

令和元年6月13日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10370

研究課題名(和文) 低酸素応答システムからみた肝動脈塞栓術後の肝癌再発機序解明と、新規治療戦略開発

研究課題名(英文) Hepatic artery embolization and hypoxia: roles in the tumor recurrence and application for new treatment strategy

研究代表者

高木 治行 (TAKAKI, Haruyuki)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30378377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術後の再発機序を、低酸素応答システムを介した免疫寛容の観点から解明し、新たな治療戦略の可能性を模索することである。

本研究の結果、ラット肝癌モデルに対する肝動脈塞栓術後、腫瘍部でPD-L1の発現が増加した。PD-L1とHIF-1aの発現には正の相関がみられ、in vitroの検討では、低酸素刺激によるPD-L1の発現はHIF-1a依存性であることが示された。更に、HIF-1阻害剤であるラパマイシンやボルテゾミブを用いることで、PD-L1の発現を抑制させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝動脈塞栓術は、肝細胞癌や多血性肝転移に対する有効な治療だが、依然、再発が多いことが欠点である。本研究の結果、肝動脈塞栓術後の再発機序として、塞栓術後の低酸素刺激によりHIF-1依存性にPD-L1の発現が増加し、がん免疫逃避機構を助長させる可能性が示唆された。よって、動脈塞栓術と抗PD-L1抗体の併用などによる治療効果の改善が期待でき、新たな治療戦略開発への橋渡しとなる研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)： Hepatic artery embolization (HAE) is a useful therapeutic option in the management of hepatocellular carcinoma (HCC) and other hypervascular liver tumors. However, little is known about the effects of HAE on the immune system.

Through the in vivo and in vitro experiments in this study, several novel findings about HAE and immune system were demonstrated. First, results of our in vivo study showed that HAE enhanced the expression of PD-L1 in the rat orthotopic hepatoma model. Moreover, the expressions of PD-L1 and HIF-1a were positively correlated. Second, our in vitro cell culture study showed that hypoxic stress increases the expression of PD-L1, and those expressions were suppressed by HIF-1a inhibitors such as Rapamycin and Bortezomib.

Results of those experiments suggests that HAE enhance the expression of PD-L1 by HIF-1 dependent manner. These finding will be useful for the development of new therapeutic approaches such as HAE plus anti-PD-L1 antibody.

研究分野：IVR、肝癌、腫瘍免疫

キーワード：肝動脈塞栓術 低酸素誘導因子 免疫チェックポイント 肝細胞癌 HIF-1 PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肝動脈塞栓術 (Transarterial embolization, TAE) は肝動脈血流を遮断して肝腫瘍を阻血・壊死させる治療法で、切除不能肝細胞癌に対する標準的治療として位置づけられている。また、TAE は多くの肝転移に対しても有効性が報告されている。しかし、TAE 後も高頻度で肝内再発が認められ、治療を繰り返しても、いずれ肝動脈閉塞や肝機能悪化を来し治療継続が困難となる。このため、TAE の治療効果を向上させ、肝内再発を抑える新たな治療戦略の開発が待ち望まれている。

近年、腫瘍微小環境における低酸素環境が様々な生理的応答を引き起こし、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor, HIF) がそのメカニズムの中心的な役割を担っている事が明らかとなってきた。HIF は転写因子として機能し、代謝調節、血管新生、細胞移動などの調節を行う様々な遺伝子の発現を制御する。更に、HIF は免疫寛容にも深く関与する。肺癌や前立腺癌の細胞株を用いた *in vitro* の実験では、低酸素下で培養された癌細胞表面では Programed cell death ligand 1 (PD-L1) の発現が HIF 依存性に亢進し、本来癌細胞を攻撃すべきエフェクター T 細胞の機能が阻害されることも報告されている。

TAE は肝動脈血流を遮断するため、腫瘍は低酸素環境に晒される。このため我々は、TAE 後の低酸素環境が HIF 依存性に PD-L1 等の免疫寛容因子の発現を促進して腫瘍微小環境における免疫寛容状態を作り出し、その結果 TAE 後の再発が促進されるのではないかと、という仮説を立てた。本研究は、TAE 後に生じる低酸素応答と免疫寛容のメカニズムを明らかにし、これを制御することにより治療効果の向上を目指す新しい治療戦略開発のための基盤研究として立案された。

## 2. 研究の目的

本研究では、担癌ラットに対して TAE を行い、低酸素誘導因子 (HIF) および免疫寛容因子の発現を検討した。更に、免疫寛容因子発現における、低酸素誘導因子の役割について検討した。

## 3. 研究の方法

(1) *In vivo* 実験 : RH7777 ラット肝癌細胞株をラット肝臓に移植して、ラット肝癌モデルを作製した。このラット肝癌モデルを、TAE 群とコントロール群に分け、TAE 群に対しては、左内頸動脈からのアプローチで TAE を施行した。

(2) *In vitro* 実験 : RH7777 の低酸素培養 (O<sub>2</sub>: 1%) と常酸素培養 (O<sub>2</sub>: 21%) を行い、24 時間後に mRNA およびタンパクを回収。RT-PCR およびウエスタンブロット法で、PD-L1 および HIF-1 の発現を比較した。

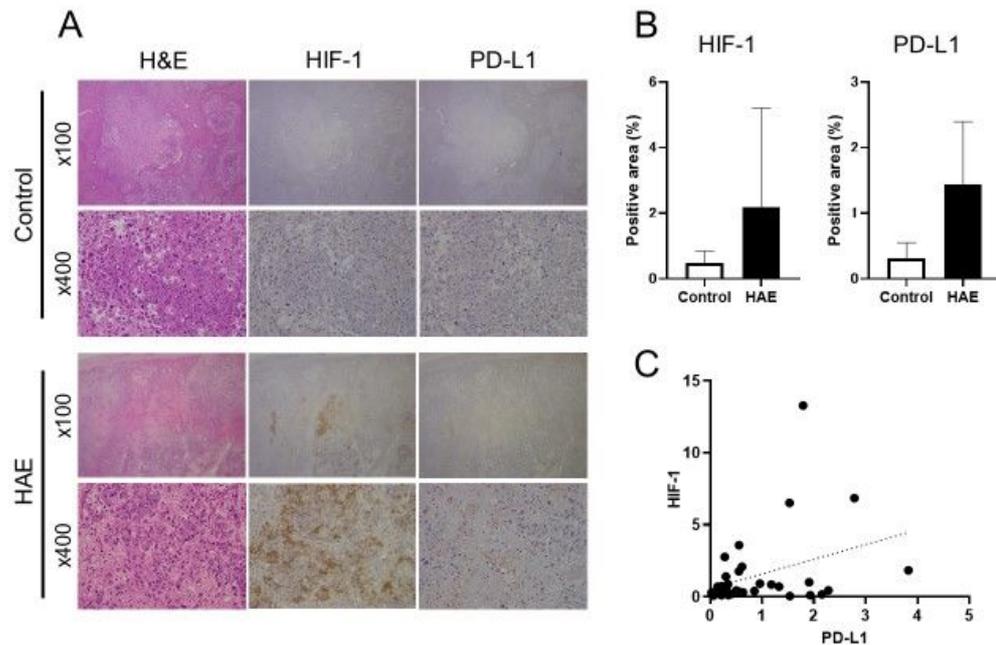
(3) *In vitro* 実験 : RH7777 の低酸素培養の際に Rapamycin や Bortezomib 等の HIF-1 阻害剤を加え、HIF-1 や PD-L1 の発現変化をみた。

## 4. 研究成果

(1) コントロール群と比較して、TAE 群において肝細胞癌の壊死が認められた (図 1 A)。ただし、TAE 群においても、腫瘍辺縁部や腫瘍内に島状に、残存肝細胞癌が認められた。この残存肝細胞癌において、PD-L1 の発現増加が認められた (図 1 A,B)。また、残存肝細

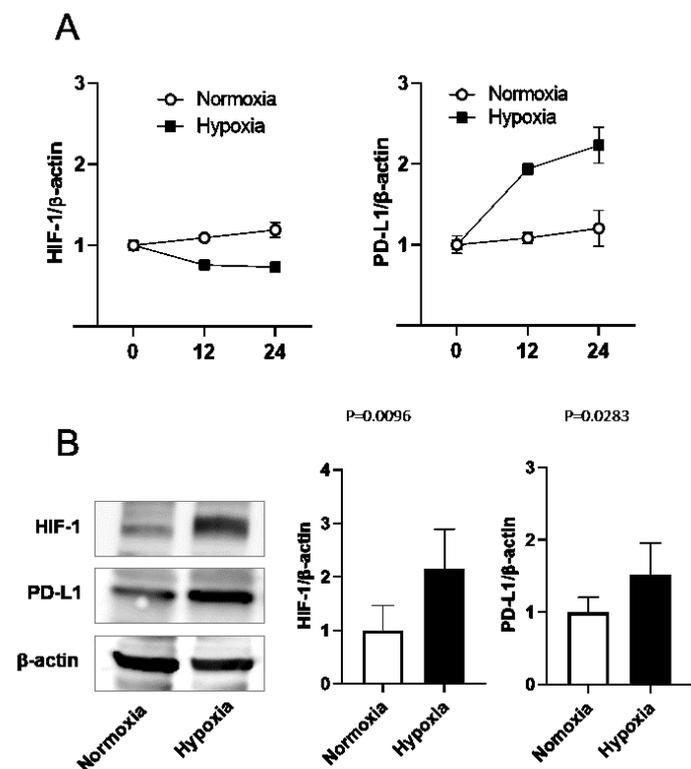
肺癌の HIF-1 の発現も有意に増加しており、PD-L1 と HIF-1 の発現には正の相関があった (図 1 A-C)。

図 1



(2) 研究結果(1)より、TAE による低酸素刺激が、HIF-1 依存性に PD-L1 の発現を増加させている可能性が示唆された。この仮説を検証するために、ラット肝細胞癌株を用いた *in vitro* の検討を行い、TAE を模した低酸素培養後 24 時間後の細胞サンプルにおいて、常酸素培養群と比較して PD-L1 や HIF-1 の変化を検討した。その結果、低酸素培養群において有意な PD-L1 の mRNA 増加が認められた (図 2A)。一方、HIF-1 の mRNA については、低酸素培養群と常酸素培養群で有意な変化は認められなかった。ウエスタンブロット法によるタンパクの発現解析では、低酸素培養後 24 時間後に PD-L1 および HIF-1 の有意な増加が認められた (図 2B)。

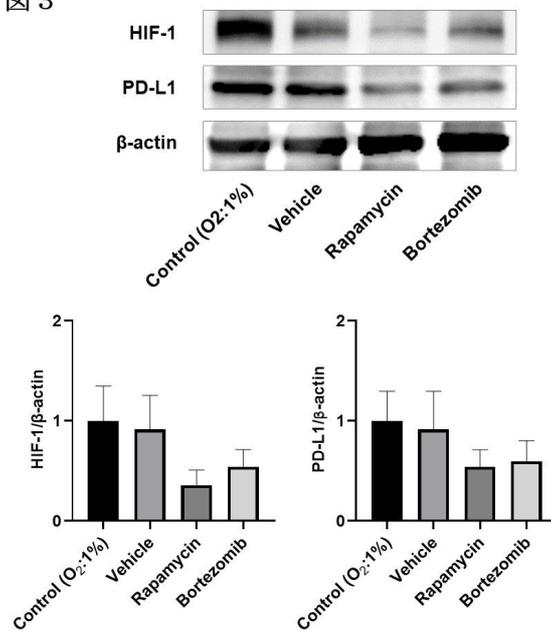
図 2



(3) Rapamycin および Bortezomib は、HIF-1 阻害作用を示すことが既に知られている。そこで、HIF-1 と PD-L1 発現の関係を更に詳細に検討するために、ラット肝細胞癌株の低

酸素培養の際に、これらの薬剤を添加し、HIF-1 や PD-L1 のタンパク発現をウエスタンブロット法で解析した。結果、Rapamycin や Bortezomib を添加することで HIF-1 および PD-L1 の発現が低下した ( 図 3 )。これらの結果より、TAE 後の PD-L1 発現増加は HIF-1 依存性であることが示唆された。さらに、TAE の際に Rapamycin や Bortezomib を併用することにより、PD-1/PD-L1 経路を阻害してがんの免疫逃避機構を阻害し、治療成績の向上につながる可能性が示唆された。

図 3



## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Takaki H, Cornelis FH. Can the combination of ablation and immunomodulation become the breakthrough of cancer treatment? *Diagn Interv Imaging*. 2018 Mar;99(3):121-122. (査読有) DOI: 10.1016/j.diii.2018.02.002
2. Takaki H, Cornelis F, Kako Y, Kobayashi K, Kamikonya N, Yamakado K. Thermal ablation and immunomodulation: From preclinical experiments to clinical trials. *Diagn Interv Imaging*. 2017;98:651-659. (査読有) DOI: 10.1016/j.diii.2017.04.008
3. Takaki H, Sato Y, Yamakado K. Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma:current topics. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2017;114(9):1602-1610. (査読有) DOI: 10.11405/nisshoshi.114.1602
4. Miyazaki M, Iguchi T, Takaki H, Yamanaka T, Tamura Y, Tokue H, Sato Y, Ikeda O, Shimizu T, Yamakado K. Ablation protocols and ancillary procedures in tumor ablation therapy: consensus from Japanese experts. *Jpn J Radiol*. 2016;34:647-56. (査読有) DOI: 10.1007/s11604-016-0569-8

### 〔学会発表〕(計 27 件)

1. Ueshima E, Nishiofuku H, Takaki H, Hirata Y, Kodama H, Tanaka T, Kichikawa K, Yamakado K, Sugimoto K, Murakami T. Hepatic Artery Embolization Enhances the Expressions of TGF- $\beta$ 1 and HIF-1 $\alpha$  in a Rat Hepatoma Model. SIO 2019, 2019/6/8-6/11、ボストン (アメリカ)
2. Cortes A, Mossman J, Hernandez A, Jo N, Hirata Y, Sato T, Chang SH, Hicks M Takaki H, Avritscher R. The Transcriptional Landscape of Liver Tumors After Transarterial Embolization. SIO 2019, 2019/6/8-6/11、ボストン (アメリカ)
3. Takaki H, Hepatic Artery Embolization and Immunomodulation: from Japanese Laboratory, SIR 2019, 2019/3/23-3/28、オースティン (アメリカ)
4. Takaki H, Ablation and Immunomodulation: current status and future perspective, APSCVIR 2019, 2019/2/23、バリ (インドネシア)
5. Takaki H, Cryoablation, 11<sup>th</sup> International Symposium on Focal Therapy and Imaging in

Prostate and Kidney Cancer, 2019/2/11、京都府

6. 高木治行、IVR と腫瘍免疫、第 43 回リザーバー研究会、2018/9/1、前橋（群馬県）
7. 高木治行、アブレーションと腫瘍免疫、第 19 回 RFA 凍結療法研究会、2018/8/26、新宿（東京都）
8. 高木治行、がんのアブレーション：どこまで来たのか？どこへ行くのか？第 70 回北海道血管造影・IVR 研究会、2018/8/25、札幌（北海道）
9. 上嶋英介、高木治行、児玉大志、山門亨一郎、肝動脈塞栓術が TGF- $\beta$  発現に与える影響：ラット肝癌モデルによる検討。第 65 回関西 IVR 研究会、2018.6.30、梅田（大阪府）
10. 高木治行、平田豊、上嶋英介、児玉大志、山門亨一郎、光イメージングで視認可能な担癌ラットモデルの開発：第一報。第 65 回関西 IVR 研究会、2018.6.30、梅田（大阪府）
11. 高木治行、TACE2.0：art から science へ、第 13 回肝アンギオ研究会、2018/6/22、新宿（東京都）
12. Takaki H, Tumor ablation and Cancer Immunology, JSIR&ISIR 2018, 2018/6/2、東京都
13. Takaki H, Ablation and Immunomodulation, JSIR&ISIR 2018, 2018/6/1、東京都
14. Takaki H, Hirata Y, Ueshima E, Kako Y, Kobayashi K, Taniguchi J, Yamakado K. Hypoxic stress induces the overexpression of programmed death ligand 1 and chemokine ligand 17 on rat hepatoma cell lines. SIR 2018, 2018/3/17-3/22、ロサンゼルス（アメリカ）
15. Takaki H, Ablation and Immunomodulation: Current Topics and Clinical Practice, APSCVIR 2018, 2018/3/9、オークランド（ニュージーランド）
16. 高木治行、平田豊、上嶋英介、谷口純一、加古泰一、小林薫、山門亨一郎、低酸素刺激が免疫抑制因子発現に与える影響について：ラット肝細胞癌株による検討。第 63 回中部・第 64 回関西 IVR 合同地方会、2018.2.17、愛知県
17. 高木治行、IVR と基礎研究、第 31 回ミッドウインターセミナー、2018/1/27、福岡国際会議場（福岡県）
18. Takaki H, Combining immunotherapy with ablative modalities, ACTA 2018, チェンナイ（インド）
19. Takaki H, Ablation and Immunomodulation, ACTA 2017, 2017/11/19、広州（中国）
20. Takaki H, Ablation and Immunomodulation, JFR 2017, 2017/10/15、パリ（フランス）
21. 高木治行、平田豊、山門亨一郎、低酸素刺激が免疫抑制因子発現に与える影響についての検討。18 回 RFA 凍結療法研究会、2017.8.26、金沢（石川県）
22. 高木治行、アブレーションと腫瘍免疫、18 回 RFA 凍結療法研究会、2017.8.26、金沢（石川県）
23. 高木治行、進行肝がんに対する、IVR の役割、第 21 回北海道肝癌治療研究会、2017/4/8、ニューオータニイン札幌（北海道）
24. Takaki H, Technical TIPS for TACE – Japanese experiences -, MD Anderson Cancer Center, 2017/3/10、ヒューストン（アメリカ）
25. Takaki H, Yamakado K, Srimathveeravalli G, Solomon SB, Erinjeri JP. Changes in Peripheral Blood T-cell Balance after Ablation Therapy, SGI 2017, 2017、インチョン（韓国）
26. Takaki H, Interventional treatment of HCC beyond the guideline, Bangkok conference in Interventional Oncology (BCIO), 2016/9/29、バンコク（タイ）
27. 高木治行、山門亨一郎、Govindarajan Srimathveeravalli, Stephen B. Solomon, Joseph P. Erinjeri. アブレーション治療後の、末梢血 T 細胞バランスの変化について。第 17 回

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山門 亨一郎

ローマ字氏名：YAMAKADO, koichiro

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20263022

研究分担者氏名：平田 豊

ローマ字氏名：HIRATA, yutaka

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10441247

研究分担者氏名：善本 知広

ローマ字氏名：YOSHIMOTO, tomohiro

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60241171

研究分担者氏名：中正 恵二

ローマ字氏名：NAKASYO, keiji

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00217712

研究分担者氏名：廣田 省三

ローマ字氏名：HIROTA, shozo

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号（8桁）：20181216

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。