

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04160

研究課題名(和文) 遺伝学的形質に基づいた肝発癌モデルの樹立と個別化免疫療法の確立

研究課題名(英文) Development of genetically-defined hepatocarcinogenesis animal model and establishment of personalized cancer immunotherapy

研究代表者

巽 智秀 (Tatsumi, Tomohide)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20397699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子cDNAの尾静脈急速静注法により発症した肝癌においてCD4陽性T細胞並びにCTLが減少し、非癌部においてNKT細胞やMDSC細胞の増加が認められた。p53欠損Myc&AKT発現マウス肝癌細胞の同種移植モデルにおいて、がん周囲非癌肝においてCTLの増加とPD-1の発現上昇を認めた。肝細胞癌患者の癌部・非癌部を用いた癌ゲノム解析を行い、カテニンに変異を有する肝癌は腫瘍内への浸潤免疫細胞数が有意に低値であった。以上より、癌ゲノム変異が癌微小環境における免疫動態に影響を与え、肝癌の発症や進展に深く関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により様々な免疫学的解析が可能なマウスモデルの樹立に成功した。これにより今後の癌免疫研究並びに様々な治療薬の免疫動態が評価可能なプレクリニカルモデルとしての有用性が期待される。また、臨床試料の解析からゲノム異常と免疫動態に関係があることを見出した。このことから、癌ゲノム以上を同定することで、患者予後の層別化や、免疫修飾を主眼とした薬剤の治療効果予測バイオマーカーの開発につながる研究成果であり、社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We found that CD4 T cells and CTLs decreased in tumor tissue, whereas NKT cells and MDSC cells increased in surrounding non-tumor tissue in the liver tumor mouse model induced by hydrodynamic injection of oncogene plasmids. We found that CTL and its surface PD-1 expressions increased in non-tumor tissues surrounding tumors. We found that HCC with CTNNB1 mutation showed lower levels of immune infiltration. Taken together, genetic mutation may affect immune system in the tumor microenvironment and thus might be involved in liver tumor development and progression.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 癌ゲノム 癌免疫 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 近年、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果が各種癌で示され、様々な癌免疫療法の臨床試験が行われているが、奏効率はいまだ低い。肝癌においてもそれらの臨床応用が期待されているが、真に有効な癌免疫療法を確立するためには、肝癌での各種免疫細胞の動態を理解することが非常に重要である。
- 肝臓内でのリンパ球の構成は、他臓器に比してNKT細胞やNK細胞といった先天免疫細胞の比率が高いという特徴があり、また肝癌はウイルス感染、慢性炎症や線維化等を背景に発症することから、その免疫動態も複雑である。肝癌患者では、NK細胞機能の低下やCD8陽性T細胞の疲弊が生じていることが報告されている。我々は、ヒトNK細胞活性化分子であるMajor histocompatibility complex class I-related chain A(MICA)に着目し、肝癌細胞膜表面からの切断によって生じた可溶性MICAが、癌細胞のNK細胞による免疫監視機構からの逃避を促進することを明らかにした(Kohga K, Tatsumi T Hepatology 2010, Kohga K, Tatsumi T Cancer Sci 2008)。また、肝癌においては骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)や制御性T細胞(Treg)といった様々な抑制性の免疫細胞が高発現していることも明らかとなっている。これらの報告から肝癌においては、免疫チェックポイント阻害剤に加えて養子免疫細胞療法や抑制性免疫細胞除去療法等が有効な治療選択肢になりうると思われる。また我々は、マウス肝癌モデルを用いた検討から、 α -galactosylceramide添加樹状細胞の肝内投与により、NKT細胞やNK細胞の活性化を介した抗腫瘍効果が誘導され、続いて強い獲得免疫の誘導が起きることを報告した(Sasakawa A, Tatsumi T J Hepatol 2009, Tatsumi T Hepatology 2007)。更に、ソラフェニブやエピルピシンが、MICAの切断阻害を介して肝癌細胞のNK細胞の細胞傷害活性に対する感受性を増大させることも報告した(Kohga K, Tatsumi T Hepatology 2010, Kohga K, Tatsumi T Cancer Res 2009)。これらより、免疫アジュバントや抗がん剤・分子標的治療薬との複合免疫療法も、肝癌に対する有効な癌免疫療法の一つになりうると思われる。しかしこれまで肝癌において、こういった種々の癌免疫療法における適切なバイオマーカーは明らかとなっておらず、良好な治療効果が得られる対象群の選定は困難である。
- 悪性黒色腫や非小細胞性肺癌、腎細胞癌に対して薬事承認されたPD-1阻害剤においても、その奏効率は25%程度であり、現在その治療効果を予測するバイオマーカーの探索が熱心に行われている。中でも、癌ゲノム解析から、ミスマッチ修復遺伝子の欠損や、体細胞変異の頻度とそこから予測されるネオアンチゲンの量等が治療効果と強く相関することが明らかとなり、またJak遺伝子の変異がPD-1阻害剤治療の抵抗性に関与することも報告され、癌で生じるゲノム異常が宿主の免疫機能や癌免疫療法の治療効果に強く影響を与えることが明らかとなってきたが、その全容は未だ明らかではない。
- 近年、癌におけるゲノム変異の包括的なカタログを作成すべく、500例を超える肝癌の全エクソームシーケンスが行われた。これにより、TERT遺伝子のプロモーター領域の活性化や、TP53, CTNNB1の高頻度の変異に加えて、約30もの遺伝子が低頻度ながら新たなドライバー遺伝子の候補として同定された。以上より肝癌はゲノム異常の腫瘍間不均一性(Intertumor heterogeneity)が非常に高い癌であることが明らかとなった。近年、悪性黒色腫のドライバー遺伝子であるBRAF変異が免疫抑制性サイトカインの産生を促し、直接宿主の免疫状態を変化させることも明らかとなった。しかし、肝癌においてドライバー遺伝子の違いが、担癌肝内や生体内での免疫機構にどのような影響を及ぼすかについてはこれまで検討されたことはない。これまでに肝癌に対して行われてきた数々の分子標的治療薬の臨床試験では、いずれも満足した結果が得られておらず、幾つかのサブ解析の結果、その要因の一つにゲノム異常の腫瘍間不均一性があることが明らかとなってきた。肝癌に対する癌免疫療法においても、こういった肝癌の遺伝学的形質の多様性が治療効果に強く影響を与えることが推察されるが、これまで詳細な検討はなされていない。

2. 研究の目的

肝癌の遺伝学的形質の多様性に着目し、各種ドライバー変異によって生じる肝癌の免疫動態の解析を通じて、遺伝学的形質に基づいた肝癌個別化免疫療法の実現とそのバイオマーカーとしての有用性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝発癌マウスモデルを用いた検討

各種ドライバー遺伝子変異を有し遺伝学的背景の均一な肝発癌マウスモデルを作製し、肝癌の免疫学的解析を通じて、各種ドライバー遺伝子変異が免疫細胞動態に与える影響を検討した。

(2) シンジェニック肝癌モデルを用いた検討

免疫能の保たれたマウスを用いたシンジェニック肝癌モデルを作製し、肝癌の免疫学的解析を通じて、各種ドライバー遺伝子変異が免疫細胞動態に与える影響を検討した。

(3) ヒト臨床試料を用いた検討

非 B 非 C 型肝細胞癌患者の癌部・非癌部を用いた遺伝子発現解析と癌ゲノム解析を行い、癌ゲノム変異と腫瘍内浸潤免疫細胞の関係について検討を行った

4. 研究成果

- 遺伝学的背景の均一な肝発がんモデルとして、C57BL6/J に対する STAM モデル (Takakura K et al., Anticancer Res 2014) を用いて検討を開始した。STAM モデルは、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) から肝発癌を発症するマウスモデルであり、生後 2 日での 200 μ g streptozotocin の皮下注射に続いて、4 週齢から高脂肪食 (32% 脂肪) 投与を継続した。その結果、STAM モデルにより 8 週齢において NASH による肝線維化を認め、約 20 週齢において多発肝腫瘍形成が生じることを確認した。また、がん遺伝子の cDNA を有するトランスポゾンベクターを尾静脈からの急速静注法により肝内で持続発現させることで、肝発癌の誘導を行った。2 種類のがん遺伝子の導入により、20 週令で多発肝腫瘍形成を認めた。そこで、腫瘍部・非腫瘍部・正常肝より MNC を単離し、Flowcytometry にて免疫細胞 (CD4 陽性 T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、マクロファージ、骨髄由来免疫抑制細胞 MDSC) の割合の解析を行った。その結果、腫瘍部において、著明な CD4 陽性 T 細胞並びに細胞傷害性 T 細胞の減少を認めた一方、非腫瘍部において NKT 細胞や MDSC 細胞の増加を認めた。
- C57BL6/J の遺伝的バックグラウンドを有する p53 欠損マウスから単離した肝前駆細胞に Myc を導入することによって不死化された肝前駆細胞株を用いて実験を行った。まずこの細胞株に Akt をレンチウイルスにより導入した後シングルクローン株を樹立した。この細胞株を免疫正常な C57BL6/J マウスの肝臓に同種同所移植 (シンジェニックオルソトピックグラフト) を行ったところ、約 1 ヶ月例で高分化な肝細胞癌を形成した。そこでこのマウスの非癌部肝臓におけるリンパ球並びに TIL の解析を行った。非癌部肝臓においてコントロール肝と比し、CTL の増加と CTL における PD-1 などの疲弊マーカーの発現上昇を認めた。これらのことから、肝細胞癌において、p53 経路や PI3K/Akt 経路の活性化が腫瘍微小環境における腫瘍免疫に対して抑制作用を有する可能性が示唆された。
- 非 B 非 C 型肝細胞癌患者の癌部・非癌部を用いた遺伝子発現解析と癌ゲノム解析を行い、癌ゲノム変異と腫瘍内浸潤免疫細胞の関係について検討を行った。腫瘍内浸潤免疫細胞の定量化については RNA-seq 解析データを用いて CYBERSORT により解析を行った。カテニンに変異を有する肝癌は腫瘍内への浸潤免疫細胞数が変異を有さない肝癌と比べて有意に少なく、カテニンによる免疫逃避機構の存在が示唆された。一方 TP53 変異を有する肝癌に関してはその傾向を認めなかった。またパスウェイレベルでの変異解析を行ったところ、クロマチンリモデリングや PI3K/AKT 経路、血管新生因子群などでの変異遺伝子の存在は浸潤免疫細胞数に影響を与えなかった一方、酸化ストレス経路に変異を有する肝癌においては有意に浸潤免疫細胞数が少なく、酸化ストレス経路による免疫逃避機構の存在が示唆された。また、CTNNB1 変異を有する肝癌は予後が良好であったのに対して、TP53 に変異を有する肝癌は予後不良の傾向が認められた。以上より、癌ゲノム変異が癌微小環境における免疫動態に影響を与え、肝癌の発症や進展に深く関与している可能性が明らかとなった。以上から、癌微小環境内免疫動態とゲノム変異情報を用いて免疫療法の適応を選択していくことが重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Suda Takahiro, Tatsumi Tomohide, Nishio Akira, Kegasawa Tadashi, Yoshioka Teppei, Yamada Ryoko, Furuta Kunimaro, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu, Takehara Tetsuo	4. 巻 2
2. 論文標題 CEACAM1 Is Associated With the Suppression of Natural Killer Cell Function in Patients With Chronic Hepatitis C	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1247 ~ 1258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1240	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 Aono Satoshi, Tatsumi Tomohide, Yoshioka Teppei, Tawara Seiichi, Nishio Akira, Onishi Yoshiki, Fukutomi Keisuke, Nakabori Tasuku, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Takahashi Takeshi, Suemizu Hiroshi, Takehara Tetsuo	4. 巻 503
2. 論文標題 Immunological responses against hepatitis B virus in human peripheral blood mononuclear cell-engrafted mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1457 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.07.063	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 Kegasawa Tadashi, Tatsumi Tomohide, Yoshioka Teppei, Suda Takahiro, Ikezawa Kenji, Nakabori Tasuku, Yamada Ryoko, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Takehara Tetsuo	4. 巻 517
2. 論文標題 Soluble UL16-binding protein 2 is associated with a poor prognosis in pancreatic cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.020	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 Tahata Yuki, Sakamori Ryotaro, Urabe Ayako, Yamada Ryoko, Ohkawa Kazuyoshi, Hiramatsu Naoki, Hagiwara Hideki, Oshita Masahide, Hijioka Taizo, Tamura Shinji, Imai Yasuharu, Kodama Takahiro, Hikita Hayato, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 50
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma occurrence does not differ between interferon based and interferon free treatment with liver histological assessment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 313 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13454	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 Kurahashi Tomohide, Yoshida Yuichi, Ogura Satoshi, Egawa Mayumi, Furuta Kunimaro, Hikita Hayato, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kiso Shinichi, Kamada Yoshihiro, Wang I-Ching, Eguchi Hidetoshi, Morii Eiichi, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Kalinichenko Vladimir V., Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 425 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2019.10.008	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 Maesaka Kazuki, Sakamori Ryotaro, Yamada Ryoko, Tahata Yuki, Urabe Ayako, Shigekawa Minoru, Kodama Takahiro, Hikita Hayato, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 50
2. 論文標題 Hypovascular hepatic nodules as a predictive factor for transcatheter arterial chemoembolization refractoriness in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 365 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13446	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 Suemura Shigeki, Kodama Takahiro, Myojin Yuta, Yamada Ryoko, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR Loss-of-Function Screen Identifies the Hippo Signaling Pathway as the Mediator of Regorafenib Efficacy in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11091362	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須田 貴広, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 C型慢性肝炎ではCEACAM1によりNK細胞活性が抑制される
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉尚宏、巽 智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 生体内forward genetic screenによる肝がんドライバー遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前阪和城、阪森亮太郎、山田涼子、中堀 輔、重川 稔、小玉尚宏、疋田隼人、巽 智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 肝細胞癌に対するレンパチニブの初期治療成績
3. 学会等名 第20回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Yuta Myojin, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 In vivo rapid genetic screen of efficacy biomarker for multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JDDW2019
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
研究分担者	小玉 尚宏 (Kodama Takahiro) (10623275)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	阪森 亮太郎 (Sakamori Ryotaro) (10644685)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	疋田 隼人 (Hikita Hayato) (20623044)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	