

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09043

研究課題名(和文) 癌微小環境内のエクソソーム情報の変化に基づいた薬剤耐性機序の解明と耐性解除の探索

研究課題名(英文) Exploratory research of drug resistance mechanisms based on exosome information in the cancer microenvironment

研究代表者

上野 昌樹 (Ueno, Masaki)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90405465

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)：肝細胞癌の微小環境において、腫瘍における各種タンパク発現と免疫系サイトカインの発現の関連性を解析し、強い免疫原性を持った腫瘍のクラスターが分類されてくることを明らかにしました。一方、臨床症例において、免疫チェックポイント阻害剤治療における効果予測を行い、alpha-fetoprotein (AFP)、C-reactive protein (CRP)、neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)が有意な予測因子として抽出され、腫瘍自身の悪性度とともに、CRP・NLRといった宿主状態を反映する因子も薬物治療効果に影響を及ぼしていることが判明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌の癌微小環境において、多様な遺伝変異と相関して、腫瘍の免疫原性も多様であり、周辺の免疫担当細胞の分布も多様であることが分かった。免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療を行う際は、このような腫瘍自体の多様性と免疫原性の程度を評価するとともに、患者自身の抗腫瘍免疫状態も効果に影響を及ぼすことが分かり、宿主側の環境因子も今後調査する必要性があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In the microenvironment of hepatocellular carcinoma, the relationship between the expression of various proteins in tumors and the expression of immune system cytokines was analyzed, and it was confirmed that there were some tumor clusters with strong immunogenicity. Meanwhile, in clinical cases performing atezolizumab and bevacizumab, the effectiveness of the treatment could be predicted from tumor characteristics and serum parameters. Alpha-fetoprotein (AFP), C-reactive protein (CRP), and neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) were extracted as significant predictive factors. The factors reflecting the host condition, such as CRP and NLR, as well as the malignancy of the tumor itself, also affected the effectiveness of these drug therapies.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝細胞癌 免疫チェックポイント阻害剤 癌微小環境

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の殺細胞性化学療法・分子標的治療薬は効果的になってきたが、それでも奏効率は 30%前後であり、必ずしも腫瘍縮小効果を示すわけでは無く、かつ治療効果のある症例においても、薬剤耐性が出てくるが多かった。腫瘍組織内で、癌細胞は、周辺微小環境を癌にとって好ましい状態するように働きかけていることがこれまでに分かっているが、その情報伝達手段の一つとしてエクソソームなどがあるが、どのような機序で、薬物治療の反応性や耐性が決定づけられるのかを探索する必要があり、また、それを解除する方法を模索する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞そのものではなく、癌をサポートしている腫瘍微小環境に着目した。また、それを制御する因子として、エクソソームなどに着目し、その発現状況と、薬物療法の反応性との関連性を探索すると共に、耐性を解除する遺伝子転写産物を探索することを目的とした。また、研究開始当初と異なり、肝細胞癌においては、殺細胞性化学療法から分子標的治療薬、特に免疫チェックポイント阻害薬の使用が、第1選択となってきた為、免疫チェックポイント阻害薬の感受性に係る腫瘍周辺の微小免疫環境について探索することも目的に加えた。

3. 研究の方法

腫瘍微小環境における遺伝子解析においては、和歌山県立医科大学外科学第2講座にて手術を実施した肝細胞癌の切除症

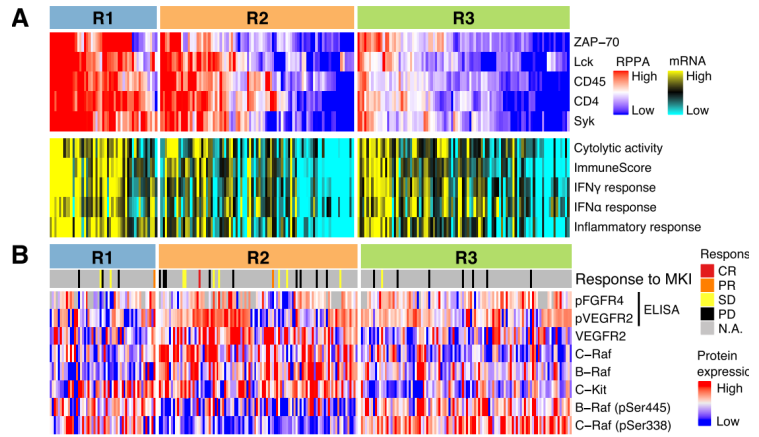


図1; プロテオーム解析における免疫関連遺伝子発現の分布 (A)と、マルチキナーゼ阻害剤の各種標的蛋白の発現程度(B)。

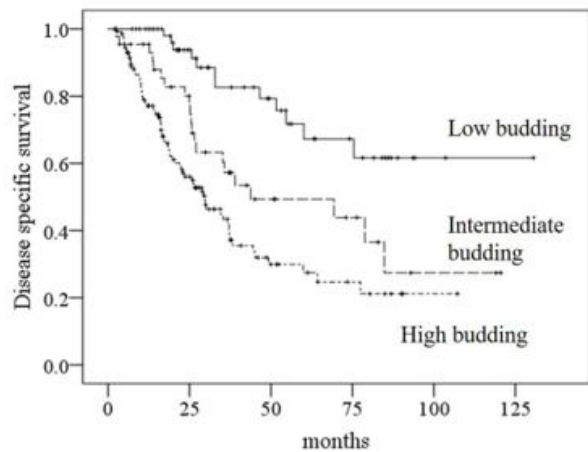
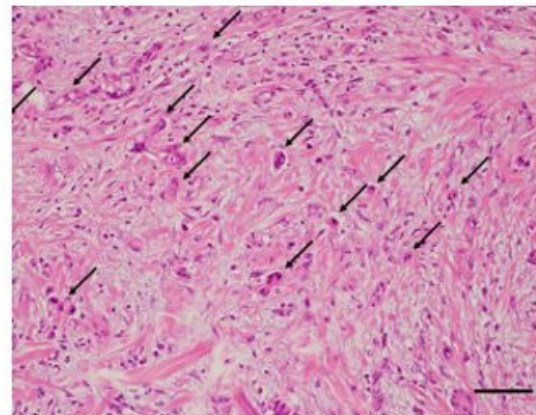


図2; high budding と診断された腫瘍周辺の典型像 (上図)と、budding status 毎の生存曲線 (下図)

例を対象とした。手術にて切除された組織サンプルを用いて遺伝子解析・タンパク質解析・エクソソーム解析を実施し、腫瘍微小環境における免疫担当細胞の分布との相関性を検討した。エクソソームやその遺伝子の抽出はキット製品により実施免疫担当細胞の分布は、各種免疫染色を行う事で評価した。また、病理学的見地から、腫瘍周辺の形態学的変化と悪性度・薬物耐性との関連性を調べた。一方、免疫チェックポイント阻害薬治療を実際に行った症例に対して、効果の程度と、組織あるいは血清から得られる情報との相関解析を加え、予後予測モデルの構築を行った。

4. 研究成果

肝細胞癌の微小環境において、腫瘍における各種タンパク発現と免疫系サイトカインの発現の関連性を解析し、強い免疫原性(hot immunity)を持った腫瘍のクラスターが分類されてくることを明らかにした(図 1)。また、hot immunity に関連する腫瘍ゲノム異常として、CTNNB1 遺伝子や TP53 遺伝子の変異が大きく関与していることが示された。また、それらの内、21 個の蛋白の発現の多寡が予後に係ることを明らかにし、代表的な蛋白として、cyclin-dependent kinase 1 や Dual-specificity phosphatase 4 が挙げられ、各々の予後に係るハザードは、3.0 と 0.5 であった。

一方、腫瘍周辺の免疫微小環境の観点からは、腫瘍微小環境で発現される PD-L1 の多寡と肝細胞癌の腫瘍悪性度の間に弱い関連性があることが観察された。このため、予後とも相関が認められる可能性が得られた。一方、腫瘍周辺に存在する CD8 陽性 T 細胞の集積程度は強く関連性を認めた。よって、PD-L1 の多寡よりも腫瘍微小環境に存在する CD8 陽性 T 細胞の function status が、特に免疫チェックポイント阻害剤の反応性を規定する可能性が示唆された。CD8 陽性 T 細胞集積の重要性は、腫瘍免疫抑制状態を遺伝子変異の観点から 4 つの表現型(腫瘍関連マクロファージ浸潤型・CTNNB1 変異型・ cytolytic activity 型・regulatory T cell 浸潤型)に分類した、これまで報告をサポートするものであった。

胆管細胞癌においては、腫瘍辺縁の組織学的な morphology と悪性度との相関を調べ、浸潤様式の一つである budding(簇出)と、腫瘍悪性度との関連性を解析し、budding の頻度が高い症例は、大きさ・個数といった TNM 因子とは独立して、有意に悪性度と関連する因子ことを報告した(図 2)。一方、臨床症例において、免疫チェックポイント阻害剤治療における効果予測

を行い、alpha-fetoprotein (AFP)、C-reactive protein (CRP)、neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR)が有意な予測因子として抽出され、腫瘍自身の悪性度とともに、CRP・NLR といった宿主状態を反映する因子も薬物治療効果に影響を及ぼしていることが判明した。これらの結果を基に、atezolizumab + bevacizumab 治療における効果予測モデルを構築し、 $\text{Logit}=1.62 - 0.61 \times [\text{CRP}] - 0.38 \times [\text{Log}_{10}\text{AFP}] - 0.37 \times [\text{NLR}]$ という予測式を得た(図 3)。

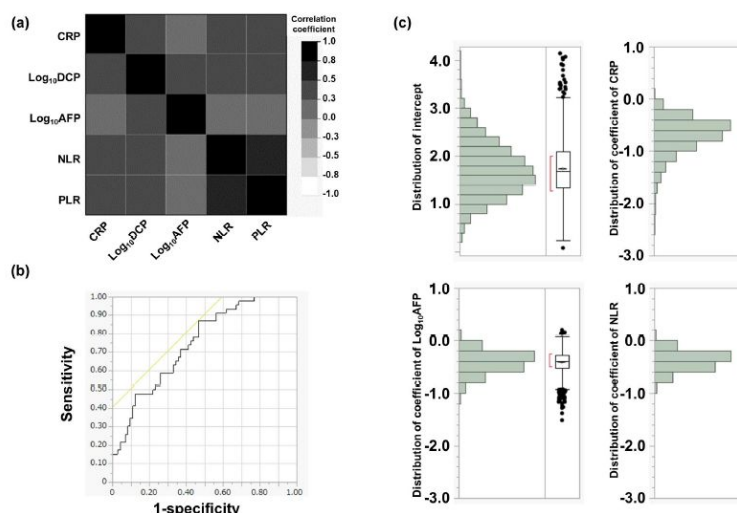


図 3:抽出された予測パラメータ間の相関図(a)と、構築された予測モデルの受信者動作特性曲線(b)、そして CRP、Log10AFP、NLR、および切片のブートストラップ回帰係数の分布(c)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yuji Kitahata, Manabu Kawai, Seiko Hirono, Ken-Ichi Okada, Motoki Miyazawa, Hideki Motobayashi, Masaki Ueno, Shinya Hayami, Atsushi Miyamoto, Hiroki Yamaue	4. 巻 29
2. 論文標題 Circulating Tumor DNA as a Potential Prognostic Marker in Patients with Borderline-Resectable Pancreatic Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Pancreatectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol .	6. 最初と最後の頁 1596-1605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-10985-0.	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 Ueno Masaki, Kosaka Hisashi, Iida Hiroya, Ida Yoshiyuki, Aoi Kazunori, Mori Haruki, Miyamoto Atsushi, Nishida Yuko, Hayami Shinya, Kawai Manabu, Kaibori Masaki	4. 巻 101
2. 論文標題 Response Prediction Model of Atezolizumab plus Bevacizumab in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: Multicenter Retrospective Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 565 ~ 574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000531317	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 Fujita Masashi, Chen Mei-Ju May, Siwak Doris Rieko, Sasagawa Shota, Oosawa-Tatsuguchi Ayako, Arihiro Koji, Ono Atsushi, Miura Ryoichi, Maejima Kazuhiro, Aikata Hiroshi, Ueno Masaki, Hayami Shinya, Yamaue Hiroki, Chayama Kazuaki, Lee Ju-Seog, Lu Yiling, Mills Gordon B., Liang Han, Nishizuka Satoshi S., Nakagawa Hidewaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Proteo-genomic characterization of virus-associated liver cancers reveals potential subtypes and therapeutic targets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-34249-x	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本篤、上野昌樹、他
2. 発表標題 肝細胞癌に対するatezolizumab+ bevacizumab 治療：宿主の免疫能と治療効果について
3. 学会等名 第54回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須崎紀彦、上野昌樹、他
2. 発表標題 肝細胞癌におけるSETD8の高発現と予後の関連
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 宮本篤、上野昌樹、他
2. 発表標題 術後3ヵ月目のALBI scoreはより鋭敏に肝細胞癌切除後の予後を反映する
3. 学会等名 日本臨床外科学会
4. 発表年 2020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	速水 晋也 (Hayami Shinya) (00468290)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	

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	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員（特別顧問） (24701)	
研究分担者	川井 学 (Kawai Manabu) (40398459)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

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