

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17618

研究課題名（和文）肝細胞癌術前がん免疫療法症例の腫瘍浸潤リンパ球を用いた抑制性免疫の解明

研究課題名（英文）Elucidation of immune suppression using tumor-infiltrating lymphocytes in perioperative immunotherapy for patients with hepatocellular carcinoma

研究代表者

新藤 芳太郎（Shindo, Yoshitaro）

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70749811

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）：がんペプチドワクチン療法の方向性としては、免疫チェックポイント阻害剤との併用を視野に入れて、負の免疫応答の制御が必要になると考えられる。我々は、肝細胞癌（HCC）患者に周術期ワクチン療法を行い、切除標本の病理学的、免疫学的特徴について解析を行った。結果として、本ワクチン療法は、腫瘍抗原特異的T細胞（CTL）を腫瘍内に誘導し、免疫原性の低いcold HCCの一部をHotに変換する可能性がある。CD8+細胞上のチェックポイント分子（PD-1、TIGIT）の高発現を認めたことから、免疫チェックポイント阻害剤の併用は、相乗的に作用し高い抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、がんワクチン療法は免疫原性の低いCold HCCが細胞傷害活性T細胞が浸潤するHotへ変化している可能性が示唆された。腫瘍浸潤細胞は免疫チェックポイント分子を高発現しているため、活性化が抑えられ十分な抗腫瘍効果を得られていない可能性がある。マウス腫瘍モデルを用いたワクチン療法と抗PD-1抗体の併用療法では、有意な抗腫瘍効果および生存期間延長効果を認めたことから、本ワクチン療法と抗PD-1抗体の併用は、相乗的に作用し高い抗腫瘍効果をもたらす可能性を示唆する学術的・社会的に意義ある成果を得た。

研究成果の概要（英文）：Combination cancer vaccination with immune checkpoint inhibitors (ICIs) to restore T cell responses may be a potential therapeutic approach for hepatocellular carcinoma (HCC). We conducted therapeutic vaccine for the perioperative treatment of patients with resectable HCC. Our novel vaccination therapy has the potential to convert immunologically cold HCC tumors into hot tumors by inducing CD8+ T cell infiltration into tumors. Our results indicate that the upregulation of PD-1 and TIGIT expression on CD8+ T cells may restrict T cell responses in HCC patients. As such, it was suggested that the combination of ICIs may act synergistically to produce a high anti-tumor effect.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 免疫療法 ワクチン療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は術後補助療法として有効性が示されたものではなく、根治切除術後5年以内の再発率が60-70%と極めて高い (Amisaki M, et al. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2018)。近年、癌特異的免疫細胞を賦活化することを目的としたがんペプチドワクチン療法が報告され一定の効果はあるものの、予後改善には至っていないのが現状である。我々はこれまでがんペプチド療法において、末梢血リンパ球の割合が15%以下の患者ではCTL誘導が低く予後不良 (Hazama S, Shindo Y, et al. J Transl Med. 2014)、血中IL-6が高値症例では予後不良 (Hazama S, Shindo Y, et al. Anticancer Res. 2014)、ELISPOT assay よりペプチド特異的CTL反応が強く出た症例で有意に予後良好 (Suzuki N, Shindo Y, et al. Cancer Sci. 2017)、末梢血のCD4、CD8T細胞上の疲弊マーカーであるPD-1、TIM-3の免疫チェックポイント受容体高発現が予後不良であると報告してきた (Shindo Y, et al. J Exp Clin Cancer Res. 2017)。これまでのがんペプチドワクチン療法は、標準療法不応の進行癌症例において選択されることが多く、末梢血中のCTL誘導に注目されることが多かった。しかしながら、がんペプチドワクチン療法によって誘導されたCTLが腫瘍局所に浸潤していることを明らかにすることは重要であり、これらと臨床効果の関連を調べることはペプチドワクチン療法の有効性評価に結びつくと思われる。そこで、本研究ではHCC患者を対象に、がんワクチン療法を周術期として行う第I相試験を行い、切除標本の病理学的、免疫学的特徴について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、教室ですでに施行中である特定臨床研究 (jRCTs061180033) 「根治切除可能HCCに対する術前・術後補助免疫療法としてのHSP70由来ペプチド+GPC3由来ペプチドと新規免疫アジュバンドであるsLAG3-IgとPoly-ICLCを用いたがんワクチン療法」に登録した患者由来の血液ならびに切除腫瘍組織を用いて、それらに含まれるリンパ球の機能を解析することである。まず本ワクチン療法を投与した切除標本の腫瘍壊死、腫瘍抗原発現状況およびCD8+T細胞浸潤状況に関して免疫病理組織学的に検討を行った。切除標本の免疫染色において、HSP70およびGPC3が染色されており、同部位にCD8T細胞の浸潤が

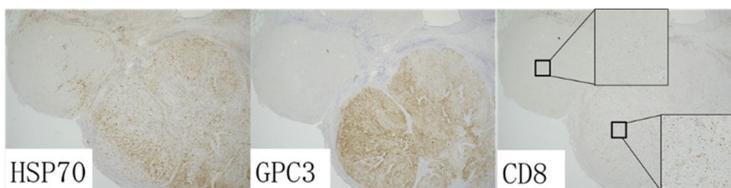


図1 ワクチン投与症例における免疫染色

確認された (図1)。このようにCTLが浸潤するHot tumorが誘導された症例においても、免疫抑制機構が働いている可能性がある。そこで、マスサイトメトリー (CyTOF)

を用いて TIL および PBMC 上の免疫チェックポイント分子の発現ならびに抑制性免疫細胞の解析を行い、今後の免疫療法の開発につなげることを目指す。

3. 研究の方法

HCC 患者 (20 症例) に対して Heat shock protein 70 (HSP70) および Glypican 3 (GPC3) 由来のペプチドと 2 種のアジュバント (Poly-ICLC + hLAG-3Ig) を組み合わせたワクチン療法を手術前に 6 回投与し、根治切除を施行した。切除標本は H&E 染色および HSP70、GPC3、CD8 の免疫組織化学的解析を行った。さらに、腫瘍浸潤リンパ球を抽出し 53 種類の抗体を用いて CyTOF により解析した。対照として、同時期にワクチン療法等の術前治療を施行せずに切除をおこなった 20 症例の HCC 切除標本を使用した。さらに、本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体併用療法の有用性を評価するため、マウス腫瘍モデルを用いた検討を行った。

4. 研究成果

ワクチン投与群の病理学的検討結果を表 1 に示した。切除標本の病理学的解析では、HSP70 と GPC3 はそれぞれ 16 名で発現しており、一部の症例では同一腫瘍内で HSP70 と GPC3 が相補的に発現していたため、19 症例で少なくともどちらかのマーカーを発現している腫瘍細胞が認められた。免疫組織学的解析により、ワクチン投与群の 20 例中 10 例で CD8+細胞の高浸潤 (450cells/mm²) が観察され、対照群では 5 例で確認された。今回、ワクチン療法以外の前治療は施行していないことを考慮すると、本ワクチン療法は一部の免疫原性が低い腫瘍である Cold な HCC を Hot に変換しうる可能性が示唆された。

表1. ワクチン症例の病理学的解析結果

患者番号	腫瘍表面 抗原発現状況*		腫瘍内CD8+細胞数 (cells/mm ²)**	
	HSP70	GPC3	Mean	SE
#01	+	+	786	33
#02	-	+	580	98
#03	+	+	592	85
#04	-	+	499	25
#05	-	-	191	44
#06	+	+	83	16
#07	+	+	1073	54
#08	+	+	609	79
#09	+	-	121	11
#10	+	+	593	119
#11	+	+	64	7
#12	+	+	342	37
#13	+	-	374	133
#14	+	+	262	36
#15	+	+	854	49
#16	+	-	547	34
#17	-	+	276	14
#18	+	+	136	23
#19	+	+	740	282
#20	+	+	136	9

次に、ワクチン群 20 症例の CyTOF データ解析の結果を図 2 に示す。図 2A では、生細胞のうち CD3+T 細胞の割合をドットプロットで示している。病理組織学的に Hot と Cold に分類した症例は、それぞれ赤と青の点で示した。CyTOF データ解析の結果、全生細胞中の CD3+T 細胞の割合は、Cold 群よりも Hot 群で有意に高く、病理学的所見と一致することが示された。次に、免疫チェックポイント分子である PD-1、T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif domain (TIGIT) 陽性細胞の割合を解析した。図 2B は、代表症例の TIL における CD3+T 細胞の CD4、CD8、PD-1、TIGIT、および CD39 の t-SNE 分類結果を示し、図 2C は、全 20 症例の割合を示している。CD8+T 細胞上に発現する、PD-1+、TIGIT+の割合は、Cold 群に比べ Hot 群で有意に高値であった(図 2C)。

さらに、t-SNE 分類による評価では、CD8+T 細胞のうち PD-1+, TIGIT+, CD39+は同一の細胞領域で発現していた (図 2B)。これは、Hot 群において、本ワクチンは T 細胞疲弊マーカーである PD-1 および TIGIT を強く発現する腫瘍特異的 CD8 + T 細胞を誘導していることが示唆された。つまり、本ワクチン療法は CTL を強力に腫瘍内に浸潤させる効果を有するが、同細胞は免疫チェックポイント分子を高発現しているため活性化が抑えられ十分な抗腫瘍効果を得られていない可能性が示唆された。そこで、本ワクチン療法とチェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体の併用療法が抗腫瘍効果を改善しうる可能性を考慮し、マウス腫瘍モデルを用いた検討を行った。

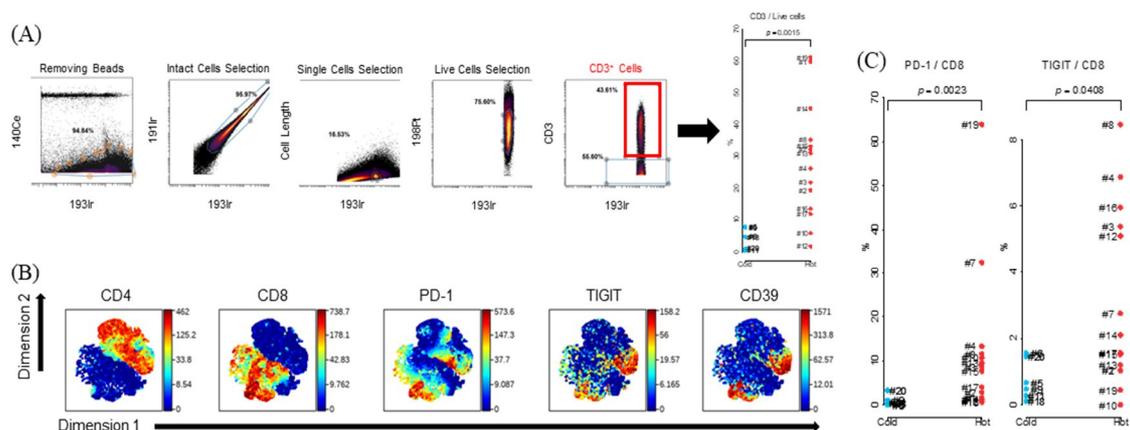


図2. 腫瘍浸潤リンパ球のCyTOF解析

マウス腫瘍モデルを用いたワクチン療法と抗 PD-1 抗体の併用療法の抗腫瘍効果の検討では、無治療、ワクチン単剤、抗 PD-1 抗体単剤と比較して併用療法は有意な抗腫瘍効果および生存期間延長効果を認めた (図 3)。

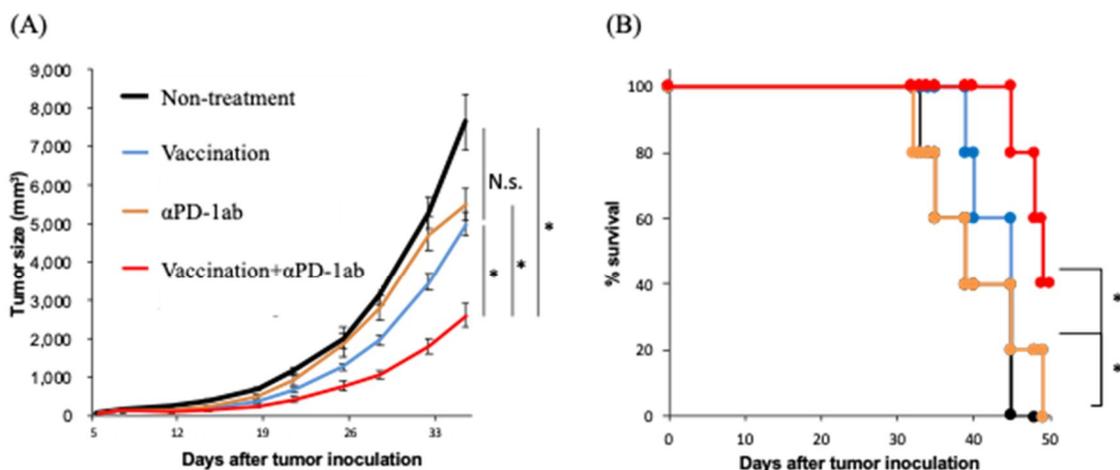


図3. マウス腫瘍モデルに対する併用療法の抗腫瘍効果

以上の結果より、本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体の併用は、相乗的に作用し高い抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

引用文献

Amisaki M, Saito H, Tokuyasu N, Sakamoto T, Honjo S and Fujiwara Y: Prognostic value of postoperative complication for early recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 17: 323-329, 2018.

Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, et al.: A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *J Transl Med* 12: 108, 2014.

Hazama S, Takenouchi H, Tsunedomi R, et al.: Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer Res* 34: 4201-4205, 2014.

Suzuki N, Hazama S, Iguchi H, et al.: Phase II clinical trial of peptide cocktail therapy for patients with advanced pancreatic cancer: VENUS-PC study. *Cancer Sci* 108: 73-80, 2017.

Shindo Y, Hazama S, Suzuki N, et al.: Predictive biomarkers for the efficacy of peptide vaccine treatment: based on the results of a phase II study on advanced pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 36: 36, 2017.

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 1件）

1. 著者名 Matsui H, Hazama S, Nakajima M, Xu M, Matsukuma S, Tokumitsu Y, Shindo Y, Tomochika S, Yoshida S, Iida M, Suzuki N, Takeda S, Yoshino S, Ueno T, Oka M, Nagano H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 945-957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02737-y. Epub 2020 Oct 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Masao, Hazama Shoichi, Tamada Koji, Udaka Keiko, Kouki Yasunobu, Uematsu Toshinari, Arima Hideki, Saito Akira, Doi Shun, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Matsukuma Satoshi, Tokumitsu Yukio, Nakagami Yuki, Takeda Shigeru, Ueno Tomio, Nagano Hiroaki	4. 巻 69
2. 論文標題 A phase I study of multi-HLA-binding peptides derived from heat shock protein 70/glypican-3 and a novel combination adjuvant of hLAG-3Ig and Poly-ICLC for patients with metastatic gastrointestinal cancers: YNP01 trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02518-7	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 Nakajima M, Hazama S, Tokumitsu Y, Shindo Y, Matsui H, Matsukuma S, Nakagami Y, Tamada K, Udaka K, Sakamoto M, Saito A, Kouki Y, Uematsu T, Xu M, Iida M, Tsunedomi R, Suzuki N, Takeda S, Ioka T, Doi S, Nagano H.	4. 巻 na
2. 論文標題 Phase I study of a novel therapeutic vaccine as perioperative treatment for patients with surgically resectable hepatocellular carcinoma: The YCP02 trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13900.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakajima M, Hazama S, Nakagami Y, Tamada K, Udaka K, Sakamoto M, Kato N, Akinaga S, Saito A, Adachi K, Matsui H, Matsukuma S, Shindo Y, Tokumitsu Y, Iida M, Tsunedomi R, Suzuki N, Doi S, Ioka T, Nagano H.
2. 発表標題 Histopathological and mass cytometry analyses of tumor microenvironments after a novel neoadjuvant peptide vaccination therapy for resectable HCC.
3. 学会等名 第33回肝胆膵外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島正夫、碓 彰一、松井洋人、新藤芳太郎、松隈 聡、徳光幸生、中上裕有樹、恒富亮一、土肥俊、玉田耕治、宇高恵子、坂元亨宇、加藤直也、秋永史郎、齋藤 彰、飯田通久、鈴木伸明、武田 茂、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 肝細胞癌に対する新規がんワクチン療法による腫瘍微小環境の改変と複合免疫療法の提案
3. 学会等名 第57回肝癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島正夫、碓 彰一、徳光幸生、新藤芳太郎、松井洋人、松隈 聡、中上裕有樹、恒富亮一、玉田耕治、宇高恵子、坂元亨宇、加藤直也、齋藤 彰、土肥俊、吉田 晋、飯田通久、鈴木伸明、武田 茂、井岡達也、永野浩昭
2. 発表標題 肝細胞癌に対する新規がんワクチン療法による腫瘍微小環境の改変と複合免疫療法の提案
3. 学会等名 第34回バイオセラピー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新藤芳太郎、碓彰一、中島正夫、松隈聡、松井洋人、徳光幸生、中上裕有樹、兼清信介、恒富亮一、友近忍、吉田晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、吉野茂文、小笠原定久、坂元亨宇、加藤直也、永野浩昭
2. 発表標題 切除可能肝細胞癌に対する 新規ペプチドワクチンを用いた周術期補助療法の開発
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中上裕有樹、碓彰一、玉田耕治、土肥俊、坂元亨宇、加藤直也、齋藤彰、秋永士朗、安達圭志、徐明、松井洋人、新藤芳太郎、松隈聰、徳光幸生、恒富亮一、永野浩昭
2. 発表標題 切除可能な HCC に対する新規術前後ペプチドワクチン療法施行症例の 免疫チェックポイントの TIL 解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中上裕有樹、碓彰一、玉田耕治、土肥俊、坂元亨宇、加藤直也、齋藤彰、安達圭志、徐明、松井洋人、新藤芳太郎、松隈聰、徳光幸生、恒富亮一、永野浩昭
2. 発表標題 切除可能な HCC に対する 新規術前後ペプチドワクチン療法症例の組織病理・免疫的反応
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新藤芳太郎、碓彰一、中島正夫、松隈聰、松井洋人、徳光幸生、中上裕有樹、渡邊裕策、恒富亮一、友近忍、吉田晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、井岡達也、小笠原定久、坂元亨宇、加藤直也、永野浩昭
2. 発表標題 周術期補助療法としての肝細胞癌に対する新規ペプチドワクチン療法
3. 学会等名 第33回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新藤芳太郎、碓彰一、徳光幸生、中島正夫、松隈聰、松井洋人、中上裕有樹、兼清信介、友近忍、恒富亮一、吉田晋、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、吉野茂文、小笠原定久、坂元亨宇、加藤直也、永野浩昭
2. 発表標題 切除可能肝細胞癌に対する 周術期補助療法としての新規ペプチドワクチン療法
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masao Nakajima, Shoichi Hazama, Koji Tamada, Keiko Udaka, Shun Doi, Michiie Sakamoto, Akira Saito, Shiro Akinaga, Hiroto Matsui, Yoshitaro Shindo, Satoshi Matsukuma, Yukio Tokumitsu, Shinobu Tomochika, Michihisa Iida, Shin Yoshida, Ryouichi Tsunedomi, Yuki Nakagami, Nobuaki Suzuki, Shigeru Takeda, Hiroaki Nagano
2. 発表標題 Immunological and histopathological tumor responses to a novel neoadjuvant peptide vaccine targeting HSP70 and GPC3 antigens in patients with resectable HCC
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------