

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08464

研究課題名(和文) 肝がん微小環境での免疫編集に関わるHLA-classII発現変化と制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of HLA-class II expression and regulation mechanism involved in immune editing of liver cancer microenvironment.

研究代表者

平松 活志 (HIRAMATSU, KATSUSHI)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授

研究者番号：30646849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌13症例の手術標本を用い、次世代シーケンサーにて癌部と非癌部の発現解析を行ったところHLA関連遺伝子の発現が有意に亢進している症例群が同定された。さらに肝細胞癌85症例の組織標本の蛍光マルチプレックス免疫組織化学染色を行ったところ、腫瘍内HLA-DPB1陽性細胞の多くはCD163陽性M2マクロファージであった。さらに、機械学習アルゴリズムを用いてCD163陽性細胞の形態(円形、紡錘形)を自動解析したところ、CD163陽性・円形マクロファージ(円形CD163)は腫瘍内で有意に増加しており($P<0.05$)、腫瘍内CD8および無再発生存期間と有意に正の相関を示した($P<0.05$)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌の免疫微小環境において、腫瘍内HLA-DPB1陽性細胞の多くはCD163陽性M2マクロファージであることが判明した。これらは一般的には腫瘍免疫の抑制に関与していると考えられているが、詳細は不明であった。そこで、これらの形態の違い(円形、紡錘形)に注目して検討したところ、CD163陽性・円形マクロファージはCD8陽性リンパ球と共に腫瘍内に存在して無再発生存の延長に寄与していることが明らかとなった。同機序の解明が新たな治療開発につながる可能性が示唆された。

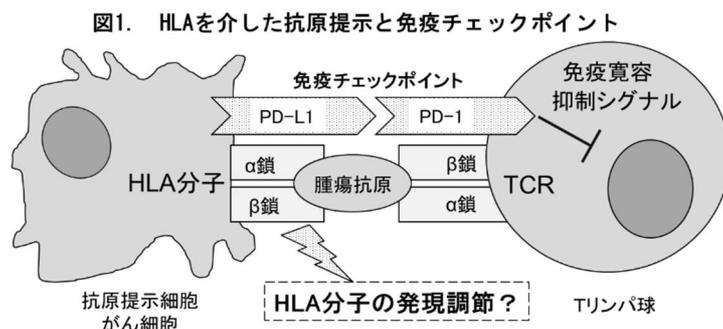
研究成果の概要(英文)：Using next-generation sequencing of surgical specimens from 13 hepatocellular carcinoma cases, we identified a group of cases in which HLA-related gene expression was significantly upregulated in cancerous and noncancerous areas. Fluorescence multiplex immunohistochemical staining of tissue samples from 85 hepatocellular carcinoma patients revealed that most of the HLA-DPB1-positive cells in the tumors were CD163-positive M2 macrophages. Furthermore, automated analysis of CD163-positive cell morphology (round, spindle-shaped) using a machine learning algorithm revealed that CD163-positive, round macrophages (round CD163) were significantly increased within tumors ($P<0.05$) and significantly positively correlated with intratumor CD8 and recurrence-free survival ($P<0.05$).

研究分野：がん腫瘍免疫

キーワード：肝細胞癌 HLA-Class II 腫瘍関連マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

わが国における肝がんによる死亡者数は年間3万人を超えている。また、5年生存率は36%と依然として予後不良であり(国立がんセンター、がんの統計2016) 新たな治療戦略の開発が望まれている。近年、がん免疫療法が急速に発展しているが、その理由のひとつとしてがん細胞が宿主の免疫反応を回避しながら増殖していく仕組み、いわゆる「がんの免疫編集」の解明が挙げられる。つまり、腫瘍内部あるいは腫瘍周囲の微小環境ではがん細胞を排除しようとするがん免疫の機能がCTLA-4やPD-1などの分子を介して強力に抑制される免疫チェックポイントという機構の存在が明らかになった(図1)。



さらに、同分子に対する阻害薬(免疫チェックポイント阻害薬)がT細胞の抗腫瘍効果を回復させ、腫瘍縮小に導くことが臨床的に確認されつつあり、肝がんに対しても有望な治療となることが期待されている(Nat Rev Gastroenterol Hepatol.12:681, 2015)。

ただし、これまでの海外における治験の結果(Lancet.389:2492, 2017)を見る限りその効果は限定的で個人差があるため、他治療との併用療法の可能性が模索されている。一方、感染症の場合と同様にがんに対する免疫応答、すなわち抗原提示細胞による腫瘍抗原の提示やエフェクター細胞による抗原認識においても、HLA(Human Leukocyte Antigen)を介したシグナル伝達が必須である。したがって、前述したようながんに対する免疫寛容状態において、HLA分子が何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではがん抗原の提示や認識に関わるHLA-classII分子に着目し、がん微小環境におけるその役割を解析する。具体的には、肝がんおよび背景肝組織からRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてHLA-classII遺伝子および関連遺伝子の発現を網羅的に検証する。さらに、新規蛍光多重免疫染色を用いてHLA-classII発現細胞について詳細なフェノタイプ解析を行う。本研究の結果は、がん免疫におけるHLA-classIIの発現調節を利用した、新たな免疫療法の開発につながる可能性をもつ。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによるHLA関連遺伝子の網羅的発現解析

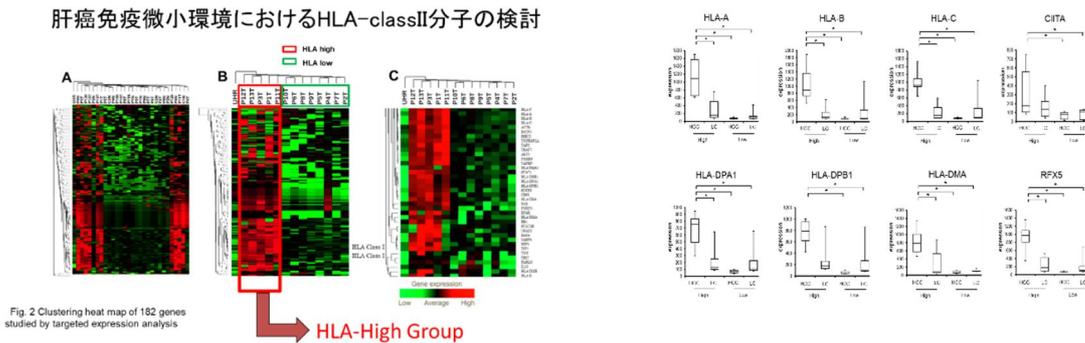
肝がん合併C型肝硬変患者の背景肝硬変組織および肝がん組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより2μmスライスで組織を切り出し、専用のフォイル付スライドにマウントしてHE染色を行ったのち、腫瘍部と非腫瘍部組織を滅菌チューブに回収する。deparaffine solution(QIAGEN)で脱パラフィン処理を行った後、AllPrep DNA/RNA Kit(QIAGEN Cat No.80204)にてRNAとDNAを同時に抽出する。抽出したRNAはBioanalyzer(Agilent社)にてクオリティーチェックを行った後、次世代シーケンサー(MiSeq™:Illumina社)を用い、TruSeq targeted RNA expression kit(Illumina社)にて発現解析を行う。

(2) 蛍光多重免疫染色によるHLA-class II分子の発現細胞の同定と発現様式の検討

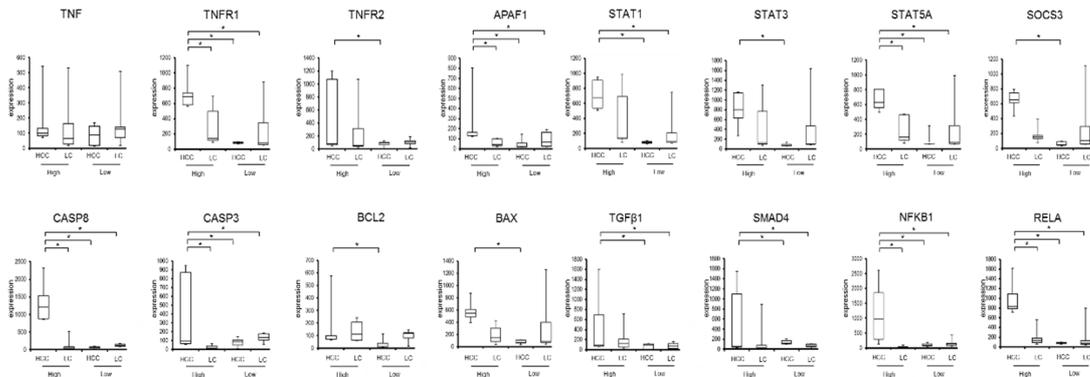
肝がん切除標本 (FFPE) を用いて肝がんおよび背景肝硬変組織での蛍光多重免疫染色を行う。一つの切片上で HLA 分子および免疫細胞マーカーなど計 7 種類を同時に蛍光免疫染色してデジタル解析することにより、HLA 分子を発現している細胞の局在、フェノタイプ、発現強度を明らかにする。

4. 研究成果

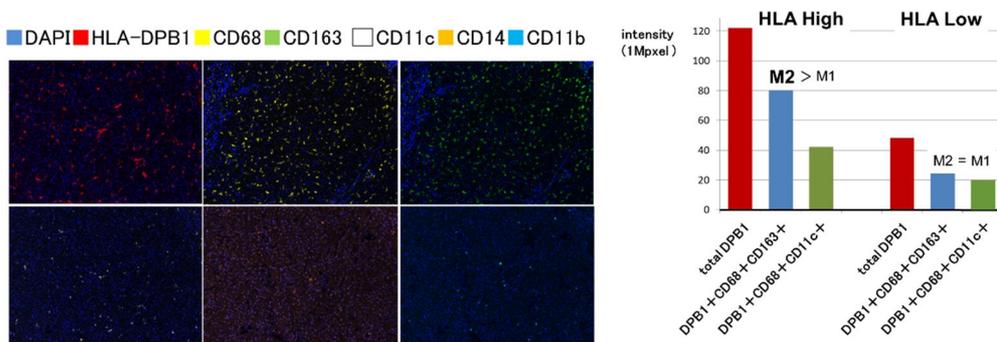
(1) 肝がんの FFPE 標本 (ホルマリン固定、パラフィン包埋標本) よりスライドを作成し、癌部と非癌部より抽出した RNA (DV200 > 50%) を用い、次世代シーケンサー (NGS、MiSeq™: Illumina 社) にて、HLA 関連遺伝子を含む 182 遺伝子の targeted RNA expression 解析を行った。発現プロファイルをクラスター解析したところ HLA 関連遺伝子の発現が有意に亢進している症例群 (HLA 発現亢進群) が同定された (下図)。



また、この HLA 発現亢進群では、同時にアポトーシス、JAK/STAT、TGF 関連 (下図) のシグナルの亢進がみられた。

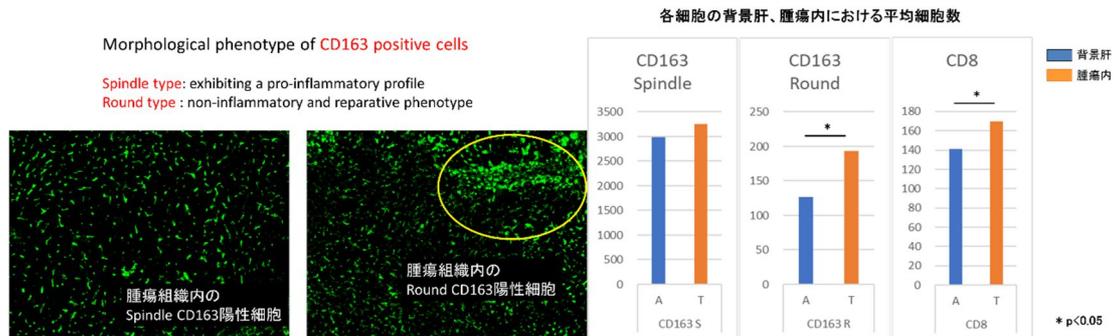


(2) 浸潤免疫細胞に関わる 9 種類の抗体 (HLA-DPB1、CD68、CD163、CD11c、CD11b、CD14、CD4、CD8、FoxP3) による新規蛍光多重免疫染色 (OPAL™: Parlink-Elmar 社) を行い、各蛍光強度をデジタル解析したところ、HLA 発現亢進群の癌部に HLA-DPB1 陽性かつ CD68、CD163 陽性を示す M2 マクロファージが有意に多く浸潤していた (80 vs 22、蛍光強度 / 1 M pixel、 $P < 0.05$)。



次に、外科手術を施行した肝細胞癌患者 85 症例 (男/女: 65 例/20 例、平均年齢 71 歳、B 型

17例、C型27例、アルコール関連13例、NAFLD 22例)の手術標本を用いて、蛍光マルチプレックス免疫組織化学染色(OPALTM: Perkin-Elmar、抗CD68、抗CD163抗CD8抗体)を行った。各標本を100倍視野で観察し、背景肝、腫瘍部より10視野ずつデジタル撮影し、各抗体に対する陽性細胞およびCD163陽性細胞の形態(円形、紡錘形)の判別は専用システム(inFormTM: Perkin-Elmar)の機械学習アルゴリズムを用いて自動解析した(下左図)。その結果、CD163陽性・円形マクロファージ(円形CD163)の1視野あたりの数(背景肝/腫瘍内)は127個/194個であり、腫瘍内で有意に増加していた($P < 0.05$)。CD163陽性・紡錘形マクロファージ(紡錘CD163)は2993個/3246個、CD8陽性リンパ球(CD8)は141個/170個でいずれも有意差はみられなかった(下右図)。



また、この腫瘍内CD163陽性細胞が多い(1視野あたり100個以上)症例に関して臨床病理学的特徴を解析したところ(下図)、腫瘍内円形CD163は腫瘍内CD8および無再発生存期間と有意に正の相関を示した($P < 0.05$)。

腫瘍内 CD163-Round と 各種パラメータとの関連

腫瘍内 CD163-Round	High > 100/field (n=42)	Low < 100/field (n=41)	P
男性/女性	32/10	31/10	0.519
腫瘍径, mm	30.6	36.9	0.104
Plts, $\times 10^3/\mu\text{L}$	163.8	170.4	0.432
PT-INR	1.12	1.11	0.421
ALT, U/L	39.7	34.9	0.226
AFP, ng/mL	1160.4	358.1	0.129
PIVKA-II, mAU/mL	725.0	717.9	0.272
PFS, days	1385.3	911.4	0.042*
OS, days	1472.6	1072.7	0.063
背景肝 CD8	85.2	99.4	0.211
腫瘍内 CD8	273.9	78.9	0.016*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 平松活志、中本安成	4. 巻 84
2. 論文標題 イメージング計測AIを用いた肝癌腫瘍内M2TAMの細胞形態解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝胆臓	6. 最初と最後の頁 51-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 3件）

1. 発表者名 Katsushi Hiramatsu, Takuto Nosaka, Yasushi Saito, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Kazuya Ofuji, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani and Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Analysis of immune microenvironment of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication
3. 学会等名 AASLD 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平松 活志, 松田 秀岳, 中本 安成
2. 発表標題 ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いたRNA発現解析および蛍光多重免疫染色による肝癌免疫病態 に関する検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katsushi Hiramatsu, Hidetaka Matsuda, Yasushi Saito, Takuto Nosaka, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Kazuya Ofuji, Masahiro Ohtani and Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 TOLEROGIC MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS ARE RECRUITED IN MICROENVIRONMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN NON-CIRRHOTIC PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION
3. 学会等名 AASLD 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平松活志、松田秀岳、中本安成
2. 発表標題 FFPE組織を用いたtargeted mRNA発現解析と蛍光多重免疫染色による、肝癌免疫微小環境の解析
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsushi Hiramatsu , Takuto Nosaka , Arisa Yamamoto, Yasushi Saito, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Kazuya Ofuji , Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani , Yasunari Nakamot
2. 発表標題 Morphological Analysis of M2 Tumor Associated Macrophage Subsets in Patients with Hepatocellular Carcinoma using Machine Learning Algorith
3. 学会等名 AASLD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松活志、野阪拓人、中本安成
2. 発表標題 肝癌組織におけるCD163陽性マクロファージの形態的特徴と臨床病態に関する検討
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松活志、野阪拓人、中本安成
2. 発表標題 イメージング計測AIを用いた 肝癌腫瘍内 M2 Tumor-Associated Macrophageの細胞形状解析と細胞内脂質代謝の検討
3. 学会等名 第108回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------