

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791290

研究課題名（和文）肝細胞癌に対する生体肝移植後の再発予防を目的とした革新的遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Gene therapy to prevent HCC recurrence after LDLT for HCC

研究代表者

萱島 寛人（KAYASHIMA HIROTO）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80546557

研究成果の概要（和文）：免疫抑制下でもインターロイキン 12(IL-12)/樹状細胞(DC)併用腫瘍内免疫療法によって、移植皮膚片の拒絶を起こすことなく、腫瘍形成した皮下接種腫瘍の増大抑制及び完全な肺、肝への転移抑制を認め、良好な抗腫瘍効果を示した。これらの抗腫瘍効果には T 細胞と NK 細胞の両方が関与していた。特に、IL-12/DC 併用腫瘍内免疫療法と腫瘍切除を組み合わせた術前補助免疫療法では、腫瘍切除と同時に肝細胞癌細胞を静脈内投与した場合でも、長期にわたる無再発期間と生存期間の著明な延長を認めた。

研究成果の概要（英文）：We found that the IL-12/DC combined immunotherapy exerted effective antitumor effects on the immunosuppressed host, resulting in significant suppression of growth of the subcutaneous established tumor and complete suppression of lung and liver metastasis, without rejection of a fully allogenic skin graft. These antitumor effects were dependent on both T cells and NK cells. Noteworthily, the combined intratumoral immunotherapy and tumor resection, that is to say "neoadjuvant immunotherapy", resulted in curative treatment of immunosuppressed mice for HCC, even when the mice were challenged with intravenous injection of HCC at the time of tumor resection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

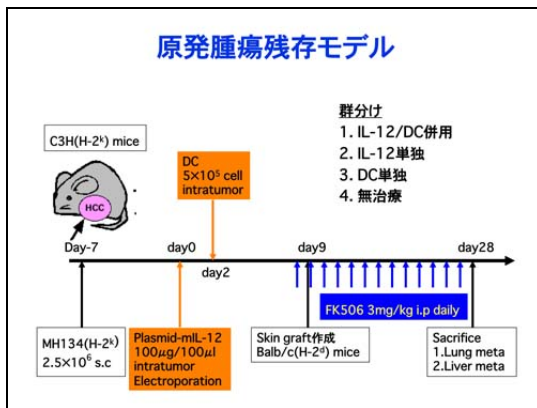
キーワード：肝臓外科学、遺伝子治療、IL-12、樹状細胞、免疫治療、肝細胞癌、肝移植

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)に対する肝移植後の再発部位は、遠隔転移が多いのが特徴である。我々は、これまでの基礎研究で、HCCに対して、インターロイキン12(IL-12)による遺伝子治療が

有効な抗腫瘍効果を呈すること、さらに、IL-12による遺伝子治療は、免疫抑制状態においても、移植グラフトの拒絶を起こすことなく、HCCに対する有効な抗腫瘍効果を呈するこ

とを報告してきた。樹状細胞(DC)は抗原提示細胞の1つで、IL-12を併用することにより、HCCに対して、より強力な抗腫瘍効果を呈する事が報告されている。そこで、我々は、免疫抑制下でのより強力な腫瘍免疫誘導を求めて、IL-12にDCを併用した免疫療法の基礎研究を開始し、「Neoadjuvant immunotherapy」と位置づけた治療法を確立することを目指し、研究を進めてきた。具体的な実験としては、MH134肝癌細胞株を用いたC3H(H-2k)マウス皮下腫瘍モデルにて検討した(下図：実験モデル)。



IL-12遺伝子を組み込んだプラスミドを、エレクトロポレーション法を用いて腫瘍内に100μg遺伝子導入し(Day0)、その2日後活性化させたDCを腫瘍内に5.0×10⁵個導入した(Day2)。DC導入後6日目(Day8)より免疫抑制剤の腹腔内投与(3mg/kg)を連日行って免疫抑制状態とし、Balb/c(H-2d)マウスのスキングラフトを作製して、免疫抑制の指標とした。無治療群、DC単独群(DC群)、IL-12単独群(IL-12群)、IL-12/DC併用群(IL-12/DC群)の4群に分類し、遺伝子治療開始後28日目(Day28)まで各群の観察を行った。原発腫瘍に対する直接的な抗腫瘍効果と、肺及び肝の遠隔転移巣に対する腫瘍抑制効果を検討した。今までの研究の結果を以下にまとめてみた。

①Day28における原発皮下腫瘍容積の比較を行ったところ、IL-12/DC群で有意に腫瘍抑制

効果を認めた。②Day28では、IL-12/DC群では1例も肺・肝転移を認めず、有意に転移抑制効果を認めた。③各群の脾細胞からリンパ球を採取し、⁵¹Cr release assayを用いて、MH134肝癌細胞に対する特異的細胞障害性T細胞の活性を検討したところ、Day8(免疫抑制剤使用前)にて、IL-12/DC群で有意に抗腫瘍効果を認めたと同時に、Day14(免疫抑制剤使用後6日目)においても、IL-12/DC群で有意に腫瘍特異的な免疫応答を認めた。④各群の原発皮下腫瘍におけるIL-12蛋白濃度及びIFN-γ蛋白濃度を測定した。Day8(免疫抑制剤使用前)では、IL-12/DC群とIL-12群で差を認めなかったが、Day14(免疫抑制剤使用後6日目)では、IL-12/DC群で有意にIL-12蛋白濃度及びIFN-γ蛋白濃度が高値であった。つまり、IL-12とDCを併用した「Neoadjuvant immunotherapy」は、免疫抑制下においても、移植グラフトを拒絶する事なく、HCCに対して腫瘍抑制効果を呈し、さらには転移抑制効果を呈していることが判明した。

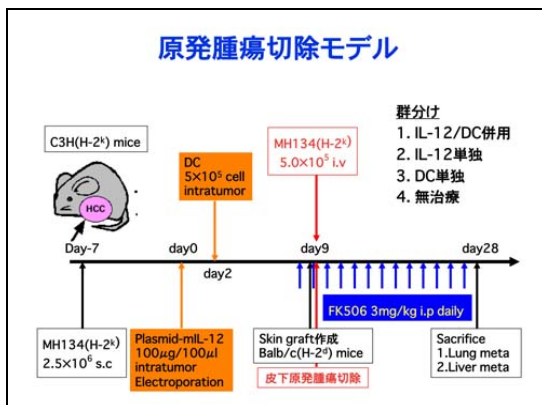
2. 研究の目的

HCC皮下腫瘍を残存したままでDay28における肺及び肝での転移巣を比較していることが問題点として挙げられ、原発皮下腫瘍そのものの増大により、転移巣の評価に有意差が生じている可能性が十分にあり、より厳密な転移抑制効果の評価が求められる。原発皮下腫瘍を切除し、MH134肝癌細胞を静脈内へ注入してその後の肺及び肝の転移巣の評価を行う事により、微少転移に対する転移抑制効果を評価する事が可能となると思われる。HCCに対する生体肝移植後、免疫抑制下状態におけるHCC再発予防のための治療法の確立が目的であり、より臨床に則した実験が望まれる。また、我々が依然報告した結果では、免疫抑制下におけるIL-12遺伝子治療の転移抑制効果の主体は、CD4陽性T細胞でもCD8陽

性T細胞でもなく、NK細胞である事が判明している。しかし、DCは抗原特異的T細胞に代表される細胞性免疫あるいは抗体に代表される体液性免疫を誘導して免疫応答を行うため、CD4陽性もしくはCD8陽性T細胞を介した腫瘍免疫が主体である事より、今回のIL-12とDCを併用した「Neoadjuvant immunotherapy」では、どの細胞がエフェクター細胞として寄与しているのか、非常に興味深い点であり、それを明らかにしたい。

3. 研究の方法

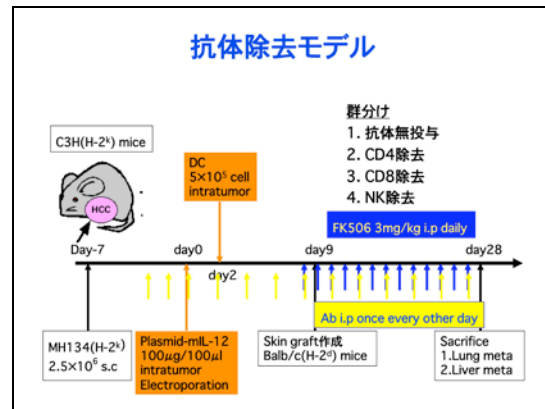
(1) 微少転移に対する転移抑制効果の検討
 具体的な実験は、今までに用いたモデルを用いる。IL-12及びDCによる併用治療、免疫抑制剤の開始は同様で、Day9にて、原発皮下腫瘍を切除し、尾静脈より強制的に同数のMH134肝癌細胞を静脈内投与して、微少転移に対する転移抑制効果を検討する。評価項目としては、Day28における肺及び肝への遠隔転移巣を、パラフィン包埋切片(最大断面)を用いて、転移巣の有無、個数、最大腫瘍径にて4群間(無治療群、DC単独群、IL-12単独群、IL-12/DC併用群)にて評価する(下図：実験モデル)。



(2) 免疫抑制下でのIL-12及びDCを併用した「Neoadjuvant immunotherapy」におけるエフェクター細胞の検討

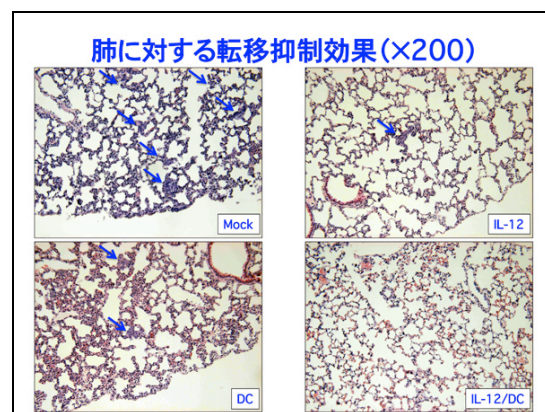
腫瘍残存モデルを用い、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK細胞を各々の抗体を用い

て除去した状態とする。最終評価は、①Day28までの原発皮下腫瘍径の測定(Day2、Day9、Day16、Day21、Day28)とその比較、②Day28における肺及び肝への遠隔転移巣を、パラフィン包埋切片(最大断面)を用いて、転移巣の有無、個数、最大腫瘍径にて4群間(抗体無投与群、CD4陽性T細胞除去群、CD8陽性T細胞除去群、NK細胞除去群)にて評価する(下図：実験モデル)。

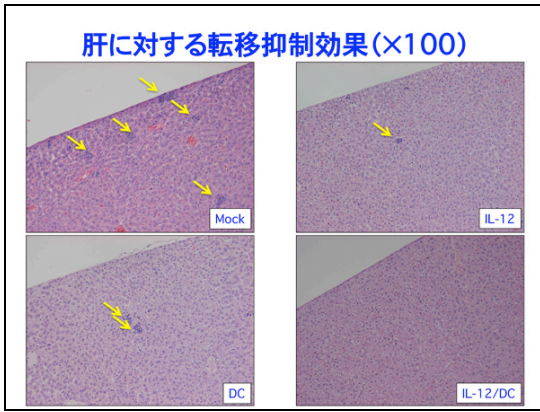


4. 研究成果

(1) 微少転移に対する転移抑制効果の検討
 肺転移はIL-12単独群では3例中3例(100%)に、DC単独群では3例中2例(67%)に、無治療群では3例中3例(100%)に認めた。



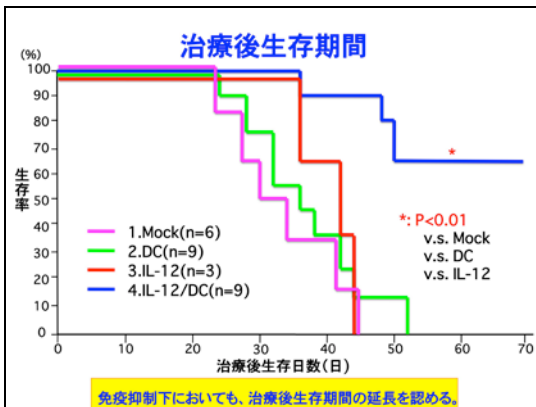
肝転移はIL-12単独群では3例中3例(100%)に、DC単独群では3例中3例(100%)に、コントロール群では3例中3例(100%)に認めた。



IL-12/DC 併用群では免疫抑制下においても、肺及び肝転移は認められなかった。

(2) 治療後生存期間の検討

各群での生存率を調べてみた。無治療群、IL-12 単独群、DC 単独群では全てのマウスが 60 日以内に死亡したのに対し、IL-12/DC 併用群では 9 例中 6 例のマウスが day70 の時点で生存していた。

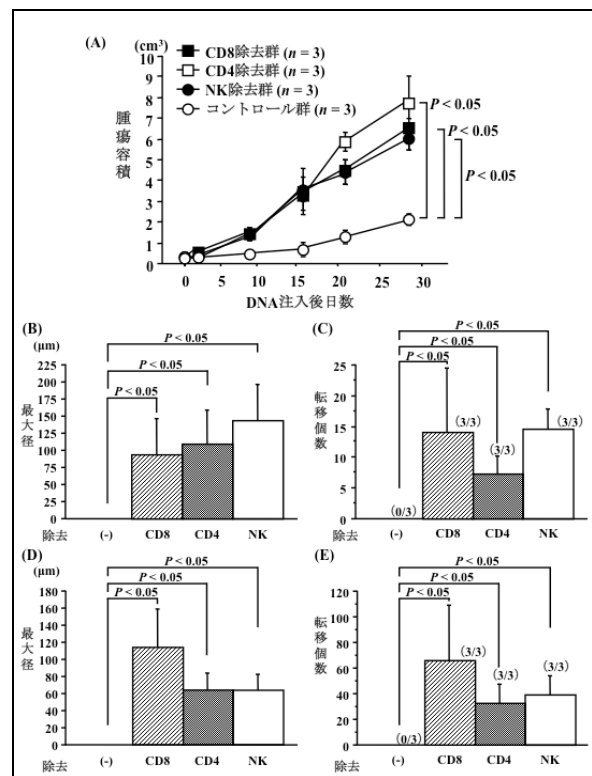


死因は肺、肝、リンパ節への腫瘍の転移によるものであった。IL-12/DC 併用群の長期生存マウスを、実験終了時に組織学的に検討したところ、肺、肝、リンパ節への転移は認められなかった。全例で移植皮膚片の拒絶は認められなかった。

(3) 免疫抑制下での IL-12 及び DC を併用した「Neoadjuvant immunotherapy」におけるエフェクター細胞の検討

IL-12/DC 併用療法施行下では、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞のいずれを

除去しても原発皮下 MH134 腫瘍の増殖の抑制が無効となった。CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞のいずれを除去しても肺及び肝転移に対する抗転移効果が消失した。肺及び肝転移共に、CD8 陽性 T 細胞除去群、CD4 陽性 T 細胞除去群、NK 細胞除去群の全てで 3 例中 3 例(100%)に認められた。CD8 陽性 T 細胞除去群、CD4 陽性 T 細胞除去群、NK 細胞除去群において、肺及び肝転移の最大転移巣径及び転移巣の個数には差を認めなかった。これらの所見から、IL-12/DC 併用療法では、T 細胞の反応が増強され、局所での腫瘍増殖抑制、抗転移効果は T 細胞及び NK 細胞の反応の相互作用に依存していると考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kayashima H, Ikegami T, Kasagi Y, Hidaka G, Yamazaki K, Sadanaga N,

- Itoh H, Emi Y, Matsuura H, Okadome K: Liver Parenchyma Perforation following Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography. Case Reports in Gastroenterology 5(2): 487-491, 2011 Reviewed
- ② Kayashima H, Shirabe K, Taketomi A, Soejima Y, Uchiyama H, Ninomiya M, Kinjo N, Maehara Y: Three-Dimensional Computed Tomography Analysis of Venous Collaterals Between the Middle Hepatic Vein Tributaries and the Right Hepatic Vein in the Donor Remnant Right Lobe: Report of a Case. Surgery Today 41(9): 1266-1269, 2011 Reviewed
- ③ Kayashima H, Toshima T, Okano S, Taketomi A, Harada N, Yamashita Y, Tomita Y, Shirabe K, Maehara Y: Intratumoral Neoadjuvant Immunotherapy Using IL-12 and Dendritic Cells Is an Effective Strategy To Control Recurrence of Murine Hepatocellular Carcinoma in Immunosuppressed Mice. The Journal of Immunology 185(1): 698-708, 2010 Reviewed
- ④ 萱島寛人, 伊地知秀樹、原田昇、二宮瑞樹、池上徹、内山秀昭、吉住朋晴、副島雄二、武富紹信、調憲、前原喜彦: 生体肝移植術後に発症した乳糜腹水の1例、臨床外科、Vol.65(2010)、P.1376~1379、第65巻 第10号 2010年 査読無
- ⑤ Kayashima H, Ikegami T, Ueo H, Tsubokawa N, Matsuura H, Okamoto D, Nakashima A, Okadome K: Inflammatory pseudotumor of the liver in association with spilled gallstones three years after laparoscopic cholecystectomy: Report of a case. Asian Journal of Endoscopic Surgery (in press) Reviewed
- [学会発表] (計9件)
- ① 萱島寛人他、Vp3以上の門脈腫瘍栓を伴う進行肝細胞癌に対する外科切除の成績と長期生存に関わる因子の検討、第98回日本消化器病学会九州支部例会(ワークショップ)、平成23年11月19日(土)、ホテルニュー長崎(長崎)
- ② 萱島寛人他、生体肝移植後の肝癌再発予防を目指したIL12/DC併用 Neoadjuvant immunotherapyの展開、第49回日本癌治療学会学術集会、平成23年10月28日(金)、名古屋国際会議場(愛知)
- ③ 萱島寛人他、生体肝移植症例の全肝病理検索からみたEOB-MRIの肝細胞癌診断能の解析、第43回日本肝癌研究会(ビデオフォーラム)、平成23年7月29日(金)、静岡県コンベンションセンター「グランシップ」(静岡)
- ④ 萱島寛人他、腹腔鏡下胆嚢摘出後3年目に指摘された落下結石を起因とした肝炎症生偽腫瘍の1例、第23回日本肝胆膵外科学会・学術集会、平成23年6月10日(金)、京王プラザホテル(東京)
- ⑤ 萱島寛人他、3DCT解析ソフトを用いた健常人ドナー移植肝における中肝静脈枝解剖の解析・評価、第18回日本消化器関連学会週間 日本消化器外科学会、平成22年10月16日(土)、パシフィコ横浜(神奈川)
- ⑥ 萱島寛人他、生体肝移植後の肝癌再発予防を目指したIL-12/DC併用 Neoadjuvant immunotherapyの展開、第65回日本消化器外科学会定期学術総会、平成22年7月16日(金)、下関市民会館(山口)
- ⑦ 萱島寛人他、バーチャル画像に基づいた生体肝移植右葉グラフト摘出術-とくに肝

静脈解剖から見た合理的の中肝静脈分枝 V5 切離の検討について-、第 22 回日本肝胆膵外科学会・学術集会(シンポジウム)、平成 22 年 5 月 28 日(金)、仙台国際センター(宮城)

⑧ 萱島寛人他、生体肝移植右葉グラフト摘出における 3 次元構築による肝静脈解剖から見た合理的の中肝静脈分枝 V5 切離法の確立、第 110 回日本外科学会定期学術集会、平成 22 年 4 月 9 日(金)、名古屋国際会議場(愛知)

⑨ Kayashima H et al: Intratumoral neoadjuvant immunotherapy” using interleukin-12 and dendritic cells is an effective strategy to prevent recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice, American Society of Clinical Oncology 2010 Gastrointestinal Cancers Symposium: Science and Multidisciplinary Management of GI Malignancies, January 24, 2010, in Orlando, Florida

6. 研究組織

(1)研究代表者

萱島 寛人 (KAYASHIMA HIROTO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80546557