

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19790496  
研究課題名(和文) 変異型ペプチドを用いた肝細胞癌に対する樹状細胞による免疫療法

研究課題名(英文) Dendritic cell-based peptide vaccine against HCC

## 研究代表者

江口 潤一 (EGUCHI JUNICHI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00384371

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌患者のほとんどが肝硬変を合併しているため、進行例においては集学的治療を十分に行うことができないことが多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。そのような観点から肝癌に対する免疫療法が注目されており様々な腫瘍抗原を標的とした免疫治療法が検討されている。本研究では、肝細胞癌患者を対象に肝細胞癌に発現している Glypican-3 抗原に対する免疫応答について検討し、免疫療法の標的となる新しい HLA 拘束性細胞傷害性 T 細胞エピトープの存在を確認した。

研究成果の概要(英文)：HCC is usually associated with cirrhosis and often recurs even after complete treatment of the tumors in the remaining part of the cirrhotic liver. Thus, there is a strong need for the development of a new intervention therapy that suppresses the occurrence or recurrence of HCC effectively and that has fewer side effects. Immunotherapy may be such a treatment and may be applicable to the clinical treatment of HCC. Restricted and high-level expression of Glypican-3 in a majority of human HCC makes this protein an attractive vaccine target. Here we described the identification of the new Glypican-3 peptide as a HLA restricted CTL epitope.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：免疫学、内科、癌、肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 末期の肝細胞癌では、全身に及ぶ侵襲の強い副作用のため集学的治療を十分に行うことができない症例も多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。そのような観点から現在免疫療法が注目され

ている。一般に肝細胞癌は免疫原性が低く、また肝臓という特殊な環境下に存在することから生体の免疫監視機構を逃れやすい。さらに、担癌生体内では癌の進行と共に全身の免疫応答は抑制されていることが多い。そこで、その免疫抑制状態を打破しようと

様々な生体免疫を賦活化させる治療法が検討されている。インターフェロン- $\alpha$ やインターロイキン-4等のサイトカイン遺伝子を用いた遺伝子治療もその一つである。その中でもサイトカイン遺伝子を導入した癌細胞を用いた免疫療法は、個々の癌細胞自体を用いるので、その癌細胞に特異的な未知の癌抗原に対する免疫を誘導できる可能性があること、局所に高濃度のサイトカインを供給できること、腫瘍が存在している部位に接種せずに免疫を誘導できる可能性があることなどが利点と考えられ種々の研究が行われている。

(2) 現行の腫瘍細胞によるワクチンの問題点は、腫瘍組織が正常組織との共通蛋白を発現している可能性があるため、正常組織に対する自己免疫反応を誘導してしまう可能性があることである。近年では主要組織適合性抗原およびT細胞レセプターに免疫源として認識されやすいペプチドを、主要組織適合性抗原に対する親和性、およびプロテオソームの認識部位の予測をするプログラムを導入することによって、腫瘍に高発現する様々な蛋白分子内の細胞障害性T細胞に認識される抗原エピトープが数多く同定されている。このペプチドをワクチンに利用することで、自己免疫反応を回避し、より効果的で腫瘍特異的な免疫治療を行うことができると考えられている

## 2. 研究の目的

(1) Glypican-3 抗原、MAGE-1 抗原、NY-ESO-1 抗原はいずれも腫瘍抗原として広く知られており、肝細胞癌においてもそれぞれ約 70%、70%、30%と高い頻度で発現があるとの報告がある。肝癌の治療前後で、上記癌特異抗原に対する細胞障害性T細胞の応答や臨床データと、肝癌再発までの期間につき比較検討し、進行肝癌に対する免疫療法の確立に臨床応用することを目的とする。

(2) Glypican-3、MAGE-1、NY-ESO-1 腫瘍抗原に対する抗原特異性 T 細胞応答を検討して、HLA 拘束性細胞傷害性 T 細胞が認識するエピトープの同定を試みることで、将来的な進行肝癌に対する免疫療法に役立てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Glypican-3、MAGE-1、NY-ESO-1 の全領域のアミノ酸配列をカバーし、10 アミノ酸ずつをオーバーラップさせた 20-mer のペプチドを計 104 個した。肝細胞癌患者を対象として治療前後において、末梢血から CD8

陽性リンパ球と単球を分離した。CD8 陽性リンパ球を effector 細胞、単球を抗原提示細胞として、合成ペプチドと共に 48 時間混合培養し、その後 ELISpot assay にて各ペプチドに対する IFN- $\gamma$  産生細胞数、Spot-Forming Cell (SFC) 数を測定した。治療前後の免疫応答を評価し、患者背景や臨床経過との関連性を検討した。

(2) 強い免疫応答を示した症例より反応する 20mer ペプチドを同定し、そのペプチドをベースとして、1 アミノ酸をオーバーラップした 20mer ペプチドを作成した。同一症例において、それらのペプチドに対する反応を ELISpot assay にて評価し、エピトープの同定を試みた。さらに患者と同一の HLA タイプを持つ健常者より樹状細胞を誘導し、同定したエピトープに対する抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導した。この抗原エピトープに対する反応を ELISpot assay にて評価し、同定されたエピトープの HLA 拘束性を確認した。

## 3. 研究の方法

(1) Glypican-3、MAGE-1、NY-ESO-1 の全領域のアミノ酸配列をカバーし、10 アミノ酸ずつをオーバーラップさせた 20-mer のペプチドを計 104 個した。肝細胞癌患者を対象として治療前後において、末梢血から CD8 陽性リンパ球と単球を分離した。CD8 陽性リンパ球を effector 細胞、単球を抗原提示細胞として、合成ペプチドと共に 48 時間混合培養し、その後 ELISpot assay にて各ペプチドに対する IFN- $\gamma$  産生細胞数、Spot-Forming Cell (SFC) 数を測定した。治療前後の免疫応答を評価し、患者背景や臨床経過との関連性を検討した。

(2) 強い免疫応答を示した症例より反応する 20mer ペプチドを同定し、そのペプチドをベースとして、1 アミノ酸をオーバーラップした 20mer ペプチドを作成した。同一症例において、それらのペプチドに対する反応を ELISpot assay にて評価し、エピトープの同定を試みた。さらに患者と同一の HLA タイプを持つ健常者より樹状細胞を誘導し、同定したエピトープに対する抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導した。この抗原エピトープに対する反応を ELISpot assay にて評価し、同定されたエピトープの HLA 拘束性を確認した。

## 4. 研究成果

(1) 20 例の肝細胞癌患者を対象として治療前後における免疫応答について評価した。その結果、80%(20 例中 16 例)の症例で癌抗原特異

的なELISpot陽性の免疫応答(SFC数 $\geq 10$ )が認められた。治療前には60%(20例中12例)で、治療後には65%(20例中13例)で陽性の免疫応答がみられた。高反応例(SFC数 $\geq 40$ )は全体の50%(20例中10例)の症例で見られ、治療前では25%(20例中5例)で、治療後では35%(20例中7例)であった。治療前後での比較では治療前と比べ治療後で免疫応答が増強する例が55%(20例中11例)、減弱する例が40%(20例中8例)みられた。(図1)

<b>ELISpot陽性例 (SFC <math>\geq 10</math>)</b>	<b>16例 (80%)</b>
治療前	12例 (60%)
治療後	13例 (65%)
<b>高反応例 (SFC <math>\geq 40</math>)</b>	<b>10例 (50%)</b>
治療前	5例 (25%)
治療後	7例 (35%)
治療後SFC増加例	11例 (55%)
治療後SFC減少例	8例 (40%)

図1 免疫応答の結果

(2) 肝癌患者の癌特異抗原に対する免疫応答や臨床データと、治療後の肝癌再発までの期間についての関連を単変量解析により解析した。血小板数(p=0.027)、プロトロンビン時間(p=0.030)、治療後の癌特異的CD8陽性細胞の免疫応答(p=0.004)が、無再発期間に関連していた。(図2)

		p value
年齢	< 73 / $\geq 73$	0.634
性別	男 / 女	0.624
AST値(IU/l)	< 52 / $\geq 52$	0.889
ALT値(IU/l)	< 55 / $\geq 55$	0.664
血小板数(万/ $\mu$ l)	< 10 / $\geq 10$	<b>0.027</b>
プロトロンビン時間(%)	< 77.5 / $\geq 77.5$	<b>0.030</b>
アルブミン値(g/dl)	< 3.4 / $\geq 3.4$	0.488
総ビリルビン(mg/dl)	< 1.0 / $\geq 1.0$	0.340
AFP(ng/ml)	< 20 / $\geq 20$	0.699
ウイルス	HCV / Non-HCV	0.975
肝機能(Child-Pugh)	A / B	0.066
腫瘍径(mm)	< 20 / $\geq 20$	0.756
腫瘍数	1 / $\geq 2$	0.486
治療	RFA / TACE	0.481
治療前SFC	< 40 / $\geq 40$	0.649
治療後SFC	< 40 / $\geq 40$	<b>0.004</b>

図2 臨床データと再発期間の関連(単変量解析)

(3) 単変量解析にて関連の見られた血小板数、プロトロンビン時間、治療後の癌特異的CD8陽性細胞の免疫応答と肝癌再発までの期間についての関連を多変量解析にて解析した。その結果、治療後の癌抗原に対する免疫応答

だけが無再発期間と関連することがわかった。(図3)

	Hazard ratio	95% Confidence limit	p value
血小板数			
$\geq 1 \times 10^5/\mu$ l	0.916	0.326-2.020	0.843
$< 1 \times 10^5/\mu$ l	1.000		
プロトロンビン時間			
$\geq 77.5\%$	0.455	0.094-1.390	0.177
$< 77.5\%$	1.000		
治療後SFC			
$\geq 40$	0.342	0.079-0.866	<b>0.022</b>
$< 40$	1.000		

図3 臨床データと再発期間の関連(多変量解析)

(4) 対象患者のうち、強力な免疫応答が誘導され、反応する20merペプチドを同定できた症例より抗原エピトープの同定を試みた。Glypican-3についてHLA-B35に認識されるGPC3<sub>286-295</sub>(MAGVVEIDKY)と、HLA-B40に認識されるGPC3<sub>287-296</sub>(AGVVEIDKYW)が抗原エピトープとして存在することが示唆された。対象患者と共通するHLAを持つ健常人より抗原特異的CD8陽性T細胞を誘導することによって同定されたエピトープのHLA拘束性を確認した。(図4)

HLA Type	Peptide	Subsequence
HLA B35 (3501)	GPC3 <sub>286-295</sub>	MAGVVEIDKY
HLA B40	GPC3 <sub>287-296</sub>	AGVVEIDKYW

図4 同定されたエピトープ

## 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5件)

- ① Hiroishi K., Eguchi J., Baba T., Shimazaki T., Ishii S., Hiraide A., Sakaki M., Doi H., Uozumi S., Omori R., Matsumura T., Yanagawa T., Ito T., Imawari M.: Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with HCC: Journal of Gastroenterology 45(4): 451-458, 2010, 査読有
- ② Doi H., Hiroishi K., Shimazaki T., Eguchi J., Baba T., Ito T., Matsumura T., Nozawa H., Morikawa K., Ishii S., Hiraide A., Sakaki M., Imawari M.: Magnitude of CD8 T-cell responses against hepatitis C virus

and severity of hepatitis do not necessarily determine outcomes in acute hepatitis C virus infection: Hepatology Research 39(3): 256-265, 2009, 査読有

- ③ Hiraide A., Hiroishi K., Eguchi J., Ishii S., Doi H., Imawari M.: Dendritic cells stimulated with cytidine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides and interferon-alpha-expressing tumor cells effectively reduce outgrowth of established tumors *in vivo*: Cancer Science 99(8): 1663-1669, 2008, 査読有
- ④ Eguchi J., Zhang JG., Kruse CA, Gomez GG., Fakhrai H., Schroter S., Ma W, Hoa N., Minev B., Delgado C., Wepsic HT., Okada H., Jadus MR.: Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics: Clinical Cancer Research 13 (2 Pt 1): 566-575, 2007, 査読有
- ⑤ Zhu X., Nishimura F., Sasaki K., Fujita M., Dusak JE., Eguchi J., Fellows-Mayle W., Storkus WJ., Walker PR., Salazar AM., Okada H.: Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models: Journal of Translational Medicine 5 : 10, 2007, 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① 江口 潤一、広石 和正、井廻 道夫、インターロイキン4 遺伝子導入細胞を用いた免疫療法の検討、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月5日、パシフィコ横浜
- ② 広石 和正、江口 潤一、井廻 道夫、IFN- $\alpha$  遺伝子導入細胞と樹状細胞との融合細胞による抗腫瘍免疫誘導作用の検討、第15回日本消化器関連学会週間 (JDDW2007)、2007年10月19日、神戸ポートピアホテル
- ③ Hiroyoshi Doi, Kazumasa Hiroishi, Ayako Hiraide, Junichi Eguchi, Shigeaki Ishii, Takuya Matsumura, Masashi Sakaki, Michio, Imawari, Efficacy and mechanism of dendritic cell-based immunotherapy with CpG and IFN-alpha-expressing tumor cells for murine colorectal cancer, 99th AACR Annual Meeting 2008、2008年4月14

日、San Diego, CA

- ④ 江口 潤一、広石 和正、土肥 弘義、平出 綾子、石井 成明、坂木 理、馬場 俊之、井廻 道夫、肝癌患者の治療前後における各種腫瘍抗原に対する細胞性免疫応答の研究、第44回日本肝臓学会総会、2008年6月6日、愛媛県県民文化会館
- ⑤ 土肥 弘義、広石 和正、江口 潤一、石井 成明、平出 綾子、坂木 理、井廻 道夫、インターロイキン-4とCpGを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討、第95回日本消化器病学会総会、2009年5月8日、北海道厚生年金会館
- ⑥ 広石 和正、江口 潤一、石井 成明、平出 綾子、坂木 理、土肥 弘義、井廻 道夫、C型肝炎におけるCTLエピトープの同定とCTL応答の解析、第45回日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸ポートピアホテル
- ⑦ 広石 和正、土肥 弘義、江口 潤一、石井 成明、平出 綾子、坂木 理、大森 里紗、伊藤 敬義、馬場 俊之、井廻 道夫、肝細胞癌患者の腫瘍抗原特異的細胞性免疫応答と治療後肝癌再発に関する検討、第17回日本消化器関連学会週間 (JDDW2009)、2009年10月15日、国立京都国際会館
- ⑧ 石井 成明、広石 和正、江口 潤一、平出 綾子、土肥 弘義、大森 里紗、井廻 道夫、マウスモデルを用いたHCV特異的T細胞エピトープの同定、第17回日本消化器関連学会週間 (JDDW2009)、2009年10月15日、国立京都国際会館
- ⑨ Kazumasa Hiroishi, Hiroyoshi Doi, Toshiyuki Baba, Junichi Eguchi, Shigeaki Ishii, Ayako Hiraide, Masashi Sakaki, Manabu Uchikoshi, Yuu Shimozuma, Risa Ohmori, Takayoshi Ito, Michio, Imawari, Tumor associated antigen specific CD8+ T cell responses would suppress recurrence of hepatocellular carcinoma, The Liver Meeting 2009, AASLD's 60st Annual Meeting, 2009年11月3日、Boston, MA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江口 潤一 (EGUCHI JUNICHI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号 : 00384371