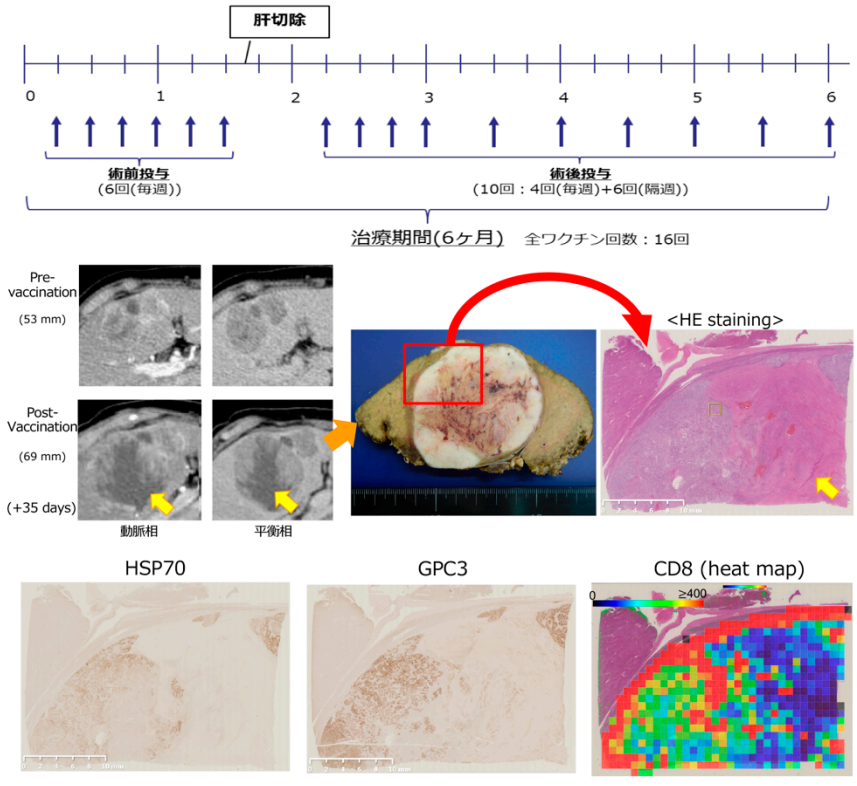
65　肝癌に対する周術期免疫療法と浸潤リンパ球の免疫応答	永野　浩昭

【目的】肝細胞癌（HCC）は仮に根治切除を施行しても高率に残肝再発をきたす難治性疾患である。近年、各種消化器癌に対する免疫チェックポイント阻害剤（ICI）を用いたがん免疫療法が標準治療となりつつある。しかし、HCC の中で ICI が奏効するのは免疫原性が高く細胞障害性 T 細胞（CTL）が多数浸潤している一部のいわゆる Hot tumor のみであり HCC の約 20%に過ぎない。したがって、HCC における ICI の抗腫瘍効果を高めるためには、免疫原性が低いことで CTL が浸潤しにくい Cold tumor をいかにして Hot tumor に誘導するかが大きな課題である。我々は新規がんペプチドワクチン療法を開発し、第 I 相試験で安全かつ高い確率で抗原特異的 CTL を誘導することを証明した。そこで、肝細胞癌患者を対象に、同ワクチン療法を周術期として行う第 I 相試験を行った。今回、切除標本の病理学的、免疫学的特徴について報告する。

【方法】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）を組み合わせて皮下注射した。本ワクチン療法は手術前に 6 回、毎週投与した。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。また、腫瘍浸潤リンパ球を抽出し 53 種類の抗体を用いてマスサイトメトリー（CyTOF）により解析した。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。

【結果】20 例に周術期ワクチン療法を行った。病理組織学的解析の結果、10 名の患者において腫瘍内への高い $CD8^{+}$T 細胞の浸潤が認められ、これらの患者は免疫学的 Hot と考えられた。腫瘍浸潤リンパ球のマスサイトメトリー解析では、病理学的に Hot と判断した症例は Cold な症例と比較して、$CD8^{+}$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。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。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。

HCC に対する周術期ワクチン療法と腫瘍微小環境の変化



65. 肝癌に対する周術期免疫療法と浸潤リンパ球の免疫応答

永野　浩昭

山口大学 大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学講座

Key words：がんペプチドワクチン療法，腫瘍免疫原性，肝細胞癌，チェックポイント阻害剤，複合免疫療法

緒　言

肝細胞癌（HCC）は仮に根治切除を施行しても高率に残肝再発をきたすことがその特徴であり 5 年以内の再発率は 60～70%と極めて高い［1］。近年、各種消化器癌に対する免疫チェックポイント阻害剤（ICI）を用いたがん免疫療法の有用性が報告され、今後標準治療となる可能性が高い。しかし、HCC の中で ICI が奏効するのは免疫原性が高く細胞障害性 T 細胞（CTL）が多数浸潤している一部のいわゆる Hot tumor のみであり HCC の約 20%に過ぎない［2］。したがって、HCC における ICI の抗腫瘍効果を高めるためには、免疫原性が低いことで CTL が浸潤しにくい Cold tumor をいかにして Hot tumor に誘導するかが大きな課題である。この点については、HCC 患者の免疫応答が強く認められる症例では、再発が抑制されることが既に報告されているが［3］、腫瘍関連抗原に特異的な CTL を持つ HCC 患者の割合は残念ながら高くない。そこで教室では、このような Cold tumor を Hot tumor へ誘導するために、(1) がん抗原特異的リンパ球の効率的な誘導と、(2) 腫瘍へのリンパ球浸潤、の 2 点に着目して研究開発を行ってきた。(1) に関しては、がんペプチドワクチン療法を代表的手法としてきた。HSP70 由来ペプチド＋GPC3 由来ペプチド＋sLAG3-Ig＋Poly-ICLC による新規がんペプチドワクチン療法を開発し、進行再発固形がん患者に対する第 I 相臨床試験（特定臨床研究：jRCTs061180058）を施行し、本ワクチン療法が安全に施行しうることと、がん特異的リンパ球を高率に誘導しうることを見出した［4］。さらに、上記のワクチン療法を、HCC 切除後再発予防を目的として、周術期に投与する新規臨床試験（特定臨床研究：jRCTs061180033）を開始し、その結果、プレリミナリーではあるが、約 6 割の患者におけるワクチン投与後の腫瘍壊死と著明な免疫細胞浸潤を確認した。

本研究においては、癌免疫療法の抗腫瘍効果増強のため、先述した (2) 腫瘍へのリンパ球浸潤に着目し、同臨床試験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、腫瘍浸潤リンパ球と肝癌細胞を解析することで、Cold tumor を Hot tumor に誘導するためのメカニズムを解明する。さらには、Hot tumor における腫瘍局所での抑制性免疫の探索を行う事で、免疫チェックポイント阻害剤等の併用を視野に入れ、高い抗腫瘍効果を有する新規複合免疫療法の開発を目的とした。

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。対照として、同時期にワクチン療法等の前治療を施行せずに切除を行った HCC 切除標本を使用した。結果、腫瘍抗原発現状況に両群間で違いは認められなかった。一方で $CD8^+$腫瘍浸潤リンパ球に関しては、ワクチン投与群で対照群の倍の症例で高浸潤を認めた。つまり、ワクチンを投与することで、一部の Cold HCC が Hot へ変化している可能性が示唆された。切除標本より抽出した腫瘍浸潤リンパ球のマスサイトメトリー解析では、ワクチン投与群において、病理学的に Hot と判断した症例は Cold な症例と比較して、$CD8^+$T 細胞上のチェックポイント分子（PD-1、TIGIT）の高発現を認め、チェックポイント阻害剤との併用療法が抗腫瘍効果を高める可能性が示唆された。そこで、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を行った。結果、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。

方　法

1. 切除肝細胞癌の病理組織学的検討

免疫組織化学的検討（IHC）は、切除 HCC 標本の 4μm ホルマリン固定、パラフィン包埋切片に対して行った。5 cm 未満の腫瘍で少なくとも 1 つの代表的な切片面を覆っている場合は 1 切片を、5 cm 以上の腫瘍に対しては代表的な組織像を調べるために、2 つまたは 3 つの代表的なブロックを選択した。解析のために、各腫瘍から少なくとも最長径と代表的な亜結節をカバーする複数の領域を選択した。腫瘍標本は、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色と、HSP70、GPC3、CD8 の IHC 染色を行った。脱パラフィン処理と抗原賦活の後、スライドを適切な一次抗体と 4℃で一晩インキュベートした。次の 3 つの一次抗体を使用した：抗 HSP70 抗体（クローン C92F3A-5、マウスモノクローナル、1：1000；アブカム社、英国ケンブリッジ）、抗 GPC3 抗体（クローン 1G12、マウスモノクローナル、1：300；バイオモザイク社、米国バーリントン、VT）、抗 CD8 抗体（マウスモノクローナル、1：150、アブ 17147；アブカム社）。翌日、切片を 3 回洗浄し、二次抗体（抗マウス K4001；Dako、Santa Clara、CA, USA）と共に室温で 30 分間インキュベートした。反応は 3,3'-diaminobenzidine（DAB、Dako）発色剤で可視化し、Mayer's hematoxylin で対比染色した。

H&E および CD8 で染色したスライドをホールスライドイメージスキャナー（NanoZoomer-RS、浜松ホトニクス、日本）を用いて 20 倍の倍率でスキャンした。高解像度画像から HCC 領域を選択し、1 mm^2の大きさの格子状に分割した。デジタル化した CD8 スライド画像上で、DAB 染色した $CD8^+$T 細胞の数を手動でカウントした。統計解析のために、各患者の腫瘍浸潤 $CD8^+$T 細胞数は、腫瘍縁領域（すなわち、腫瘍の境界と交差する関心領域）を除いて、$CD8^+$T 細胞数の最高値 5 個の平均±SE として表した。HSP70 および GPC3 の IHC 染色は、それぞれ腫瘍細胞の 10%以下または 10%超が染色された場合に陰性または陽性と評価した。IHC 染色は、臨床病理学的パラメータと盲検化された 2 名の病理医によって評価した。

2. 腫瘍浸潤リンパ球（TIL）のマスサイトメトリー解析

TIL は、53 種類の抗体を用いて、マスサイトメトリー（Fluidigm Corp.、米国カリフォルニア州）により解析した。各サンプルにつき 2 つのパネルをマスサイトメーター（CyTOF）で分析した。各パネルは 33 の抗体で構成され、13 の抗体は重複して使用した。

TIL は切除 HCC から単離した。つまり、腫瘍サンプルを 1 mm^2の断片に切断し、Liberase TL（F. Hoffmann-La Roche Ltd.、Basel、Switzerland）を含む RPMI 培地 1640（Thermo Fisher Scientific Inc、Waltham、MA、USA）中で 37℃、30 分間インキュベートした。その後、サンプル混合物を 40μm のセルストレーナーで濾過した。得られた TIL は、直ちに CyTOF 染色を行った。最後に、CyTOF を用いてサンプルを解析し、さらなる解析のためにフローサイトメトリーファイルフォーマット（.FCS）に変換した。TIL の $CD3^+$細胞は、従来の 2 軸プロットベースのゲーティングによって得られた。X 軸は Iridium-193 を表し、Y 軸は 5 種類のマーカーから 1 つを表示した。Cerium-140 はビーズを除去するために使用し、Iridium-191、細胞長、Cisplatin-198、CD3 はそれぞれ、無傷、単一、生細胞、$CD3^+$細胞の指標として使用した。

ゲーティングされた $CD3^+$T 細胞は、t-distributed stochastic neighbor embedding（t-SNE）教師なし分類アルゴリズムにより 2 次元空間へ投影した。計算には、1,200 回の反復、30 回の plexity、0.5 回の theta、および 1 回の seed をパラメータとして設定した。入力変数には、両パネルの重複抗体、すなわち、CD3、CD4、CD8、CD16、CD25、CD44、CD45RA、CD45RO、CTLA-4、CCR4、CCR7、PD-1、TIM-3 を用いた。T 細胞免疫マーカーの割合は、t-SNE の結果に基づいて定量化した。ゲーティングと計算には Cytobank（Fluidigm Corp.）を使用した。

3. マウス腫瘍モデルおよび治療スケジュール

オスまたはメスの 6～10 週齢の C57BL/6 マウスは、Japan SLC（静岡、日本）から購入した。T 細胞、MC38 の培地として、10% FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、25 mM HEPES、および 50 mM 2-メルカプトエタノールを補充した RPMI-1640 を使用した。すべての動物実験に関しては、山口大学の施設内動物管理使用委員会によって承認されている。C57BL/6 マウスに、0 日目に 1×10^6細胞の MC38 を皮下接種（sc）した。5 日目に腫瘍体積が均等

となるような 4 群に分け、5、12 そして 19 日目に治療介入を行った（無治療、100 μg/head の抗 PD-1 抗体を腹腔内投与、ペプチドとアジュバント複合体を 1 か所皮下投与、併用療法）。すべての実験で、腫瘍の大きさとマウスの生存率を週 2 回評価した。

4. 統計解析

生存実験を除くすべてのアッセイの統計分析は両側 student-t 検定を使用した。マウスの生存率については、カプラン・マイヤー曲線を描き、統計分析にはログランク検定を使用した。0.05 未満の P 値での差は有意とみなした。

結果および考察

1. 病理組織学的検討による腫瘍細胞の壊死、抗原発現状況および腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の評価

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、6 症例で腫瘍細胞の壊死が確認された。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。さらに、腫瘍浸潤 $CD8^+$T 細胞の数に関して評価を行った。一般的に無治療の HCC においても、$CD8^+$T 細胞が高集積してる、いわゆる免疫学的に Hot な HCC は約 2 割程度存在すると報告されている［5～8］。今回腫瘍浸潤 $CD8^+$T 細胞が 450 cells/mm^2以上を高浸潤と定義すると、同時期にワクチン等の前治療を施行せずに肝切除術を行った 20 症例（コントロール群）の検討では、5 例 25%が免疫学的に Hot な腫瘍であり既報と一致した（データ非公開）。一方で、ワクチン投与群 20 症例の内 10 例 50%が免疫学的に Hot な腫瘍であった。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学的に Cold な HCC を Hot に変換しうる可能性が示唆された。

2. TIL のマスサイトメトリー解析

ワクチン群 20 症例の CyTOF データ解析の結果を図 1 に示す。図 1A 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 と分類した症例は、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（$p=0.0015$）、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 1B 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 1C は、全 20 症例の割合を示した。$CD8^+$T 細胞上に発現する、$PD\text{-}1^+$、$TIGIT^+$の割合は、Cold 群に比べ Hot 群で有意に高値であった（それぞれ、$p=0.0023$、$p=0.0408$：図 1C）。さらに、t-SNE 分類による評価では、$CD8^+$T 細胞のうち $PD\text{-}1^+$、$TIGIT^+$、$CD39^+$は同一の細胞領域で発現していた（図 1B）。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を示唆した。つまり、本ワクチン療法は腫瘍抗原特異的 T 細胞を強力に腫瘍内浸潤させる効果を有するが、同細胞は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。

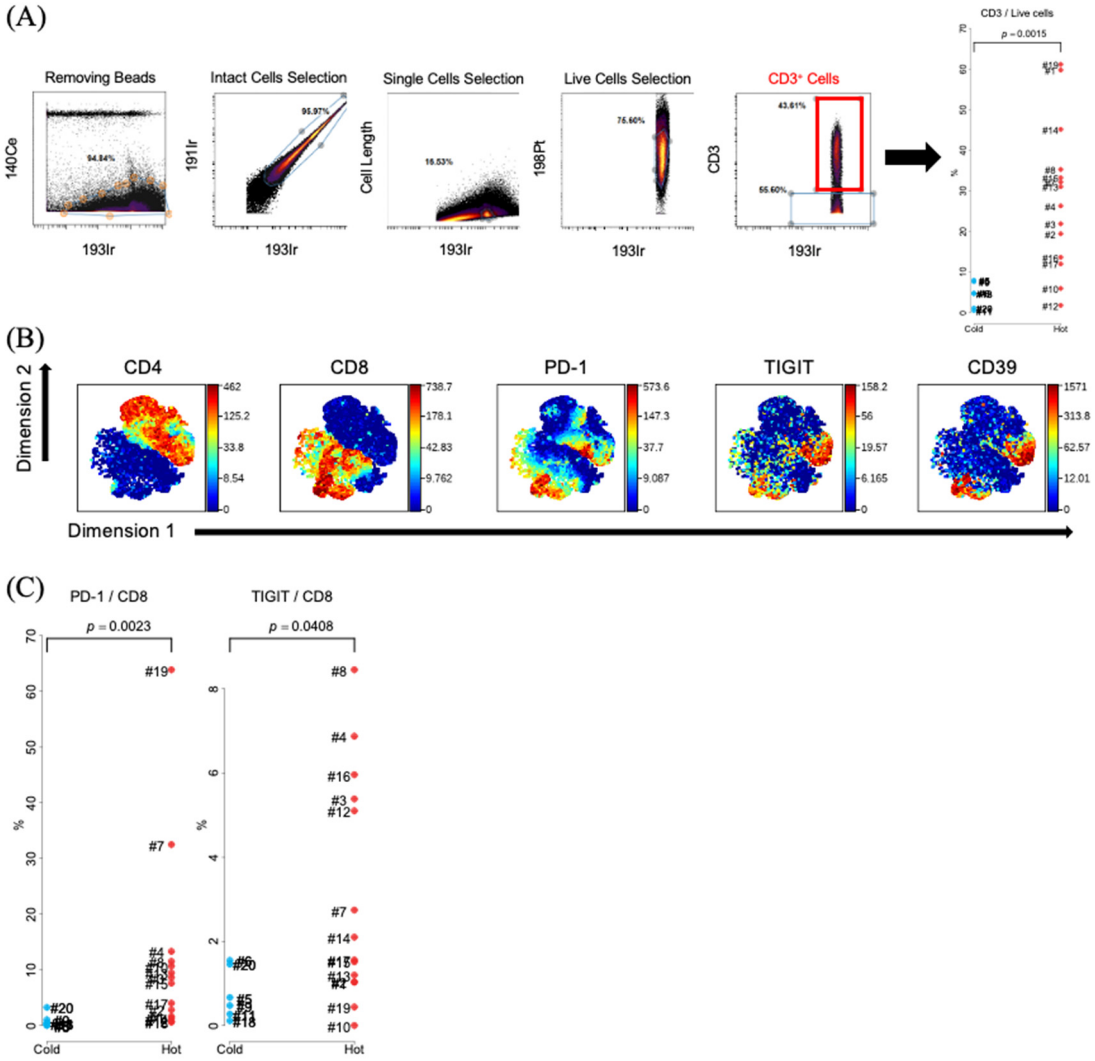


図 1. 腫瘍浸潤リンパ球のマスサイトメトリー解析

A) 腫瘍浸潤リンパ球における $CD3^+$T 細胞のゲーティングの流れと、免疫学的 Hot（赤丸）と Cold（青丸）の患者における生細胞中の $CD3^+$細胞の割合の比較。

B) 代表症例の TIL における CD4、CD8、PD-1、TIGIT、CD39 の t-SNE 分類。

C) 免疫学的 Hot（赤丸）と Cold（青丸）の患者における $CD8^+$T 細胞上の PD-1、TIGIT 発現割合の比較結果。p 値、Mann-Whitney-Wilcoxon 検定。

3. マウス腫瘍モデルにおける本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体の併用療法の可能性の検討

固形腫瘍を有するマウス腫瘍モデルに対する本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体併用療法の治療効果を検討した。0 日目に MC38 を C57BL/6 マウスに皮下接種した。5、12 そして 19 日目に治療介入（無治療、抗 PD-1 抗体を腹腔内投与、ペプチドとアジュバントを皮下投与、併用療法）を行った。結果、併用療法による治療は無治療、抗 PD-1 抗体単剤またはワクチン単剤で治療したものと比較して、腫瘍増殖を有意に抑制し（図 2A）、マウスの生存を有意に延長した（図 2B）。一方で、抗 PD-1 抗体単剤やワクチン療法は、無治療と比較して、有意な腫瘍増殖抑制や生存延長効果も認められなかった。以上の検討結果より、本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体併用療法の有用性が強く示唆された。今後は臨床試験として消化器癌患者に対する本併用療法の有用性を検証してゆきたい。

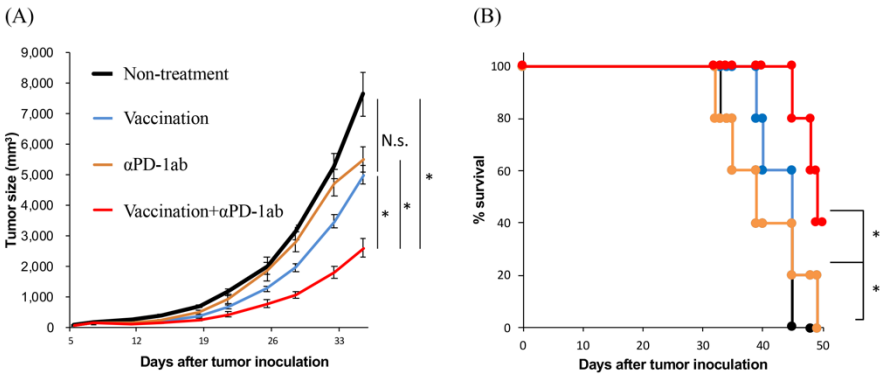


図 2. マウス腫瘍モデルに対する併用療法の抗腫瘍効果

MC38 を保有する C57BL/6 マウスに、抗 PD-1 抗体単剤（n＝6）、ワクチン単剤（n＝6）そして併用（n＝6）を投与した。

A) 腫瘍の成長を定期的に測定した。

B) マウスの生存率を評価した。* Log-rank P＜0.005。

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/mm2)**		腫瘍壊死の有無
	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	-

*＋は腫瘍抗原の陽性（腫瘍細胞の 10%以上が陽性）、－は陰性をそれぞれ表す。

**腫瘍内 $CD8^+$T 細胞の上位 5 カウントの平均細胞数を示す。$CD8^+$T 細胞の高度な浸潤（＞450 cells/mm^2）は太字で示す。SE：標準誤差。

共同研究者

本研究の共同研究者は、山口大学医学部免疫学講座の玉田耕治教授、安達圭志講師、慶應義塾大学医学部病理学講座の坂元亨宇教授、東京医科大学分子病理学分野の齋藤彰教授である。

文 献

1) Nakajima M, Nagano H, et. al. Viral elimination is essential for improving surgical outcomes of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: Multicenter retrospective analysis. Ann Gastroenterol Surg. 2020 Jul 23;4(6):710-720. PMID: 33319162 doi: 10.1002/ags3.12377.

2) Finn RS, Cheng AL, et. al; IMbrave150 Investigators. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. N Engl J Med. 2020 May 14;382(20):1894-1905. PMID: 32402160. doi: 10.1056/NEJMoa1915745.

3) Mizukoshi E, Kaneko S, et. al. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2011 Apr;53(4):1206-16. PMID: 21480325. doi: 10.1002/hep.24149.

4) Nakajima M, Nagano H, et. al. 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. Cancer Immunol Immunother. 2020 Aug;69(8):1651-1662. PMID: 32219501. doi: 10.1007/s00262-020-02518-7.

5) Wada Y, Kojiro M, etl al. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. Hepatology. 1998 Feb;27(2):407-14. PMID: 9462638. doi: 10.1002/hep.510270214.

6) Gao Q, Tang ZY, et. al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J Clin Oncol. 2007 Jun 20;25(18):2586-93. PMID: 17577038. doi: 10.1200/JCO.2006.09.4565.

7) Yarchoan M, Anders RA, et. al. Characterization of the Immune Microenvironment in Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res. 2017 Dec 1;23(23):7333-7339. PMID: 28928158. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0950.

8) Kurebayashi Y, Sakamoto M, et. al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. Hepatology. 2018 Sep;68(3):1025-1041. PMID: 29603348. doi: 10.1002/hep.29904.