

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17455

研究課題名（和文）単一細胞解析を用いた脂肪肝炎関連肝癌における抗腫瘍免疫の解明

研究課題名（英文）Analysis of anti-tumor immunity in steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma

研究代表者

北原 征明（KITAHARA, MASAOKI）

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70632660

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）：本研究において我々は、脂肪肝炎関連肝癌患者の末梢血および肝細胞癌組織浸潤免疫細胞の解析を行い、肝線維化進行や肝癌発症に関わる免疫担当細胞の特徴を明らかにした。脂肪肝炎関連肝癌はウイルス関連肝癌と比較して、樹状細胞をはじめとする免疫細胞プロファイルにおいて大きな違いが認められ、その結果は治療効果や予後と関連する傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脂肪肝から肝硬変、肝癌に至るまでの進展を一種の免疫異常として捉え、宿主免疫応答の中心を担い抗原提示細胞である樹状細胞に着目し、臨床データと統合することで本疾患に特徴的な免疫細胞の基盤情報を明らかにした。本研究の結果は、脂肪肝炎を背景とする肝癌のみならず、今後他臓器癌における免疫学的側面を研究し、新規免疫治療を確立するための重要な基盤情報になると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the peripheral blood and hepatocellular carcinoma tissue-infiltrating immune cells of patients with steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma to characterize the immune cells involved in liver fibrosis progression and hepatocarcinogenesis. Compared with virus-related hepatocellular carcinoma, steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma showed significant differences in immune cell profiles, including dendritic cells, which tended to be associated with treatment response and prognosis.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪肝炎関連肝癌 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の食生活の欧米化により過剰な栄養が肝臓に及ぼす影響の一つに脂肪肝がある。これまで肝癌発症の成因の大部分は B 型や C 型肝炎といったウイルス性肝炎が占めてきたが、これらウイルスに対する治療の発展と共に、脂肪肝炎(脂肪肝の肝臓に炎症が生じる状態)を背景とする肝癌が急速に増加し(Hepatology 2018;67:123-133)、我が国をはじめとする先進国における解決すべき課題となっている。これまでの脂肪肝炎から肝硬変、肝癌への進展に関する研究は、生活習慣の欧米化に伴うインスリン抵抗性や酸化ストレス、腸内細菌叢といった宿主因子の存在に焦点が当てられ、血液を用いた生化学的研究、肝組織形態による病理学的研究、肝組織発現遺伝子解析を用いた分子生物学的研究が中心に行われてきた。一方、近年肝細胞への脂肪沈着に続いて、炎症と線維化を進展させる因子の一つとして自然・獲得免疫系の異常が報告されている(Nature 2016;531:253-257)。これらの研究結果は脂肪肝炎の病態進展や肝癌発症には宿主の免疫系が大きく関わっていることを示唆している。

(2) これまでに我々は、肝癌患者における宿主免疫応答の特徴を明らかにすると共に、免疫機序に基づいた治療法の開発を行ってきたが、この過程でウイルス性肝炎と比較して脂肪肝炎を背景とした肝癌では、肝組織における腫瘍抗原の発現が同等に認められるにもかかわらず、その腫瘍抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導に乏しいことを見出してきた。この抗腫瘍免疫すなわち癌治療の中心となる細胞傷害性 T 細胞の誘導には、抗原提示細胞であり自然免疫から獲得免疫への橋渡しを行う樹状細胞、制御性 T 細胞など免疫抑制細胞の関与が予想されるが、その詳細な機序の説明には至らなかった(Hepatology 2019;69:653-665)。脂肪肝炎における宿主の免疫細胞ネットワークを、特にその獲得免疫の中心的役割を担う樹状細胞に着目し、詳細に研究することで既存の免疫治療の抗腫瘍効果を高め、延いてはより有効な免疫治療法を開発できるのではないかという構想に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究では脂肪肝炎関連肝癌患者の末梢血や肝内および腫瘍内に浸潤する免疫細胞、特に免疫ネットワークの中心を担い抗原提示細胞である樹状細胞に着目し、同細胞の宿主の抗腫瘍免疫応答における役割を解明する。更に対象患者の臨床データ(患者背景や病理所見)、これまでに基礎実験で得られた免疫応答に関するデータ、他の免疫細胞の解析データ、我々が保有するウイルス性肝炎関連肝癌のデータベースと統合することにより、脂肪肝炎関連肝癌に特徴的な宿主免疫系の基盤情報を整備する。

(2) 脂肪肝から肝硬変、肝癌に至るまでの進展を一種の免疫異常として捉え、宿主免疫応答に関わる細胞を解析するこの研究手法の確立は、脂肪肝炎を背景とする肝癌のみならず、今後他臓器癌における免疫学的側面を研究するための手法になる。宿主免疫系の基盤情報を整備し、治療標的として有用な免疫細胞やその機能の同定を行うことは、新しい治療法の開発へと繋がる可能性がある。最終的には抗腫瘍免疫を高める新規免疫治療法の開発が目的である。

3. 研究の方法

(1) 免疫細胞の解析は、多重染色を用いたフローサイトメトリーにて測定した。特に樹状細胞は、単核球分画を分離、さらに Lineage 陰性・HLA-DR 陽性分画を抽出し、その後 CD123 陽性分画の plasmacytoid 樹状細胞と CD11c 陽性分画の myeloid 樹状細胞に分けてソーティングを行

い、それぞれの解析を行った。DCの機能として抗原提示能、遊走能、貪食能、サイトカイン産生能の解析を行った。

(2) 腫瘍内浸潤免疫細胞の取得は外科的に切除された肝癌組織検体で経過観察が可能であった症例のサンプルを使用した。同サンプルはgentleMACS Octo Dissociator システムを用いて凍結されており、融解後にも細胞回収のうえ解析可能になるよう調整した。分離細胞はシングルセルで回収し、取得した細胞の発現遺伝子解析により、細胞同定ならびに機能予測を行った。

(3) サンプルを測定した症例における上記解析データを、臨床情報、肝病理組織、抗腫瘍免疫に関する基礎実験データ、必要に応じて樹状細胞以外の免疫細胞のデータと統合し、その関連性を解析、基盤情報を整備した。

4. 研究成果

(1) 脂肪肝関連肝癌患者において非癌患者と比較し、樹状細胞数に関しては末梢血中で差異がないものの、抗原提示能、遊走能、サイトカイン産生能の機能は低下する傾向を認めた。またこの機能低下は、いずれも背景の肝線維化進行と関連する傾向にあった。末梢血リンパ球のプロファイルにおいては、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞における CD25 陽性細胞の割合、CCR4 陽性細胞の割合、CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞における PD-1 の発現において肝の線維化進行との相関が認められた。CD4 陽性細胞における effector T 細胞の割合については、非癌患者との比較において有意に高値であり、抗原特異的な獲得免疫が誘導されている可能性が示唆された。骨髄由来免疫抑制細胞においては、肝の線維化進行および発癌と有意な相関をもつ細胞群を同定することが出来た。また背景肝の病理組織像における脂肪化、炎症、線維化、風船様腫大の程度、血清における線維化マーカー値とそれぞれ相関する免疫細胞が同定された。一方、肝組織中におけるリンパ球プロファイルにおいても、肝線維化進行および癌の有無と共に割合が変化する細胞群が同定され、この結果はウイルス関連肝癌症例では認められず、脂肪肝関連肝癌患者に特徴的であった。

(2) 肝癌組織内において各種表面マーカーを発現する T 細胞、B 細胞、樹状細胞等の免疫担当細胞が認められ、脂肪肝関連肝癌患者において、ウイルス肝炎関連肝癌と比較して有意に免疫関連分子の発現が低下していることが確認された。また我々がこれまでに同定した肝癌特異的抗原に応答する T 細胞の割合も有意に低く、治療効果や予後と関連する傾向にあった。この結果は末梢血における樹状細胞関連のプロファイルと統計学的に有意な相関を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seike Takuya, Mizukoshi Eishiro, Yamada Kazutoshi, Okada Hikari, Kitahara Masaaki, Yamashita Tatsuya, Arai Kuniaki, Terashima Takeshi, Iida Noriho, Fushimi Kazumi, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Honda Masao, Harada Kenichi, Kaneko Shuichi	4. 巻 55
2. 論文標題 Fatty acid-driven modifications in T-cell profiles in non-alcoholic fatty liver disease patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 701～711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01679-7	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 Kitahara Masaaki, Mizukoshi Eishiro, Terashima Takeshi, Nakagawa Hidetoshi, Horii Rika, Iida Noriho, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Honda Masao, Nakamoto Yasunari, Kaneko Shuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Safety and Long-Term Outcome of Intratumoral Injection of OK432-Stimulated Dendritic Cells for Hepatocellular Carcinomas After Radiofrequency Ablation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100777～100777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100777	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 Tamai Toshikatsu, Mizukoshi Eishiro, Kumagai Masashi, Terashima Takeshi, Iida Noriho, Kitahara Masaaki, Shimakami Tetsuro, Kitamura Kazuya, Arai Kuniaki, Yamashita Taro, Sakai Yoshio, Yamashita Tatsuya, Honda Masao, Fushimi Kazumi, Kaneko Shuichi	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel -fetoprotein-derived helper T-lymphocyte epitope with strong immunogenicity in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60843-4	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hidetoshi Nakagawa, Eishiro Mizukoshi, Kiichiro Kaji, Toshikatsu Tamai, Masaaki Kitahara, Kazumi Fushimi, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Long-term presence of tumor-specific CD8 T cells over 10 years after peptide vaccination in hepatocellular carcinoma patients
3. 学会等名 71th AASLD (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaaki Kitahara, Eishiro Mizukoshi, Toshikatsu Tamai, Takeshi Terashima, Noriho Iida, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Immunotherapy for hepatocellular carcinoma using peptide-stimulated dendritic cells after radiofrequency ablation
3. 学会等名 70th AASLD (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------