1002/hep.26153.

3) 水腰英四郎, 伏見一美 (他 4 名、1 番目) Expression of Chondroitin-glucuronate C5-epimerase and Cellular Immune Responses in Patients with Hepatocellular Carcinoma.

Liver International, 32, 1516-1526, 2012, 査読有
doi: 10.1111/j.1478-3231.2012.02853.x.

4) 水腰英四郎, 本多政夫 (他 4 名、1 番目) Identification of Aldo-Keto Reductase 1C3-derived Peptides Recognized by Cytotoxic T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients.

Immuno-Gastroenterology, 1, 47-57, 2012,

査読有

doi: 10.7178/ig.1.1.10

5) 水腰英四郎, 金子周一
Prospects of Immunotherapy for Hepatocellular Carcinoma.

Immuno-Gastroenterology, 1, 47-57, 2012, 査読無

doi: 10.7178/ig.12

6) 水腰英四郎, 中本安成 (他 8 名、1 番目) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.

Hepatology, 53, 1206-1216, 2011, 査読有
doi: 10.1002/hep.24149.

[学会発表] (計 6 件)

1) 水腰英四郎, A phase I study of vaccination with human telomerase reverse transcriptase-derived peptide in patients with hepatocellular carcinoma.

The 63rd annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2012. 11. 10, Hynes Convention Center (USA)

2) 水腰英四郎, 肝細胞がんに対する免疫療法の開発, 第 16 回日本がん免疫学会総会, 2012. 7. 28, 北海道大学学術交流会館 (北海道)

3) 水腰英四郎, 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼療法による腫瘍関連抗原特異的 T 細胞の増強, 第 48 回日本肝臓学会, 2012. 6. 8, ANA クラウンプラザホテル (石川県)

4) 水腰英四郎, ペプチドワクチンによる肝細胞癌免疫療法の開発, 第 98 回日本消化器病学会総会, 2012. 4. 19, 京王プラザホテル (東京都)

5) 水腰英四郎, Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.

The 62nd annual meeting of the American association for the study of liver disease, 2011. 11. 8, Moscone West (USG)

6) 水腰英四郎, Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. The International Liver Congress 2011 by EASL (46th annual meeting), 2011. 4. 11, Internationales Congress Centrum (ICC)

(Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水腰 英四郎 (MIZUKOSHI EISHIRO)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：90345611