

令和元年6月1日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07089

研究課題名(和文)肝細胞癌における免疫微小環境の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma (HCC)

研究代表者

紅林 泰 (Kurebayashi, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40805123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の免疫微小環境を検討するため、肝細胞癌切除検体の標本上において様々な種類の免疫細胞を染め分け(多重免疫染色)、顕微鏡を用いて各免疫細胞の数と分布を詳細に検討した。統計学的に解析した結果、肝細胞癌における免疫微小環境は3つのパターンに分類されることがわかった。このうちImmune-highパターンとした一群はT細胞とB細胞・形質細胞の共浸潤に特徴付けられ、このような免疫微小環境を呈する肝細胞癌は術後の再発率が有意に低かった。また、肝細胞癌が多段階発癌の良いモデルであることを用いて、肝細胞癌の多段階発癌の過程で免疫微小環境も段階的に変化することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌に含まれる多様な免疫細胞がどのような組み合わせで浸潤して免疫微小環境を形成しているのかに関しては不明な点が多かった。本研究の学術的意義は、肝細胞癌における免疫微小環境の全体像を組織病理学的に最も直接的な形で示すことで、その疑問に答えた点にある。社会的意義としては、免疫微小環境の分類が、従来の病理学的・分子生物学的分類に加えて肝細胞癌の予後予測因子として重要であり、臨床病理学的にも応用が可能であることを示した点が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：To analyze the patterns of anti-tumor immunity against hepatocellular carcinoma (HCC), we performed multi-color immunohistochemistry to histopathologically evaluate various immune cells and analyzed the number and distribution of each type of immune cells using microscopy. Consequently, we revealed that the patterns of anti-tumor immunity against HCC can be classified into 3 patterns, among which "Immune-high pattern" was characterized by the co-infiltration of T cells and B/plasma cells and significantly associated with better prognosis after surgical resection of HCC. We also revealed how the pattern of anti-tumor immunity changes during the course of multi-step carcinogenesis of HCC.

研究分野：人体病理学

キーワード：肝細胞癌 肝 免疫 微小環境

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍の発生や進行が免疫反応により抑えられていることが多くの研究で明らかとなり、新規薬剤である抗 PD-1/PD-L1 抗体を始めとして臨床応用が進んでいる。このような抗腫瘍免疫の主体は腫瘍を直接認識して攻撃する T 細胞であるが、腫瘍組織に浸潤する T 細胞の細胞障害活性は、腫瘍組織に共に浸潤してくる他の免疫細胞や攻撃標的である腫瘍細胞が産生するサイトカインなどの因子により変化することが知られている。このように、様々な免疫細胞が免疫細胞同士さらには腫瘍細胞と相互作用している局所的な環境は「免疫微小環境」と呼ばれている。しかし、多様な免疫細胞がどのような組み合わせで腫瘍に浸潤して免疫微小環境を形成しているのかに関しては、解析手法が複雑となることもあり不明な点が多かった。

研究代表者は本研究申請前の 2016 年に、腫瘍組織の連続切片上で多重免疫染色を行い、光学顕微鏡下で直接かつ網羅的に免疫微小環境を解析するとともに、その結果を病理医が通常観察する HE 標本の組織病理学的所見と対比することが可能であることを報告した。また、この手法を用いて、ヒトの肺腺癌の免疫微小環境が 4 種類に分類できること、ならびに腫瘍の組織型や予後と相関することを報告した (Kurebayashi et al., *Cancer Immunology Research* (2016) 4: 234-247)。

本研究ではこれらの研究手法をさらに拡張するとともに、研究代表者の所属がこれまで肝細胞癌の多段階発癌過程の研究をリードしてきた経緯を活かし、肝細胞癌における免疫微小環境の網羅的解析と、肝細胞癌が多段階的に悪性度を増す過程での免疫微小環境の変化、ならびに免疫微小環境が変化するメカニズムに関して検討することを目的とした。

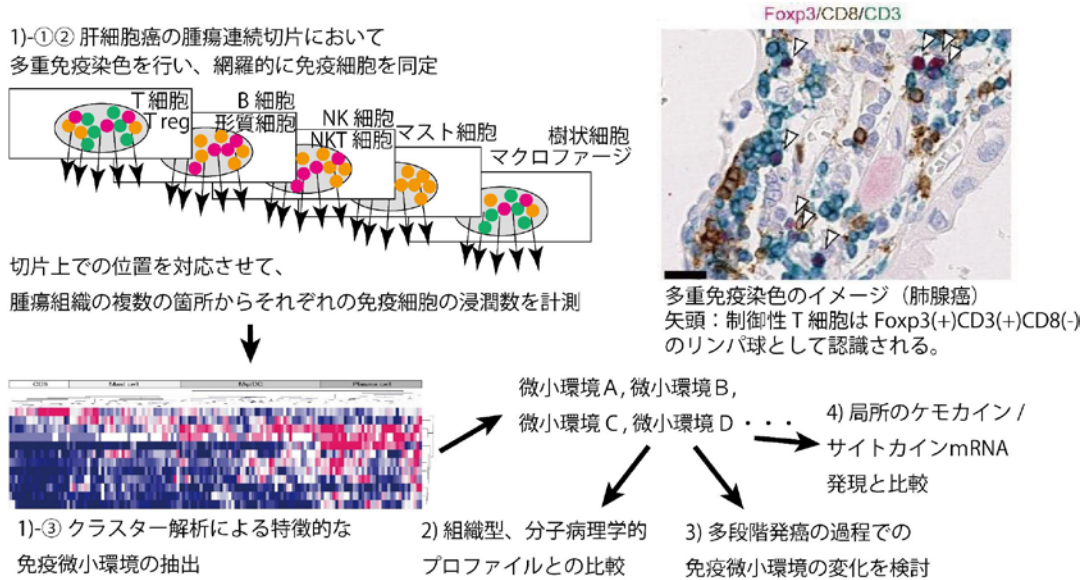
### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、次の四点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 肝細胞癌に浸潤する免疫細胞を多重免疫染色により網羅的かつ組織病理学的に解析し、多変量解析を組み合わせることで特徴的な免疫微小環境を抽出する。
- (2) (1)により抽出された免疫微小環境のパターンと、対応する部位における肝細胞癌の組織型ならびに分子病理学的プロファイルとの関係を明らかにする。
- (3) 腫瘍の悪性度が段階的に増す過程（多段階発癌）における免疫微小環境の変化、ならびに腫瘍内における免疫微小環境の分布の不均一性の程度を明らかにする。
- (4) 特徴的な免疫微小環境を形成するメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 120 例前後の肝細胞癌コホートを用いて、①ホルマリン固定パラフィン包埋切片上において多重免疫染色を行い、②光学顕微鏡を用いて腫瘍に浸潤する多様な免疫細胞を網羅的に同定し、計測した。③得られた結果からクラスター分析をはじめとする多変量解析を用いて特徴的な免疫微小環境の抽出を行った。
- (2) (1)で抽出された免疫微小環境のパターンと、対応する部位の肝細胞癌の組織型ならびに肝細胞癌の分子生物学的プロファイルとの比較・検討を行い、互いの関係を検討した。
- (3) 組織病理学的に肝細胞癌が段階的に組織学的悪性度を増している領域に着目して、腫瘍が悪性度を増す前後（例：高分化型肝細胞癌から中分化型肝細胞癌、中分化型肝細胞癌から低分化型肝細胞癌）でどのように免疫微小環境が変化するかを検討した。また、個々の腫瘍から複数の部位を選択して免疫微小環境を検討し、免疫微小環境の分布の不均一性の程度を検討した。
- (4) それぞれの免疫微小環境から採取された cDNA 検体を用いて遺伝子発現解析を行い、特徴的な免疫微小環境の形成に関連するサイトカインやケモカインの発現パターンを検討した。



(図) 研究方法の概要

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝細胞癌における免疫微小環境は組織病理学的に3種類の Immunosubtype に分類される

肝細胞癌 158 例において多重免疫染色を行い検討した結果、肝細胞癌の免疫微小環境は浸潤する免疫細胞の組み合わせと多寡により、Immune-high, Immune-mid, Immune-low の3つの Immunosubtype に分類されることがわかった。

術後の再発データと比較すると、Immune-high subtype は術後の無再発生存期間が有意に長く、ほかの臨床病理学的因子と比較しても独立した予後良好因子であることが判明した。さらに重要なことに、組織病理学的所見と比較すると、Immune-high subtype は一般に予後不良と言われる低分化型肝細胞癌に有意に多く認められ、Immune-high subtype に属する低分化型肝細胞癌や CK19 陽性高悪性度肝細胞癌は予後が良いことが判明した。

予後不良とされる低分化型肝細胞癌、特に CK19 陽性肝細胞癌の中に予後の良い症例が混在しており、組織病理学的に免疫微小環境を評価することでこれらの予後の良い症例を拾い上げることができた点は、臨床病理学的にも意義の高い成果と考えられる。

##### (2) 肝細胞癌の分子生物学的分類と Immunosubtype との関係

これまでに、遺伝子発現解析による肝細胞癌の分子生物学的分類として Hoshida 分類ならびに Boyault 分類が広く知られているものの、これらの分子生物学的分類の各サブクラスにおいてどのような組織病理学的所見が認められるのか、さらにどのような免疫微小環境が認められるのかは不明であった。

本研究では、Immune-high subtype が Hoshida の S1 ならびに Boyault の G2 サブクラスと有意に相関していることを示した。これらの分子生物学的分類は多くの場合有意な予後予測因子ではないとされているものの、分子標的療法のターゲットを整理する上では有用である。従って、分子生物学的分類と免疫微小環境の分類を組み合わせることで臨床病理学的に重要な肝細胞癌のサブクラスが定義できる可能性があり、今後の研究を要する。

##### (3) 肝細胞癌の多段階発癌の過程において免疫微小環境が変化する

肝細胞癌は、組織病理学的に多段階発癌の概念が確立しており、癌の進展に伴いどのように免疫微小環境が変化するかを検討するうえで非常に良いモデルである。

同一症例内において肝細胞癌の分化度が変化する前後を比較検討した結果、免疫微小環境が多段階発癌の過程にあわせて段階的に変化するようになった。高分化型肝細胞癌から中分化型肝細胞癌に進展する場合と、中分化型肝細胞癌から低分化型肝細胞癌に進展する場合とでは浸潤数の変化する免疫細胞の種類が異なり、それぞれの過程で生じる腫瘍側の分子生物学

的な変化が腫瘍内における免疫微小環境の形成に強く影響していると推察された。

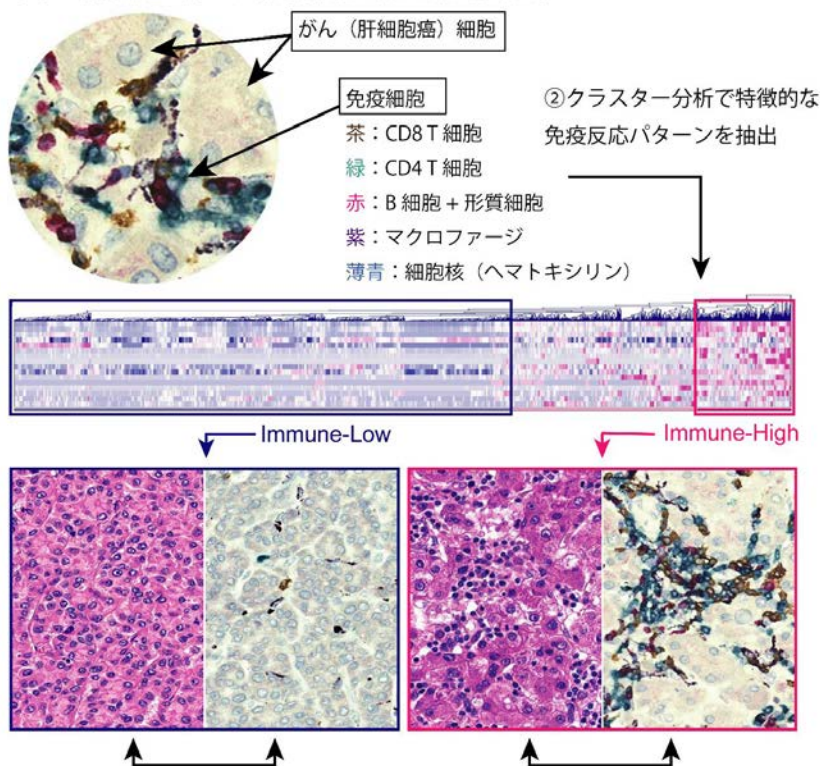
近年、腫瘍免疫学の分野ではフローサイトメトリー、マスサイトメトリー、さらに遺伝子発現解析を用いた検討による報告が数多くなされているが、これらの手法では組織病理学的に定義される多段階発癌の過程に対応させた検討が難しいという問題点がある。特に、多段階発癌をはじめとする癌の進展に伴う免疫反応の変化や、フローサイトメトリー、マスサイトメトリー、あるいは遺伝子発現解析のための検体が得られにくい前癌病変から早期癌の免疫微小環境に関する研究では、組織病理学的な検討が今後さらに重要性を増すと考えられる。

#### (4) Immune-high subtype の肝細胞癌において発現が認められる分子の検討

採取した cDNA サンプルにおいて RT-PCR を行い検討すると、Immune-high subtype の肝細胞癌では、Ifng や Cxcl9/10 をはじめとする Th1/CTL 関連遺伝子の強い発現が認められた。また、Immune-high subtype の肝細胞癌は、腫瘍ならびに腫瘍内のマクロファージにおける PD-L1 の発現、また CD8 T 細胞における PD1 の発現が有意に上昇しており、免疫チェックポイント療法の良いターゲットとなる可能性が示唆された。

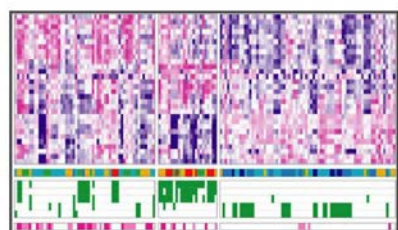
また、Immune-high subtype の肝細胞癌において特徴的な濾胞外 B 細胞ならびに形質細胞浸潤を生じるメカニズムを検討するために、B 細胞ならびに形質細胞の遊走に関連する因子の発現について検討した。結果として CXCR5 ならびにそのリガンドである CXCL13 の発現が Immune-high subtype の肝細胞癌にほぼ限定して認められた。CXCL13 を産生する細胞を特定するため in situ hybridization 法を用いた検討を行ったが、有意な陽性像が認められなかった。本研究で用いた検体がやや過固定であることと、保管期間が数年以上経過していることが原因と考えられた。現在、CXCL13 に対する抗体を用いて免疫組織化学による検討が可能か研究を継続している。

#### ① 多重免疫染色を行い、各免疫細胞の数を顕微鏡で計測



#### ③ 得られた免疫反応のパターンと組織学的所見を比較、予後を検討

→ 分化度の低い癌 (顔つきの悪い癌) であっても、Immune-high パターンだと予後が良い。



#### ④ 免疫反応のパターンと

既存の分子生物学的分類を比較

→ 分子生物学的に高悪性度が予想されても、

Immune-high パターンだと予後が良い。

(図) 研究成果の概要

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1)

1. 著者名

Yutaka Kurebayashi, Hidenori Ojima, Hanako Tsujikawa, Naoto Kubota, Junki Maehara, Yuta Abe, Minoru Kitago, Masahiro Shinoda, Yuko Kitagawa, and Michiie Sakamoto

2. 論文表題

Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification.

3. 雑誌名

HEPATOLOGY

4. 査読の有無

有

5. 巻

68

6. 発行年

2018

7. ページ

1025-1041

[学会発表] (計 1 件)

1)

1. 発表者

紅林 泰

2. 発表表題

肝細胞癌において、組織学的・分子生物学的分類に加えて免疫微小環境を評価する意義について

3. 学会等名

第 107 回日本病理学会

4. 発表年

2018 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者: なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。