

T細胞輸注療法

Adoptive T cell therapy



池田裕明(写真) 今井奈緒子

Hiroaki IKEDA and Naoko IMAI

三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学講座

◎有効な腫瘍免疫が存在するのか、という長い論争の年月を経て、われわれはいままさに免疫療法が腫瘍治療の医療現場に持ち込まれる時代の目撃者になろうとしている。悪性腫瘍患者から腫瘍特異的T細胞を誘導し、体外で拡大培養した後に患者に輸注する腫瘍特異的T細胞輸注療法は、進行性の悪性黒色腫の患者において既存治療法を凌ぐ臨床効果を示している。腫瘍特異的T細胞の誘導と大量培養が困難ながん種においても、T細胞輸注療法を可能とする試みとして腫瘍特異的T細胞受容体(TCR)遺伝子導入T細胞療法やキメラ受容体(CAR)遺伝子導入T細胞療法が開発され、有効性を示す症例が報告されはじめています。T細胞輸注療法は細胞療法であり、場合によっては遺伝子治療であるという方法論の抱える制約ゆえに、医薬品としての開発はがんワクチンや抗体療法の後を追う形となってきた。しかし、近年のT細胞療法臨床試験における顕著な臨床効果は企業などの関心を急速に集めており、今後製薬化、医療化が急ピッチで進むと考えられる。一方、その顕著な臨床効果は副作用の出現可能性と表裏一体であることも明らかになりつつあり、今後はより有効で、かつ安全性の高い治療戦略の構築が必須になる。



細胞療法, T細胞, TCR, CAR

1950年代後半のバーネット、トーマスらによる“がんの免疫監視機構”のコンセプト¹⁾の提示以来、半世紀以上を経てようやく免疫学的手法によるがんの治療が医療の現場に持ち込まれようとしている。特異的がん免疫療法では抗原認識の特異性、記憶の形成、細胞破壊能力というT細胞の特徴が利用される。がんに対する特異的免疫療法は、能動的免疫による治療法であるがんワクチン療法と、受動的免疫による治療法である抗体療法や細胞輸注療法に分けられる。がんワクチン療法では2010年にDendreon社の樹状細胞ワクチンPROVENGE[®]がアメリカFDAによりがんワクチン製剤としてはじめて承認され、特異的免疫療法の本格的な臨床応用の夜明けを迎えつつある。抗体療法では抗CTLA-4抗体、抗PD-1/PD-L1抗体、抗CCR4抗体などが臨床の有用性を示しつつある。細胞療法においても腫瘍特異的T細胞を患者から誘導したり、抗原特異的レセプター遺伝子

を導入して腫瘍特異的T細胞を作製したりして患者に輸注する治療の臨床試験において悪性黒色腫、滑膜肉腫、白血病などの難治性悪性腫瘍に対して既存の治療法を大きく凌ぐ効果を示す症例が報告されはじめています。現在、腫瘍特異的T細胞輸注療法は、細胞療法、遺伝子治療という技術的・規制的な制約を乗り越え、製薬化を含めた治療の標準化へ向けた動きが企業などを巻き込み加速している。

期待される腫瘍特異的T細胞輸注療法

1990年代にはじまるヒト腫瘍抗原の分子的同定²⁾はがんワクチン療法と腫瘍特異的T細胞輸注療法という2つの特異的免疫療法の開発を可能とした。近年、腫瘍抗原特異的なT細胞の輸注療法が有効ながん免疫療法としてきわめて有効なものとなりうるという報告があいつぎ、たいへん期待されている。具体的には末梢血やがん浸潤リンパ

球を腫瘍抗原ペプチドや腫瘍細胞などにより体外で刺激し、腫瘍特異的な T 細胞を大量調整し輸注する方法である³⁾。

本治療法も初期には臨床的な効果がみられない例や輸注した T 細胞の患者体内生存が限られているという結果が多かった。これらの報告例にはおもに 2 つの問題点があったと考えられる。第 1 には近年ますますその重要性が認識されつつある、担がん生体における免疫抑制機構の存在がある。免疫抑制機構の解除を伴わない方法では効果が限られていた。第 2 には輸注する T 細胞のクオリティーの問題がある。初期の輸注療法では長期に *in vitro* 培養を繰り返した T 細胞が用いられる場合が多かった。近年の T 細胞研究が示すところでは長期培養 T 細胞は *in vitro* におけるエフェクター機能は強いが老化形質が強く、*in vivo* における生存性に劣り、結果として輸注療法に用いた場合の抗腫瘍効果が弱い⁴⁾。

アメリカ国立がん研究所の Rosenberg らのグループは、T 細胞輸注療法実施患者に化学療法剤や放射線照射の前処置を加え、担がん生体の免疫抑制機構の解除をめざしている。これらの前処置により、がん患者中の制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄性抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells : MDSC) などの免疫抑制性細胞群が抑制されるとともに、輸注されたリンパ球がホメオスタティック拡大により活性化され、増殖する^{3,4)}。また、腫瘍破壊に伴う Toll-like receptor 刺激物質により自然免疫系が活性化されると考えられている。同時に、輸注する T 細胞の *in vitro* 調整時間は近年短く設定される傾向にある。実際、Rosenberg らは進行期の悪性黒色腫患者を対象として化学療法剤で前処置をした後に、がん浸潤リンパ球を用いた特異的 T 細胞輸注を行い、50% 近くの患者に RECIST 基準で有効性 (PR+CR) を認めたと報告した。さらに、前処置に放射線照射を加えることにより RECIST 基準で 72% という有効率を報告している^{4,5)}。進行期悪性黒色腫では標準的な化学療法の奏功率は 20% 未満と考えられ、免疫療法が抗がん剤による治療成績を大きく上まわる可能性を示している。

T細胞受容体(TCR)遺伝子導入T細胞療法

上に述べたような、腫瘍特異的 T 細胞を患者から誘導して輸注するという治療法の大きな障壁のひとつとして悪性黒色腫を除く多くのがん種では、十分な数の腫瘍特異的 T 細胞を分離、拡大培養することが困難であるという問題があげられる。さらに、数を増やすための体外における長期培養は、T 細胞の老化、疲弊を誘導し、輸注後の体内生存性を顕著に悪化させる。この問題ゆえに腫瘍特異的 T 細胞輸注療法は、ごく限られた例外を除いてほぼ悪性黒色腫の患者に適用が限られてきた。また、患者体内における十分に親和性の高い TCR をもつ T 細胞の頻度は一般に低い。これらの問題点の克服法のひとつとして、がん抗原特異的キラー T 細胞クローンから得られた高親和性 TCR 遺伝子を患者末梢血より得られた CD8⁺ T 細胞に遺伝子導入し、人為的に大量のがん特異的 CD8⁺ T 細胞を短期間の培養で作製し輸注するアプローチが検討されている (図 1)。Rosenberg らのグループは、がん抗原 MART-1 特異的な TCR をレトロウイルスにより遺伝子導入したリンパ球を用いた悪性黒色腫患者に対する臨床試験の結果を 2006 年に報告した。この試験では、17 例中 2 例において輸注細胞の生体内長期維持と腫瘍縮小効果が報告された⁶⁾。その後、より高親和性な TCR を用いることにより有効率を上げる試み (19~30%) が報告されたが、同時にメラノサイト分化抗原 (MART-1, gp100) を標的としたこの治療法では正常メラノサイトの破壊に伴う皮膚、眼、内耳の障害も観察されている⁷⁾。このことは T 細胞輸注療法がトランスや免疫抑制の問題を打開しようという希望と、それゆえの副作用への配慮の必要性を示している。興味深いことに、NY-ESO-1 を標的とした高親和性 TCR を用いた臨床試験においては、投与された滑膜細胞肉腫患者の 60% と悪性黒色腫患者の 45% に臨床的効果を示し、かつ正常組織への交差反応性に由来する副作用はみられなかったことが報告されている⁸⁾。これらの結果は、特異的 T 細胞輸注療法、とくに高親和性の T 細胞を輸注する場合に適切な抗原を選択する重要性を示唆している。

遺伝子導入を受ける T 細胞がもともとつ内

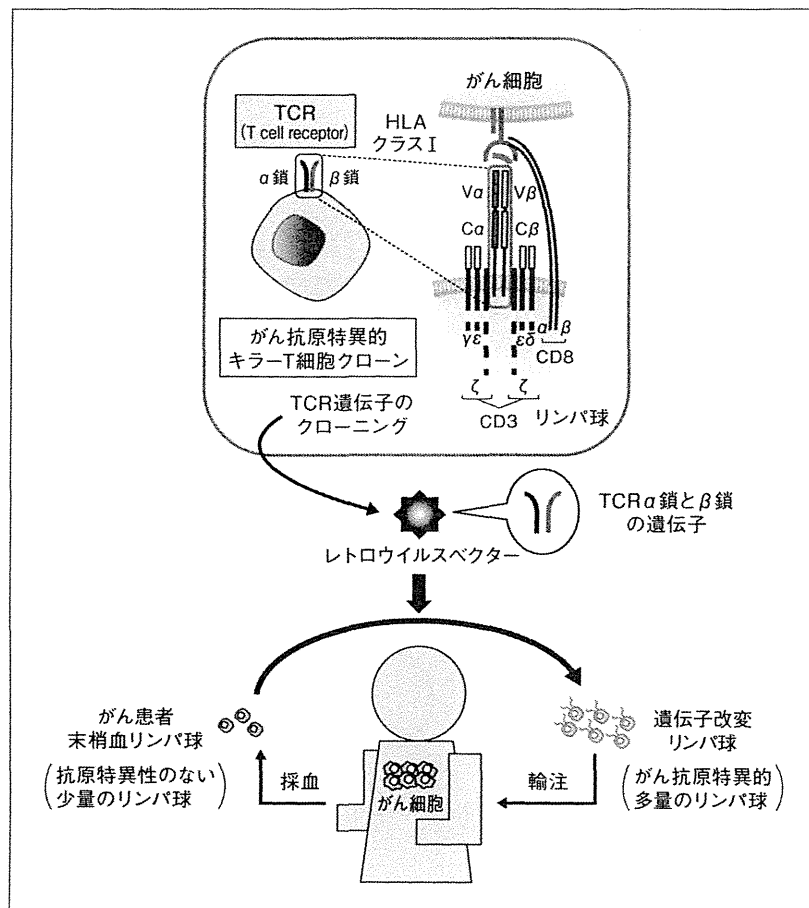


図 1 T細胞受容体(TCR)遺伝子導入T細胞療法

在性の TCR は、導入 TCR の発現を阻害するものとして問題視されてきた。TCR の細胞表面への発現には CD3 分子との複合体形成が必要であるために、内在性 TCR と導入 TCR が CD3 分子を競合してしまうのである。また、遺伝子導入した TCR の α 鎖と β 鎖が内在性 TCR の α 鎖と β 鎖と望まれないヘテロダイマーを形成する、いわゆるミスペアリングの問題も指摘されてきた。ミスペアリングは予測不可能な TCR 特異性を生み出し、場合によっては自己反応性 TCR をつくりだすのではないかという危険性も指摘されている。これらの問題を解決するために、内在性 TCR に対して siRNA やジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて内在性 TCR の発現を抑制する方法が報告されている^{9,10)}。

キメラ抗原受容体(CAR)導入T細胞療法 遺伝子改変によってT細胞に腫瘍反応性を付

与するユニークな方法のひとつとして、抗体の抗原反応性ドメインと CD3 ζ 分子の細胞内シグナル伝達ドメインとのキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)遺伝子を患者リンパ球に遺伝子導入するアプローチ¹¹⁾が試みられている(図 2)。初期のいくつかの臨床試験においては輸注した T 細胞の体内生存が限られ臨床効果も認められなかった¹¹⁾。これは CD3 ζ 分子からの刺激のみでは生理的な抗原刺激と大きく異なり、さまざまな共刺激分子を含む副刺激シグナルを欠くためであると考えられた。そこで、CD28 や 4-1BB などの T 細胞共刺激分子のシグナル伝達ドメインを付加したコンストラクトを用いることが試みられ、輸注細胞の生存性の向上が認められている。近年、これらのコンストラクトを用いて慢性リンパ球性白血病やリンパ腫の患者への抗 CD19CAR あるいは抗 CD20CAR 遺伝子導入 T 細胞の輸注療法が試みられている¹²⁻¹⁷⁾。慢性リンパ

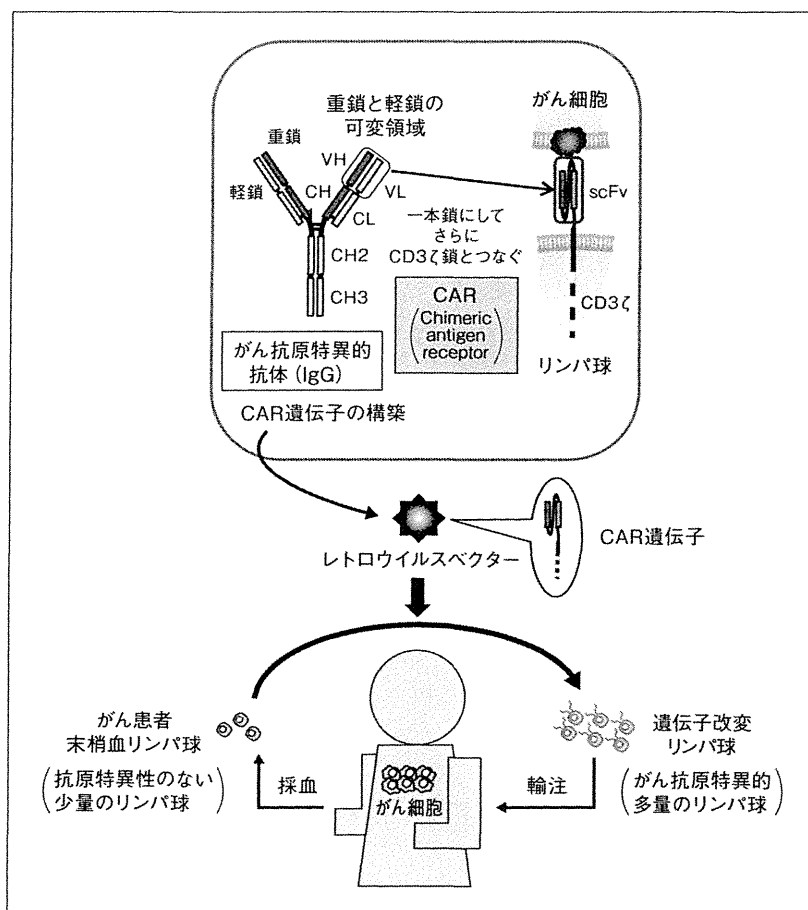


図 2 キメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入 T 細胞療法

球性白血病において顕著な臨床効果を示す症例が報告され¹³⁻¹⁵⁾、同様のアプローチによる固形腫瘍の治療にも今後大きな期待が寄せられている。CAR 遺伝子導入 T 細胞の患者体内における生存性を向上させる興味深い他のアプローチとして、GD2 特異的 CAR を EBV 特異的な T 細胞に導入し、脳腫瘍患者に投与する方法が報告されている¹⁸⁾。この方法では患者を EBV ワクチンで免疫することにより、CAR 遺伝子導入 T 細胞は EBV 特異的 TCR を介して生理的な抗原刺激を受け、したがって体内における良好な生存性を得ることが可能と考えられる。

CAR 遺伝子導入 T 細胞療法は抗体の反応性を利用しているために、基本的に標的細胞表面に存在する抗原でないと認識できないという制限がある。一方、有利な面としては、①CD8 陽性 T 細胞のみならず CD4 陽性 T 細胞や非 T 細胞にも原理的には機能を与えること、②標的細胞の MHC

発現を必要としないために MHC 拘束性にとらわれず、MHC の発現低下にも影響を受けないこと、③抗体の反応性を受け継ぐために一般の TCR に比較してはるかに親和性が高いこと(「サイドメモ」参照)、などがあげられる。

副作用の克服

すでに述べたように、T 細胞輸注療法を実施する際に患者に化学療法剤や放射線による造血細胞抑制性の前処置を施すことが、T 細胞輸注による抗腫瘍効果を顕著に向上させることが知られている。アメリカ国立がん研究所のグループではこれまでシクロホスファミドとフルダラピンを用いた比較的強力な前処置を基本としてきた⁵⁾。当然、骨髄抑制をはじめとする副作用が不可避である。これらの化学療法剤投与に加えて 12 Gy の放射線照射を追加する前処置では CD34 陽性造血幹細胞の輸注を必要としており、骨髄移植に匹敵する強

度である⁵⁾。現在、いくつかのグループがより副作用を軽減した前処置の開発をめざしているが、輸注療法の効果を損なわずにどこまで前処置が軽減可能であるか、今後の課題である。輸注細胞の生存性を向上させる目的で高用量の IL-2 投与の併用も行われてきたが⁵⁾、IL-2 に起因する副作用も不可避であり、この点の改善可能性も検討課題である。

T 細胞輸注療法においては、T 細胞がその抗原特異的の反応を起こすこと自体が招くと考えられる、いわゆる on-target 効果と呼ばれる副作用が当初から考えられ、一部には実際に観察されてきた。悪性黒色腫に対する T 細胞輸注療法の実施患者で多く観察される皮膚の白斑はその代表といえる。とくに高親和性の TCR を用いた TCR 遺伝子改変 T 細胞療法ではその出現が顕著となり、皮膚のみならず、眼球や内耳においてもメラニン保有細胞の障害に起因すると考えられる組織学的傷害が報告されている⁷⁾。また、CEA (carcinoembryonic antigen) 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞の輸注により、登録された全症例において一過性の重篤な大腸炎が認められた¹⁹⁾。抗 MAGE-A3 高親和性 TCR を用いた TCR 遺伝子導入 T 細胞の輸注療法においても、交差反応性によると考えられる死亡例を含む重篤な副作用が報告されている²⁰⁾。さらに、CAR 導入 T 細胞の輸注療法に目を移すと、HER2/neu 特異的な CAR を発現する T 細胞の輸注と CD19 特異的 CAR を発現する T 細胞の輸注療法においてそれぞれ 1 名の死亡例が報告された^{21,22)}。これらの症例の死亡に至る正確な機序は明らかになっていないが、輸注細胞の抗原に対する反応性との因果関係が考慮されている。CD19 特異的 CAR の輸注療法については、その後慎重に多くの臨床試験が実施された結果、すでに述べたように、B 細胞性腫瘍患者において顕著な抗腫瘍効果を示す報告があいつぎ、たいへん有効な新規治療法として期待されている。しかし、有効例では多くの場合に血中に一過性のサイトカインストーム様のサイトカイン値上昇が観察されており、一時的に免疫抑制剤によるコントロールを必要としている。また、有効例では治療後恒久的な B 細胞の消失が続いており、治療効果の代償と

なっている。表 1 にこれらの副作用の報告をまとめる。このようなリスクを低減するためにはいくつかの方策が提案されている。それらには、①標的抗原の適切な選択、②少量の輸注細胞から開始し注意深いモニタリングとともに輸注量を増加させること、③前処置の軽減化、④自殺遺伝子の導入などにより輸注細胞の輸注後排除をコントロール可能にすること、などがある。とくに自殺遺伝子に関しては誘導可能な改変を施したカスパーゼ 9 の遺伝子をリンパ球に導入することにより非常に速やかに輸注細胞を任意に排除可能とする技術が報告されている²³⁾。

これらの副作用は乗り越えるべき大きな課題ではあるが、このような副作用が起こること自体は同時に T 細胞輸注療法が秘める大きなポテンシャルを示している。現在、多くのがん免疫療法において担がん生体における免疫抑制機構の打

サイド メモ

T細胞受容体(TCR)とキメラ受容体(CAR)の抗原親和性

現在知られている腫瘍抗原の多くは、発現する組織や発生における発現時期が限られた、しかし変異をもたない自己抗原である。これらの抗原を認識する TCR のうち高い抗原親和性を示すものはヒトの発生の段階で淘汰される(胸腺における negative selection)。したがって、癌患者から誘導した腫瘍特異的 T 細胞はあまり高い親和性の TCR をもたないことが多い。TCR 遺伝子導入 T 細胞療法では高い親和性をもつ TCR を用いる努力がなされている。それは①多くの T 細胞クローンをスクリーニングして可能な限り高親和性のものを見出したり、②マウスなど他の動物をヒト腫瘍抗原で免疫することにより非自己抗原反応性の高親和性 TCR を取り出したり、③既存の TCR に mutagenesis で変異を導入したライブラリーから特異性を維持しつつ親和性が上昇したものを見出す方法などが試みられている。一方、CAR の場合、抗体の抗原結合部位を利用しているため、一般に抗原との親和性は TCR に比較してはるかに高い。このことは CAR の優位性のひとつと考えられるが、高すぎる親和性は T 細胞に activation induced cell death を誘導することも考えられ、どの程度の親和性がもっとも有用かは今後の課題である。

表 1 TCRあるいはCAR遺伝子導入T細胞療法における副作用

導入遺伝子	標的抗原	対象腫瘍	副作用	臨床効果	文献
TCR (高親和性, 抗 gp100 はマウス由来)	MART-1, gp100	転移性悪性黒色腫	皮膚白斑, 一過性ぶどう膜炎(G2), 一過性難聴(G3)	PR(6/20), MR(1/17)	7)
TCR (高親和性マウス由来)	CEA	大腸がん	下痢症, 炎症性腸炎(G3)	PR(1/3), CEA 低下(3/3)	19)
TCR (高親和性マウス由来)	MAGE-A3	転移性悪性黒色腫, 滑膜肉腫, 食道がん	精神障害(3/9), うち壊死性白質脳症で死亡2例	腫瘍縮小(5/9)	20)
CAR (CD28B)	HER2/neu	大腸がん	急性肺傷害で死亡(1/1)	評価不能	22)
CAR (4-1BB)	CD19	慢性リンパ性白血病	リンパ球減少症(G2), B細胞消失	CR(2/3), PR(1/3)	14)
CAR (CD28)	CD19	慢性リンパ性白血病, 慢性骨髄性白血病	低血圧, 腎不全で死亡(1/10), B細胞消失	PR(CLL)(1/8)	16, 21)
CAR (CD28)	CD19	慢性骨髄性白血病, 濾胞性リンパ腫	低血圧, 腎不全, 感染(G3/4), B細胞消失	CR(CLL)(1/4), PR(CLL)(2/4), PR(lymphoma)(3/4)	15)
CAR (CD28/4-1BB)	CD20	マンツル細胞リンパ腫, 濾胞性リンパ腫	低酸素血症(G3), 発熱(G2)	PR(follicular lymphoma)(1/1)	17)

破が有効性を引き出すうえで不可欠と考えられるようになっており²¹⁾, その免疫抑制機構にはがん抗原(その多くは自己抗原である)の抗原性の低さ(すなわち中枢性トレランス)や制御性T細胞をはじめとする抑制性細胞群(すなわち末梢性トレランス)が大きく関与している。T細胞輸注療法において抗原を発現する正常細胞に対する強い反応性が観察されていることは、輸注されたT細胞が生体の備える免疫学的寛容を乗り越えている可能性を示している。とくに高親和性TCR遺伝子導入T細胞やCAR発現T細胞はその成り立ちゆえに輸注される生体におけるネガティブセレクションを経っていない存在であるから、中枢性トレランスをバイパスしている。体外で活性化して大量に輸注することで末梢性トレランスにも抵抗している可能性がある。したがって、T細胞輸注療法はそのメカニズムのなかに、担がん生体の免疫抑制機構を乗り越え顕著な有効性を示す機構をあらかじめ備えもっていると考えられる。

おわりに

免疫による腫瘍のコントロール自体が果たして存在するか、という長い論争の年月を経てわれわ

れはいま、まさに免疫療法が腫瘍治療の医療現場に持ち込まれる目撃者となろうとしている。T細胞輸注療法は細胞療法であり、場合によっては遺伝子治療であるという方法論の抱える技術的な制約、規制上の制約ゆえに、医薬品としての開発はがんワクチンや抗体療法の後を追う形となってきた。しかし、近年のT細胞輸注療法臨床試験における顕著な臨床効果は企業などの関心を急速に集めており、今後製薬化、医療化が急ピッチで進むと考えられる。一方で、その顕著な臨床効果は本稿で概観したように副作用の出現可能性と表裏一体であり、今後はより有効で、かつ安全性の高い治療戦略の構築が必須になると考えられる。

文献

- 1) Dunn, G. P. et al.: Cancer immunoeediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, **3** : 991-998, 2002.
- 2) van der Bruggen, P. et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254** : 1643-1647, 1991.
- 3) Restifo, N. P. et al.: Adoptive immunotherapy for cancer : harnessing the T cell response. *Nat. Rev. Immunol.*, **12** : 269-281, 2012.
- 4) Gattinoni, L. et al.: Adoptive immunotherapy for cancer : building on success. *Nat. Rev. Immunol.*,

- 6 : 383-393, 2006.
- 5) Dudley, M. E. et al.: Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma : evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J. Clin. Oncol.*, **26** : 5233-5239, 2008.
 - 6) Morgan, R. A. et al.: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*, **314** : 126-129, 2006.
 - 7) Johnson, L. A.: T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, **114** : 535-546, 2009.
 - 8) Robbins, P. F. et al.: Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.*, **29** : 917-924, 2011.
 - 9) Okamoto, S. et al.: Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res.*, **69** : 9003-9011, 2009.
 - 10) Provasi, E. et al.: Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer. *Nat. Med.*, **18**(5) : 807-815, 2012.
 - 11) Sadelain, M. et al.: The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **21** : 215-223, 2009.
 - 12) Savoldo, B. et al.: CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest.*, **121** : 1822-1826, 2011.
 - 13) Porter, D.L. et al.: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **365** : 725-733, 2011.
 - 14) Kalos, M. et al.: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Trans. Med.*, **3** : 95ra73, 2011.
 - 15) Kochenderfer, J. N. et al.: B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, **119** : 2709-2720, 2012.
 - 16) Brentjens, R. J. et al.: Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, **118**(18) : 4817-4828, 2011.
 - 17) Till, B. G. et al.: CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1 BB domains : pilot clinical trial results. *Blood*, **119** : 3940-3950, 2012.
 - 18) Louis, C. U. et al.: Anti-tumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor positive T-cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, **118** : 6050-6056, 2011.
 - 19) Parkhurst, M. R. et al.: T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.*, **19** : 620-626, 2011.
 - 20) Morgan, R. A. et al.: Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene Therapy. *J. Immunother.*, 2013.(Epub ahead of print)
 - 21) Brentjens, R. et al.: Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells : case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol. Ther.*, **18** : 666-668, 2010.
 - 22) Morgan, R. A. et al.: Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.*, **18** : 843-851, 2010.
 - 23) Di Stasi, A. et al.: Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.*, **365** : 1673-1683, 2011.
 - 24) Schreiber, R. D. et al.: Cancer immunoeediting : Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, **331** : 1565-1570, 2011.

* * *

1. T細胞輸注療法

TIL, T細胞クローン, 遺伝子改変T細胞

池田裕明, 珠玖 洋

免疫で腫瘍が治癒するのか、という長い論争の年月を経て、われわれは今まさに免疫療法が腫瘍治療の医療現場に持ち込まれる時代の目撃者になろうとしている。腫瘍特異的T細胞輸注療法は、進行性の悪性黒色腫の患者において既存治療法を凌ぐ臨床効果を示した。さらに、近年のT細胞培養法の工夫や、抗原受容体遺伝子を導入したT細胞の輸注療法の開発により、さまざまながん種で有効性を示す症例が報告されはじめている。T細胞輸注療法は細胞療法、場合によっては遺伝子治療であるという制約ゆえに、医薬品としての開発は抗体医薬やがんワクチンの後を追う形となってきたが、今後製薬化、医療化が急ピッチで進むと考えられる。一方、その臨床効果は副作用の出現可能性と表裏一体であることも明らかになりつつあり、今後はより有効で、かつ安全性の高い治療戦略の構築が必須になる。

はじめに

1950年代後半のBurnet, Thomasらによる「がんの免疫監視機構」のコンセプト¹⁾の提示以来、半世紀以上を経てようやく免疫学的手法によるがんの治療が医療の現場に持ち込まれようとしている。本特集の第I部で詳述されるごとく、腫瘍免疫にかかわる細胞群

や分子群が次々と同定され、がんの微小環境やがんの進展に伴う免疫抑制機序の知見が集積してきた。同時に免疫学においてはT細胞の生物学が長足の進歩を遂げた。これらの基盤知識の集積のもと、腫瘍特異的T細胞を患者から誘導する技術、抗原認識受容体遺伝子を導入して腫瘍特異的T細胞を作製し患者に輸注する技術が開発、改善され、臨床試験において悪性黒色腫、

【キーワード&略語】

T細胞, IL-21, IL-15, TCR, CAR

CAR : chimeric antigen receptor

(キメラ抗原受容体)

CEA : carcinoembryonic antigen

(がん胎児性抗原)

CTL : cytotoxic T lymphocytes

(細胞傷害性T細胞)

DLT : donor lymphocyte infusion

(ドナーリンパ球輸注)

MDSC : myeloid-derived suppressor cells

(骨髄由来抑制性細胞)

TCR : T cell receptor (T細胞受容体)

TIL : tumor-infiltrating lymphocytes

(腫瘍浸潤リンパ球)

Treg : regulatory T cells (制御性T細胞)

Adoptive immunotherapy with T cells: TIL, T cell clone, and gene-modified T cells

Hiroaki Ikeda¹⁾ / Hiroshi Shiku¹⁾²⁾ : Department of Immuno-Gene Therapy, Mie University Graduate School of Medicine¹⁾ / Department of Cancer Vaccine, Mie University Graduate School of Medicine²⁾ (三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学¹⁾ / 三重大学大学院医学系研究科がんワクチン治療学²⁾)

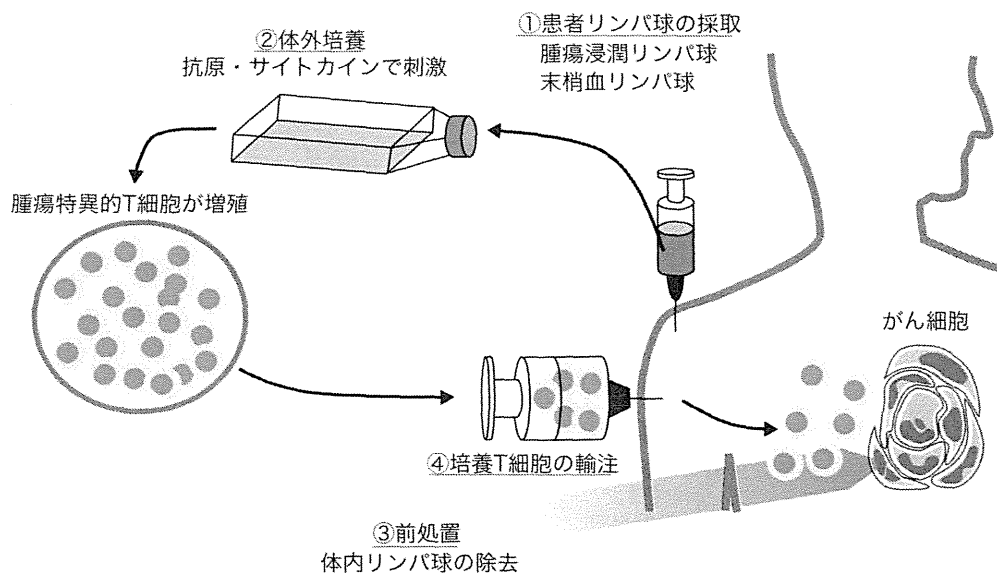


図1 腫瘍特異的T細胞（腫瘍浸潤リンパ球，末梢血リンパ球）の輸注療法

滑膜肉腫，白血病などの難治性悪性腫瘍に対して既存の治療法を大きく凌ぐ効果を示す症例が報告されはじめている。本稿ではT細胞輸注療法の歴史を概観し，近年報告されつつある新規治療法の紹介と今後克服すべき問題の抽出を行う。

期待される腫瘍特異的T細胞輸注療法

1990年台初頭にはじまるヒトがん抗原の分子的同定²⁾はがんワクチン療法と腫瘍特異的T細胞輸注療法という2つの特異的免疫療法の開発を可能とした。近年，がん抗原特異的なT細胞の輸注療法がきわめて有効なものとなりうるという報告が相次ぎ大変期待されている³⁾。具体的には，末梢血や腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocytes : TIL) を，がん抗原ペプチドや腫瘍細胞などの抗原により体外で刺激し，腫瘍特異的なT細胞を大量調製し輸注する方法である (図1)。

本治療法も初期には臨床的な効果や輸注したT細胞の体内生存が限られているという結果が多かった。これらには少なくとも2つの大きな問題点があったと考えられる。第1は近年ますますその重要性が認識される担がん生体における免疫抑制機構の存在であり，第2は輸注するT細胞のクオリティーの問題である。

第1の問題点の解決法の1つとして，Rosenbergら

のグループはT細胞輸注療法実施患者に化学療法剤や放射線照射の前処置を加え，担がん生体の免疫抑制機構の解除をめざしている。これらの前処置により，がん患者中の制御性T細胞 (Treg) や骨髄由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells : MDSC) などの免疫抑制性細胞群が一時的に除去/活性阻害されるとともに，輸注されたリンパ球がホメオスタティック拡大により活性化され増殖する⁴⁾。また前処置により腫瘍破壊に伴うToll様受容体刺激物質が放出され自然免疫系が活性化されると考えられる。第2の問題の解決法として輸注するT細胞の*in vitro*調製時間は短く設定される傾向にある。近年のT細胞研究により，長期培養T細胞は*in vitro*におけるエフェクター機能は強いが，老化形質が強く，*in vivo*における生存性に劣り，結果として輸注療法に用いた場合の抗腫瘍効果が弱い⁴⁾ことが明らかとなってきたためである。

Rosenbergらは進行期の悪性黒色腫患者を対象として，化学療法剤にて前処置をした後に，腫瘍浸潤リンパ球を用いた特異的T細胞輸注を行い，50%近くの患者にRECIST基準で有効性 (PR + CR) を認めたと報告した。さらに前処置に放射線照射を加えることにより，RECIST基準で72%という有効率を報告している^{4) 5)}。将来的には抗CTLA-4抗体，抗PD-1/PD-L1抗体などの免疫抑制解除薬とT細胞輸注療法との併用

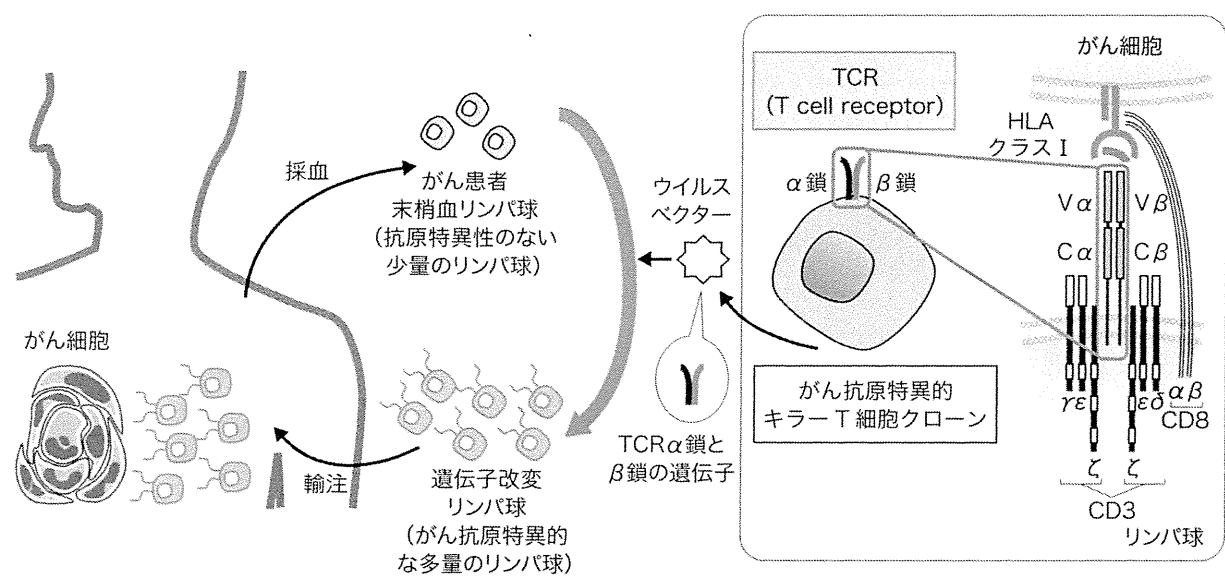


図2 T細胞受容体 (TCR) 遺伝子導入T細胞療法
文献8より改変して転載

も期待される。

2 T細胞培養技術の改善

大きく期待される腫瘍特異的T細胞輸注療法であるが、悪性黒色腫を除く多くのがん種では十分な数の腫瘍特異的T細胞を分離、拡大培養することがこれまで困難であった。さらに、数を増やすための体外における長期培養は、前述のようにT細胞の老化、疲弊を誘導し、輸注後の体内生存性を顕著に悪化させる。近年、T細胞培養技術の改善によりこの問題を解決しようとする試みが報告されている。

Greenbergらは、白血病患者を対象として、造血幹細胞移植後にドナー由来のWT1抗原特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) のクローンを作製し、DLT (donor lymphocyte infusion) として輸注する試験を実施した⁶⁾。本試験ではCTLクローンの誘導、培養の際にIL-21を添加することにより、CTLはCD27、CD28、CD127を高発現するフェノタイプを示し、患者への輸注後に患者体内で長期にわたり維持されることが示された。輸注を受けた11名の患者のうち1名で一時的な腫瘍量の減少、1名で微小残存病変 (MRD) からの長期寛解導入が示された。さらに3名の再発リスクの高い患者での長期無再発も観察されている。この報告は

長期培養クローンであってもIL-21の添加により体内生存がよく、抗腫瘍効果を示すCTLが作製できる可能性、CTLクローンを用いることにより新たながん種に適用が広がる可能性を示している。Hiranoらの報告では悪性黒色腫患者からMART-1特異的CTLラインを誘導する際に、人工的APC (ヒト細胞株K562をベースにHLA-A*02:01、CD80、CD83を遺伝子導入) とIL-2/IL-15を用いた⁷⁾。誘導されたCTLはCD45RA⁻CD45RO⁺CD62L^{+/+}CD27⁺のcentral memory and effector memoryのフェノタイプを示し、患者体内で長期維持された。9名の登録患者中1名でPR、3名で長期SDの臨床効果を示している。

3 T細胞受容体 (TCR) 遺伝子導入T細胞療法

T細胞輸注療法をさまざまながん種に拡大し、多くの患者に届けうる方法の1つとして、がん抗原特異的CTLクローンから得られた高親和性TCR遺伝子を患者末梢血より得られたリンパ球に遺伝子導入し、人為的に大量のがん特異的T細胞を短期間の培養で作製し輸注するアプローチが検討されている (図2)。Rosenbergらのグループはがん抗原MART-1特異的なTCRをレトロウイルスにより遺伝子導入したリンパ球を用いた悪

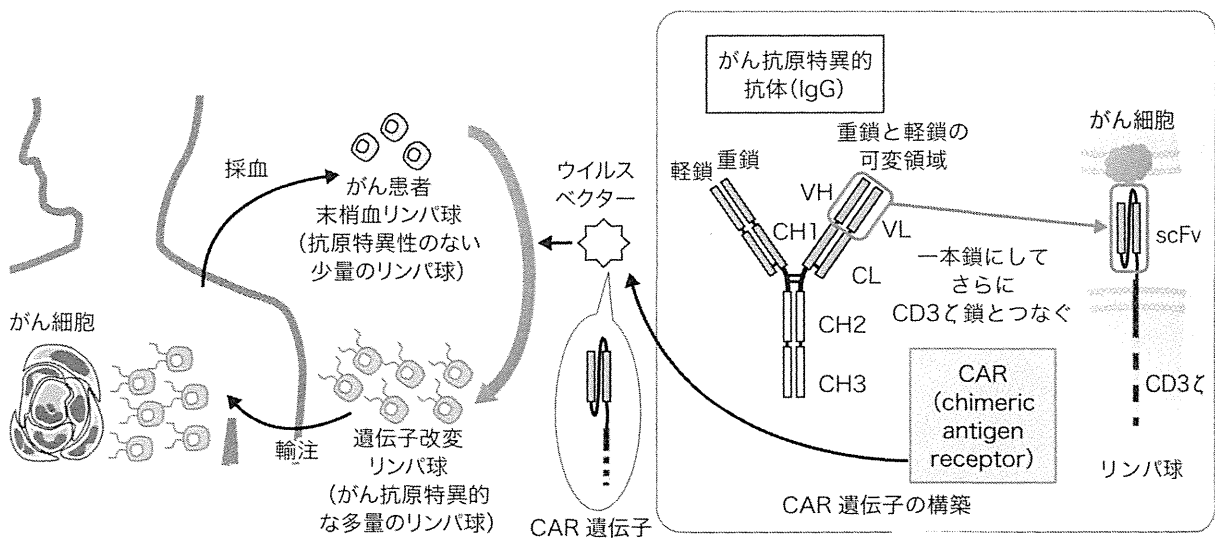


図3 キメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入T細胞療法
文献8より改変して転載

性黒色腫患者に対する臨床試験の結果を2006年に報告した。この試験では17例中2例において輸注細胞の生体内長期維持と腫瘍縮小効果が報告された⁹⁾。その後、より高親和性のTCRを用いることにより有効率を上げる試み(19~30%)が報告された¹⁰⁾。NY-ESO-1を標的とした高親和性TCRを用いた臨床試験においては投与された滑膜細胞肉腫患者の60%と悪性黒色腫患者の45%に臨床的効果を示している¹¹⁾。われわれはMAGE-A4特異的TCR遺伝子を導入したT細胞の輸注療法を進行期食道がん患者を対象に実施し、10名中1名のSDを観察している。

遺伝子導入を受けるT細胞がもつ内在性のTCRの存在は、導入TCRの発現を阻害し、導入TCRとの間でミスペアリングを起こすとして問題視されてきた。ミスペアリングは予測不可能なTCR特異性、場合によっては自己反応性をつくり出す危険性が指摘されている。これらの問題を解決するために、内在性TCRに対するsiRNAやジンクフィンガーヌクレアーゼを用いて内在性TCRの発現を抑制する方法が報告されている^{12) 13)}。

4 キメラ抗原受容体 (CAR) 遺伝子導入T細胞療法

遺伝子改変によってT細胞に腫瘍反応性を付与するユニークな方法の一つとして、抗体の抗原反応性ドメ

インとCD3ζ分子の細胞内シグナル伝達ドメインとのキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子を患者リンパ球に遺伝子導入するアプローチ¹⁴⁾が試みられている(図3)。

CAR遺伝子導入T細胞療法は抗体の反応性を利用しているために、基本的に標的細胞表面に存在する抗原でないと認識できない。一方、有利な面としては、①CD8⁺T細胞のみならずCD4⁺T細胞や非T細胞にも機能を与える、②標的細胞のMHC発現を必要としない、③一般のTCRに比較してはるかに親和性が高い、などがあげられる。

近年、慢性リンパ球性白血病やリンパ腫の患者へのCD19あるいはCD20特異的CAR遺伝子導入T細胞の輸注療法では顕著な臨床効果を示す症例が報告され、同様のアプローチによる固形腫瘍の治療にも今後大きな期待が寄せられている(表)^{15)~20)}。CAR遺伝子導入T細胞の患者体内における生存性を向上させる興味深い他のアプローチとして、GD2特異的CARをEBV特異的なT細胞に導入し、脳腫瘍患者に投与する方法が報告された²¹⁾。患者をEBVワクチンで免疫することにより、CAR遺伝子導入T細胞はEBV特異的TCRを介して生理的な抗原刺激を受け、体内における良好な生存性を得ると考えられる。

表 TCRあるいはCAR遺伝子導入T細胞療法における副作用と臨床効果

導入遺伝子	標的抗原	対象腫瘍	副作用	臨床効果	文献
TCR (高親和性, 抗gp100はマウス由来)	MART-1, gp100	転移性悪性黒色腫	皮疹, 眼球前房炎 (G2), 内耳炎 (G3)	PR (6/20), MR (1/17)	10
TCR (高親和性マウス由来)	CEA	大腸がん	下痢, 炎症性腸炎 (G3) (3/3)	PR (1/3), CEA低下 (3/3)	22
TCR (高親和性マウス由来)	MAGE-A3	転移性悪性黒色腫, 滑膜肉腫, 食道がん	精神障害 (3/9), 壊死性白質脳症にて死亡2例	腫瘍縮小 (5/9)	23
CAR (CD28B)	HER2/neu	大腸がん	急性肺障害にて死亡 (1/1)	評価不能	25
CAR (4-1BB)	CD19	慢性リンパ性白血病	リンパ球減少症 (G2), B細胞消失	CR (2/3), PR (1/3)	17
CAR (CD28)	CD19	慢性リンパ性白血病, 慢性骨髄性白血病	低血圧, 腎不全にて死亡 (1/10), B細胞消失	PR (CLL) (1/8)	19, 24
CAR (CD28)	CD19	慢性骨髄性白血病, 濾胞性リンパ腫	低血圧, 腎不全, 感染 (G3/4), B細胞消失	CR (CLL, 1/4), PR (CLL, 2/4), PR (lymphoma, 3/4)	18
CAR (CD28/4-1BB)	CD20	マンデル細胞リンパ腫, 濾胞性リンパ腫	低酸素血症 (G3), 発熱 (G2)	PR (follicular lymphoma, 1/1)	20

文献8より引用

5 副作用の克服

すでに述べたごとく、T細胞輸注療法を実施する際に、患者に化学療法剤や放射線による造血細胞抑制性の前処置を施すことが、T細胞輸注による抗腫瘍効果を顕著に向上することが知られる。Rosenbergらのグループでは、これまでシクロホスファミドとフルダラビンをを用いた比較的強力な前処置を基本としてきた⁵⁾。当然、骨髄抑制をはじめとする副作用が不可避である。さらに12グレイの放射線照射を追加する前処置では輸注療法効果の向上が示唆されているが、CD34⁺造血幹細胞の輸注を必要としており、幹細胞移植に匹敵する強度である⁵⁾。現在、いくつかのグループがより副作用を軽減した前処置の開発をめざしているが、輸注療法の効果を損なわずにどこまで前処置が軽減可能であるか、今後の課題である。輸注細胞の生存性を向上させる目的で高用量IL-2投与の併用も行われてきたが⁵⁾、IL-2に起因する副作用も不可避であり、この点の改善も検討課題である。

T細胞輸注療法においては、T細胞の抗原特異的反応に起因すると考えられる、on-target効果とよばれる副作用が観察されてきた。悪性黒色腫に対するT細胞

輸注療法の実施患者で多く観察される皮膚の白斑はその代表といえる。特に高親和性TCRを用いた遺伝子改変T細胞療法ではその出現が顕著となり、皮膚のみならず、眼球や内耳においてもメラニン保有細胞の傷害に起因すると考えられる組織学的傷害が報告された¹⁰⁾。また、CEA (carcinoembryonic antigen) 特異的TCR遺伝子導入T細胞の輸注により、登録された全症例において一過性の重篤な大腸炎が認められた²²⁾。抗MAGE-A3高親和性TCRを用いたTCR遺伝子導入T細胞の輸注療法においては交差反応性によると考えられる死亡例を含む重篤な中枢神経系の副作用が報告された²³⁾。CAR療法に目を移すと、HER2/neu特異的なCARを発現するT細胞の輸注とCD19特異的CARを発現するT細胞の輸注療法においてそれぞれ1名の死亡例が報告された^{24) 25)}。CD19特異的CARの輸注療法についてはその後慎重に多くの臨床試験が実施され、すでに述べたごとく慢性リンパ球性白血病やリンパ腫患者に対する有効な新規治療法として期待されている。しかし、有効例では多くの場合に一過性の血中サイトカイン上昇が観察され、免疫抑制剤によるコントロールを必要としている。また、有効例では治療後恒久的なB細胞の消失が続き、治療効果の代償となっている。

人為的に高親和性に改変した受容体は生体内のネガティブセレクションを受けていないので、副作用の発現が予測しにくいという点には十分な留意が必要である。表に副作用の報告をまとめる。

興味深いことに、NY-ESO-1を標的とした高親和性TCRを用いた臨床試験では正常組織への交差反応性に由来する副作用はみられていない¹¹⁾。この結果はT細胞輸注療法における抗原選択の重要性を示唆している。T細胞輸注療法のリスクを低減するための方策として、①標的抗原の適切な選択、②少量の輸注細胞から開始し注意深いモニタリングとともに輸注量を増加させること、③前処置の軽減化、④自殺遺伝子の導入などにより輸注細胞の排除をコントロール可能にすること、などが提案されている。自殺遺伝子に関しては、誘導可能な改変を施したカスパーゼ9の遺伝子をリンパ球に導入することにより非常に速やかに輸注細胞を任意に排除可能とする技術が報告されている²⁶⁾。

このような副作用は、嚴重な注意の必要性と同時にT細胞輸注療法が秘めるポテンシャルをも示している。現在多くのがん免疫療法において、担がん生体における免疫抑制機構の打破が有効性を引き出すうえで不可欠と考えられるようになっており、その免疫抑制機構にはがん抗原（その多くは自己抗原である）の抗原性の低さ（すなわち中枢性寛容）やTregをはじめとする抑制性細胞群（すなわち末梢性寛容）が大きく関与している。T細胞輸注療法における正常細胞に対する反応性は、輸注されたT細胞が生体の備える免疫学的寛容を乗り越えている可能性を示す。特に人為的に改変された高親和性TCRやCARはその成り立ちゆえに輸注される生体におけるネガティブセレクションを経っていない存在である。T細胞輸注療法はそのメカニズムのなかに、担がん生体の免疫抑制機構を乗り越え顕著な有効性を示す機構を備えもつと考えられる。

おわりに

免疫による腫瘍のコントロール自体がはたしてあるか、という長い論争の年月を経て、今では命題は「あるかないか」ではなく「どのように用いるのか」へと変わった。T細胞輸注療法は、細胞療法であり場合によっては遺伝子治療であるという方法論の抱える技術的な制約、規制上の制約を乗り越え、今後製薬化、医

療化が急ピッチで進むと考えられる。一方で、その顕著な臨床効果は副作用の出現可能性と表裏一体であり、今後はより有効で、かつ安全性の高い治療戦略の構築が必須になる。

文献

- 1) Dunn, G. P. et al. : Nat. Immunol., 3 : 991-998, 2002
- 2) van der Bruggen, P. et al. : Science, 254 : 1643-1647, 1991
- 3) Restifo, N. P. et al. : Nat. Rev. Immunol., 12 : 269-281, 2012
- 4) Gattinoni, L. et al. : Nat. Rev. Immunol., 6 : 383-393, 2006
- 5) Dudley, M. E. et al. : J. Clin. Oncol., 26 : 5233-5239, 2008
- 6) Chapuis, A. G. et al. : Sci. Transl. Med., 5 : 174ra27, 2013
- 7) Butler, M. O. et al. : Sci. Transl. Med., 3 : 80ra34, 2011
- 8) 池田裕明, 今井奈緒子 : 医学のあゆみ, 244 : 843-849, 2013
- 9) Morgan, R. A. et al. : Science, 314 : 126-129, 2006
- 10) Johnson, L. A. et al. : Blood, 114 : 535-546, 2009
- 11) Robbins, P. F. et al. : J. Clin. Oncol., 29 : 917-924, 2011
- 12) Okamoto, S. et al. : Cancer Res., 69 : 9003-9011, 2009
- 13) Provasi, E. et al. : Nat. Med., 18 : 807-815, 2012
- 14) Sadetain, M. et al. : Curr. Opin. Immunol., 21 : 215-223, 2009
- 15) Savoldo, B. et al. : J. Clin. Invest., 121 : 1822-1826, 2011
- 16) Porter, D. L. et al. : N. Engl. J. Med., 365 : 725-733, 2011
- 17) Kalos, M. et al. : Sci. Transl. Med., 3 : 95ra73, 2011
- 18) Kochenderfer, J. N. et al. : Blood, 119 : 2709-2720, 2012
- 19) Brentjens, R. J. et al. : Blood, 118 : 4817-4828, 2011
- 20) Till, B. G. et al. : Blood, 119 : 3940-3950, 2012
- 21) Louis, C. U. et al. : Blood, 118 : 6050-6056, 2011
- 22) Parkhurst, M. R. et al. : Mol. Ther., 19 : 620-626, 2011
- 23) Morgan, R. A. et al. : J. Immunother., 36 : 133-151, 2013
- 24) Brentjens, R. et al. : Mol. Ther., 18 : 666-668, 2010
- 25) Morgan, R. A. et al. : Mol. Ther., 18 : 843-851, 2010
- 26) Di Stasi, A. et al. : N. Engl. J. Med., 365 : 1673-1683, 2011

<筆頭著者プロフィール>

池田裕明：長崎県佐世保市育ち。久留米大学附設高等学校卒業。1996年、長崎大学大学院博士課程修了（医学博士）。学生時代に珠玖洋教授に出会い、がん免疫研究の世界へ。'99年より2004年まで米国ワシントン大学（St. Louis）医学部 Robert D. Schreiber 博士とともにがん免疫エディティングの研究に携わる。'04年より'06年まで北海道大学遺伝子病制御研究所助教授。'06年より三重大学大学院医学系研究科准教授。現在はT細胞輸注療法の研究を中心に、がん免疫系の相互作用全般に興味をもっている。好奇心の探求ができる幸せと、その成果の医療への還元に関わる責任を感じている。

Hepatic Interferon-Stimulated Genes Are Differentially Regulated in the Liver of Chronic Hepatitis C Patients With Different Interleukin-28B Genotypes

Masao Honda,^{1,2} Takayoshi Shirasaki,² Tetsuro Shimakami,¹ Akito Sakai,¹ Rika Horii,¹ Kuniaki Arai,¹ Tatsuya Yamashita,¹ Yoshio Sakai,¹ Taro Yamashita,¹ Hikari Okada,¹ Kazuhisa Murai,¹ Mikiko Nakamura,² Eishiro Mizukoshi,¹ and Shuichi Kaneko¹

Pretreatment up-regulation of hepatic interferon (IFN)-stimulated genes (ISGs) has a stronger association with the treatment-resistant interleukin (IL)28B minor genotype (MI; TG/GG at rs8099917) than with the treatment-sensitive IL28B major genotype (MA; TT at rs8099917). We compared the expression of ISGs in the liver and blood of 146 patients with chronic hepatitis C who received pegylated IFN and ribavirin combination therapy. Gene expression profiles in the liver and blood of 85 patients were analyzed using an Affymetrix GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). ISG expression was correlated between the liver and blood of the MA patients, whereas no correlation was observed in the MI patients. This loss of correlation was the result of the impaired infiltration of immune cells into the liver lobules of MI patients, as demonstrated by regional gene expression analysis in liver lobules and portal areas using laser capture microdissection and immunohistochemical staining. Despite having lower levels of immune cells, hepatic ISGs were up-regulated in the liver of MI patients and they were found to be regulated by multiple factors, namely, IL28A/B, IFN- λ 4, and wingless-related MMTV integration site 5A (WNT5A). Interestingly, WNT5A induced the expression of ISGs, but also increased hepatitis C virus replication by inducing the expression of the stress granule protein, GTPase-activating protein (SH3 domain)-binding protein 1 (G3BP1), in the Huh-7 cell line. In the liver, the expression of WNT5A and its receptor, frizzled family receptor 5, was significantly correlated with G3BP1. **Conclusions:** Immune cells were lost and induced the expression of other inflammatory mediators, such as WNT5A, in the liver of IL28B minor genotype patients. This might be related to the high level of hepatic ISG expression in these patients and the treatment-resistant phenotype of the IL28B minor genotype. (HEPATOLOGY 2014;00:000-000)

Interferon (IFN) and ribavirin (RBV) combination therapy has been a popular modality for treating patients with chronic hepatitis C (CHC); however, ~50% of patients usually relapse, particularly those with hepatitis C virus (HCV) genotype 1b and a high viral load.¹ The recently developed direct-acting antiviral drug, telaprevir, combined with pegylated (Peg)-IFN plus RBV, significantly improved sustained virologic response (SVR) rates; however, the SVR rate was not satisfactory (29%-33%) in patients who had no

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CCL, CC chemokine ligand; CHC, chronic hepatitis C; CLLs, cells in liver lobules; CPAs, cells in portal areas; CXCL10/IP-10, chemokine (C-X-C motif) ligand 10/interferon-gamma-induced protein 10; CXCR3, chemokine (C-X-C motif) receptor 3; DCs, dendritic cells; DVL, disheveled; FZD5, frizzled family receptor 5; G3BP1, GTPase-activating protein (SH3 domain)-binding protein 1; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; HCV, hepatitis C virus; IFI44, interferon-induced protein 44; IFIT1, interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1; IFN, interferon; IHC, immunohistochemical; IL, interleukin; ISGs, interferon-stimulated genes; JFH-1, Japanese fulminant hepatitis type 1; LCM, laser capture microdissection; MA, major genotype; MA_d, major genotype, down-regulated; MA_u, major genotype, up-regulated; MI, minor genotype; Mx, myxovirus (influenza virus) resistance; NK, natural killer; OAS2, 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2; PALT, portal-tract-associated lymphoid tissue; Peg-IFN, pegylated IFN; RBV, ribavirin; RTD-PCR, real-time detection polymerase chain reaction; SG, stress granule; siRNA, small interfering RNA; SVR, sustained virologic response; WNT5A, wingless-related MMTV integration site 5A.

From the ¹Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Kanazawa, Japan; and ²Department of Advanced Medical Technology, Kanazawa University Graduate School of Health Medicine, Kanazawa, Japan.

Received May 31, 2013; accepted September 30, 2013.

response to previous therapy.² Therefore, IFN responsiveness is still an essential clinical determinant for treatment response to triple (Peg-IFN+RBV+DAA) therapy.

A recent landmark genome-wide association study identified a polymorphism in the interleukin (IL)28B, IFN- λ 3 gene that was associated with either a sensitive (major genotype; MA) or resistant (minor genotype; MI) treatment response to Peg-IFN and RBV combination therapy and was characterized by either up- (-u) or down-regulation (-d) of interferon-stimulated genes (ISGs).³⁻⁵ However, the underlying mechanism for the association of this polymorphism and treatment response has not been clarified. Previously, we showed that up-regulation of the pretreatment expression of hepatic ISGs was associated with an unfavorable treatment outcome and was closely related to the treatment-resistant IL28B genotype (TG or GG at rs8099917).⁶ It could be speculated that the pretreatment activation of ISGs would repress additional induction of ISGs after treatment with exogenous IFN. However, it is unknown how hepatic ISGs are up-regulated in treatment-resistant CHC patients and why patients with high levels of ISG expression cannot eliminate HCV. Therefore, other mechanisms should be involved in the unfavorable treatment outcome of patients with the treatment-resistant IL28B genotype.

In the present study, we performed gene expression profiling in the liver and blood and compared the expression of ISGs between them. Furthermore, ISG expression in liver lobules and portal areas was analyzed separately using a laser capture microdissection (LCM) method. Finally, we identified an immune factor that is up-regulated in patients with the treatment-resistant IL28B genotype and mediates favorable signaling for HCV replication.

Materials and Methods

Patients. We analyzed 168 patients with CHC who had received Peg-IFN- α 2b (Schering-Plough K.K., Tokyo, Japan) and RBV combination therapy for 48 weeks at the Graduate School of Medicine,

Kanazawa University Hospital, Japan and its related hospitals, as reported previously (Table 1 and Supporting Table 1).⁶

Preparation of Liver Tissue and Blood Samples. A liver biopsy was performed on samples from 168 patients, and blood samples were obtained from 146 of these patients before starting therapy (Table 1 and Supporting Table 1). Detailed procedures are described in the Supporting Materials and Methods.

Affymetrix GeneChip Analysis. Liver tissue samples from 91 patients and blood samples from 85 patients were analyzed using an Affymetrix GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). LCM analysis was performed in 5 MAu, MA, and MI patients. Affymetrix GeneChip analysis and LCM were performed, as described previously.^{6,7} Detailed procedures are described in the Supporting Materials and Methods.

Hierarchical Clustering and Pathway Analysis of GeneChip Data. GeneChip data analysis was performed using BRB-Array Tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.htm>), as described previously.⁷ Pathway analysis was performed using MetaCore (Thomson Reuters, New York, NY). Detailed procedures are described in the Supporting Materials and Methods.

Quantitative Real-Time Detection Polymerase Chain Reaction, Cell Lines, Cell Migration Assay, Vector Preparation, HCV Replication Analysis, and Statistical Analysis. These procedures are described in detail in the Supplemental Material and Methods.

Results

Differential ISG Expression in Liver and Blood of Patients With Different IL28B Genotypes. Previously, we showed that pretreatment up-regulation of hepatic ISGs was associated with an unfavorable treatment outcome and was closely related to the treatment-resistant IL28B MI (TG or GG at rs8099917).⁶ To examine whether expression of hepatic ISGs would reflect the expression of blood ISGs, we compared ISG expression between the liver and blood. We utilized three ISGs (interferon-induced protein 44 [IFI44], interferon-induced protein with

Address reprint requests to: Shuichi Kaneko, M.D., Ph.D., Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, Kanazawa University, Takara-Machi 13-1, Kanazawa 920-8641, Japan. E-mail: skaneko@m-kanazawa.jp; fax: +81-76-234-4250.

Copyright © 2013 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.26788

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Table 1. Clinical Characteristics of 146 Patients Whose Liver and Blood Samples Were Analyzed by RT-PCR

Clinical Category	Major (MA)				Minor (MI)		P Value
	Major ISG Up (MAu)		Major ISG Down (MAd)				
No. of patients	n = 42		n = 68		n = 36		NA
Age and sex							
Age (years)	55	(30-72)	56	(31-72)	55	(30-73)	NS
Sex (M vs. F)	27 vs. 15		34 vs. 34		19 vs. 17		NS
Treatment responses							
SVR/TR/NR	24/12/6		30/33/6		6/7/23*		MAu vs. MI < 0.0001, MAd vs. MI < 0.0001 NA
IL28B genotype (TT vs. TG+GG)	TT		TT		TG/GG (31/5)		NA
Liver factors							
F stage (1/2/3/4)	14/13/11/4		30/20/11/7		14/8/10/4		NS
A grade (A0-1 vs. A2-3)	16 vs. 26		37 vs. 31		20 vs. 16		NS
ISGs (Mx1, IFI44, IFIT1)	3.83*	(2.14-9.48)	1.30*	(0.36-2.08)	5.52*	(0.86-17.3)	MAu vs. MAd < 0.0001, MAu vs. MI < 0.0001, MAd vs. MI < 0.0001 MAu vs. MAd < 0.0001, MAu vs. MI = 0.0004, MAd vs. MI = 0.031
IL28A/B	41.3*	(4-151)	11.7*	(1-53)	22.7*	(3-93)	MAu vs. MAd < 0.0001, MAu vs. MI < 0.0001 NS
Blood factors							
ISGs (Mx1, IFI44, IFIT1)	11.1*	(2.78-24.9)	4.76	(0.41-20.6)	5.64	(0.71-2.8)	MAu vs. MAd < 0.0001, MAu vs. MI < 0.0001 NS
IL28A/B	1.6	(0.1-7.7)	1.3	(0.2-6.4)	1.3	(0.3-3.6)	NS
Laboratory parameters							
HCV-RNA (KIU/mL)	2,430	(160-5,000)	2,692	(140-5,000)	1,854*	(126-5,000)	MAd vs. MI = 0.017
BMI (kg/m ²)	24	(18.7-31.9)	24	(16.3-34.7)	22.8	(19.1-30.5)	NS
AST (IU/L)	86*	(22-258)	54	(18-192)	64	(21-178)	MAu vs. MAd = 0.0008
ALT (IU/L)	112*	(17-376)	75	(16-345)	79	(18-236)	MAu vs. MAd = 0.023
γ-GTP (IU/L)	99*	(21-392)	47	(4-367)	74	(20-298)	MAu vs. MAd = 0.0003
WBC (/mm ³)	4,761	(2,100-8,100)	4,982	(2,800-9,100)	4,823	(2,500-8,200)	NS
Hb (g/dL)	14.1	(11.4-16.7)	14.1	(9.3-16.9)	13.9	(11.2-16.4)	NS
PLT (× 10 ⁴ / mm ³)	15.2	(9.2-27.8)	16.8	(7-39.4)	16.3	(9-27.8)	NS
TG (mg/dL)	112	(42-248)	102	(42-260)	136*	(30-323)	MAd vs. MI = 0.02
T-Chol (mg/dL)	162	(90-221)	169	(107-229)	167	(81-237)	NS
LDL-Chol (mg/dL)	77	(36-123)	83*	(42-134)	72	(29-107)	MAd vs. MI = 0.04
HDL-Chol (mg/dL)	40	(18-67)	43	(27-71)	47*	(27-82)	NS
Viral factors							
ISDR mutations ≤ 1 vs. ≥ 2	23 vs. 19*		51 vs. 17		26 vs. 10		MAu vs. MAd = 0.02
Core aa 70 (wild-type vs. mutant)	24 vs. 18		42 vs. 22		16 vs. 20*		MAd vs. MI = 0.02

*P < 0.05.

Abbreviations: BMI, body mass index; ALT, alanine aminotransferase; WBC, leukocytes; Hb, hemoglobin; PLT, platelets; TG, triglycerides; T-chol, total cholesterol; LDL-chol, low density lipoprotein cholesterol; HDL-chol, high density lipoprotein cholesterol; NA, not applicable; NS, not significant.

tetratricopeptide repeats 1 [IFIT1], and myxovirus (influenza virus) resistance [Mx1] with a high dynamic range, comparable relative expression, and good predictive performance.⁶ Mean values of the three ISGs detected by real-time detection polymerase chain reaction (RTD-PCR) in 168 liver tissue samples (Supporting Table 1) showed a significant up-regulation of their expression in nonresponder or treatment-resistant IL28B MI (TG/GG; rs8099917) patients, compared to responder (SVR+TR) or treatment-sensitive IL28B MA (TT; rs8099917) patients, as reported previously (Fig. 1A and Supporting Fig. 1A).⁶ However, ISG expression in 146 blood samples (Table 1) showed no difference between responders and nonresponders or the IL28B major and minor genotypes (Fig. 1B and Supporting Fig. 1B). To explore these findings further, gene expression profiling using Affymetrix GeneChips was performed on liver and blood samples from 85 patients (Supporting Tables 2 and 3), and the expression of 37 representative ISGs⁶ was compared (Fig. 1C-E). MA patients were divided into two groups according to their ISG expression pattern in the liver: MAu and MAd. MI patients expressed ISGs at a higher level than MAu patients. Interestingly, ISG expression in MA patients showed a similar expression pattern in liver and blood, and ISGs were up-regulated in MAu patients and down-regulated in the MAd patients. However, MI patients showed a different ISG expression pattern in liver and blood, where ISGs were up-regulated in the liver, but down-regulated in the blood (Fig. 1C). The correlation of the mean values of the three ISGs (IFI44, IFIT1, and Mx1) between liver and blood from 146 patients demonstrated a significant correlation between values in MA patients (Fig. 1D), whereas no correlation was observed in MI patients (Fig. 1E). Interestingly, ISG expression correlated significantly between liver and blood of responders, but not of nonresponders, in MA and MI patients (Supporting Fig. 1C-F). These results indicate that the correlation of ISG expression in the liver and blood is an important predictor of treatment response.

Clinical Characteristics of IL28B MA Patients With Up- and Down-Regulated ISGs and IL28B MI Patients. From the expression pattern of ISGs and mean values of the three ISGs (IFI44, IFIT1, and Mx1), we could use receiver operating characteristic curve analysis to set a threshold of 2.1-fold to differentiate MAu and MAd patients. Following this criterion, 42 MAu, 68 MAd, and 36 MI patients (total, 146) were grouped (Table 1). Hepatic ISG expression was highest in MI patients, whereas blood ISG expression

was highest in MAu patients. Conversely, hepatic IL28A/B (IFN- λ 2/3) expression was highest in MAu patients, whereas blood IL28A/B expression showed no difference among the three groups. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) levels were significantly higher in MAu patients than in MAd patients. Interestingly, serum ALT levels were significantly correlated with ISG expression in MA patients, but not in MI patients (Supporting Fig. 2E,F).

Gene expression profiling in peripheral immune cells showed the presence of active inflammation in MAu patients, whereas the inactive or remissive phase of inflammation was observed in MAd patients. In contrast, monophasic and intermediate inflammation existed in MI patients (Supporting Fig. 3).

Reduced Number of Immune Cells in the Liver Lobules of IL28B MI Patients. To examine the discordant expression of ISGs in liver and blood of MI patients, we performed LCM to collect cells in liver lobules (CLLs) and cells in portal areas (CPAs) separately from each of five liver biopsied samples from MAu, MAd, and MI patients (Fig. 2A). Interestingly, the ISG expression pattern in CLLs from MA patients was similar to that of CPAs, and ISGs were up-regulated in MAu patients and down-regulated in MAd patients. ISG expression in CLLs from the MI patients was different to that in CPAs, and ISGs were up-regulated in CLLs, but down-regulated in CPAs (Fig. 2A). We hypothesized that the discordance of ISG expression between CLLs and CPAs in MI patients might be the result of the lower number of immune cells that infiltrated the liver lobules of these patients. To prove this hypothesis, immunohistochemical (IHC) staining was performed (Fig. 2B). IHC staining showed that IFI44 was strongly expressed in the cytoplasm and nucleus of CLLs from MI patients, whereas it was intermediately expressed in MAu patients and weakly expressed in MAd patients. Interestingly, IFI44 was strongly expressed in CPAs of MAu patients and weakly expressed in CPAs of MAd patients, showing a correlation between expression in CLLs and CPAs of MA patients, whereas ILI44 expression was relatively weak in CPAs, compared with CLLs, in MI patients (Fig. 2B). In the same section of the specimens, there were less CD163-positive monocytes and macrophages in MI patients than in MAu and MAd patients. Similarly, there were fewer CD8-positive T cells in MI patients than in MAu and MAd patients (Fig. 2B). Semiquantitative evaluation of CD163- and CD8-positive lymphocytes in liver lobules showed a significantly lower number of cells in

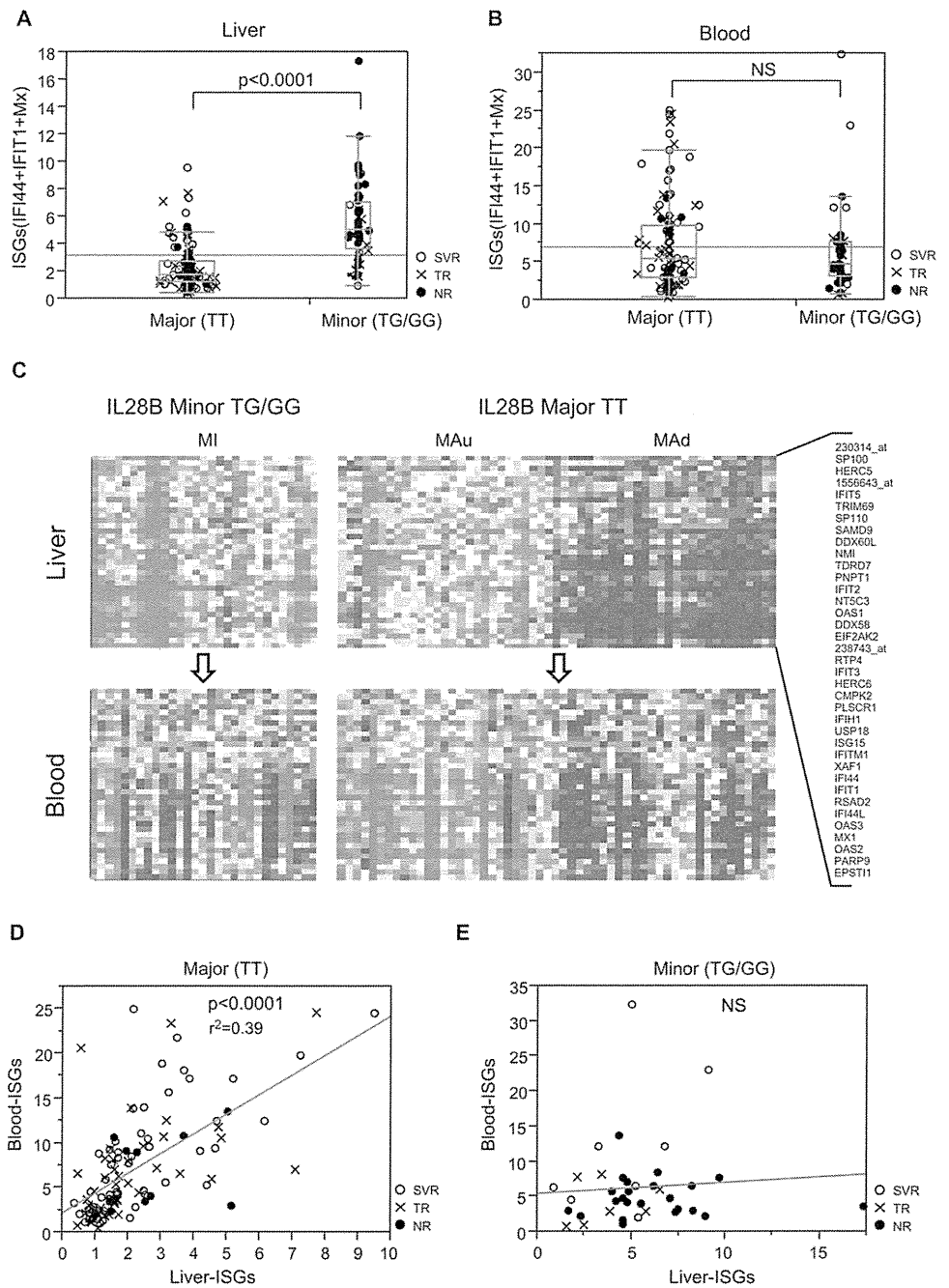


Fig. 1. Comparison of ISG expression in liver and blood of patients with different IL28B genotypes. (A and B) RTD-PCR results of mean ISG expression (IFI44-IFIT1+Mx1) in liver (A) and blood (B) of IL28B major (MAu/MAd) and minor (MI) genotype patients. (C) One-way hierarchical clustering analysis of 85 patients using 37 representative ISGs derived from liver (upper) and blood (lower). (D and E) Correlation of mean ISG expression (IFI44-IFIT1+Mx1) in liver and blood of IL28B major (MA; D) and minor (MI; E) genotype patients.

MI patients than in MAu and MAd patients (Supporting Fig. 4A,B). To support these findings, we examined the expression of 24 surface markers of immune cells in CLL, including dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, macrophages, T cells, B cells, and granulocytes (Supporting Fig. 5A). The expression of immune cell-surface markers was repressed in MI patients, compared to MAu and MAd patients. Furthermore, whole-liver expression profiling in 85 patients showed the reduced expression of these surface markers in MI patients, compared to MAu and MAd

patients (Supporting Fig. 5B). These results indicated that fewer immune cells had infiltrated the liver lobules of MI patients.

In addition to these findings, various chemokines, such as CC chemokine ligand (CCL)19, CCL21, CCL5, and chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)13, which are important regulators for the recruitment of DCs, NK cells, T cells, and B cells in the liver, were significantly down-regulated in MI patients, compared to MAd and MAu patients (Supporting Fig. 4C-F).

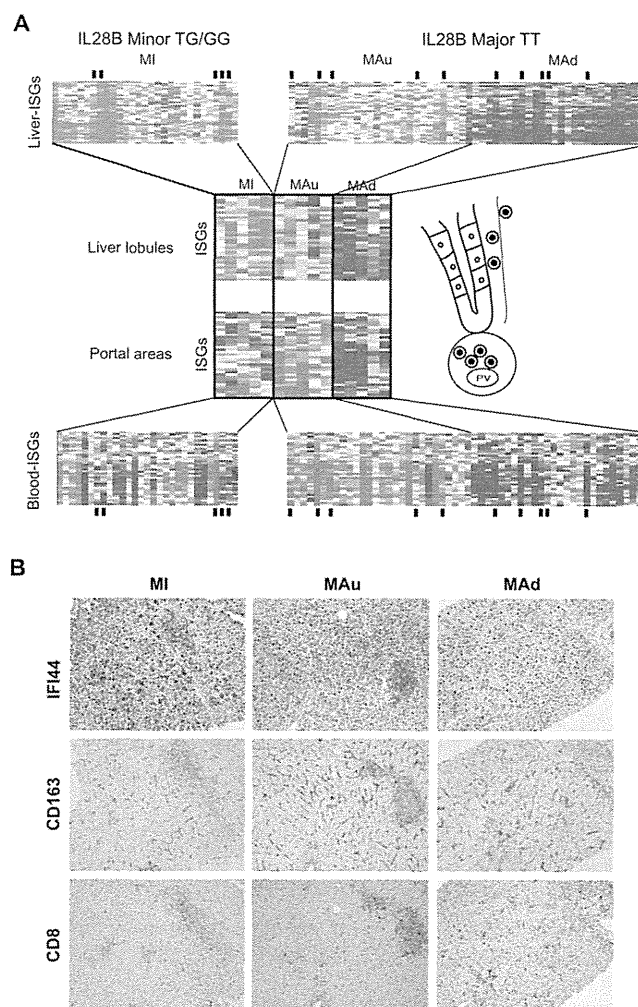


Fig. 2. LCM and IHC staining of biopsied liver specimens. (A) Comparison of the ISG expression pattern of whole liver (upper), CLLs (upper middle), CPAs (lower middle), and blood (bottom). CLLs and CPAs were obtained from 5 MI, MAu, and MAd patients, who are indicated by small black bars. (B) IHC staining of IFI44, CD163, and CD8 in MI, MAu, and MAd patients.

Hepatic ISG Expression Is Significantly Correlated With IL28A/B, but not IFN- α or IFN- β .

The lower number of immune cells in the liver lobules of MI patients implies that reduced levels of IFN are produced from DCs, macrophages, and so on. These findings prompted us to examine the relationship between hepatic ISGs and IFN- α , IFN- β , IL29/IFN- λ 1, and IL28A/B in CHC patients. Hepatic ISG expression was significantly correlated with IL28A/B, but not IFN- β (Fig. 3A-C) or IFN- α (data not shown) in MAu, MAd, and MI patients. Expression of IL29 was correlated with hepatic ISG expression only in MAu patients. These results indicate that hepatic ISGs would be mainly induced by IL28A/B in CHC patients. Interestingly, the correlation between hepatic ISGs and IL28A/B was strongest in MA patients ($P < 0.0001$ in MAu; $P = 0.0006$ in MAd), whereas rather a weak correlation was observed in MI patients ($P = 0.015$). Moreover, the ratio of hepatic ISGs to IL28A/B

was larger in MI patients than in MA patients ($S = 0.061$ in MI; $S = 0.028$ in MAu; $S = 0.020$ in MAd), suggesting the presence of additional factors that can induce expression of ISGs in MI patients. Therefore, we evaluated the expression of the recently discovered IFN- λ 4 in MI patients. Interestingly, there was a significant correlation between hepatic ISG and IFN- λ 4 expression ($P = 0.0003$; Fig. 3C).

Wingless-Related MMTV Integration Site 5A and Its Receptor, Frizzled Receptor 5, Are Significantly Up-Regulated in the Liver of Patients With the IL28B MI. IFN- λ 4 is a promising factor to induce ISG expression in MI patients,⁸ and the functional relevance of IFN- λ 4 for the pathogenesis of CHC is under investigation. We searched for other factors that could induce ISG expression in MI patients. A closer observation of gene expression profiling in CLLs obtained by LCM demonstrated that WNT signaling was specifically up-regulated in MI patients

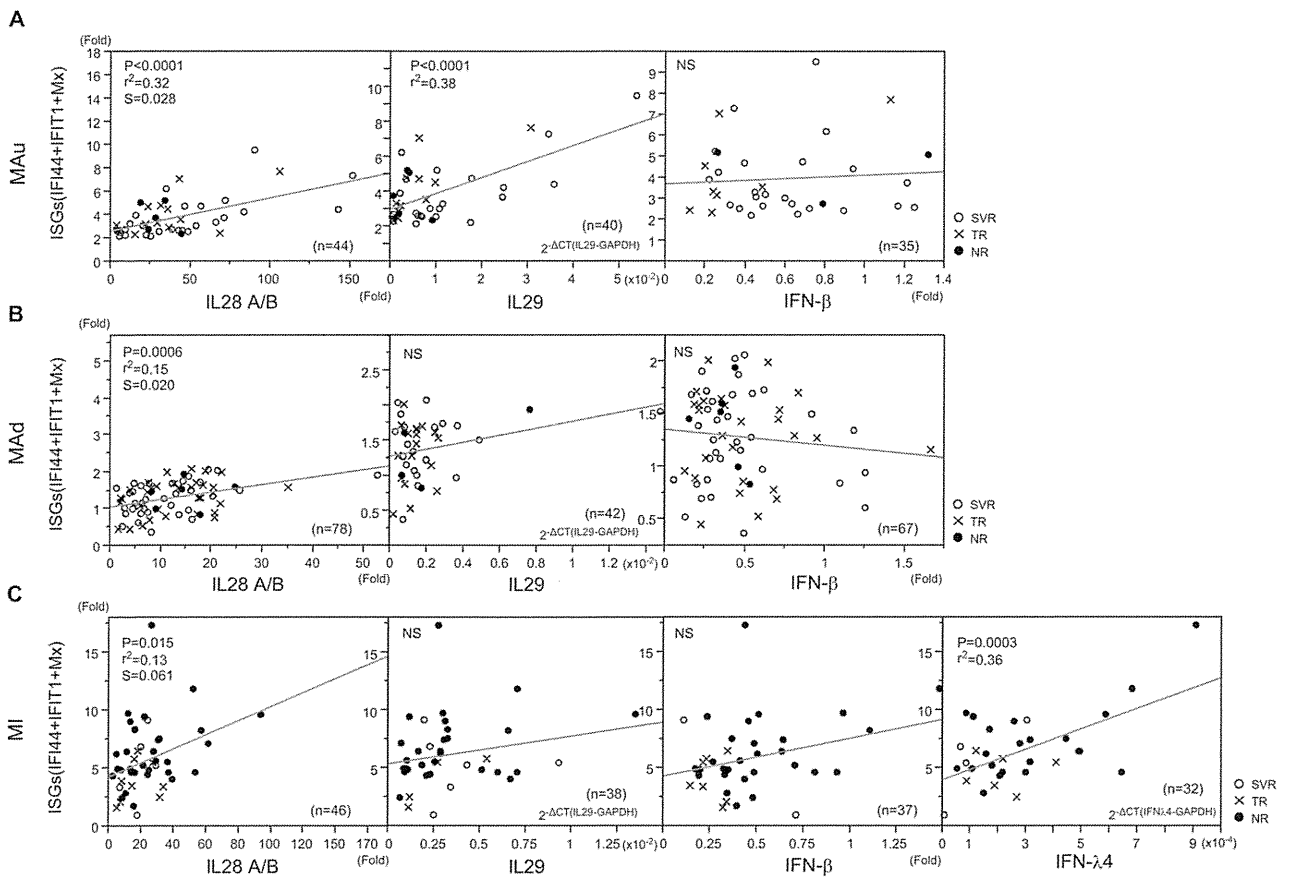


Fig. 3. Correlation analysis of hepatic ISGs and IL28A/B, IL29, IFN- β , and IFN- $\lambda 4$. Correlation of mean ISG (IFI44+IFIT1+Mx1) and IL28A/B, IL29, IFN- β , and IFN- $\lambda 4$ expression was evaluated in MAu (A), MAd (B), and MI (C) patients. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

(Supporting Fig. 6). Further observation enabled us to identify that the WNT ligand, wingless-related MMTV integration site 5A (WNT5A), and its receptor, frizzled receptor 5 (FZD5), were up-regulated in MI patients. RTD-PCR results on 168 liver-biopsied samples confirmed the significant up-regulation of WNT5A and FZD5 in MI patients, compared to MAu and MAd patients (Fig. 4A,B). Interestingly, WNT5A expression was negatively correlated with chemokine expression (Supporting Fig. 7). IHC staining showed up-regulation of FZD5 in liver lobules of MI patients, but not in MAu or MAd patients (Fig. 4C). WNT5A expression was significantly correlated with hepatic ISG expression in MI and MAd patients (Fig. 4D). Interestingly, we found a weak, but significant, correlation between WNT5A and IFN- $\lambda 4$ expression in MI patients (Fig. 4E).

WNT5A Induces ISG Expression, but Stimulates HCV Replication in Huh-7 Cells. To examine the functional relevance of up-regulated expression of WNT5A in MI patients, we first evaluated expression levels of WNT5A and ISGs ($2'$ - $5'$ -oligoadenylate

synthetase 2 [OAS2], Mx1, IFI44, and IFIT1) in two immortalized human hepatocyte cell lines, THLE-5b and TTNT cells (Supporting Materials and Methods), and one human hepatoma cell line, Huh-7 cells (Supporting Fig. 8A,B). WNT5A was moderately expressed in THLE-5b and TTNT cells, whereas its expression in Huh-7 cells was minimal. Interestingly, ISG expression in these cells correlated well with expression of WNT5A (Supporting Fig. 8B). Small interfering RNA (siRNA) to WNT5A efficiently repressed WNT5A expression to $\sim 20\%$ of the control in THLE-5b cells, and in this condition, ISG expression was significantly decreased to 30%-50% of the control (Supporting Fig. 8C). Conversely, transduction of WNT5A using a lentivirus expression system in Huh-7 cells significantly increased OAS2 expression (Supporting Fig. 8D), as well as Mx1 and IFIT1 expression (data not shown), in the presence and absence of HCV infection. Surprisingly, HCV replication, as determined using Gaussia luciferase activity, increased in WNT5A-transduced cells (Supporting Fig. 8E). Furthermore, WNT5A-transduced cells supported more HCV replication than