

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15778

研究課題名（和文）抗原特異的T細胞受容体を用いた肝癌治療に関する検討

研究課題名（英文）Investigation of antigen-specific T cell receptors for the treatment of hepatocellular carcinoma

研究代表者

玉井 利克（Tamai, Toshikatsu）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40782082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝がん患者から得られた肝がん関連抗原を認識するT細胞受容体(TCR)についての基礎的データを取得した。肝がん関連抗原であるAFP、MRP3、hTERT由来抗原特異的な細胞障害性T細胞(CTL)のTCRについて、内在性TCRの発現を抑制するsiRNAベクターに組み込んだ。それらのTCRの肝がん細胞株に対する細胞傷害活性を、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いてtime-lapse観察で視覚的に確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCR治療を臨床応用するためには、内在性TCRと導入TCRとのミスペアリングを抑制しながら、治療効果の高いTCRを取得する必要がある。本研究においては、新規の肝がん関連抗原由来特異的TCRを取得することはできなかったが、既存のTCRを用いて、内在性TCR発現を抑制するベクターに組み込んだ場合の細胞傷害活性を確認した。本研究結果および用いた手法は、肝がんに対する免疫療法を確立するために有用な情報になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Basic data on T cell receptors (TCRs) recognizing hepatocellular carcinoma-associated antigens obtained from hepatocellular carcinoma patients. The TCR of cytotoxic T cells (CTLs) specific for AFP, MRP3, and hTERT-derived antigens, which are hepatocarcinoma-associated antigens, were incorporated into siRNA vectors that suppress expression of the endogenous TCR. The cytotoxic activity of those TCRs against hepatocellular carcinoma cell lines was visually confirmed by time-lapse observation using a confocal laser microscope system.

研究分野：消化器内科

キーワード：T細胞受容体 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における悪性新生物による死亡数の中で、部位別で肝癌は年間約 2.8 万人で 5 位を占めている(厚生労働省 人口動態統計 2016)。肝癌は他部位再発のため、治療後再発が高率に生じる。また近年、非 B 非 C を背景とした肝細胞癌が増加しており、進行癌になってから発見されることも多い。これが、肝癌による死亡者数がいまだに多い理由の一つである。進行肝癌に対しては分子標的薬を含めた化学療法が行われるが、その治療効果は十分とはいえない。そこで、肝癌に対する新規の治療法開発が望まれているが、癌免疫療法は有力な候補と考えられている。これまで我々のグループでは、肝細胞癌に特異的に発現する腫瘍関連抗原を数多く同定してきた。これらの HLA-A24 拘束性の抗原由来ペプチドを用いて、実際の肝細胞癌患者を対象としたペプチドワクチン臨床試験を行い、それぞれのワクチンの安全性を確認した。効果を認めた症例もあったが、進行癌症例ではペプチドワクチンによる細胞傷害性 T 細胞(CTL)の誘導効率が悪いことも明らかになった。抗原特異的 TCR を治療に用いる養子細胞移植であればこの問題を解決できる可能性がある。ただ、個体によって発現している癌抗原は異なっているため、個別化医療を今後行う際には標的とする癌抗原が多い方が望ましい。

2. 研究の目的

本邦ではヒト白血球抗原-A(HLA-A)は A24 と A2 が多数を占める。本研究で、HLA-A24 拘束性の肝癌関連抗原特異的 TCR に関する知見を多く得ることで、今後の我が国での肝癌治療に寄与することができると思われる。

まず、これまでに我々が同定した AFP・hTERT・MRP3 由来ペプチドや、既報の GPC3 由来ペプチドなどの肝癌関連抗原に特異的な TCR を同定し取得する。そして数多く得られた TCR 遺伝子の機能評価を行い、肝癌治療に有効と考えられる TCR を確認する。本研究を通してヒト肝癌治療へ応用していくための基礎データを取得することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)肝がん患者の末梢血リンパ球から、HLA-A24 の MHC ペプチドテトラマーを用いて、ペプチド特異的 CTL を検出し、シングルセルレベルでソーティングする。次に、その TCR レパートリーを解析し、ヒト末梢血リンパ球への TCR 遺伝子導入のための pMXs-TCR-IRES-GFP プラスミドベクターを作成する。

(2)作成したプラスミドベクターを、ヒト CD3 および CD8 分子を遺伝子導入した細胞株上に導入し、MHC ペプチドテトラマーとの結合を確認する。ここまで確認できたものについて、レトロウイルスベクターを作成し、同ベクターを用いて実際にヒト末梢血リンパ球に TCR 遺伝子導入する。それぞれの TCR について、各種がん抗原を発現する細胞株に対する細胞障害活性を共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて、time-lapse 観察を行い視覚的に確認する。標的細胞は Calcein Violet で染色し、培地中に Propidium Iodide を入れておくことで死細胞を標識することができる。

4. 研究成果

(1)複数の肝がん患者の末梢血リンパ球から、テトラマー陽性細胞を検出し、それらの TCR 発現ベクターを作成したが、新規の TCR を同定することは困難であった。そこで、すでに取得済みである既存の AFP・MRP3・hTERT 由来抗原を認識する TCR を用いて、今後の臨床応用に向けた基礎的データを得る方針とした。

TCR 遺伝子治療を確立するにあたって、内在性 TCR の存在が問題となるが、これを抑制する siRNA ベクター(Mol Ther Nucleic Acids 2012, Takara Bio, Inc.)を用いることで内在性 TCR の発現を抑制し、導入 TCR の発現を上昇させることができる。このベクターに上記の各 TCR 遺伝子を組み込んだ。対象コントロールとして、CMV 由来抗原特異的 TCR を用いた。

(2)引き続き、各種 TCR を siRNA ベクターに組み込んだものの機能評価を行った。まず、ヒト肝がん細胞株である HepG2(A24 陽性)をペプチドパルスしたものに対する細胞傷害活性を検討した。siRNA-CMV と比較して、AFP・MRP3・hTERT の siRNA ベクターは細胞傷害活性が強いことを確認できた。次に、ペプチドパルスした状態ではなく、内在性の抗原に対する細胞傷害活性を調べるために、肝がん関連抗原を発現する細胞株で検討することとした。HepG2 が AFP、MRP3、hTERT を

発現することは qRT-PCR で予め確認しており、ペプチドパルスしない状態で HepG2 に対する細胞傷害活性を確認した。hTERT は CMV より細胞傷害活性が強いことを示めせたが、AFP・MRP3 は CMV と同程度の killing であった。

以上の結果から、本研究では TCR 治療を臨床研究に応用するための基礎的データを取得することができた。また、細胞傷害活性を視覚的に確認する手法を習得することができた。

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 Tamai Toshikatsu, Mizukoshi Eishiro, Kumagai Masashi, Terashima Takeshi, Iida Noriho, Kitahara Masaaki, Shimakami Tetsuro, Kitamura Kazuya, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Honda Masao, Fushimi Kazumi, Kaneko Shuichi	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 Scientific Reports	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 Toshikatsu Tamai, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko.
2. 発表標題 Identification of a novel -protein-derived helper T cell epitope in hepatocellular carcinoma patients.
3. 学会等名 AASLD The liver meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshikatsu Tamai, Eishiro Mizukoshi, Makoto Kurachi, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Identification and Functional Analysis of HBV Epitope-Specific TCRs
3. 学会等名 AASLD The Liver meeting 2021（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------