

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16037

研究課題名（和文）シングルセルマルチオミクス解析による肝がん微小環境の解明

研究課題名（英文）Elucidation of liver tumor microenvironment by single-cell multi-omics analysis

研究代表者

村居 和寿（Murai, Kazuhisa）

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：10828099

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫抑制分子PD-1/PD-L1を標的とした免疫チェックポイント阻害剤（ICI）による肝がんの治療成績向上を目指した基礎的検討を行った。本研究により、肝がんの腫瘍免疫を抑制するグルタミン代謝制御因子GeneXを同定した。GeneXの阻害と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法は、肝がんに対する有効な新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ICIによる治療効果を規定する因子としてGeneXを同定した。GeneXによるグルタミン代謝の制御は、肝がんをはじめとする様々ながん種に対する免疫応答において重要な役割を担っている可能性が示唆された。今後、GeneXのさらなる解析から、肝がん患者に対するICI治療抵抗性メカニズムの解明や、新規治療標的の探索、患者層別化マーカーの同定などが可能になると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted a basic investigation aimed at improving treatment outcomes for liver cancer using immune checkpoint inhibitors (ICI) that target the immunosuppressive molecules PD-1/PD-L1. Through this study, we identified GeneX, a glutamine metabolism regulator that suppresses tumor immunity in liver cancer. These results suggest that combination therapy of GeneX inhibition and immune checkpoint inhibitors may be an effective new treatment for liver cancer.

研究分野：腫瘍免疫学、ウイルス学

キーワード：肝がん 免疫チェックポイント阻害剤 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

全世界において年間約 70 万人もの人々が肝細胞がんにより死亡している¹⁾。肝細胞がんに対する治療法は外科的手術・ラジオ波焼灼療法・肝動脈塞栓療法・分子標的薬などにより格段に進歩したが、進行性肝がんの 5 年生存率は依然として低く、新規治療戦略の考案が喫緊の課題である。

免疫抑制分子 PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は、悪性黒色腫をはじめ多種の固形がんに対し有効性を示す^{2,3)}。しかしながら、肝細胞がんに対する ICI の治療効果は十分ではなく、最近進行肝臓がんの一次治療として認可された「アテゾリズマブ (抗 PD-L1 抗体) + ベバシズマブ (抗 VEGF 抗体) 併用療法」においても奏効率は 27% に留まっている。

2. 研究の目的

近年、ICI 治療効果を規定するがん組織型が明らかになりつつあり、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL ; Tumor-infiltrating lymphocytes) が多い炎症性の “Hot” な腫瘍では治療効果が高く、TIL の少ない非炎症性の “Cold” な腫瘍では治療効果が不良であることが報告されている^{4,5)}。しかしながら、なぜリンパ球浸潤度が高い組織型と低い組織型が存在するのか、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。申請者は、リンパ球浸潤度を規定する因子が腫瘍細胞側に存在すると考え、150 症例の肝がん組織を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。この解析から、T 細胞マーカーである “CD3” 発現と逆相関する遺伝子として “GeneX” を同定した (特許の都合上 GeneX と表記する)。臨床サンプルを用いた解析から、GeneX 低発現の肝細胞がん患者群では、全生存率 (OS ; overall survival) および無病生存率 (DFS ; disease-free survival) が有意に高いことが明らかになった。本研究では GeneX が肝がんの腫瘍免疫および ICI 感受性に与える影響を評価し、Cold な肝がんに対する新規治療法の考案を目指す。

3. 研究の方法

当研究室で樹立した C57BL/6 マウス由来の肝がん細胞株「MHCF5 細胞」を用いて GeneX のノックアウト細胞 (KO 細胞) を作成し、異所性・同所性肝がん移植マウスモデルを作成した⁶⁾。生着した腫瘍組織を分離し、RNA-seq 解析、Multiplex IHC 染色、メタボローム解析、Western blot 法で解析した。

4. 研究成果

(1) GeneX が ICI 治療効果に与える影響

GeneX が ICI 治療効果に与える影響を明らかにするため、MHCF5 細胞を用いて GeneX KO 細胞を樹立した。GeneX のタンパク発現を Western Blotting 法で確認した (図 1A)。また、GeneX のノックアウトによる細胞増殖への影響を MTT assay を用いて評価したところ、有意な差は認められなかった (図 1B)。

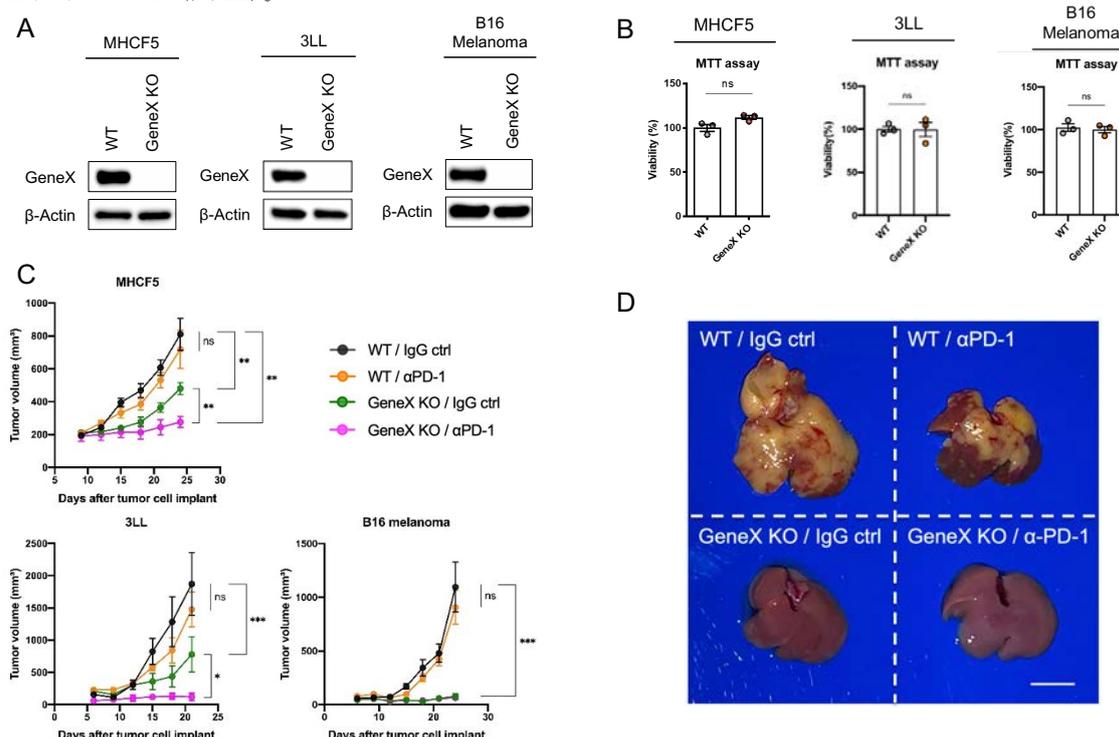


図 1. GeneX が ICI 治療効果に与える影響

次に、MHCF5 細胞のコントロール細胞と GeneX KO 細胞のマウス移植実験をおこなった。皮下移植による異所性腫瘍のモデルにおいて、GeneX KO による顕著な腫瘍体積縮小および ICI 感受性の亢進が認められた (図 1C)。興味深いことに、肺がんおよび悪性黒色腫の細胞株である 3LL 細胞および B16 melanoma 細胞の腫瘍においても同様の現象が認められた (図 1A, B, C)。この結果から、GeneX は肝がんのみならず多種の固形がんにおいて重要な役割を担っている可能性が示唆された。

がん発生が本来見られる臓器への移植 (同所性移植: orthotopic implantation) モデルは、従来の皮下移植腫瘍のような異所性移植モデルと比較して、より生理的な腫瘍微小環境を反映する。MHCF5 細胞のコントロール細胞と GeneX KO 細胞を用いて、splenic injection による同所性腫瘍のモデルによる検討をおこなった。すると、同所性腫瘍においても腫瘍体積縮小・ICI 感受性の亢進が認められた (図 1D)。以上の結果から、がん細胞の GeneX 発現は ICI 治療効果を規定する重要な因子であることが示された。

(2) 腫瘍組織の遺伝子発現解析

GeneX による ICI 感受性制御メカニズムを明らかにするために、MHCF5 の GeneX KO 細胞および GeneX レスキュー細胞の皮下腫瘍を用いて RNA-seq 解析をおこなった。その後、発現変動遺伝子群やクラスター解析により、統計学的な評価に基づいて生物学的なプロセスを捉える Gene ontology (GO) 解析をおこなった。すると興味深いことに、GeneX KO 腫瘍では、T 細胞・B 細胞の活性化、サイトカイン産生の上昇、抗原提示細胞機能の活性化などを伴った、自然免疫系および獲得免疫系の亢進が認められた (図 2)。以上の結果から、GeneX はがん微小環境中の自然免疫系および獲得免疫系を強く制御する因子であることが明らかになった。

(3) GeneX が免疫細胞浸潤に与える影響

GO 解析から、GeneX KO 腫瘍における自然免疫系および獲得免疫系の亢進が認められた。そこで、同所性移植モデルの腫瘍を用いて、mIHC による免疫細胞浸潤度の解析をおこなった。興味深いことに、GeneX KO 腫瘍ではコントロール腫瘍と比べ、腫瘍内に浸潤する CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、樹状細胞、制御性 T 細胞 (Treg) が顕著に増加していることが明らかになった (図 3A)。また、腫瘍部全細胞に占める免疫細胞の比率を解析して数値化したところ、上記のいずれの免疫細胞においても有意な増加であることが示された (図 3B)。逆に、マクロファージにおいては、GeneX KO 腫瘍で有意な減少を認めた。以上の結果から、GeneX は腫瘍内への免疫細胞浸潤を制御する因子である可能性が示唆された。

(4) GeneX によるがん細胞代謝の制御

GeneX は解糖系を制御することが報告されているが、肝がん微小環境下におけるがん細胞代謝への関与は明らかにされていない。腫瘍細胞では正常細胞に比べ、好氣的解糖が促進しており (ワールブルグ効果)、この解糖系の亢進による乳酸の蓄積は T 細胞と NK 細胞の腫瘍内浸潤を抑制することが報告されている⁷⁾。そこで、GeneX による肝がん細胞のグルコース代謝制御が腫瘍免疫および ICI 感受性に影響を及ぼしている可能性を考え、腫瘍組織のメタボローム解析をおこなった。すると思いがけないことに、GeneX KO の腫瘍微小環境中では、既報の解糖系の抑制のみならず、グルタミンをはじめとするアミノ酸濃度が有意に上昇していることが明らかになった (図 4)。以上の結果から、GeneX KO 腫瘍では、がん微小環境中の免疫細胞がグルタミンを利用できるようになるため、腫瘍免疫の活性化が引き起こされている可能性が示唆された。

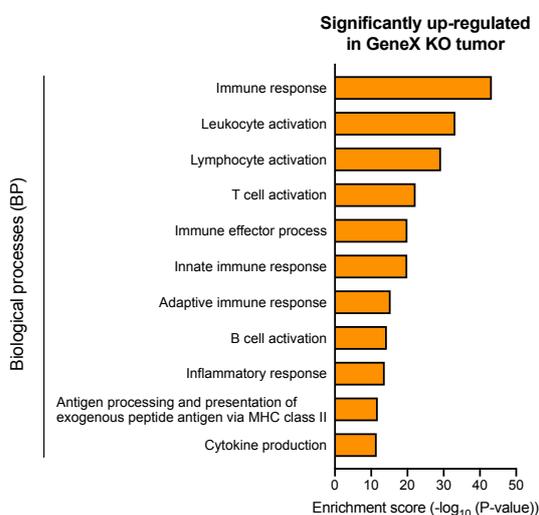


図 2. 腫瘍組織の遺伝子発現解析

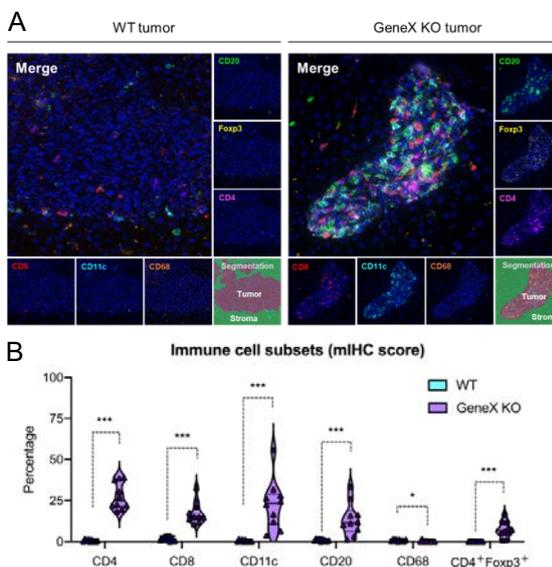


図 3. GeneX が免疫細胞浸潤に与える影響

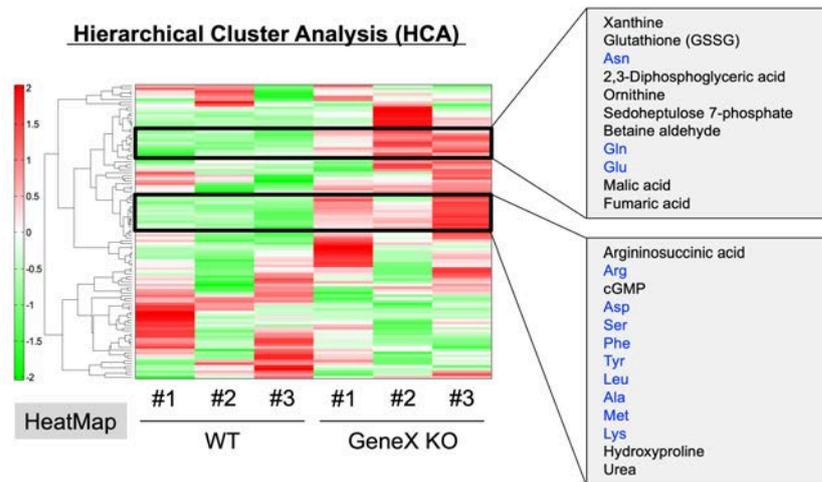


図 4. GeneX によるがん細胞代謝の制御

本研究により、肝がんの腫瘍免疫を抑制するグルタミン代謝制御因子 GeneX を同定した。GeneX の阻害と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法は、肝がんに対する有効な新規治療法となる可能性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Llovet JM et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Jan 21;7 (1) :6.
- 2) CG Drake et al. Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Jan;11 (1) :24-37.
- 3) JM Michot et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade. a comprehensive review. *Eur J Cancer*. 2016 Feb;54:139-148.
- 4) S Spranger et al. Rational combinations of immunotherapeutics that target discrete pathways. *J Immunother Cancer*. 2013 Sep 23;1:16.
- 5) Herbst RS et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):563-7.
- 6) Shirasaki T and Murai K et al. Establishment of liver tumor cell lines from atherogenic and high fat diet fed hepatitis C virus transgenic mice. *Sci Rep*. 2021 Jun 22;11 (1) :13021.
- 7) A Brand et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells *Cell Metab*. 2016 Nov 8;24(5):657-671.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村居和寿、山下太郎、本多政夫
2. 発表標題 肝がん細胞代謝制御因子による腫瘍免疫抑制機序の解析
3. 学会等名 JDDW 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高良紅羽、村居和寿、田村優奈、本多政夫
2. 発表標題 Functional analysis of host factors that regulate liver cancer cell metabolism
3. 学会等名 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北村萌、田村優奈、高良紅羽、村居和寿、本多政夫
2. 発表標題 肝がん細胞代謝を制御する宿主因子の同定とその機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川人清玄、吉村佳子、村居和寿、本多政夫
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤感受性を制御する転写経路の機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村優奈、村居和寿、本多政夫
2. 発表標題 Elucidation of the immunosuppressive mechanism in liver cancer
3. 学会等名 日本癌学会学術總會
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

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