

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17557

研究課題名（和文）肝細胞癌における腫瘍免疫制御機構の機序解明

研究課題名（英文）tumor immunoregulatory mechanism in hepatocellular carcinoma

研究代表者

遊佐 俊彦（Yusa, Toshihiko）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：20867204

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）：本研究では、肝細胞癌において腫瘍内部および腫瘍周囲の双方で免疫細胞の局在を調べ、臨床病理学的因子との関連性や予後に与える影響について明らかにしていくことを目的とし、主に切除検体のパラフィン組織を用いた免疫染色にて免疫細胞の局在・浸潤の程度と患者背景因子や予後との対比を行った。結果、予後についての検討では腫瘍周囲の好中球、マクロファージが多い症例やCD8+ T細胞が少ない症例は予後不良だった。制御性T細胞を加えた腫瘍周囲の4種の免疫細胞についてRisk- signature modelを作成すると、High-risk群はLow-risk群と比較して予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年抗腫瘍免疫能を賦活化する治療が肝細胞癌においても臨床応用されており、治療に関わるバイオマーカー探索や、新たな治療標的探索の重要性は高まっている。本研究の結果によって、肝細胞癌の腫瘍微小環境における免疫細胞群が腫瘍内だけでなく腫瘍周囲環境においても予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後さらに詳細なメカニズム解明を行うことで癌治療への臨床応用が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the localization of immune cells both inside and around the tumor in hepatocellular carcinoma, and to clarify the relationship with clinicopathological factors and the effect on prognosis. The degree of localization and invasion of immune cells was compared with the patient background factors and prognosis by immunostaining using the paraffin tissue of the resected specimen. As a result, in the examination of prognosis, cases with many neutrophils and macrophages around the tumor and cases with few CD8 + T cells had a poor prognosis. When a risk-signature model was created for four types of immune cells around the tumor, the high-risk group had a poorer prognosis than the low-risk group.

研究分野：消化器外科学分野

キーワード：腫瘍微小環境 腫瘍関連好中球 腫瘍関連マクロファージ CD8陽性リンパ球 制御性T細胞 肝細胞癌 腫瘍免疫

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2018年にノーベル生理学・医学賞を受賞した本庶 佑博士の研究により、抗PD1抗体薬であるニボルマブやキートルーダが臨床応用され、癌治療の新たな時代が築かれた。抗腫瘍免疫能を賦活化する治療が肝細胞癌においても米国FDAにて認可されたが、進行癌に対するその奏効率は20%程度と報告されていた(El-Khoueiry et al. Lancet 2017, Andrew et al. Lancet Oncol 2018)。このような腫瘍免疫に着目した治療に関わるバイオマーカー探索や、新たな治療標的探索の重要性は高まっており、これらの免疫回避機構に関わるメカニズム解明は極めて重要な注目度の高い研究課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3つを明らかにすることである。

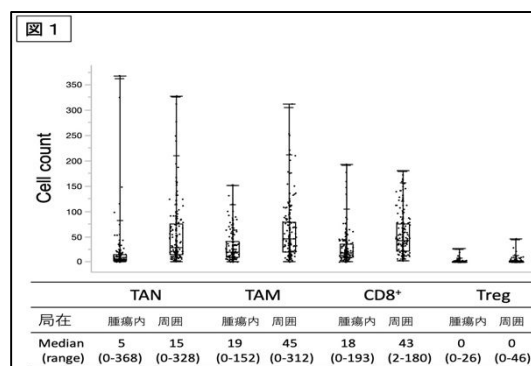
- 1) 肝細胞癌の進展に関わる免疫担当細胞はどの細胞が重要か？  
これまで Prospective に database を構築してきた症例を基に、免疫組織学的に様々な免疫担当細胞を対象として癌の進展とこれらの細胞の関連性を調べ、重要な細胞のスクリーニングを広く行う。腫瘍組織内だけでなく、腫瘍組織周囲の免疫細胞についても同様にスクリーニングを行う。
- 2) PD1、PD-L1 との関連性は？  
免疫回避機構に関わる重要なメカニズムとして、抗PD1に関わるメカニズムがこれまで明らかとなっており、PD1、PD-L1 と他の免疫細胞とのかかわりを調べる。一方、抗PD1治療に関して、TGF- $\beta$  を介した新たな免疫逃避機序が報告され、TGF- $\beta$  阻害薬と抗PD1抗体を用いた Dual inhibitor の有効性が報告された(Sanjeev et al. Nature 2018)。このTGF- $\beta$  による免疫回避機序を含めた腫瘍免疫回避のメカニズムは肝細胞癌においてまだ解明されておらず、これも踏まえて研究をすすめる。
- 3) 腫瘍組織内もしくは腫瘍組織外における標的免疫担当細胞の機能的な特性の解明  
目的となる細胞を組織より分離して機能解析を行う。

### 3. 研究の方法

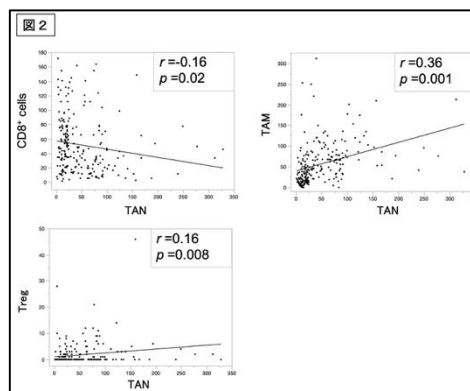
- 1) 免疫染色: 2005年以降当科における肝細胞癌根治切除例 1200例のうち、予後解析の精度を高めるために選別した初回治療としての肝切除例 500例を選別し、さらに3年以上術後経過している約 225例を対象とする。免疫担当細胞の解析であるため、対象とする免疫細胞(およびそのマーカー)は、マクロファージ(CD68/CD163)=TAM、T細胞(CD3/CD8/CD4/IL17/FoxP3)、B細胞(CD20)、好中球(CD66b)=TANといった細胞を対象とする
- 2) Risk-signature の作成: 我々はこれまで様々な腫瘍進展に関わる免疫担当細胞の統合的な解析手法として Narest Template Prediction(NTP) algorithm を用いた risk-signature model の有用性を報告しており、肝細胞癌においても現在腫瘍進展に関わる候補免疫担当細胞のスクリーニングを現在行っており、腫瘍進展に関わる複数の免疫担当細胞を用いて予後予測モデルを作成する。
- 3) 組織からの細胞分離: HCC は腺癌腫瘍組織と比較して柔らかく、細胞分離の行いやすい Material である。手術で採取された肝組織から腫瘍組織・背景肝組織を必要量採取し、組織消化にはコラゲナーゼ、ディスパーゼ、DNase と Tissue dissociator (Miltenyi Biotech.) を用いる。候補細胞が定まったら、その細胞の表面マーカーを用いて分離を行う。機器のメンテナンスや修復・維持費を考慮すると、組織の結合組織による機器の不具合の多い FACS sorting よりも我々は磁器ビーズを用いた分離を行う MACS システムをこれまで用いてきた。腫瘍内の免疫担当細胞の特性を明らかにするため、同一患者からの血液サンプルも採取し、腫瘍内と循環血液中の細胞の特性を比較する。血液からの PBMC 分離には Ficoll を用いて行い、これから各種免疫細胞(CD45/CD3/CD4/CD8/CD66b/FoxP3)の解析を Flowcytometry で行う。

### 4. 研究成果

- 1) 免疫染色と患者背景・予後との関連  
腫瘍内部および腫瘍周囲における TAN、TAM、Treg、CD8<sup>+</sup> cell について免疫染色を施行した。腫瘍内および腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞数を比較すると、腫瘍周囲に浸潤する免疫細胞数は腫瘍内に浸潤する免疫細胞数よりも多い傾向を認めた(図1)。

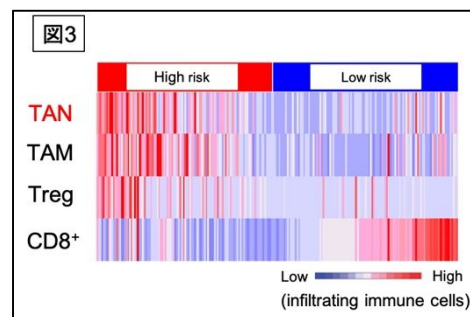


各免疫担当細胞群の関連について検討すると、腫瘍周囲組織内における TAN と TAM ( $p=0.001$ ,  $r=0.36$ ) および Treg ( $p=0.008$ ,  $r=0.16$ ) は正の相関関係を、TAN と CD8 陽性リンパ球は逆相関関係を認めた ( $p=0.02$ ,  $r=-0.16$ ) (図 2)。免疫細胞浸潤数と患者予後について検討を行うと、腫瘍内部における TAN、TAM、Treg、CD8+cell と予後 (全生存期間: OS、無再発生存期間: DFS) に優位な関連は認めなかった。一方、腫瘍周囲環境における TAN-high 群と TAM-high 群は、有意に予後不良であり (TAN OS:  $p=0.0398$ , DFS:  $p=0.010$ , TAM OS:  $p=0.001$ , DFS:  $p=0.0125$ )、CD8+ cell-high 群は有意に OS が延長した ( $p=0.0275$ )。



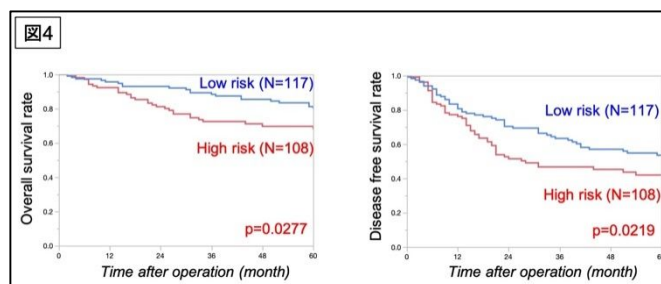
## 2) Risk-signature の作成

各細胞群の浸潤数を基に Nearest Template Prediction (NTP) algorithm を用いた Risk signature を作成した。予後不良に関わる免疫細胞が多く、良好な予後に関わる免疫細胞が少ないような症例を High risk 群、予後不良に関わる免疫細胞が少なく、良好な予後に関わる免疫細胞が多い症例を Low risk 群と 2 群に分類すると (図 3)、High risk 群は優位に予後不良となった (OS:  $p=0.0277$ , DFS:  $p=0.0219$ ) (図 4)。



## 3) 組織からの細胞分離

腫瘍組織からの TAN を中心とした免疫細胞分離については MACS を用いた分離により免疫細胞の形態学および機能的な確認と、精製度の向上を目指した。しかし好中球は N1/N2 TAN



としての特性に関する報告が少ないこともありマーカーを用いた分離の確立には至らなかった。末梢血からの免疫細胞分離については FicolI および Polymorphprep を添加・遠心することで形態学的評価において純度の高い検体を得ることが可能であった。これらの知見を生かし今後は組織および末梢血中の免疫細胞の分離プロトコルを確立し、得られたサンプルによる網羅的解析を検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遊佐俊彦、山下洋市、甲斐田剛圭、美馬浩介、中川 茂樹、林洋光、今井克憲、馬場秀夫
2. 発表標題 肝細胞癌(HCC)における免疫細胞の局在と相互関与が予後に与える影響についての検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
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
---------	---------