

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07890

研究課題名（和文）ST2陽性肝細胞癌による免疫疲弊システムの解明及び治療法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of HCC immune exhaustion system and establishment of treatment methods

研究代表者

岡田 光 (Okada, Hikari)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：50788916

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝がんでもImmune checkpoint 阻害剤(ICI)に有効性を示す亜型としてimmune subclassが注目されているが、ICIに臨床応答を示すかは不明である。申請者は、癌の悪性度に沿った層別化された肝がん細胞に対してICIによる免疫応答するか判定し、腫瘍の微小環境の免疫システムの破綻状態を調べICI応答に抵抗する原因遺伝子soluble form ST2 (sST2)を突き止めた。soluble form ST2 (sST2)は、抗腫瘍免疫で重要な細胞障害性CD8 T細胞(CTL)を機能不全にさせることで腫瘍成長を促した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ST2陽性肝細胞癌の腫瘍内浸潤リンパ球における疲弊システムは解明されていない。本研究の成果は、申請者が新たに樹立した肝細胞癌株を用いてsST2陽性肝細胞癌の免疫非応答・疲弊機序を解明し、微小環境の免疫活性システムを正常化させる治療法に貢献することができた。申請者が作製したマウス新規肝細胞癌株は、完全にオリジナルでありヒト免疫学的分類に沿った基礎的研究が可能になり、癌免疫研究への発展に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Immune subclasses of liver cancer are also attracting attention as subtypes that are effective against immune checkpoint inhibitors (ICIs), but it is unclear whether they show clinical responses to ICIs. The applicant will determine whether an ICI-induced immune response occurs against liver cancer cells stratified according to the malignancy of the cancer and investigate the state of failure of the immune system in the tumor microenvironment to determine the causes of resistance to ICI responses. We identified the gene soluble form ST2 (sST2). Soluble form ST2 (sST2) promoted tumor growth by dysfunctioning cytotoxic CD8 T cells (CTLs), which are important in antitumor immunity.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

これまで肝細胞癌の腫瘍形成や転移・浸潤に対する癌免疫の研究するためのツールが存在しない。マウスの肝細胞癌の肝発がんモデルは1年以上の長期間飼育する必要があることと、マウスの肝細胞癌モデルはヒト肝細胞癌と異なり悪性度が低いことが問題にあった。申請者は肝線維化からの肝発癌モデルマウスを使った肝発がん治療標的の探索を目的とした研究 (Okada H et al. *Cancer Research* 2012, Honda M et al. *BMC cancer* 2012, Takegoshi K et al. *Oncotarget*. 2017, Okada H et al. *Oncotarget*. 2017) と平行にマウスの肝細胞癌の悪性度を高める実験と癌免疫の研究に使用できる肝がん細胞株の作製を行ってきた。10年かけた検討からヒト血小板増殖因子-C (PDGF-C tg) mice に肝特異的に TP53 を欠損させたマウス(PDGF-C-Tg/Alb-cre/TP53-flox/flox)から皮下移植による腫瘍形成、尾静注による肺転移、脾注による肝転移の解析ができるマウス肝細胞癌細胞株を5種類作製することができた。gDNA whole exome seq 解析、RNA-seq 解析、免疫組織染色にて作製した5種類のフェノタイプを評価した結果、①腫瘍浸潤 CD4,CD8 リンパ球が多い(1種類)、②中程度(2種類)、③低程度(2種類)の3種類に分類ができた。ただし、これまでにがん免疫学的分類の報告されている Sia et al *Gastroenterology*, 153:812-826,2017, Kurebayashi Y, et al: *Hepatology*,68:1025-1041, 2018 とは異なり、①の腫瘍浸潤リンパ球が多い分類は、②と③と比較して極めて予後不良であり肺転移も認められた。この Immune exhausted HCC と考えられる細胞は、PD-L1 及び PD-L2 両方ともに発現しているが PD-1 陽性である CD4、CD8 の T 細胞の浸潤が多く、また抗 PD-1 抗体による治療反応性が全く認められなかった。

肝細胞癌(HCC)の免疫治療法の中でも免疫チェックポイント阻害剤(immune checkpoint inhibitor: ICI)の単剤及び他剤との併用も有用性が示されている。しかしながら、ICIにおけるHCC側の宿主免疫応答機序は明らかではない。今後、リンパ球の腫瘍浸潤の度合いで分類された免疫学的分類とHCCにおける宿主免疫反応の関係性を明らかにし、ICIの有効性を示すバイオマーカーを探索することは重要な課題になる。申請者は、興味深い Immune exhausted HCC の特徴を掴み、新規疲弊因子である IL1rl1(ST2)の宿主側の免疫応答機序の解析と ICI 阻害剤の治療の際のバイオマーカーになり得るかを検討する必要がある。

2. 研究の目的

ST2 陽性肝細胞癌の腫瘍内浸潤リンパ球における疲弊システムは解明されていない。本研究は、申請者が新たに樹立した肝細胞癌株を用いて ST2 陽性肝細胞癌の免疫非応答・疲弊機序を解明し、微小環境の免疫活性システムを正常化させる治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

①cell membrane form と Soluble form の2種類のどちらが腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の免疫破綻に関与しているか?

IL1rl1(ST2)の生理学的構造は、2つの形態をもち、Cell membrane form ST2 は、IL1RAP(Interleukin-1 receptor accessory protein)とヘテロダイマーで膜上に存在し炎症因子 IL33 と結合することで Toll like receptor (TLR) family と同様なアダプター分子 Myd88 によってシグナル活性が伝達される。Soluble form は、血中の炎症因子 IL33 と結合することで、Cell membrane form に結合しないようにマスキングし IL33 の活性阻害する機能をもつ。更に、ST2L と sST2 は、プロモーターによる発現調節は異なる。そのため、まずは ST2 そのものの発現を Crispr cas9 システムで欠損させ、野生型 C57BL6J マウスの皮下移植による腫瘍形成させる。作成した ST2 KO 細胞に、ST2L か sST2 を過剰発現させ免疫システムが正常に働く C57BL6J マウスに皮下腫瘍形成の成長を評価する。sST2 と ST2L のプロモーター領域が異なるため immune exhausted HCC に特徴的な発現調節機構を解明し、ST2 発現調節因子阻害剤による皮下腫瘍形成能を評価する。ST2 中和抗体による腫瘍形成能・肺転移能の評価も行う。継続的に血液を採取し、sST2 の発現変動を ELISA 法にて確認する。上記作製した腫瘍組織及びヒト検体は、TIL に対する影響を免疫組織染色にて免疫疲弊システムを評価する。

②Immune exhausted HCC 細胞以外の ICI 阻害剤の応答性の評価

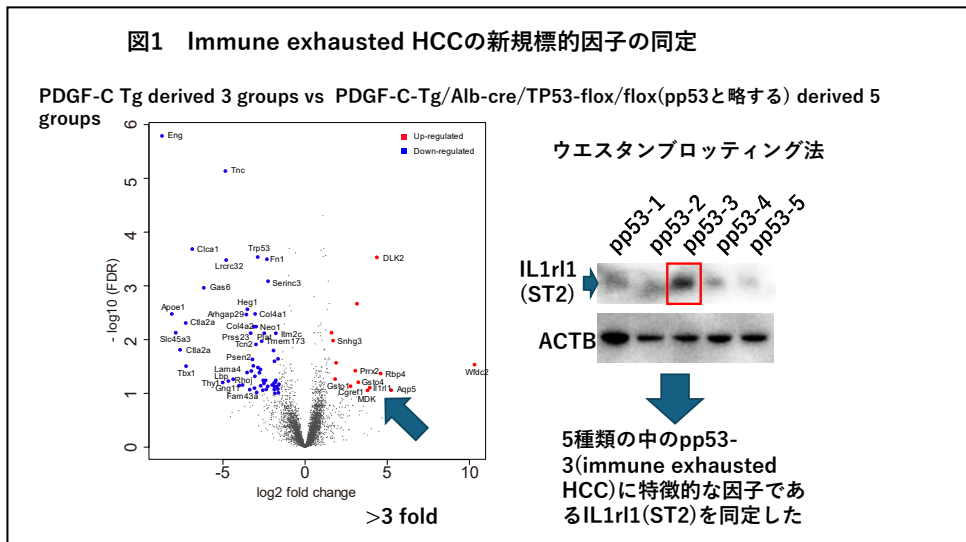
申請者が作製した5種類のマウス癌細胞株による腫瘍は、ICI 阻害剤の有効性があるか評価し、ヒト肝がん症例と照らし合わせることでヒト肝細胞癌にも応用が可能かを検討する

4. 研究成果

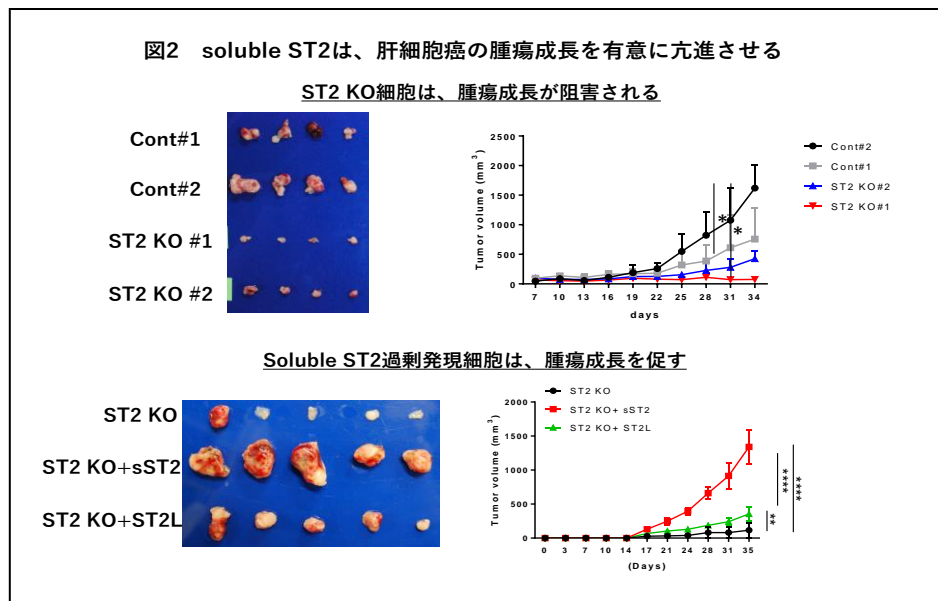
①soluble form ST2 は肝細胞癌の悪性度を増悪させる。

樹立した5種類のマウス初代肝がん細胞株内の4種類は、癌幹細胞マーカーである AFP、EpCAM、KRT19、SOX2 のいずれかの発現が高く、CD4、CD8 陽性細胞の浸潤は

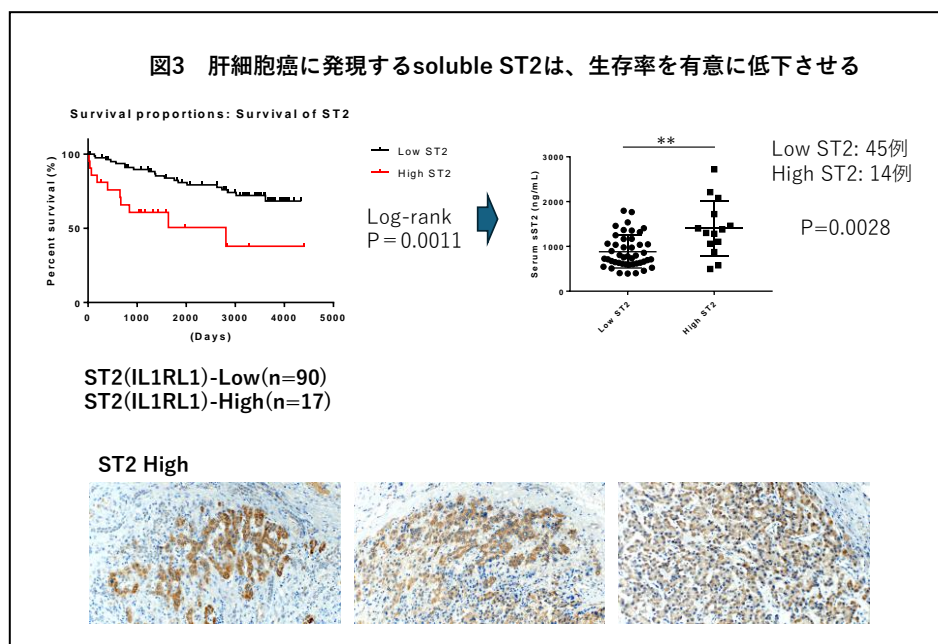
少ない傾向にあったため stem cell subclass と考えられる。つまり、腫瘍浸潤リンパ球による免疫学的分類に沿った癌免疫研究に使えるマウス初代肝がん細胞株の樹立に成功した。一方、CD4、CD8 陽性細胞の浸潤を多く認めるが腫瘍を形成する肝がん細胞株を1つ確立した。この Immune exhausted HCC と考えられる細胞はマウス皮下移植モデルでは他の4種類と比較して極めて予後不良であり肺転移も認められた。この Immune exhausted HCC 細胞は、PD-L1 及び PD-L2 両方ともに発現しているが PD-1 陽性である CD4、CD8 の T 細胞の浸潤が多く、また抗 PD-1 抗体による治療反応性が全く認められなかった。私たちが樹立した興味深い Immune exhausted HCC 細胞株を RNA-seq 解析により、特徴的に高発現している新規免疫疲弊因子 Interleukin 1 receptor like 1 (IL1r1、又は ST2) を同定することができた(図1)。



Crispr cas9 による ST2L と sST2 を両方欠損した Immune exhausted HCC 細胞は、Wild type と比較して 2D 細胞培養による細胞増殖速度には変化がみられないが野生型 C57BL6J マウスの皮下移植による腫瘍形成を有意に阻害した(図2)。



ST2 KO 細胞に、ST2L 加



sST2 をそれぞれ過剰発現させ C57BL6J マウスに皮下腫瘍成長の評価を行った。結果は、ST2 KO 細胞と細胞膜型の ST2 過剰発現細胞よりも分泌型である sST2 過剰発現細胞が劇的に腫瘍形成を増悪させることが確認できた(図 2)。

Soluble ST2 だけに反応する抗体を用いてヒト HCC の病理組織 107 例を免疫組織染色にて実施しました。Soluble ST2 過剰発現細胞を移植した皮下腫瘍と同様に、ヒト HCC 症例でも soluble ST2 の発現が高い症例ほどリンパ球浸潤が高頻度に見られ、全生存率(OS)も有意に低かった(図 3)。

これらの研究成果は、Soluble ST2 がヒト及びマウスの肝細胞癌に対して腫瘍の悪性度の増加や免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性を示す可能性を示すことができた。

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 岡田光、山下太郎
2. 発表標題 Stem cell/Immune exhausted subclass マウス肝がんの特性解析
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023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	山下 太郎 (Yamashita Taro) (90377432)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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