

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590963

研究課題名(和文) 肝移植後の肝癌再発機序におけるNK細胞機能の重要性と免疫監視破綻機序の解明

研究課題名(英文) Importance of NK cell function in the mechanisms responsible for tumor evasion of immune surveillance against hepatocellular carcinoma after liver transplantation

研究代表者

山際 訓 (YAMAGIWA, Satoshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10419327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血と肝組織中ナチュラルキラー(NK)細胞機能の解析などにより、肝移植後の肝細胞癌再発と関連する特異的な免疫関連マーカーなどの同定は出来なかったものの、臓器移植後の抗体関連型拒絶反応にも関与する抗NK細胞活性化レセプターリガンド抗体や、免疫チェックポイント分子に対する可溶性リガンドが肝細胞癌症例で検出されることなど、肝癌に対する免疫監視破綻機序の解明や新規免疫療法開発に繋がる可能性がある重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We analysed mainly the function of natural killer (NK) cells in the liver and blood of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) before and after liver transplantation (LT), but any specific immune markers associated with the recurrence of HCC after LT could not be defined. However, we revealed that anti-NK cell activation ligand antibody and soluble immune checkpoint molecule were detected in the blood of patients with HCC. Our results may help unveiling the mechanisms responsible for tumor evasion of immune surveillance against HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：NK細胞 肝癌 肝移植 免疫監視

1. 研究開始当初の背景

1996年にMazzaferroらが提唱した「ミラノ基準」は肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) に対する肝移植の適応決定に広く応用されてきたが、再発の可能性のほとんど無い患者群を選別するには優れているものの、一方で肝移植により治癒させ得る患者群の切り捨てという大きな問題点が指摘されていた。ミラノ基準外の進行HCC症例であっても肝移植後の予後が良好な症例が少なからず存在し、適応拡大の余地があることは各国からの発表で明らかとなっており、移植後のHCC再発リスクを高い精度で診断しうる生物学的評価法の確立と再発抑止を目指した新規治療法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

移植後再発の抑制には肝癌細胞に対する免疫監視機構の理解が重要であり、特に免疫抑制剤によるT細胞応答抑制下ではnatural killer (NK)細胞機能の重要性が高いと考えられる。本研究は最近のNK cell biologyの進歩を背景に、移植前後の特に免疫抑制下におけるNK細胞を中心とした免疫監視機構の詳細な評価と、肝癌細胞自体の免疫学的特性の検討により、再発リスクを高い精度で予測しうる生物学的評価法を確立し、肝細胞癌に対する肝移植の適応拡大の可能性を検討することを目的とし、最終的には再発抑止を目的とした新規免疫療法の開発につながる知見を目指した。

3. 研究の方法

(1) 研究対象の選定、同意を得た上での切除肝組織・肝生検組織と末梢血の採取、臨床データまとめ

消化器外科医の協力により、当機関で生体肝移植を施行されたHCC症例、通常のHCC症例とHCC非合併のウイルス性慢性肝炎症例を対象とし、文書による同意を得た上で肝切除・肝生検組織と末梢血の採取を実施した(新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会承認番号:724)。

(2) 肝組織と末梢血より分離したNK細胞におけるNK細胞レセプターや細胞傷害性リガンド、サイトカイン・ケモカインレセプター、活性化マーカー発現の蛋白レベルとmRNAレベルでの定量

研究対象として選定された症例より適切に採取された肝組織および末梢血を用いて、フローサイトメトリー (FACS) と免疫組織染色により、NK細胞活性化に關与し腫瘍に対する免疫監視との關連が報告されているNKG2D、NKp44を中心としたnatural cytotoxicity receptors (NCRs)など、NK細胞機能抑制に關与するNKG2A、Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)、CD161など、活性化マーカーやTRAIL、

Granzymeなど細胞傷害活性に關与する分子、IL-12、IL-15、IL-18などのサイトカインに対するレセプターやCXCR3などのケモカインレセプターの発現を解析した。また、末梢血から分離したリンパ球と肝組織から抽出したRNAを用い、real-time PCR法によりmRNA発現も定量した。

(3) 切除肝組織・肝生検組織におけるNKG2Dリガンド発現と血清中の可溶性NKG2Dリガンドと可溶性PD-L1の測定

肝組織を用いて免疫組織染色とreal-time PCR法により、肝癌細胞などにおけるNKG2Dリガンド発現を評価するとともにHCC再発との關連について検討した。また、可溶性NKG2Dリガンドに加えて、可溶性PD-L1についても血清を用いてELISAにより測定し、HCC再発との關連を検討した。

(4) 肝癌細胞株に対する細胞傷害活性やサイトカイン・抗体刺激によるサイトカイン産生など*in vitro*でのNK細胞機能解析

HuH7、Hep3B、KYN-2などの肝癌細胞株と不死化肝細胞(HPT1、千葉大学・消化器内科 神田達郎先生よりご供与)を用い、インターフェロン- (IFN-) などによる各種NKG2DリガンドやPD-L1発現の変化をFACSにより解析するとともに、末梢血より分離したNK細胞による細胞傷害活性の変化をLDH Cytotoxicity Detection Kitにより検討した。

4. 研究成果

(1) 症例の選定、肝組織と末梢血の採取、臨床データのまとめ

肝移植症例については免疫抑制剤使用状況を含む治療経過とHCC再発の有無、血液生化学検査などの臨床データをまとめるとともに、適切に採取された肝組織と末梢血を用いて以下の解析に利用した。

(2) 肝組織と末梢血より分離したNK細胞におけるNK細胞レセプターや細胞傷害性リガンド、サイトカイン・ケモカインレセプター、活性化マーカー発現の蛋白レベルとmRNAレベルでの定量

以前の結果と同様に、肝移植後のC型慢性肝炎症例ではNK細胞亜分画の変化、特にCD56^{bright}分画が通常のC型慢性肝炎症例と比較して有意に減少し、CD56^{bright}分画における抑制性レセプターであるNKG2Aの発現が有意に高いことを確認し報告した(論文)。肝移植後のHCC症例については背景肝を反映し、C型肝炎再発症例では同様の傾向が認められたものの有意な変化とは言えず、各種レセプター発現についても有意な発現変化を認めるものは検討範囲内で確認出来なかった。

その為、NK細胞と同じ自然免疫担当細胞として肝臓に多く局在しているmucosal-associated T細胞(MAIT細胞)にも着目し、頻度や分布などの検討を追加した。HCC症例

における変化は現時点で確認されていないものの、HCC の背景となるウイルス性慢性肝炎症例（男性 8 例、女性 4 例、平均年齢 63.8 歳）においては肝内 MAIT 細胞の比率は対照とした転移性肝癌症例（男性 5 例、女性 5 例、平均年齢 61.6 歳）の非癌部肝組織と比較して増加傾向を認め（図 1）活性化レセプター発現も増加している一方で、MAIT 細胞の活性化に重要なインターロイキン 7（IL-7）受容体の発現が低下していることを見出した（学会発表、英文論文準備中）。

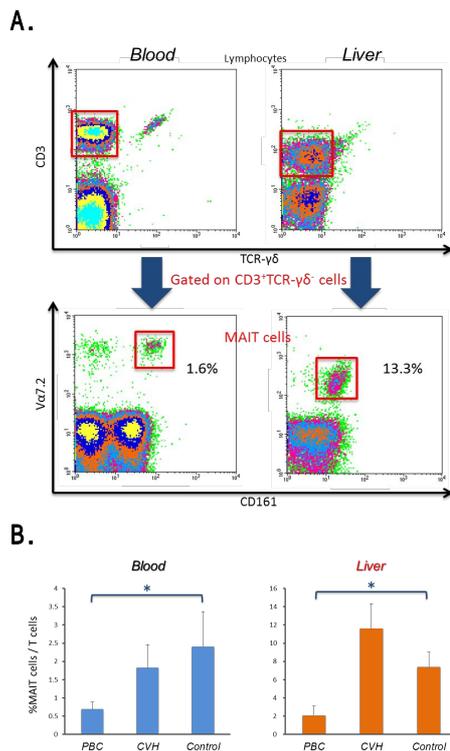


図 1. 末梢血中と肝組織中 MAIT 細胞 (A) MAIT 細胞の同定、(B) ウイルス性慢性肝炎 (CVH) では対照群 (Control) と比較して肝内 MAIT 細胞の増加を認めた。

(3) 切除肝組織・肝生検組織における NKG2D リガンド発現と血清中の可溶性 NKG2D リガンドの測定

NK 細胞機能に關与する可溶性 NK 細胞レセプターリガンド (可溶性 MHC class I chain-related gene A, sMICA) を手術前後の血清を用いて ELISA により検討したところ、HCC 非合併症例と比較して HCC 症例で sMICA は高値を示した。更に、Luminex 法により測定した MICA に対する抗体 (抗 MICA 抗体) も HCC 症例 32 例中 8 例で陽性であった。しかしながら、sMICA 値や抗 MICA 抗体の有無と肝細胞癌の悪性度や再発との有意な相関は明らかではなかった。免疫組織染色による検討では MICA は肝癌細胞では特に高分化 HCC に強く発現しているが、腫瘍細胞のみでなく腫瘍血管内皮細胞にも発現が認められることを見出した (図 2)。

programmed cell death-1 (PD-1) は活性化 T 細胞、B 細胞および単球に広く発現する

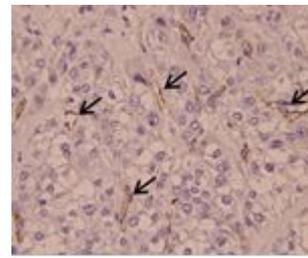


図 2. 肝癌腫瘍血管内皮細胞における MICA 発現亢進

免疫チェックポイント分子であるが、そのリガンドである PD-L1 は抗原提示細胞、腫瘍細胞や炎症のある微小環境中の非血液細胞などに発現している。一方、血清中の可溶性 PD-L1 の存在も確認されており、本研究においても健常人 10 例とウイルス性慢性肝炎 (B 型 22 例、C 型 80 例) で測定したところ、C 型慢性肝炎 (CHC) 症例では健常人 (HC) や B 型慢性肝炎症例 (CHB) と比較して有意に高値であった (図 3)。HCC 症例についても高値を示す症例を認めたものの、現時点で測定症例数が少数に留まっており、今後も追加検討を予定している (学会発表、英文論文準備中)。

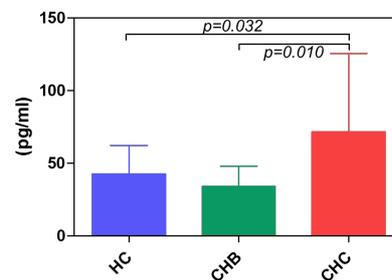


図 3. 血清中可溶性 PD-L1

(4) 肝癌細胞株に対する細胞傷害活性やサイトカイン・抗体刺激によるサイトカイン産生など in vitro での NK 細胞機能解析

前述の通り血清中 sPD-L1 が C 型慢性肝炎や HCC 症例で高値であったが、各種肝癌細胞株において PD-L1 は高発現しており、不死化肝細胞においては無刺激の状態では PD-L1 発現は認めないものの、IFN- γ 刺激により PD-L1 発現が誘導されることを確認した (学会発表、英文論文準備中)。

(5) 考察と今後の展望

本研究では肝移植前後の特に免疫抑制下における NK 細胞を中心とした免疫監視機構の詳細な評価と、肝癌細胞自体の免疫学的特性の検討により、再発リスクを高い精度で予測しうる生物学的評価法を確立することを目的としたが、研究期間内での HCC 再発症例が想定よりも少なく、肝移植後の HCC 再発と関連する特異的な免疫関連マーカーなどの同定は出来なかった。しかしながら、臓器移植後の抗体関連型拒絶反応に關与する重要な因子であることが明らかにされている抗

MICA 抗体が HCC 症例でも検出されること、また標的となる MICA 分子は肝癌細胞だけでなく肝癌腫瘍血管にも発現していることなど、これまでに未解明の重要な知見が得られた。抗 MICA 抗体の出現や液性免疫の作用が、自然免疫担当細胞が豊富な肝臓内の免疫応答、特に NK 細胞機能にどのように影響するのかが十分に解明されておらず、肝癌細胞のみでなく腫瘍血管に対する作用も明らかにすることは、腫瘍血管を標的とした新規治療法開発に繋がる可能性があると考えられる。

一方、新規がん免疫療法として免疫チェックポイント分子である PD-1 やそのリガンドである PD-L1 に対する抗体療法が近年、注目されている。HCC 症例においても、肝癌細胞における PD-L1 発現の程度が予後と関連することが報告されており (Umehoto Y, *et al.* *J. Gastroenterol.* 2015; 50(1): 65-75) C 型慢性肝炎においては CD8 陽性 T 細胞の疲弊 (exhaustion) との関連が報告されている。本研究では肝疾患における報告の無い血清中の可溶性 PD-L1 に着目して検討をおこない、C 型慢性肝炎症例における上昇を初めて明らかにした。今後、HCC 症例における検討を追加し、HCC の悪性度や予後との相関などを明らかにし、予後予測の新たなバイオマーカーとしての有用性を検討したい。

NK (conventional NK; cNK) 細胞とは異なる自然免疫担当細胞として、本研究では MAIT 細胞の検討を追加し、C 型慢性肝炎における肝内 MAIT 細胞の増加などを明らかにしたが、一方で自然免疫担当細胞として自然リンパ球 (innate lymphoid cells; ILCs) が近年注目・定義され、cNK 細胞と同じ common ILC progenitor (CILP) から分化する ILCs として ILC1 から ILC3 に分類されている。cNK 細胞は細胞傷害活性が機能の中心であるのに対し、ILCs はサイトカイン分泌を介した helper 機能を有し、臓器の恒常性維持や炎症への関与が報告されているが、ヒト肝内における ILCs の機能解析は十分ではなく、慢性肝炎・HCC における肝内自然免疫応答の理解には ILCs の解析が必須と考えられる。今後は cNK 細胞に加えて肝内自然リンパ球の詳細な解析による HCC 発癌・再発に関与する免疫監視不全の解明と、その回復による治療法開発とともに、HCC 再発リスクを高い精度で予測しうる生物学的評価法の確立を目指した研究を予定したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Yamagiwa S, Sato Y, Suda T, Nomoto M, Wakai T, Narita I, Aoyagi Y. A single-institution experience with artificial liver support for acute liver failure and late-onset hepatic failure. *Hepatogastroenterology*. (査読有) 2015 (掲載確定)

Kamimura H, Yamagiwa S, Takamura M, Iwasaki T, Hayashi K, Hirose S, Ogata N, Aoyagi Y. Efficacy of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy for malignant ascites. *Hepatogastroenterology*. (査読有) 2015 (掲載確定)

Takamura M, Kanefuji T, Suda T, Yokoo T, Kamimura H, Tsuchiya A, Kamimura K, Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Value of shear wave velocity measurements for the risk assessment of hepatocellular carcinoma development in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Int.* (査読有) 2015 (掲載確定)

Tamura Y, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto M, Waguri N, Igarashi K, Ishikawa T, Kubota T, Kamimura T, Sugitani S, Wakabayashi H, Yamazaki K, Takimoto M, Yanagi M, Tsubata S, Aoyagi Y; Niigata Liver Disease Study Group. Comparison of liver fibrosis biomarkers and proposal of a simple scoring system for prediction of severe fibrosis in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*. (査読有) 2015 (掲載確定)

Yamagiwa S, Tamura Y, Takamura M, Genda T, Ichida T, Ishikawa T, Kamimura T, Takahashi T, Suda T, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Increase of fucosylated alpha-fetoprotein fraction at the onset of autoimmune hepatitis and acute liver failure. *Hepatol. Res.* (査読有) 44(14): E368-75, 2014
DOI: 10.1111/hepr.12318

Yamagiwa S, Kamimura H, Takamura M, Genda T, Ichida T, Nomoto M, Aoyagi Y. Presence of Antibodies against Self Human Leukocyte Antigen Class II Molecules in Autoimmune Hepatitis. *Int. J. Med. Sci.* (査読有) 11(9): 850-6, 2014
DOI: 10.7150/ijms.8633

Yamagiwa S, Sato Y, Ichida T, Setsu T, Tominaga K, Kamimura H, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Aoyagi Y. Imbalance between CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets in the liver of patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Biomed. Res.* (査読有) 35(3): 177-84, 2014
<http://doi.org/10.2220/biomedres.35.177>

Aso-Ishimoto Y, Yamagiwa S, Ichida T, Miyakawa R, Tomiyama C, Sato Y,

Watanabe H, Aoyagi Y. Increased activated natural killer T cells in the liver of patients with advanced stage primary biliary cirrhosis. *Biomed. Res.* (査読有) 35(2): 161-9, 2014

<http://doi.org/10.2220/biomedres.35.161>

Yamagiwa S, Kamimura H, Takamura M, Aoyagi Y. Autoantibodies in primary biliary cirrhosis: Recent progress in research on the pathogenetic and clinical significance. *World J. Gastroenterol.* (査読有) 20(10): 2606-12, 2014

DOI: 10.3748/wjg.v20.i10.2606

Takamura M, Yamagiwa S, Ichida T, Aoyagi Y. Involvement of liver-intestine cadherin (LI-cadherin) in cancer progression. *Med. Mol. Morphol.* (査読有) 2013; 46(1): 1-7

DOI: 10.1007/s00795-012-0003-y

[学会発表](計9件)

山際 訓、他. DAA を含む 3 剤併用療法を施行された C 型慢性肝炎症例における血清 PD-L1 値の検討. 第 53 回日本肝臓学会総会. 2015 年 5 月 21 日. 熊本ホテルキャッスル(熊本市)

上村博輝、山際 訓、野本 実. 自己免疫性肝炎に合併した胸腺腫 - 画像上の注意点と免疫担当細胞の解析による液性免疫への関与について. 2014 年 11 月 27 日. 京王プラザホテル(東京都新宿区)

Yamagiwa S, et al. Efficacy and safety of telaprevir-based triple therapy for patients aged 66 years and older with genotype 1b chronic hepatitis C. The 65th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014 年 11 月 9 日 John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, 米国)

Tominaga K, Setsu T, Yamagiwa S, et al. Distinctive phenotypic features of human mucosal-associated invariant T cells in the liver. The 65th annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014 年 11 月 7 日 John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, 米国)

山際 訓、他. 多施設における C 型慢性肝炎に対する TVR 3 剤併用療法の治療成績と治療効果予測. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014 年 5 月 30 日. ホテルニューオータニ(東京都千代田区)

上村博輝、山際 訓、他. 自己免疫性肝炎の肝細胞傷害における MHC class II

分子の関与. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013 年 10 月 9 日. グランドプリンスホテル国際館パミール(東京都港区)

山際 訓、他. 新たな診断基準に基づく急性肝不全例の検討. 第 39 回日本肝臓学会東部会. 2012 年 12 月 6 日. グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都港区)

山際 訓、他. TVR を含む 3 剤併用療法困難例における PEG-IFN -2a/RBV 併用療法の有効性・安全性に関する臨床的検討(新潟県多施設共同研究). 2012 年 12 月 6 日. グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都港区)

Yamagiwa S, et al. Presence of antibodies against self-HLA class II molecules in autoimmune hepatitis. The 63rd annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012 年 11 月 13 日 John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, 米国)

[その他]

新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野ホームページ:

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/in3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山際 訓 (YAMAGIWA, Satoshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 1 0 4 1 9 3 2 7

(2) 研究分担者

高村 昌昭 (TAKAMURA, Masaaki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号: 2 0 4 2 2 6 0 2

松田 康伸 (MATSUDA, Yasunobu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 4 0 3 3 4 6 6 9

(3) 連携研究者

なし