

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21K07899
研究課題名(和文) 難治性肝癌のCD8陽性T細胞誘導を介した免疫療法改善の検討とバイオマーカーの構築

研究課題名(英文) Examination of immunotherapy improvement through CD8+ T cell induction of refractory hepatocellular carcinoma and, construction of biomarkers.

研究代表者
中馬 誠 (Chuma, Makoto)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授

研究者番号：30360910
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)：本研究の目的は、肝細胞癌(HCC)の複合免疫療法において、CD8陽性T細胞誘導を介した複合免疫療法の改善と臨床的に重要なバイオマーカーを同定し、HCCに対する標的戦略を開発することである。
CD8陽性T細胞誘導を介した免疫複合療法の改善には至らなかったが、HCCにおける複合免疫療法の有効性に関連する血中のctDNA変異は認めず、CD8陽性T細胞誘導が、その一過程である、がんの免疫サイクルにおけるケモカインである血清CXCL9およびLAG-3レベルは治療効果と関連しており、肝細胞癌患者における複合免疫療法の有効性を予測するマーカーとなりうることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究より、複合免疫療法の治療効果に関して、がんの免疫サイクルにおけるケモカインが有用なマーカーである事が示され、HCCにおける複数の化学療法において、バイオマーカーに基づく個別化医療への橋渡しが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to identify clinically significant biomarkers of a response to combined immunotherapy therapy and to develop target strategies against hepatocellular carcinoma (HCC) and examination of immunotherapy improvement through CD8+ T cell induction of HCC. CD8+ T-cell induction in HCC did not improve combined immunotherapy. Although no ctDNA mutations in blood were found to be related to combined immunotherapy therapy efficacy, serum CXCL9 and LAG-3 levels, which are related to the cancer immune cycle, were associated with treatment efficacy and could be predictive markers of the efficacy of combined immunotherapy therapy in HCC patients.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌 免疫チェックポイント阻害剤 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

切除不能肝癌において免疫複合療法が使用されるようになったが、いまだ難治性肝癌における成績は十分とは言い難い。特にがん免疫療法において、治療が奏功する “Hot tumor” と無効の “Cold tumor” の概念において、無効例の予後は極めて厳しい。“Hot tumor” とは、免疫微小環境において CD8⁺T 細胞の浸潤が多く認められる T cell-inflamed で、“Cold tumor” とは、Non- T cell-inflamed と考えられている。

“Cold tumor” において、WNT/ β -catenin 経路の活性 (β -catenin の変異)があることによって CD8⁺T 細胞が排除され、腫瘍免疫抵抗性であり (Spranger S, et al. Nature 2015)、HCC においても β -catenin の変異は抗 PD-1/PD-L1 抗体治療において無効 “Cold tumor” と考えられている (Llovet JM, et al. Nat Rev Clin Oncol 2018)。がん免疫療法の治療向上に関して腫瘍免疫微小環境における CD8⁺T 細胞の浸潤が重要な役割を担っていると考えられている。nuclear factor of activated T cells (NFAT) は、免疫応答に不可欠な分子であり、近年、宿主の防御システムを制御する IKK 関連キナーゼである IKK- β の欠損において NFAT 抑制、CD8⁺T 細胞を介した免疫応答の増強が報告され (Junjie Z et al. Cell Reports 2016)、今回、IKK β 抑制、 β -catenin の不活化により CD8⁺T 細胞を介した免疫応答が亢進し、抗 PD-L1/PD-1 抗体治療において相乗効果が得られるかを検討する。研究者らは以前に NF- κ B/IKK 活性化経路や炎症性サイトカインに関して肝発癌モデル解析を行い、極めて重要な知見を示してきた (Maeda S et al. Cell 2005, Chuma M et al. Carcinogenesis 2014)。IKK β を肝癌細胞にて抑制した場合、CD8⁺T 細胞を介した免疫応答が顕著になり、更に抗 PD-L1/PD-1 抗体投与において抗腫瘍効果の向上が得られるか、がん免疫療法において重要な問いである。また今後肝癌において様々な免疫チェックポイント阻害剤、分子標的治療薬が保険適応となる見込みであるが、肝癌における分子、遺伝子診断に基づく免疫療法、分子標的治療は規定されていない。

2. 研究の目的

今回、免疫微小環境における CD8⁺T 細胞の浸潤を介し “Cold tumor” を “Hot tumor” に変化させる肝癌免疫療法の構築を試みることを第一の目的とする。また免疫チェックポイント阻害剤、分子標的治療薬の奏功に関するバイオマーカーを確立し、バイオマーカーに基づく個別化医療の基盤を構築することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

1) IKK β 抑制による CD8⁺T 細胞数、免疫関連分子の発現変化と抗 PD-1/PD-L1 抗体併用における細胞増殖能、細胞死の変化を明らかにする；肝癌細胞株を用いて、抗 PD-L1/PD-1 抗体による様々な濃度での増殖能の変化と細胞死の程度を検討する。siRNA を用いて IKK β 抑制による (IKK β KD-肝癌細胞株)、CD8⁺T 細胞数の変化をフローサイトメトリーにて解析し、microarray, microRNA-microarray を用いて、IKK β の抑制と、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-1 抗体併用により、変化する免疫関連分子、細胞増殖能の変化、細胞死の変化を検討する。

2) IKK β 抑制、 β -catenin/TCF 転写活性抑制による腫瘍組織における CD8⁺T 細胞の浸潤を明らかにする；DEN 肝発癌モデルにおいて、Adenoviral Vector を用いて後天的に IKK β を抑制する事により、肝癌腫瘍組織における CD8⁺T 細胞の浸潤が見られるかを病理組織局在で明らかにする。

免疫複合療法治療効果に関するバイオマーカーの同定

免疫複合療法治療前に同意取得が得られた血液検体、組織検体を用いて治療効果に関するバイオマーカーの同定を行う。1) 免疫複合療法; Atezolizumab + Bevacizumab (ATZ+BV) 治療前の24例の血清より次世代シーケンス (Next Generation Sequencing, NGS) にて効果関連 circulating tumor DNA (ctDNA)変異の同定を行う。2) ATZ+BV 治療前の130例における血清より、HCCにおいて血中に分泌されている、または関連またはCD8陽性T細胞誘導がその一過程である、がんの免疫サイクル (CD8陽性T細胞のプライミング CTL, CTLの腫瘍への輸送、腫瘍への浸潤、CTLによる腫瘍の認識、CTLによる腫瘍の殺傷)に関連する血中 chemokine の CD274, CCL2,4,5, CXCL1,9,10,12,13, CCR5, CX3CL1, IFN- γ , IL-6, 8, LAG-3の15 chemokine 濃度をELISAにて測定し、効果、無増悪生存期間 PFS、全生存期間 OSとの関与を検討した。免疫組織染色に関しては、腫瘍浸潤部におけるPD-L1、CD8⁺T/PD1、の発現と治療効果の相関を検討し、これら3種のマーカーにより、治療効果を予測するスコアリングを形成し、コンパニオン診断の基盤を構築する。

4. 研究成果

1) IKK KD-肝細胞癌株を作成し、フローサイトメトリーCD8⁺T細胞数の変化を解析したが、IKK 抑制によりCD8⁺T細胞数の変化は見られなかった。抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体併用により、細胞増殖能はやや減弱していたが、統計学的に有意差は認めなかった。また、IKK- ノックアウトマウスの作成を試みたが、期間内では、作成が得られなかった。CD8⁺T細胞数の変化が認められなかった原因として、フローサイトメトリー、実験条件によるものであったのか、IKK 欠損でなく、KD抑制の状況では、CD8⁺T細胞数に変化が見られないのか、IKK 抑制により補完的なパスウェイが関与していたからか、今後詳細に検討していく課題である。

1) ctDNAの解析: Variant Read Frequency (VRF) 1%以上の変異としてFGFR1遺伝子を37.5% (9例/24例)に認めたと、pathological benignであった。pathological malignant 遺伝子として、TP53 (3例/24例; 12.6%), APC(8.4%), PICK3CA (8.4%), VHL(4.2%)の変異を認めたと、治療効果との相関は認めなかった。またCTNNB1はprogressive disease (PD) 2例とstable disease (SD) 2例にも認めたと、VRF 0.5%の低い頻度であり、本解析において治療効果に関するpathological malignant 遺伝子としてのctDNA変異は認めなかった。2) Objective response (OR) 12例/ PD 12例で、発現に差のあるchemokineとして、IL-6, CCL5, CXCL9, 10, LAG-3が抽出され、特に有意差の著明なCXCL9 (CTLの輸送), LAG-3 (CTLによる腫瘍の殺傷)を130例で検討したところ、PD/non-PDのcut offとしては、CXCL9 (402 pg/ml)で、OR/non-ORのcut offとしては、LAG-3 (3863pg/ml)で、識別可能であった。更にこのcut offでの患者の層別化による効果、PFS、OSを検討したところ、CXCL9 高値(H)かつLAG3 低値(L)では、ORのpositive predictive value (PPV) 70.3%と高く、PFS 415日、OS > 784日と良好、CXCL9-LかつLAG3-Hでは、PDのPPV 65.4%、PFS 84日、OS 289日と不良であった。OSに関する多変量解析でもCXCL9-H (HR, 2.442; 95%CI, 1.391-4.289; P=0.0019)とLAG-3-L (HR, 2.354; 95%CI, 1.360-4.073; P=0.0022)が独立因子として抽出された(Chuma M, et al. Hepatology International in press)。3) ATZ+BV治療前に得られた組織検体は、27例(OR 8例/ SD 12例/PD 7例)であり、OR例でSD, PDに比較してPD-L1、CD8⁺T/PD1の発現がやや高かったが、有意差は認めなかった。治療前に得られた検体数が少ないため、今後症例を蓄積して、PD-L1、CD8⁺T/PD1の発現と治療効果の関連について検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Chuma M, Yokoo H, Hiraoka A, Ueda K, Yokoyama T, Tsuji K, Shimada N, Uojima H, Kobayashi S, Hattori N, Okubo T, Atsukawa M, Ishikawa T, Takaguchi K, Tsutsui A, Toyoda H, Tada T, Saito Y, Hirose S, Tanaka T, Takeda K, Otani M, Sekikawa Z, Watanabe T, Hidaka H	4. 巻 29
2. 論文標題 Identification of CT Values That Could Be Predictive of Necrosis (N-CTav) in Hepatocellular Carcinoma after Lenvatinib Treatment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Oncol.	6. 最初と最後の頁 3259-3271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curroncol29050266.	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 該当する
1. 著者名 Chuma M, Uojima H, Hattori N, Arase Y, Fukushima T, Hirose S, Kobayashi S, Ueno M, Tezuka S, Iwasaki S, Wada N, Kubota K, Tsuruya K, Shimma Y, Hiroki I, Takuya E, Tokoro C, Iwase S, Miura Y, Moriya S, Watanabe T, Hidaka H, Morimoto M, Numata K, Kusano C, Kagawa T, Maeda S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Safety and efficacy of atezolizumab plus bevacizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma in early clinical practice: A multicenter analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 269-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13732.	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 該当する
1. 著者名 Ogushi K, Chuma M, Numata K, Nozaki A, Moriya S, Uojima H, Kondo M, Morimoto M, Maeda S	4. 巻 34
2. 論文標題 Impact of psoas muscle index assessed by a simple measurement method on tolerability and duration of continued treatment with sorafenib in hepatocellular carcinoma patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 774-781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MEG.0000000000002346	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 該当する
1. 著者名 Kawamura A, Uojima H, Chuma M, Shao X, Hidaka H, Nakazawa T, Take A, Sakaguchi Y, Numata K, Kako M, Nozaki A, Azuma S, Horio K, Kusano C, Atsuda K	4. 巻 22
2. 論文標題 The change rate in serum nitric oxide may affect lenvatinib therapy in hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 912-921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10002-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 該当する

1. 著者名 He X, Hikiba Y, Suzuki Y, Nakamori Y, Kanemaru Y, Sugimori M, Sato T, Nozaki A, Chuma M, Maeda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 EGFR inhibition reverses resistance to lenvatinib in hepatocellular carcinoma cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8007-80017
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12076-w.	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 該当する

1. 著者名 Kobayashi S, Fukushima T, Ueno M, Moriya S, Chuma M, Numata K, Tsuruya K, Hirose S, Kagawa T, Hattori N, Watanabe T, Matsunaga K, Suzuki M, Uojima H, Hidaka H, Kusano C, Suzuki M, Morimoto M	4. 巻 22
2. 論文標題 A prospective observational cohort study of lenvatinib as initial treatment in patients with BCLC-defined stage B hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC cancer	6. 最初と最後の頁 517-525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09625-x.	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 -

1. 著者名 Chuma M, Uojima H, Hattori N, Arase Y, Fukushima T, Hirose S, Kobayashi S, Ueno M, Tezuka S, Iwasaki S, Wada N, Kubota K, Tsuruya K, Shimma Y, Hiroki I, Takuya E, Tokoro C, Iwase S, Miura Y, Moriya S, Watanabe T, Hidaka H, Morimoto M, Numata K, Kusano C, Kagawa T, Maeda S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Safety and efficacy of atezolizumab plus bevacizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma in early clinical practice: A multicenter analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 269-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13732. Epub 2021 Nov 30.	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 Ogushi K, Chuma M, Numata K, Nozaki A, Moriya S, Uojima H, Kondo M, Morimoto M, Maeda S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of psoas muscle index assessed by a simple measurement method on tolerability and duration of continued treatment with sorafenib in hepatocellular carcinoma patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Gastroenterol Hepatol.	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) 10.1097/MEG.0000000000002346.	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 He X, Hikiba Y, Suzuki Y, Nakamori Y, Kanemaru Y, Sugimori M, Sato T, Nozaki A, Chuma M, Maeda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 EGFR inhibition reverses resistance to lenvatinib in hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 8007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-12076-w.	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 Makoto Chuma, Hideki Yokoo, Atsushi Hiraoka, Kazuhiko Ueda, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of CT Values That Could Be Predictive of Necrosis (N-CTav) in Hepatocellular Carcinoma after Lenvatinib Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Oncology	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) 10.3390/curroncol29050266	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 Kobayashi S, Fukushima T, Ueno M, Moriya S, Chuma M, Numata K, Tsuruya K, Hirose S, Kagawa T, Hattori N, Watanabe T, Matsunaga K, Suzuki M, Uojima H, Hidaka H, Kusano C, Suzuki M, Morimoto M.	4. 巻 22
2. 論文標題 A prospective observational cohort study of lenvatinib as initial treatment in patients with BCLC-defined stage B hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09625-x.	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 1.Chuma M, Uojima H, Hiraoka A, et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Analysis of efficacy of lenvatinib treatment in highly advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in the main trunk of the portal vein or tumor with more than 50% liver occupation: A multicenter analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 201-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13592.	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 Maeda S, Hikiba Y, Fujiwara H, Ikenoue T, Sue S, Sugimori M, Matsubayashi M, Kaneko H, Irie K, Sasaki T, Chuma M	4. 巻 12
2. 論文標題 NAFLD exacerbates cholangitis and promotes cholangiocellular carcinoma in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Sci,	6. 最初と最後の頁 1471-1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14828.	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 -

〔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 Chuma M, Uojima H, Hattori N, Arase Y, Fukushima T, Hirose S, Hidaka H, Morimoto M, Numata K, Kagawa T, Maeda S
2. 発表標題 Safety and efficacy of atezolizumab plus bevacizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma in early clinical practice: A multicenter analysis.
3. 学会等名 30th. United European Gastroenterology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chuma M, Yokoo H, Hiraoka A, Ueda K, Tsuji K, Shimada N, Uojima H, Kobayashi S, Hattori N, Okubo T, Atsukawa M, Ishikawa T, Toyoda H, Tada T, Saito Y, Hidaka H, Morimoto M, Numata K, Kagawa T, Sakamoto M, Kumada T
2. 発表標題 Identification of CT Values That Could Be Predictive of Necrosis (N-CTav) in Hepatocellular Carcinoma after Lenvatinib Treatment
3. 学会等名 30th. United European Gastroenterology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chuma M, Toyoda H, Yokoo H, Nozaki A, Ogushi K, Tada T, Ogawa K, Numata K, Kumada T, Taketomi A, Naoya S, Maeda S
2. 発表標題 Circulating microRNA-1246 as a Possible Biomarker for Early Tumor Recurrence of Hepatocellular Carcinoma.
3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Oncology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中馬誠, 加川建弘, 豊田秀徳
2. 発表標題 肝細胞癌の免疫療法+分子標的治療の実臨床における成績と効果関連バイオマーカーの選定
3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間 (JDDW2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中馬誠, 魚嶋晴紀, 福島泰斗
2. 発表標題 切除不能肝細胞癌におけるAtezolizumab+Bevacizumabの安全性、有効性に関する多施設共同研究
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中馬誠, 森本学, 加川建弘
2. 発表標題 進行肝癌におけるアテゾリズマブ/ペバシズマブの治療効果、安全性に関する多施設共同研究
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中馬誠, 魚嶋晴紀, 服部伸洋
2. 発表標題 進行肝癌に対するAtezolizumab+Bevacizumabの初期治療成績
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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	前田 慎 (Maeda Shin) (40415956)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	
研究 分担者	魚嶋 晴紀 (Haruki Uojima) (20752869)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

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