

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08700

研究課題名(和文)リンパ球浸潤肝癌における、腫瘍免疫とオートファジー、鉄代謝との関連

研究課題名(英文)The relationship between the tumor immunity, autophagy and the iron metabolism

研究代表者

竹下 篤 (Takeshita, Atsushi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：30298765

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)：原発性肝癌切除例を、古典的肝細胞癌とリンパ球浸潤を伴う肝細胞癌に分け検討した。古典的肝細胞癌では有意差をもって被膜形成が多くみられた。細胞質内封入体や淡明細胞、脂肪化は有意差はなかった。当初は背景肝に差があると思われたが、症例の蓄積により、有意差はなくなった。しかし近年、非B非Cで、組織学的にも正常の背景肝を有する肝細胞癌症例は、組織学的に古典的ではない傾向がみられ、今後も検討が望まれる。免疫細胞を多角的に検討するため、正常組織における(疑似)多重蛍光免疫染色組織の作成と、その解析法を確立した。今後は、当初の目的であった、肝細胞癌におけるこれらの検討を、引き続き行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の登場により、癌免疫治療が注目されている。これに伴い癌の微小環境(癌と癌周囲の非癌組織)での炎症細胞と癌細胞との関係が重要になってきている。通常、腫瘍は免疫チェックポイントシステムを介し、リンパ球に攻撃されにくくなっている。しかし一部の癌では、腫瘍内に高度のリンパ球浸潤がみられる。今回の検討は、リンパ球浸潤の高度な肝細胞癌に着目し、その特徴を調べることで、炎症細胞浸潤を来しやすい癌の特徴を知る事であった。今回の研究期間内に、正常組織における(疑似)多重蛍光免疫染色組織の作成と、その解析法を確立した。今後は、肝細胞癌におけるこれらの検討を、引き続き行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We classified the resection cases of hepatocellular carcinoma into two groups. One is classical hepatocellular carcinoma (cHCC) and the other is hepatocellular carcinoma with lymphocyte infiltration (LHCC). In cHCC, there were significantly more capsular formations. There were no significant differences in Mallory-Denk bodies, clear cells, and fat deposition. Initially, there seemed to be differences in the background liver, but due to the accumulation of cases, there was no significant difference. However, cases of hepatocellular carcinoma, that are not viral infection and a histologically normal in the background liver, tend to be histologically non-classical. Further study is needed. In order to examine immune cells from various angles, we established a "virtual" multiplex fluorescent immunostained image in normal samples and established the analysis method by HALO software. In the future, we plan to continue these studies for hepatocellular carcinoma, which was the original purpose.

研究分野：肝臓病理

キーワード：癌微小環境 炎症細胞 画像解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肝細胞癌と免疫チェックポイント

免疫チェックポイント阻害剤などの登場により、腫瘍の微小環境が注目されるようになった。通常、腫瘍細胞は免疫チェックポイント機構を介して腫瘍内への炎症細胞浸潤を抑制している。しかし、一部の腫瘍では、腫瘍内に高度のリンパ球浸潤がみられ、これらリンパ球浸潤の強い腫瘍は予後が良いと言われているものが多い。これらの腫瘍の特徴を検討する事により、免疫機構を介した抗腫瘍効果の理解を深められる可能性がある。

古典的な肝細胞癌は腫瘍内の炎症細胞浸潤が少なく、免疫チェックポイント機構を介し、腫瘍に対する免疫抑制作用が働いていると予想されるにもかかわらず、臨床的に免疫チェックポイント阻害剤の有効性は確立されていない。現在も予後不良の癌の一つである肝細胞癌の腫瘍微小環境や腫瘍の組織学的特徴を検討する事により、免疫チェックポイント阻害剤の有効な使用法が発見される可能性がある。また、肝細胞癌の特徴として、B型、C型などの肝炎ウイルスやNASH、アルコール制肝炎などの、発癌の原因に関係すると思われる背景肝の違いがあげられる。したがって、検討の項目に、背景肝の性状を加える必要がある。

### (2) CHCC と wLHCC、pLHCC

典型的な肝細胞癌(common HCC; CHCC)は線維性被膜に覆われており、腫瘍内に炎症細胞浸潤はほとんどみられないが、稀にリンパ球浸潤の強い肝細胞癌(リンパ球浸潤肝癌, lymphocyte infiltrating HCC; LHCC)が存在する。これは、リンパ球浸潤が腫瘍全体にみられるもの(whole LHCC: wLHCC)と、一部にリンパ球浸潤がみられるもの(partial LHCC: pLHCC)に分けられる。wLHCCは一般に予後が良いとされている(Hepatology.(1998) 27(2):407-414)。しかし腫瘍全体にリンパ球浸潤がみられる肝細胞癌(wLHCC)は実際にはほとんど存在しない。そこで我々は当院での過去5年間のpLHCC症例を検討したところ、pLHCCではCHCCに比して、脈管侵襲、多発、被膜形成無しなどの、予後不良と考えられる因子がむしろ多くみられた。また、これらの症例は肝炎ウイルス陰性、かつ飲酒歴もなく、発癌の原因が不明である症例が多かった。このことより我々は、pLHCCではwLHCCやCHCCとは異なる免疫機構あるいは発癌機構が働いている可能性があると考えている。我々の仮説が正しければ、癌巣内へのリンパ球浸潤の程度により、予後が大きく変わる可能性があり、予後予測の一助となる可能性がある。

(3)肝細胞あるいは肝細胞癌において、細胞質内封入体として、マロリーデンク小体(MDB)がみられることがある。我々はMDBに注目し検討したところ、pLHCCやwLHCCでMDBの指標であるユビキチンや、オートファジー不全のマーカーであるp62の過剰発現がみられることがあるものを経験した。オートファジー不全に陥った細胞、すなわちMDBがみられる細胞はアポトーシスを介し細胞死に至ると考えられている。したがって癌細胞にMDBがみられることは一見予後良好因子のように思われるが、我々の検討では、これらの癌細胞は細胞接着因子であるE-cadherinの発現が弱いことが分かっている。E-cadherinが減弱すると、癌細胞間の接着が弱まり、癌のクラスターが小さくなる。その結果、癌の脈管侵襲や遠隔転移を促進する可能性があるため、癌細胞におけるオートファジーは必ずしも予後良好な因子ではないと、われわれは推測している。肝細胞癌において、腫瘍免疫とオートファジーの関連を検討した論文はない。また近年、神経変性疾患を中心にオートファジーの研究、創薬が盛んに行われているが、これらの薬剤の作用機序や副作用を考える上でも今回の研究は重要な課題であると考えられる。また、オートファジーの側面からの、癌の新たな治療法開発の足がかりとなる可能性もある。オートファジーの原因に鉄代謝が関係していると言われていたことより、今回は鉄代謝も加えて検討したい。

## 2. 研究の目的

### (1) 病態を背景病変から探る。

肝細胞癌の発生には、背景因子は重要な関連がある。背景となる肝疾患の原因は、①B, C 型などの肝炎ウイルス、②アルコール、③非アルコール (NAFLD)、④自己免疫 (AIH, PBC, PSC)、⑤原因不明、などが考えられる。同一の背景病変における pLHCC と CHCC および wLHCC の病理像を詳細に検討する。

### (2) 多重免疫染色の画像解析方法の確立。

免疫応答においては、種々の免疫細胞が互いに関連し働くため、複数の免疫細胞や発現する受容体などの関係を、同一切片上で検討することが重要である。免疫応答を組織学的に検討するには多重蛍光免疫染色を行うのが一般的だが、重ね合わせる染色数が限られていることで、目的とする抗原の組み合わせが変わるたびに、染色をやり直す必要がある。また、蛍光免疫染色は標的抗原を有する細胞しか発色しないため、細胞の分布、例えば腫瘍の内外の免疫細胞の比較などを行うとき、その境界（微小環境）の検討が難しい。さらに、染色性は経年劣化により1年程度しか保持されない。IndicaLabs 社の画像解析ソフト「HALO」は、プレパラート全体における各細胞の数や分布を解析できる。「HALO」には目的に応じて多数のソフトが用意されている。今回我々は、多重蛍光染色の細胞を解析できるソフト「HALO highplex FL」と、明視野画像から疑似蛍光多重染色画像を作成できる「HALO Deconvolution FL」に注目した。これらのソフトと、以前より本学にあるバーチャルスライドスキャナ「Olympus VS120」を組み合わせ、新たな画像解析法を確立することとした。

### (3) 肝細胞癌における、微小環境とオートファジー、鉄代謝の関連を検討する。

(2) で確立した手技を用いて肝細胞癌における、微小環境とオートファジー、鉄代謝の関連を検討する。我々の検討では、pLHCC は非ウイルス性肝炎、特に NASH に多い傾向にある。NASH は鉄代謝異常と関連しているといわれており、NASH の発癌には鉄代謝異常による酸化ストレスが大きな要因であると考えられている。このことより、pLHCC に特徴的な分子、特にオートファジーや発癌に関係するといわれているヘプシジンなどの鉄代謝関連分子を検討し、患者ごとの予後予測因子としての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 当院における過去のリンパ球浸潤肝癌の臨床病理学的特徴より、予後予測因子を検討する。

本検討前に、当院にて過去5年間の症例を見直した結果、約13%（年5例程度）の肝細胞癌にリンパ球浸潤(LHCC)がみられた。当院では15年前より肝細胞癌を積極的に切除し始めたので、約75例の症例が集まると考えられる。これらの症例に関して臨床データ（検査結果、患者背景および予後など）を検討する。過去5年間の検討では、患者背景としてB型、C型などの肝炎ウイルス陰性で、原因不明、または非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の症例が多い傾向にあった。また、癌の多発や脈管侵襲がみられ、予後が悪い症例が多い傾向にあった。症例数を増やして検討する必要がある。コントロール群はCHCCとする。また、wLHCCの症例があれば、wLHCCとpLHCCを分けて比較検討を行う。臨床データを多変量解析し、予後予測因子を検討する。

### (2) (疑似) 多重蛍光免疫染色の画像作成と画像解析

本研究を始める段階ではまだ画像解析ソフトを購入しておらず、解析に適した染色法と解析法から検討する必要がある。そこで、肝細胞癌の組織を用いる検討の前に、扁桃組織を用いて画

像解析法を検討を行うこととする。

(3) 肝細胞癌と浸潤リンパ球およびオートファジーの関連を明らかにする。さらに pLHCC の鉄代謝異常を検討し、患者個別の予後予測や治療戦略を構築する。

手術で得られた組織について、免疫組織学的手法により、浸潤リンパ球のサブタイプ (CD4, CD8, CD56, Foxp3 など)、およびリンパ球や肝癌細胞から放出されるサイトカインやケモカインを同定する。そして、浸潤リンパ球と癌細胞の相互作用を明らかにする。また、オートファジー関連因子 (p62、ユビキチン、CK8/18、LC3 など) や、アポトーシスのマーカー (Fas, FasL など) についても検討する。コントロール群として、①各症例の背景肝 (非癌部) の浸潤リンパ球、②癌巣内のリンパ非浸潤部の癌細胞、③リンパ球浸潤はみられるが、癌細胞の破壊がみられない部分を用いる。また、鉄代謝異常に関しては、鉄代謝関連分子のヘプシジン、炎症性サイトカインの IL-6、TNF- $\alpha$ 、酸化ストレスマーカーのカルボニル化蛋白質、8-OHdG などの免疫染色を検討する。

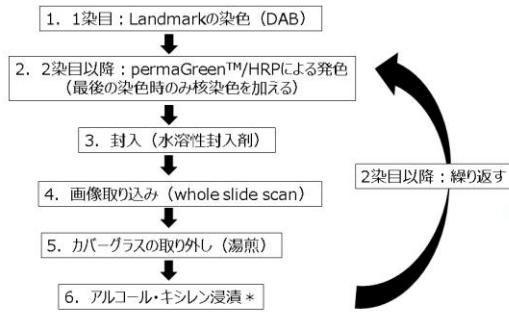
#### 4. 研究成果

##### (1) 当院における過去のリンパ球浸潤肝癌の臨床病理学的特徴

2012～2016年の5年間の症例を、組織学的に検討した。5年間の当院での原発性肝細胞癌は191例 (193結節) であった。そのうち、pLHCCは26結節 (13.4%)、CHCCは155例 (86.4%) であった。wLHCCはなかった。pLHCCとCHCCの背景因子としてHBV単独はそれぞれ8例と37例、HCV単独は10例と58例、非B非Cは8例と60例であった。非B非CのうちNAFLD/NASHは1例と5例、アルコール多飲は3例と16例であった。その他のNBNCは、それ以上の検索はされていなかった。HCV+アルコール多飲はpLHCCで1例、HBV+アルコール多飲はCHCCで1例であった。背景因子に両群の有意差はみられなかった。術後は紹介元病院に通院され、電子カルテ上は、術後経過を追うことが不可能であった。組織学的には、「原発性肝癌取り扱い規約第7版」に基づき検討した。組織学的項目のうち唯一有意差を認めたのはfcでCHCCで被膜形成が多かった ( $p=0.03$ )。細胞質内封入体や淡明細胞、脂肪化はpLHCCに多い傾向にあったが有意差はみられなかった。

##### (2) 多重免疫染色の画像解析方法の確立。

まず、水溶性発色剤を用いた、明視野での免疫単染色を行い、「Olympus VS120」でスキャンし、デジタル画像を作成する。このスライドを湯煎することにより発色剤を脱色し、別の抗体で染色し直す。そして「VS120」でスキャンするという作業を繰り返す。次に、「Deconvolution FL」で画像を疑似蛍光化する。そののち、fuse機能を用いて、これら疑似蛍光画像を重ね合わせて、一枚の (疑似) 多重蛍光免疫染色画像を作成する (図1-5)。抗体はCD20, CD3, CD8, FoxP3を用い、B細胞 (CD20+CD3<sup>+</sup>)、キラーT細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)、制御性T細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>)、(制御性以外の) ヘルパーT細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>FOXP3<sup>-</sup>) を検討した。本来、ヘルパーT細胞はCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>であり、CD4を染色することが望ましいが、CD4の染色性は不安定で、陽性細胞を抽出するのが困難であるため今回は染色しなかった。今回の方法では、ヘルパーT細胞の中にCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>のNKT細胞などが一部含まれてしまう可能性があるが、今回は暫定的にCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞を、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞と考えた。作成した疑似多重蛍光免疫染色画像の一部を皮質領域と、傍皮質領域に分け、それぞれの部分で上記フェノタイプを検索した (図6)。細胞を抽出し、解析部位を指定すると、その範囲での、フェノタイプごとの細胞数及び解析した面積などが自動で算出される (表1)。



\* アルコール・キシレン浸漬は、50%アルコール→100%アルコール→キシレン→50%アルコール→100%アルコール→流水を、各2分ずつ行う。

図1. 画像解析のスキーム

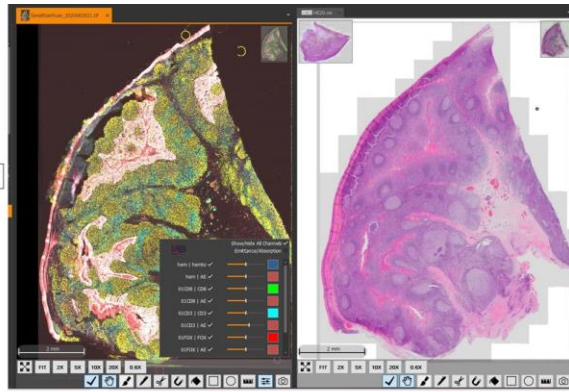


図4. HE染色の連続切片との同期. HE染色があると、標的細胞が確認しやすい。

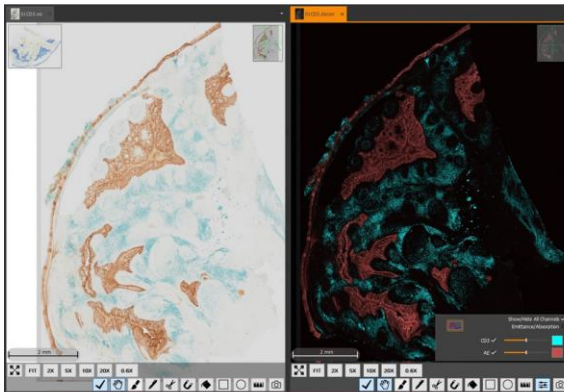


図2. 明視野単染色画像を(疑似)蛍光画像化する(水色: CD3, 茶色: AE1/AE3).

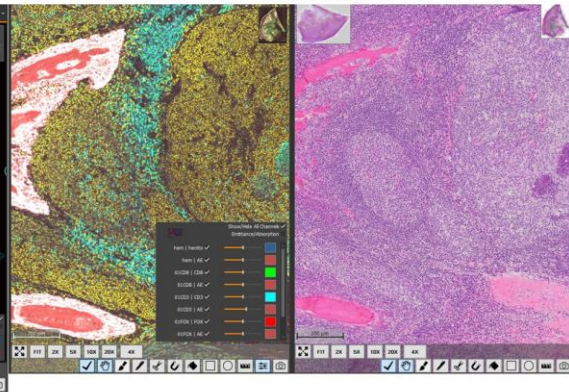


図5. 図4の強拡大.

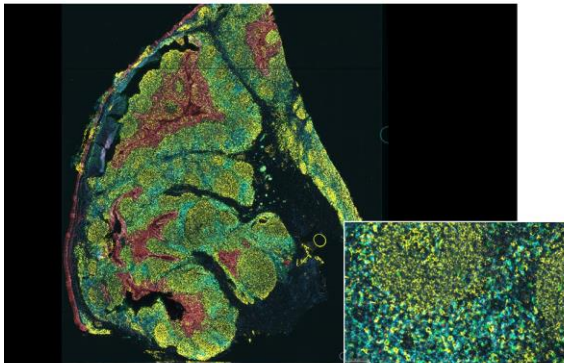


図3. CD20, CD3, CD8, FoxP3, AE1/AE3を重ね合わせ、(疑似)多重蛍光染色画像を作成する。

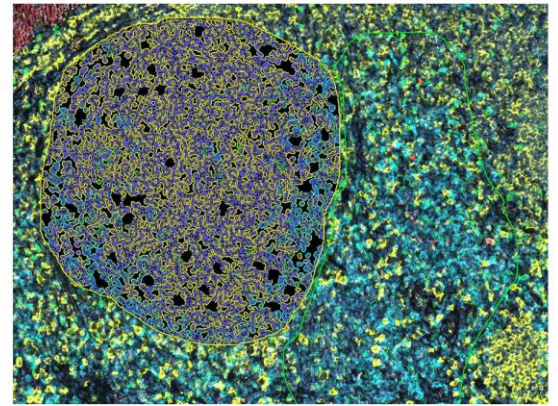


図6. 選択した部分の解析を行うことができる(図は皮質領域の解析)。

表1. 解析結果

	皮質領域(%)	傍皮質領域(%)
解析した全細胞数	2540	1753
B細胞 (CD20 <sup>+</sup> )	1722(67.8%)	144(8.2%)
T細胞 (CD3 <sup>+</sup> )	541(21.3%)	1348(76.9%)
キラーT細胞 (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )	67(2.6%)	260(14.8%)
ヘルパーT細胞 (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> (CD4 <sup>+</sup> )FoxP3 <sup>-</sup> )	474(18.7%)	1086(62.0%)
制御性T細胞 (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> (CD4 <sup>+</sup> )FoxP3 <sup>+</sup> )	0(0%)	2(0.1%)
解析した面積( $\mu\text{m}^2$ )	135478.8	107540.5

終わりに

今回の研究期間では、画像解析手法の確立に時間がかかり、肝細胞癌での検討を行うことができなかった。今後引き続き、肝細胞癌での検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 竹下 篤	4. 巻 79
2. 論文標題 Whole slide imageを利用した明視野（疑似）多重染色による組織検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 大阪医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下 篤
2. 発表標題 von Meyenburg complex由来と考えられた肝内胆管癌の一例
3. 学会等名 第54回日本肝癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 真大, 横濱 桂介, 松井 將太, 岡本 紀夫, 安岡 秀高, 西川 知宏, 中村 憲, 大濱 日出子, 土本 雄亮, 朝井 章, 福西 新弥, 津田 泰宏, 竹下 篤, 樋口 和秀
2. 発表標題 非小細胞性肺癌に対するPembrolizumab導入後より肝障害をきたし、経皮的肝生検にて免疫関連有害事象と診断した一例
3. 学会等名 第112回 日本消化器病学会近畿支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 将司(大阪医科大学 臨床研修センター), 土本 雄亮, 岡本 紀夫, 松井 將太, 安岡 秀高, 西川 知宏, 中村 憲, 横濱 佳介, 大濱 日出子, 朝井 章, 福西 新弥, 竹下 篤, 津田 泰宏, 樋口 和秀
2. 発表標題 EBV/GRZ療法にて著明な血小板減少を伴った高齢C型肝炎患者の1例
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江 克昌(大阪医科大学 第二内科), 土本 雄亮, 岡本 紀夫, 横濱 桂介, 大濱 日出子, 朝井 章, 福西 新弥, 竹下 篤, 樋口 和秀
2. 発表標題 多発血管炎性肉芽腫症の経過中に慢性活動性EBV感染症を認めた一例
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会西部会
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
--	---------------------------	-----------------------	----