

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08018

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対するGAS5遺伝子を用いたマクロファージ療法

研究課題名(英文) GAS5 gene therapy on macrophage for hepatocellular carcinoma

研究代表者

大濱 日出子 (Ohama, Hideko)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：60794782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は年間3万人が死に至る難治性の癌であり、最近、抗腫瘍免疫を回復させる癌免疫療法が適応となった。申請者はCCL1を抑制する事により宿主のM2bマクロファージ(Mf)/単球を消失させ、宿主の抗腫瘍免疫を回復せしめる新しい手段を発見した。しかし、それはCCL1 antisense oligodeoxynucleotidesを用いており、効率よくCCL1を抑制できない。本研究ではCCL1遺伝子発現を抑制する長鎖型non coding RNAであるGrowth Arrest Specific 5を用いた遺伝子治療により、肝細胞癌患者のM2b単球の機能をin vitroにて阻止する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤(ICI)は効果的であるが万能ではない。我々はその原因の一つが、Mfにあると考えている。Mfは全身の80%が肝臓に存在し、肝臓の抗腫瘍免疫において非常に重要だが、肝細胞癌患者では腫瘍殺傷能を持たずまた抗原提示能も殆ど持たない上、他の腫瘍殺傷性1型細胞の出現を強力に妨害してしまうM2bMf/単球が優位に存在する。ICIは、このM2bMfに対し効果的に働かない。本研究のGAS5遺伝子療法は、M2bMf/単球のCCL1産生を効果的に抑制した。本治療はCCL1抑制からM2bMf消失を促し、最終的に肝臓の抗腫瘍免疫を回復させる新たな治療法となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most difficult cancers to deal with and 30,000 people die due to HCC every year. Treatment with immune checkpoint inhibitors that restore anti-tumor immunity has been recently indicated for HCC.

We have previously reported that M2b macrophage (Mf)/monocytes has the function of suppressing anti-tumor immunity in patients with HCC. When M2bMf/monocytes are eliminated, host anti-tumor immunity could be restored. However, this method uses CCL1 antisense oligodeoxynucleotides which could not efficiently suppress CCL1. In this study, M2b monocytes isolated from the blood of hepatocellular carcinoma patients, were treated with a gene therapy using Growth Arrest Specific 5, a long non-coding RNA that suppresses CCL1 gene expression. After the gene therapy, CCL1 productions from these cells were successfully decreased in vitro.

研究分野：Hepatology

キーワード：Hepatocellular carcinoma macrophage

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、肝炎ウイルスや酸化ストレス・アルコール等が原因による慢性炎症を持つ患者に発生し、日本では年間3万人が死に至る。その肝細胞癌は、様々な集学的治療を行うも、非常に高い再発率のため10年生存率が12%しかなく、最も難治性の癌の一つである。最近、固形癌に対して新たな癌免疫療法が脚光を浴びている。それは癌による様々な影響により低下した宿主の抗腫瘍免疫を回復させ癌を制御する手段であるが、研究開始当初において肝細胞癌において効果があるとされている癌免疫療法は未だ認められていなかった。抗腫瘍免疫の機序は、腫瘍細胞に発現している変異抗原をMφや樹状細胞が認識する事から始まる。それをT細胞に提示することにより、細胞障害性T細胞(CTL)の活性化が誘導され、CTLが腫瘍微小環境へ浸潤し腫瘍細胞を殺傷する。しかし癌は、自らProgram Cell Death Ligandを発現し、T細胞のProgram Cell Death 1(PD-1)に結合させ、そのT細胞の活性化を抑制し、抗腫瘍免疫の働きを低下させてしまう。現在の癌免疫療法は、PD-1に対する抗体を中心としたものであり主な対象はT細胞であるが、それは肝細胞癌に対して十分な効果はない。その理由の大きな一つは、肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫においてMφが重要な役割を果たすからである。Mφ/単球は全身の80%が肝臓に集中して存在しており、肝臓の抗腫瘍免疫において非常に重要である。そのMφの活性型には個体を腫瘍抵抗性にするM1Mφ/単球と、腫瘍殺傷能を持たずまた抗原提示能もほとんど持たないという、他の腫瘍殺傷性1型細胞(CTL、NK細胞、M1Mφ)の出現を強力に妨害してしまうM2Mφ/単球の2種類があるが、肝細胞癌患者ではそのM2Mφ/単球の一つであるM2bMφ/単球が優位に存在する。そのM2bMφ/単球を移入した免疫不全マウスは、抗腫瘍免疫が殆ど機能せず肝細胞癌株が増殖してしまう。M2MφにもPD-1の発現が認められるという報告もあるが(Nature, 545: 495-9, 2017)、それでも肝細胞癌の抗腫瘍免疫に対して、PD-1に対する抗体を用いた現在の癌免疫療法では、効果的に同個体の抗腫瘍免疫を回復できない。なぜなら腫瘍殺傷能及び抗原提示能を持たないM2bMφがさらに活性化しても抗腫瘍免疫改善から、又、M2bMφの細胞傷害性細胞(CTLを含む)活性化抑制機序はPD-1/PD-L1を介した経路ではなく、IL-10等のサイトカインによる影響によるからである。以上の事から、申請者は肝細胞癌に対するMφを対象とした新たな癌免疫療法の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

M2bMφ/単球は自身の生存維持に必須なサイトカイン(CCL1)を産生する。Growth Arrest Specific 5(GAS5)RNAは、CCL1遺伝子発現を抑制する長鎖型non coding RNAである。申請者は、予備実験にて肝細胞癌のM2b単球においてGAS5遺伝子の発現が著しく低下しているため、CCL1の産生が維持され、結果的にM2b単球の延命が保たれる事を発見した。更に肝細胞癌患者由来単球にlentivirusを用いてGAS5遺伝子を発現させたところ、著明にCCL1の産生は抑制された。またこのlentivirusを用いるGAS5遺伝子導入法は、予備実験においてMφ/単球に対して効果的に導入される事が判明しており、その事は肝臓におけるMφ(肝臓ではKupffer細胞と呼称)に効率良くCCL1を抑制できうる可能性がある。以上のことから本研究の目的は、lentivirusを用いてGAS5遺伝子を導入することにより

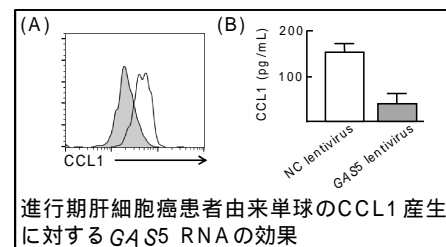
M2bMφ/単球の CCL1 産生抑制を介して、最終的に宿主の肝臓における抗腫瘍免疫を回復させることであった。

3. 研究の方法

肝細胞癌患者由来の単球に対して、lentivirus を用い Gas5 遺伝子を単回導入する事により、Kupffer 細胞もしくは単球に対する Gas5 遺伝子導入効果、その効果の持続期間、Gas5 導入により Kupffer 細胞は腫瘍殺傷能を回復しえるか、in vivo における抗腫瘍免疫回復効果を明らかにする。

4. 研究成果

進行期肝細胞癌患者由来単球(1×10^6 cells/ml)に対して GAS5 lentivirus (5×10^7 TU/ml) を導入し、(A)24 時間後に細胞内 CCL1 発現を Flow cytometry にて検討した。コントロールは Negative control Lentivirus(NC lentivirus) を使用した。その結果、細胞内の CCL1 の発現は減少していた。また、その細胞



を感染 24 時間後に一度洗浄し、その後さらに 24 時間培養した。得られた培養上清中の CCL1 産生量を ELISA にて評価した。ところ、GAS5 lentivirus にて感染させた単球の CCL1 産生は抑制されていた。

本研究において、肝細胞癌患者由来の単球に lentivirus を効果的に感染させる条件設定が難しい事が判明した。今後は、感染を介して CCL1 をより抑制できる条件を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Asai Akira, Tsuchimoto Yusuke, Ohama Hideko, Nishikawa Hiroki, Chopra Ashok, Higuchi Kazuhide	4. 巻 11
2. 論文標題 CD34+CD10+CD19 ⁺ Cells in Patients with Unhealthy Alcohol Use Stimulate the M2b Monocyte Polarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2703 ~ 2703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11172703	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 Asai Akira, Yasuoka Hidetaka, Matsui Masahiro, Tsuchimoto Yusuke, Fukunishi Shinya, Higuchi Kazuhide	4. 巻 12
2. 論文標題 Programmed Death 1 Ligand Expression in the Monocytes of Patients with Hepatocellular Carcinoma Depends on Tumor Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2286 ~ 2286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12082286	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Ohama H, Asai A, Yasuoka H, Tsuchimoto Y, Fukunishi S, Higuchi K.
2. 発表標題 Role of CD34+CD10+CD19 ⁺ - Pax5 ⁺ cells on M2b macrophage polarization.
3. 学会等名 Immunology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuoka H, Asai A, Matsui M, Okamoto N, Nishikawa T, Ohama H, Tsuchimoto Y, Fukunishi S, Higuchi K.
2. 発表標題 PD-L1+PD-L2 ⁺ monocytes from patients with hepatocellular carcinoma may be associated with a poor prognosis.
3. 学会等名 Immunology 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ohama H, Asai A, Tsuchimoto Y, Fukunishi S, Higuchi K.
2. 発表標題 PD-1 expressions on monocytes from patients with hepatocellular carcinoma differs depending on the progression of the cancer.
3. 学会等名 Immunology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuchimoto Y, Asai A, Ohama H, Fukunishi S, Higuchi K.
2. 発表標題 Suppressive role on bacterial resistance of CD10+Pax5+ cells in alcohol use disorder patients.
3. 学会等名 Immunology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuoka H, Asai A, Tsuchimoto Y, Ohama H, Nakamura K, okamoto N, matsui M, Fukunishi S, Higuchi K.
2. 発表標題 Role of PD-L1+PD-L2+ monocytes from advanced-stage HCC patients suppressed the tumoricidal activity of CD8+cells from syngeneic patients.
3. 学会等名 The Liver Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	朝井 章 (Asai Akira) (30622146)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	小谷 卓矢 (Kotani Takuya) (80411362)	大阪医科薬科大学・医学部・特別職務担当教員（講師） (34401)	

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