

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08133

研究課題名（和文）肝動脈塞栓術後のガン微小環境におけるマクロファージ極性制御に基づく新規治療戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategies based on macrophage polarization in the tumor microenvironment after hepatic arterial embolization.

研究代表者

上嶋 英介 (Ueshima, Eisuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40645561

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）：N1S1ラット肝癌細胞を用いて同種移植肝癌モデルを作成、腫瘍動脈の塞栓を行った。肝癌移植・辺縁部をCD68およびCD206抗体による免疫染色にて、TGF- $\beta$ 1産生細胞が集積する腫瘍関連マクロファージの多寡を評価した。動脈塞栓群ではCD206陽性の腫瘍関連マクロファージが有意に増加し、Lenvatinib投与群では有意に減少していた。microarrayによる網羅的遺伝子解析にて塞栓群ではTAM関連遺伝子群の発現が増加傾向にあり、Lenvatinib併用群では減少する傾向にあった。TAEにより生じた腫瘍免疫微小環境中のTAM極性がLenvatinibにより緩和される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈塞栓術後の残存腫瘍中の腫瘍免疫微小環境の悪化は、肝癌再発時の予後不良に関連していると考えられる。塞栓術後にLenvatinibを投与することで、微小環境中の腫瘍関連マクロファージの極性を変化させ、免疫状態を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：An allogeneic transplantation hepatocarcinoma model was created using N1S1 rat hepatocarcinoma cells, and tumor arteries were embolized. The number of tumor-associated macrophages in which TGF- $\beta$ 1-producing cells accumulated was evaluated by immunostaining with CD68 and CD206 antibodies in the transplanted and marginal areas of hepatocarcinoma. Comprehensive genetic analysis by microarray revealed a trend toward increased expression of TAM-associated genes in the embolization group and decreased expression in the lenvatinib group. This suggests that TAM polarity in the tumor immune microenvironment induced by TAE may be alleviated by lenvatinib.

研究分野：インターベンショナルラジオロジー

キーワード：肝細胞癌 腫瘍関連マクロファージ 動脈塞栓術

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝癌発癌の背景には肝硬変が強く関わっており、治療の標的とは異なる新たな肝癌発生が多く見られることが治療を難しくしている。肝動脈塞栓術(TAE)は、肝腫瘍の栄養血管に抗癌剤とともに塞栓物質で血流を遮断し、癌細胞を壊死させる有効な治療法である。一方、TAE やラジオ焼灼術等の局所療法による侵襲が壊死部周辺に炎症・免疫反応を強力に誘発するが、これが新たな発癌を惹起させているという報告がある。

TGF- $\beta$ 1 は、癌微小環境において免疫抑制性サイトカインとして働き、抗腫瘍免疫応答を抑制するため、肝癌の予後不良因子として注目されている。TGF- $\beta$ 1 は癌細胞やマクロファージ等の免疫細胞による産生が多いと考えられている。塞栓域周囲に多数の免疫細胞の遊走が見られ、多くのマクロファージが集積していることも明らかになっている。マクロファージには機能的に相反する2つの極性があることが知られており、M1タイプが主に貪食や炎症惹起、M2タイプは組織再生や細胞増殖に寄与する。癌微小環境には腫瘍随伴マクロファージ(Tumor-associated macrophage:TAM)と呼ばれるマクロファージが見られ、抗炎症性のM2タイプに分類される。TAMはIL-10, TGF- $\beta$ 1などの免疫抑制性サイトカインを産生し、制御性T細胞の浸潤を促すことで抗腫瘍免疫を抑制、種々の血管新生因子の産生によって新生血管を誘導する。即ち、TAMは癌細胞の増殖に都合の良い微小環境を提供し、肝癌において腫瘍進展に寄与している。近年、腫瘍進展のキーファクターであるマクロファージを対象とした治療が注目を浴びており、マクロファージの遊走・機能分化を司るCSF-1受容体の阻害薬を用いて、TAMからM1へと極性転換を試みる治療も登場し、複数の臨床試験が行われている。

### 2. 研究の目的

- ① 肝癌に対するTAE後の癌微小環境の再形成メカニズムをマクロファージの極性転換のアプローチにより解明する、
- ② TAE後の癌微小環境における免疫抑制性サイトカイン産生を抑制し、抗腫瘍免疫応答を活性化させるため、間質細胞の形質変化や腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の極性転換を誘導する新規治療の開発基盤を構築する。

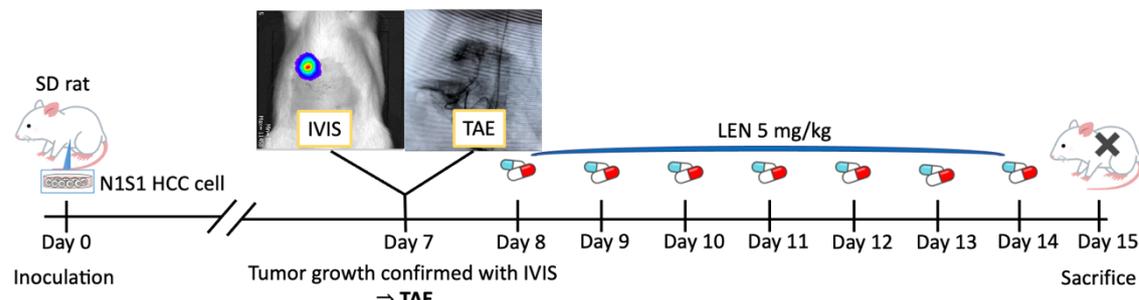
### 3. 研究の方法

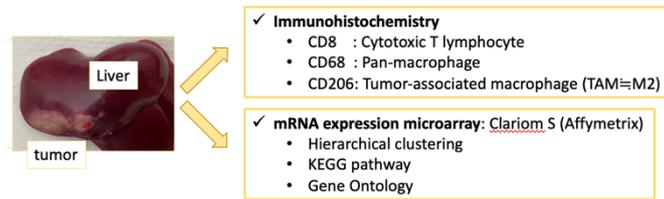
・複数の肝癌細胞(Huh7, HepG2, N1S1, Rh7777)を用いて常酸素・低酸素培養下でそれぞれの細胞の生存率、TGF- $\beta$ 1産生能の評価した。

・これら4種の肝癌細胞の内、Ratへの移植に最も適したN1S1細胞に蛍光(cherry)と発光(luciferase)を共発現する遺伝子導入を行い、低酸素培養下での生存および蛍光・発光の有無を確認した。

・N1S1ラット肝癌細胞を用いて同種移植肝癌モデルを作成、腫瘍動脈の塞栓および免疫環境を変化させる薬剤としてLenvatinibの投与を行い、腫瘍切片より免疫染色にてCD8, CD68, CD206の発現を評価した(下図)。

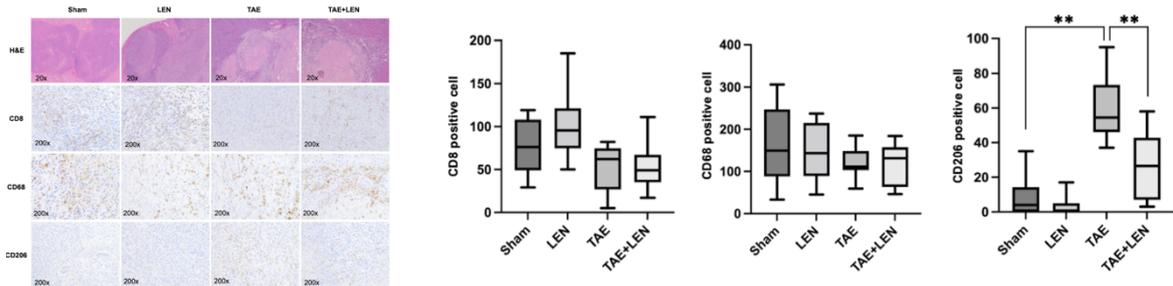
・Microarrayにて網羅的遺伝子解析を行った。



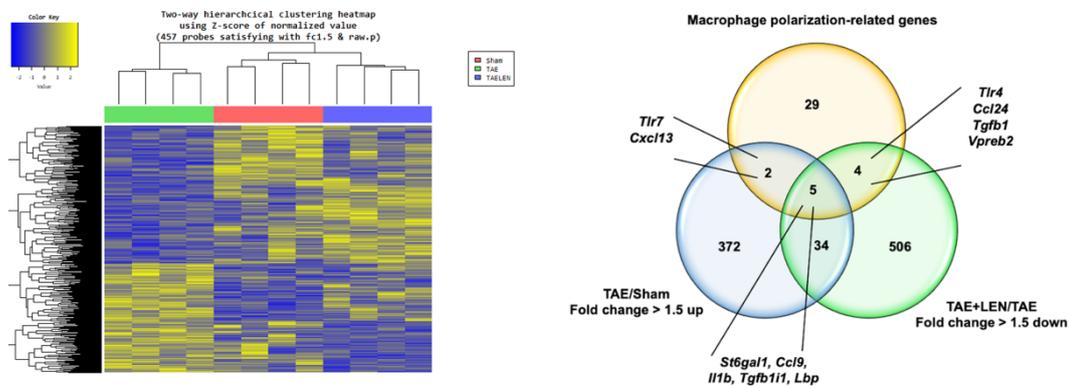


#### 4. 研究成果

肝癌移植・辺縁部の CD68 および CD206 抗体による免疫染色にて、動脈塞栓群では CD206 陽性の腫瘍関連マクロファージの割合が有意に増加し、Lenvatinib 投与群では有意に減少していた（下図）。



Microarray による網羅的遺伝子解析にて塞栓群では TAM に関与する遺伝子群の発現が増加傾向にあり、これらは Lenvatinib 併用群では減少する傾向にあった（下図）。これらに関連する遺伝子として *St6gal1*, *Ccl9*, *Il1b*, *Tgfb1i1*, *Lbp* の 5 つが候補に挙げられた。TAE により生じた腫瘍免疫微小環境の TAM 増加に向かう変化が Lenvatinib により修正されうる可能性が示唆された。



ラット脛骨より骨髓細胞を採取し、M-CSF 投与によりマクロファージへと分化させた。同骨髓由来マクロファージと N1S1 細胞を用いてマクロファージ極性変化を評価した。Lenvatinib とマクロファージのみに投与しても極性変化は見られなかったが、N1S1 の Conditioned medium を加えるとマクロファージ極性変化が生じ、Lenvatinib 投与により改善が見られた。よって、Lenvatinib はマクロファージに作用するのではなく、腫瘍細胞に作用し、その結果、腫瘍より放出されるサイトカインによりマクロファージ極性変化が生じることが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Ueshima E, Sofue K, Takaki H, Hirata Y, Kodama H, Hamada M, Matsushiro K, Sasaki K, Gentsu T, Okada T, Yamaguchi M, Yamakado K, Sugimoto K, Murakami T   |
| 2. 発表標題<br>Embolization Induced Tumor-Associated Macrophage Polarization in Tumor Immune Microenvironment can be Reprogrammed by Lenvatinib in a Rat Hepatoma Model |
| 3. 学会等名<br>Society of Interventional Radiology  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)          | 備考 |
|-------|---|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 平田 豊<br>(HIRATA YUTAKA)<br>(10441247)       | 兵庫医科大学・医学部・講師<br><br>(34519)   |    |
| 研究分担者 | 児玉 大志<br>(KODAMA HIROSHI)<br>(20422834)     | 兵庫医科大学・医学部・助教<br><br>(34519)   |    |
| 研究分担者 | 祖父江 慶太郎<br>(SOFUE KEITARO)<br>(90622027)    | 神戸大学・医学部附属病院・講師<br><br>(14501) |    |
| 研究分担者 | 村上 卓道<br>(MURAKAMI TAKAMICHI)<br>(20252653) | 神戸大学・医学研究科・教授<br><br>(14501)   |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|