

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08706

研究課題名(和文) 肝癌循環腫瘍細胞の免疫回避機構解明と制御法の開発

研究課題名(英文) Elucidation and development of control method of the immune escape mechanism of circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma

研究代表者

小林 剛 (Kobayashi, Tsuyoshi)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：50528007

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(HCC)に特異的なGlypican-3(GPC3)陽性の循環腫瘍細胞(CTC)解析から、CTCが獲得する形質を探索し、マクロファージ免疫チェックポイント機構における免疫逃避解除法を開発することを目的とした。

GPC3-CTC、AFP、DCP、多発腫瘍がHCC術後再発の独立危険因子であった。HCC255例のSIRP IgVドメインヴァリアント解析では、V1が無再発生存率、生存率ともに有意に不良であった。GPC3-CTCにおけるCD47発現率による予後に与える影響は有意ではなかった。HCC321例のPD-1遺伝子多型PD-1.1の解析では、GGアレルは有意に肝外再発率が高率であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCCの再発予防療法開発が困難な理由として、heterogeneityが極めて大きいことが考えられるが、HCC特異的なGPC3-CTCを標的とした機能解析や治療戦略はheterogeneityを克服できる可能性を秘めている。マクロファージCD47-SIRPシグナルは新たな免疫チェックポイント機構であり、その阻害療法が期待されている。CD47-SIRPシグナルにおける免疫回避機構解明とその制御法の開発は、画期的な治療手段となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate and develop a method for releasing immune escape mechanism in the macrophage immune checkpoint system using single-cell analysis of Glypican-3 (GPC3) -positive circulating tumor cells (CTC) specific for hepatocellular carcinoma (HCC).

In a study of 132 HCC patients, GPC3-CTC, AFP, DCP, and multiple tumors were independent risk factors for postoperative recurrence. In the SIRP IgV domain variant analysis of 255 HCC patients, V1 variant was significantly poor in both recurrence-free survival rate and overall survival rate. The effect of CD47 expression on GPC3-CTC on prognosis was not significant. In the analysis of PD-1 gene polymorphism PD-1.1 in 321 HCC patients, the GG allele had a significantly higher rate of extrahepatic recurrence.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝細胞癌 循環腫瘍細胞 遺伝子多型 免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) 根治切除後の転移再発は予後に直結し、転移再発を防止する方法は確立されていない。血行性転移を高率に生じる HCC において、転移形成の主因となるであろう循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells; CTC) が、血中で生存しかつ転移形成に至るメカニズムには不明な点が多い。HCC の再発予防療法開発が困難な理由として、背景肝疾患の heterogeneity、腫瘍間の heterogeneity、そして腫瘍内の heterogeneity が極めて大きいことが考えられる。これまでに我々は HCC に特異的な細胞表面マーカー Glypican-3 (GPC-3) を標的にした CTC 検出法を確立し、GPC-CTC は顕微鏡的門脈侵襲の独立した危険因子であることを明らかにしたが、CTC に対する治療戦略は HCC の heterogeneity を克服できる可能性を秘めている。マクロファージ CD47-SIRP シグナルは新たな免疫チェックポイント機構であり、その阻害療法が期待され、バイオマーカーの開発が重要である。

2. 研究の目的

肝癌特異的 CTC の一細胞解析から、CTC が獲得する形質を探索する。さらに自然免疫の一翼を担うマクロファージ免疫チェックポイント機構に着目し、CTC の免疫逃避解除法を開発する。

3. 研究の方法

CTC が獲得する生存のための形質転換探索
CD47 の発現制御機構の解析をはじめ、CTC が獲得する表現形質を一細胞解析により探索する。
宿主側 SIRP 遺伝子多型解析
ヒト SIRP の IgV ドメインには 10 種類のヴァリアントがあり、CD47 結合能が異なることが報告されており、遺伝子多型により HCC 予後に差異がある可能性がある。
個別化治療に向けた CTC 免疫逃避解析
症例ごとに得られた CTC とマクロファージにより貪食能を評価することにより、個別化された治療効果予測を試みる。

4. 研究成果

HCC 切除 132 例 (2015-2018 年) の検討から、GPC3-CTC、AFP、DCP、多発腫瘍が術後再発の独立危険因子であることを明らかにした。(図 1)

HCC 切除 255 例のマクロファージ免疫チェックポイント分子 SIRP IgV ドメインヴァリアント解析では、V1 ヴァリアントは V2 および V1/V2 ヴァリアントに比較して、無再発生存率 ($p=0.011$)、生存率ともに有意に不良であった ($p<0.001$) (図 2)。HCC 切除 127 例の GPC3-CTC における CD47 陽性数は中央値 2 (0-69) であった。CD47 陽性率 75%以上が 70 例 (55.1%)、75%未満 57 例 (44.9%) であり、2 群間の予後に差はみられなかった。

CD47 陽性 CTC の検出個数 0 個、1-4 個、5 個の症例では、陽性数が増加するにしたがって予後不良の傾向がみられたが、有意ではなかった。CD47 発現強度 (MFI) の検討においても、MFI25 以上 (63 例 49.6%) と MFI25 未満 (64 例 50.4%) の予後は同等であった。現在、患者血液及び切除肝灌流液から単離したマクロファージの機能解析を行なっている。

HCC 切除 321 例の T 細胞免疫チェックポイント分子 PD-1 遺伝子多型 PD-1.1 の解析では、PD-1 高発現型の GG アレルは有意に肝外再発率が高率で ($p=0.036$) 全生存率が不良であった ($p=0.009$) (図 3)。HCC 切除 61 例の GPC3-CTC における PD-L1 発現数は中央値 0 (0-10)、発現強度 MFI は中央値 17.2 (1-565) であった。症例を蓄積し予後との関連を評価予定である。

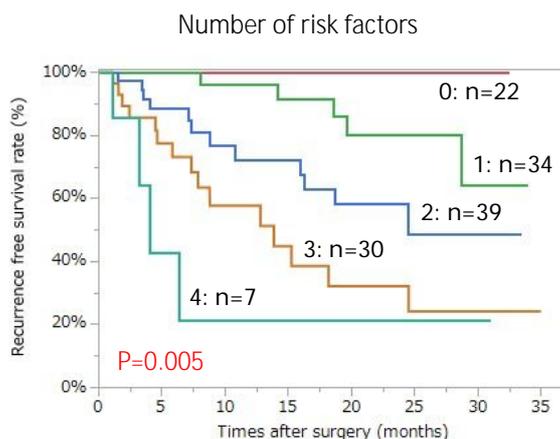


図1. GPC-CTC陽性はHCC肝切除後の再発危険因子

HCC 切除症例における CTC の検出およびフェノタイプ解析を継続的に行い、臨床データを蓄積している。CTC 上の CD47 および PD-L1 発現制御に関わる遺伝子解析を行う予定である。SIRP および PD-1 の遺伝子多型解析は解析が終了し、PD-1 遺伝子多型に関して論文報告した (Yamamoto M, Kobayashi T, Mashima H, et al: PD1 gene polymorphism is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma following liver resection, cohort study. Int J Surg 80:84-90, 2020)。

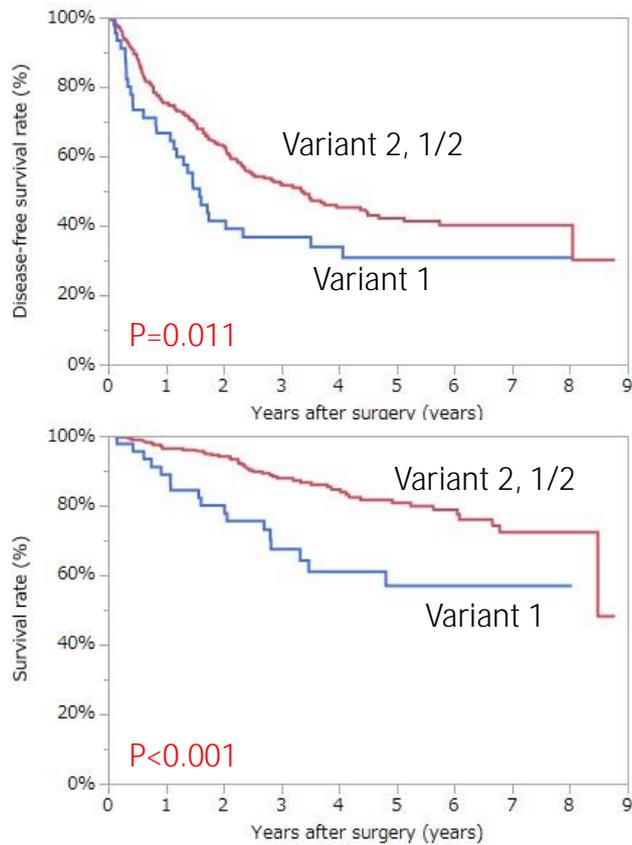


図2. SIRPαヴァリアント別の生存率

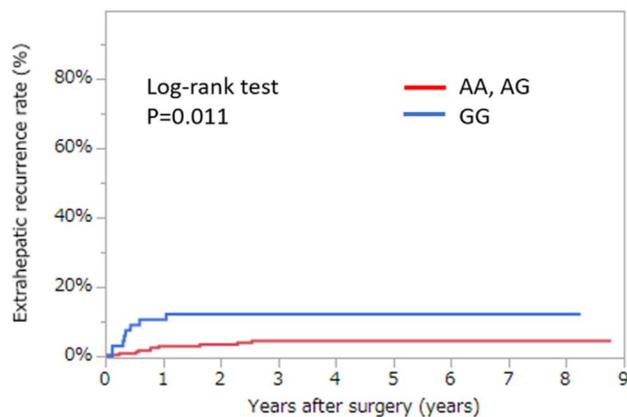


図3. PD1.1遺伝子多型別の肝外再発率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13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 Honmyo Naruhiko, Kobayashi Tsuyoshi, Kuroda Shintaro, Oshita Akihiko, Onoe Takashi, Kohashi Toshihiko, Fukuda Saburo, Ohmori Ichiro, Abe Tomoyuki, Imaoka Yasuhiro, Akita Tomoyuki, Tanaka Junko, Ohdan Hideki	4. 巻 23
2. 論文標題 A novel model for predicting posthepatectomy liver failure based on liver function and degree of liver resection in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 134 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2020.05.008	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 Yamamoto Masateru, Kobayashi Tsuyoshi, Mashima Hiroaki, Miki Daiki, Kuroda Shintaro, Hamaoka Michinori, Aikata Hiroshi, Chayama Kazuaki, Ohdan Hideki	4. 巻 80
2. 論文標題 PD1 gene polymorphism is associated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma following liver resection, cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 84 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijssu.2020.05.007	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 Yamamoto Masateru, Kobayashi Tsuyoshi, Kuroda Shintaro, Hamaoka Michinori, Honmyo Naruhiko, Yamaguchi Megumi, Takei Daisuke, Ohdan Hideki	4. 巻 27
2. 論文標題 Impact of postoperative bile leakage on long term outcome in patients following liver resection for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 931 ~ 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.750	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 Oshita Ko, Ohira Masahiro, Honmyo Naruhiko, Kobayashi Tsuyoshi, Murakami Eisuke, Aikata Hiroshi, Baba Yasutaka, Kawano Reo, Awai Kazuo, Chayama Kazuaki, Ohdan Hideki	4. 巻 55
2. 論文標題 Treatment outcomes after splenectomy with gastric devascularization or balloon-occluded retrograde transvenous obliteration for gastric varices: a propensity score-weighted analysis from a single institution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 877 ~ 887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01693-9	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 Okimoto Sho, Tashiro Hirota, Iwako Hiroshi, Kuroda Shintaro, Kobayashi Tsuyoshi, Hinoi Takao, Ohdan Hideki	4. 巻 50
2. 論文標題 Antithrombin attenuates the progression of hepatocellular carcinoma by regulating neutrophil/interleukin 8 signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1284 ~ 1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13558	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 Morio Kei, Kawaoka Tomokazu, Aikata Hiroshi, Namba Maiko, Uchikawa Shinsuke, Kodama Kenichiro, Ohya Kazuki, Fujino Hatsue, Nakahara Takashi, Murakami Eisuke, Yamauchi Masami, Tsuge Masataka, Hiramatsu Akira, Imamura Michio, Nakamura Yuko, Akagi Motonori, Awai Kazuo, Kobayashi Tsuyoshi, Ohdan Hideki, Chayama Kazuaki	4. 巻 124
2. 論文標題 Preoperative PET-CT is useful for predicting recurrent extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma after resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 108828 ~ 108828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejrad.2020.108828	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 Kaibori Masaki, Yoshii Kengo, Hasegawa Kiyoshi, Ariizumi Shunichi, Kobayashi Tsuyoshi, Kamiyama Toshiya, Kudo Atsushi, Yamaue Hiroki, Kokudo Norihiro, Yamamoto Masakazu	4. 巻 27
2. 論文標題 Impact of systematic segmentectomy for small hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 331 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.720	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 Hamaoka M, Kobayashi T, Tanaka Y, Mashima H, Ohdan H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical significance of glypican-3-positive circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma patients: A prospective study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0217586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217586	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 Honmyo N, Kobayashi T, Hamaoka M, Kohashi T, Abe T, Oishi K, Tazawa H, Imaoka Y, Akita T, Tanaka J, Ohdan H	4. 巻 49
2. 論文標題 Comparison of new prognostic systems for patients with resectable hepatocellular carcinoma: Albumin-Bilirubin grade and Albumin-Indocyanine Green Evaluation grade.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1218-1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13393	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 Iwako H, Tashiro H, Okimoto S, Yamaguchi M, Abe T, Kuroda S, Kobayashi T, Ohdan H	4. 巻 236
2. 論文標題 Antithrombin Insufficiency Promotes Susceptibility to Liver Tumorigenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Surg Res	6. 最初と最後の頁 198-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jss.2018.11.026	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 Yamamoto M, Kobayashi T, Kuroda S, Hamaoka M, Okimoto S, Honmyo N, Yamaguchi M, Ohdan H	4. 巻 3
2. 論文標題 Verification of inflammation-based prognostic marker as a prognostic indicator in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 667-675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12286	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 Liu B, Anno K, Kobayashi T, Piao J, Tahara H, Ohdan H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Influence of donor liver telomere and G-tail on clinical outcome after living donor liver transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0213462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213462	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 Ohira M, Kobayashi T, Hashimoto M, Tazawa H, Abe T, Oshita A, et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Prognostic factors in patients with recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma after curative resection: A retrospective cohort study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Surg	6. 最初と最後の頁 156-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijssu.2018.04.058	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 剛, 山本 将輝, 大段 秀樹
2. 発表標題 循環腫瘍細胞からみた肝癌の外科治療戦略
3. 学会等名 JDDW2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 剛, 大平 真裕, 山本 将輝, 竹井 大祐, 真島 宏聡, 濱岡 道則, 橋本 昌和, 谷峰 直樹, 黒田 慎太郎, 田原 裕之, 井手 健太郎, 田中 友加, 大段 秀樹
2. 発表標題 肝癌外科治療後の再発予防に向けた取り組み
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林剛, 真島宏聡, 山本将輝, 本明慈彦, 山口恵, 沖本将, 濱岡道則, 黒田慎太郎, 大段秀樹
2. 発表標題 Significance of anatomical liver resection for intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林剛,真島宏聡,黒田慎太郎,井手健太郎,大平真裕,田原裕之,橋本慎二,瀨岡道則,大段秀樹
2. 発表標題 肝細胞癌術後肝内再発に対する再切除の意義と安全性
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林剛,黒田慎太郎,大段秀樹
2. 発表標題 高齢者の小肝細胞癌に対する治療選択
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 剛、瀨岡道則、真島宏聡、沖本将、本明慈彦、山口恵美、清水誠一、黒田慎太郎、田原裕之、大平真裕、井手健太郎、大段秀樹
2. 発表標題 リキッドバイオプシーとしての肝癌循環腫瘍細胞
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 剛、瀨岡道則、大段秀樹
2. 発表標題 肝細胞癌切除例におけるGlypican3陽性循環腫瘍細胞の臨床的意義
3. 学会等名 J D D W2018
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------