

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07462

研究課題名(和文) 直接抗ウイルス剤によるウイルス排除後肝癌における免疫微小環境の病理学的研究

研究課題名(英文) Pathological investigation of microenvironment in the liver cancer treated by direct anti-viral drugs

研究代表者

相島 慎一 (Aishima, Shinichi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：70346774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：HCV(C型肝炎ウイルス)に対する直接抗ウイルス剤使用による持続的なウイルス学的著効の状態が肝発癌と腫瘍形成に与える影響を病理学的に検討した。肝癌に対して外科切除された肝細胞癌症例に対して肝癌の病理学的因子とともに、腫瘍内および腫瘍外に浸潤するリンパ球および、CD8陽性のT細胞の浸潤について画像解析ソフトにより解析した。癌部のリンパ球浸潤、はSVRなし群では、SVRあり群に比べて高かったが、癌部のCD8陽性細胞は両群で有意な差は認めなかった。HCVウイルス排除後においてもCD8陽性細胞が腫瘍内微小環境に影響を与えている可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は肝癌切除組織を用いて、癌組織および非癌組織の免疫細胞の空間的なネットワークの構築を形態的に検討している。HCVに対する直接抗ウイルス剤使用による持続的なウイルス学的著効の状態であっても、肝細胞癌が発生しており、肝発癌と腫瘍形成メカニズムを明らかにすることは喫緊の課題である。本研究の結果からは、SVRによって変化した肝内の免疫環境が、どう変化するのかいまだ不明であるが、腫瘍内および腫瘍内に浸潤するCD8陽性T細胞を主とする腫瘍免疫担当細胞の誘導が肝発癌に関与する可能性があり、さらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The effect of sustained virologic response (SVR) to direct antiviral therapy against hepatitis C virus (HCV) on hepatocarcinogenesis and tumorigenesis was investigated pathologically. Hepatocellular carcinoma patients who underwent surgical resection were analyzed for intra- and extra-tumoral lymphocyte and CD8-positive cells infiltration as well as pathological factors of hepatocellular carcinoma using image analysis software. Intratumoral lymphocyte infiltration was higher in the group without SVR than in the group with SVR, but CD8-positive cells in the tumor were not significantly different between the two groups, suggesting that CD8-positive cells may influence the intratumoral microenvironment even after HCV virus elimination.

研究分野：肝臓

キーワード：肝癌 肝炎ウイルス 免疫微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 直接抗ウイルス剤(DAA)の登場によって、C型肝炎ウイルスが消失し肝炎が鎮静化した持続的ウイルス学的著効(SVR)が達成できるようになったものの、SVR後にも肝癌が発生することは大きな課題である。そのため、DAAによるSVR達成後の発癌リスク因子(加齢、男性、脂肪肝、飲酒、線維化進展例)についての研究や、IFN治療後の肝癌とDAA治療後の肝癌との比較研究が精力的に行われている。また、DAA治療後早期に肝発癌した症例や10年以上変化がなかった1cmの結節がDAA治療後に急速増大した症例が報告されたことから、DAAによる発癌促進機構の有無にも注目が集まっているが、現在のところDAA治療が発癌を抑制するのか促進するのかいまだ一定の見解がない。(2) SVR後の発癌の理由としては、ウイルス排除前にすでに蓄積された肝傷害が存在すること、HCV感染状態で活性化していたNK細胞やIFN産生がDAA治療により減少することで発癌しやすい環境になる可能性などが考えられる。肝炎ウイルス存在下における慢性炎症状態での免疫環境と、肝炎ウイルス消失後の免疫再構築状態は異なると思われ、DAA治療後の発癌機構ならびに、発生した肝癌の特徴を明らかにするためには、非腫瘍部および腫瘍内免疫微小環境(Tumor immune microenvironment; TIME)を包括的に解析する必要がある。DAA治療によってTIMEはどのように変化するのか、さらにDAA後に再発しやすい肝癌のTIMEの特徴は何か、について明らかにすることを重要な課題である。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究はヒト肝癌患者より採取された、肝癌切除組織および血液を用いて、癌組織および非癌組織の免疫細胞の空間的なネットワークの構築を形態的に検討することによって、肝癌の『腫瘍内免疫微小環境』の包括的な分析を目指す。特にHCVに対する直接抗ウイルス剤(DAA; Direct acting Antivirals)使用による持続的ウイルス学的著効の状態(SVR; Sustained Viral Response)が肝発癌と腫瘍形成に与える影響を明らかにすることを目的としている。

(2) 近年、DAA治療後の発癌リスク群や発癌頻度についてまとまった報告が相次いでいる。一方で肝癌の病理学的な特徴についての報告はほとんどなく、DAA後の肝細胞癌はDAA後の肝細胞癌に比べて血管浸潤が多く、AFPが高いという少数例の報告しかなく、SVRによって変化した肝内の免疫環境が、どう変化するのかいまだ不明である。

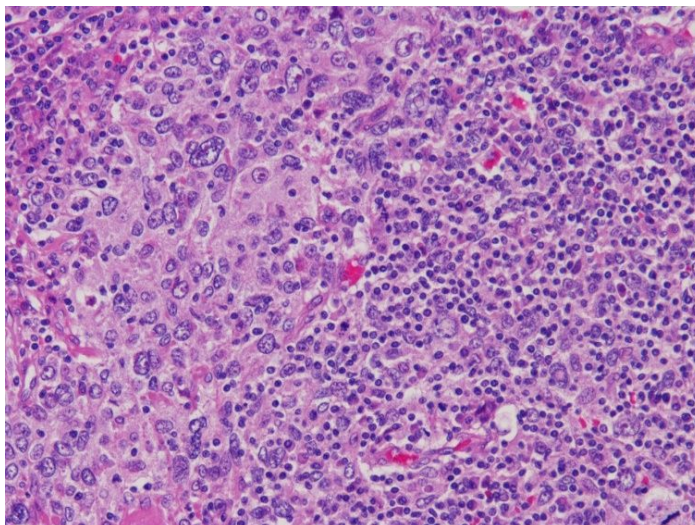
### 3. 研究の方法

(1) 2011年から2018年に肝癌に対して外科切除された肝細胞癌症例に対してインターフェロン治療の有無、DAA治療の有無と薬剤の種類、DAA治療の期間、SVRの有無に加え、臨床的な検査データを収集し、該当症例の肝癌組織を形態学的に以下の点(肝癌組織の分化度、腫瘍径、脂肪化の程度、炎症細胞浸潤の程度、血管侵襲の有無、非腫瘍部の肝障害の程度など)を評価した。インターフェロンまたはDAA治療群と無治療群、SVR群と非SVR群とに分類して、臨床病理学的なデータの収集を行った。代表的切片を選択した後、腫瘍内および非腫瘍部に浸潤しているTリンパ球に対するCD8抗体による免疫染色を147例に対して行った。光学顕微鏡下に、対物レンズ20倍×接眼レンズ10倍視野(200倍)で観察し、非癌部および癌部において代表的な部位を3カ所選択した。

(2) 選択部位はリンパ球浸潤が多い部分を選んでいる。画像解析ソフトによりリンパ球およびCD8陽性細胞をカウントし3視野平均の浸潤細胞数として測定した。統計解析はJUMPを用いてWilcoxon検定を行った。

### 4. 研究成果

(1) 対象症例の内訳は、男性：女性 = 104 : 43人で、年齢は44歳~91歳までであり、肝癌の組織学的な分化度は高分化型14例、中分化型110例、低分化型23例である。背景肝疾患はHBV陽性が24例、HCV陽性が88例(うちSVRなし54例、SVRあり34例)、非B非Cが35例である。

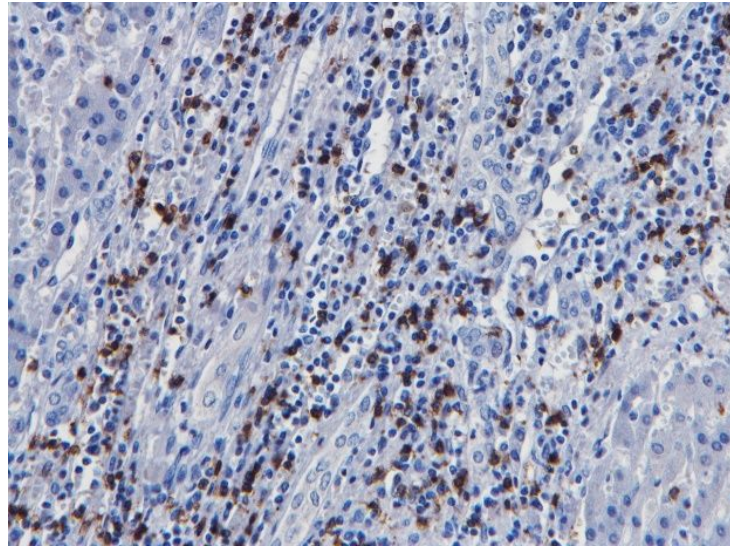




(2) 147 例の症例全体において、非癌部における浸潤リンパ球数は 614.8(81.7-1971)個、非癌部の CD8 陽性細胞数は 160.7(5.3-601.7)個、非癌部における CD8 陽性細胞割合 (CD8 細胞 /リンパ球) 27.9%(3.9%-65.4%) であった。

<SVR 例 非癌部 CD8 陽性細胞 : 220 >

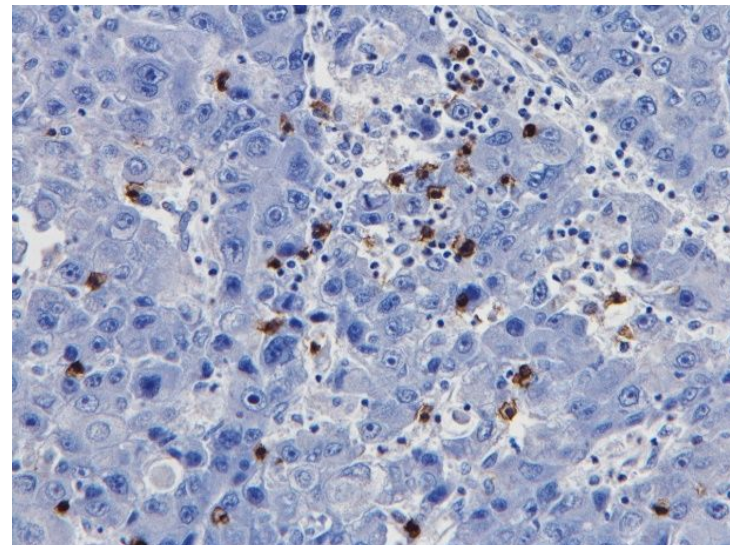
(3) 癌部における浸潤リンパ球数は 417.3(53.7-1858.6)個、癌部における CD8 陽性細胞数は 46.1(0-311.3)個、癌部 CD8 陽性細胞割合 13.2%(0-63%) であった。上記の細胞数と年齢、性別、癌の組織学的分化度、肉眼型、多発・単発、腫瘍径との間に統計学的有意差は見られなかった。非癌部の炎症細胞浸潤と CD8 陽性細胞はいずれも HCV 群で NBNC 群よりもリンパ球浸潤が多かった。一方で、癌部のリンパ球浸潤、CD8 陽性細胞は HCV 群、HBV 群、NBNC 群で統計学的に有意差は無かった。



<SVR 例 癌部 CD8 陽性細胞 30 >

(4) HCV 群 (88 名)において SVR の有無について比較したところ、非癌部のリンパ球浸潤、CD8 陽性細胞は SVR なし群は SVR あり群に比べて高かった。

(5) 癌部のリンパ球浸潤は SVR なし群は SVR あり群に比べて高かったが、癌部 CD8 陽性細胞は SVR の有無により有意差はなかった。非癌部および癌部のリンパ球浸潤は SVR により有意に減少するが、CD8 陽性細胞数には有意差は見られなかったことから、



HCV ウイルス排除後にも CD8 陽性細胞が腫瘍内微小環境に、HCV ウイルス排除後にも CD8 陽性細胞が腫瘍内微小環境に影響を与えている可能性が示唆される。

#### <引用文献>

Griffith AS, et al. Decreased hepatocellular carcinoma tumor burden with the achievement of hepatitis C virus sustained virologic response: unlocking the potential of T-cell-mediated immunosurveillance. J Hepatocellular carcinoma 2018;5:55-39.

Yamashita N, et al. Rapid growing hepatocellular carcinoma recurrence during direct acting antiviral treatment for chronic hepatitis C. Clin J Gastroenterol 2018;11:497-500.

Mashiba T, et al. Does interferon-free direct-acting antiviral therapy for hepatitis C after curative treatment for hepatocellular carcinoma lead to unexpected recurrences of HCC? A multicenter study by the Japanese Red Cross Hospital Liver Study Group. PLOS one 2018;13:e0194704.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	吉田 裕樹  (Yoshida Hiroki)  (40260715)	佐賀大学・医学部・教授   (17201)	
研究分担者	平岡 伸介  (Hiraoka Nobuyoshi)  (40276217)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長   (82606)	
研究分担者	能城 浩和  (Noshiro Hirokazu)  (90301340)	佐賀大学・医学部・教授   (17201)	
研究分担者	杉町 圭史  (Sugimachi Keishi)  (90452763)	独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他部局等・肝胆膵外科医長   (87102)	

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