

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16770

研究課題名（和文）がん免疫逃避機構からみた肝動脈塞栓術後再発メカニズムの解明と、新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Investigation of cancer immune evasion mechanism of recurrence after Transarterial Embolization and development of novel treatment strategies

研究代表者

松本 武士（Matsumoto, Takeshi）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：50790309

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）：我々の研究では肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術の治療成績向上を目指して、動物実験で肝動脈塞栓術とガン免疫逃避機構阻害薬を組み合わせた新しい治療戦略の開発を目指し研究を行った。肝細胞癌のラットモデルを用いて、無治療群、肝動脈塞栓術単独群、抗PD-L1抗体単独群、肝動脈塞栓術＋抗PD-L1抗体併用群、腹腔内生食投与群の5群を作成し、腫瘍の壊死率やPD-L1やCD8の発現を画像・病理学的に評価した。肝動脈塞栓術とガン免疫逃避機構阻害薬による併用治療による治療成績の向上は示すことができなかったが、無治療群と比較し塞栓術による腫瘍内部や辺縁へのPD-L1やCD8の発現が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、ガン免疫逃避機構の視点から肝動脈塞栓術後の再発メカニズムを明らかにし、再発を阻止するための新規治療の構築を目指したが、肝動脈塞栓術とガン免疫逃避機構阻害薬の併用治療による治療成績の向上は今回示すことはできなかった。原因としてはガン免疫逃避機構にはPD-L1だけでなく制御性T細胞、骨髄由来抑制細胞など様々な因子があり、今後他の免疫チェックポイント分子を標的とする抗体や、免疫抑制細胞に対する阻害薬を用いて最も抗腫瘍効果の高い治療方法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：In our study, we aimed to improve the therapeutic outcomes of transarterial embolization (TAE) for hepatocellular carcinoma by developing a novel treatment strategy combining TAE with inhibitors of cancer immune evasion mechanisms in animal experiments. Using a rat model of hepatocellular carcinoma, we created five groups: untreated group, TAE alone group, anti-PD-L1 antibody alone group, TAE combined with anti-PD-L1 antibody group, and intraperitoneal saline group. Tumor necrosis rates and the expression of PD-L1 and CD8 were evaluated through imaging and pathological analysis. Although the combined treatment of TAE and cancer immune evasion mechanism inhibitors did not demonstrate improved therapeutic outcomes, increased expression of PD-L1 and CD8 in the intratumoral and peritumoral region was observed in the embolization groups compared to the untreated group.

研究分野：放射線医学

キーワード：肝動脈塞栓術 ラット ガン免疫逃避機構

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、本邦では年間約 4 万人が発病し、約 3 万 5000 人が死亡している。また、世界では年間約 75 万人が新たに肝細胞癌を発症し、その発症頻度は増加の一途を辿っている。肝細胞癌の根治治療として肝切除、肝移植、ラジオ波凝固治療が行われるが、根治治療が可能なのは約 30%の症例に限られる。肝動脈塞栓術は、根治治療が困難な肝細胞癌に対する標準的治療として位置づけられている。しかし、肝動脈塞栓術後も 50-80%の頻度で再発が認められ、再発した場合の予後は不良である。よって、肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術後の再発制御を目指した新たな治療戦略の開発が待ち望まれている。

近年、ガンと免疫の関りが注目されており、ガンの再発や転移に免疫細胞が深くかかわっていることが明らかになってきた。免疫系は通常、体内に発生したガン細胞を排除しようと働く。一方、ガン細胞は PD-L1 等の抑制性免疫チェックポイント分子を発現したり、制御性 T 細胞・Treg(regulatory T-cell)等の免疫抑制性細胞を活用して、免疫系からの攻撃から逃れようとしている(ガン免疫逃避機構)。よって、ガン免疫逃避が優位となった場合には、ガン再発を助長しうる。実際、PD-L1 の発現亢進や Treg の腫瘍内集積増加を認める肝細胞癌症例では治療後再発の頻度が高く予後も不良である。また、肝動脈塞栓術後の残存肝細胞癌では PD-L1 発現が亢進していることが報告されている。更に、肝動脈塞栓術を模した低酸素環境で肝癌細胞株の培養を行うと、PD-L1 に加え、Treg 走化因子である CCL17 の mRNA が過剰に発現することも報告されている。そこで、"肝動脈塞栓術後の再発には、ガン免疫逃避機構の活性化が関与しているのではないかと考えた。そして、"肝動脈塞栓術の際にガン免疫逃避機構を阻害することで、更なる治療成績の向上に寄与するのではないかと"という仮説を立案した。

本研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、「肝動脈塞栓術後に高頻度で再発が生じるのは、ガン免疫逃避機構の活性化に起因しているのではないかと」という着想が原点にある。本研究では、ガン免疫逃避機構の観点から肝動脈塞栓術後の再発メカニズムに迫り、肝動脈塞栓術とガン免疫逃避機構阻害を組み合わせた新しい治療戦略の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ガン免疫逃避機構の視点から肝動脈塞栓術後の再発メカニズムを明らかにし、再発を阻止するための新規治療の開発基盤を構築することである。肝細胞癌は、世界的に増加の一途をたどっている。根治治療が困難かつ他の薬物療法に不応となった場合には、肝動脈塞栓術が唯一の治療となる場合も多い。しかし、肝動脈塞栓術後も高頻度で再発が認められ、その治療成績はいまだ十分とは言えない。現在、肝動脈塞栓術の治療成績向上を目指した研究開発が世界中で進められている。しかし、これらの取り組みのほとんどが、使用するカテーテルおよび塞栓物質の改良や、塞栓物質とともに使用する抗癌剤の開発である。一方、本研究の学術的独自性は、ガン免疫逃避機構の観点から肝動脈塞栓術の再発メカニズムを解明し新規治療へと展開させる点であり、従来のアプローチとは一線を画する。

また、本研究では、ラット肝細胞癌モデルを用い、肝動脈塞栓術後の再発メカニズム解明を目指す。そして、そのメカニズムを基に、ガン免疫逃避機構阻害薬と肝動脈塞栓療法を組み合わせ、新しい治療戦略を開発する。

## 3. 研究の方法

肝動脈塞栓術を模した低酸素培養下で肝癌細胞とリンパ球の共培養を行う。更に、この共培養の培地に、標的に対する抗体(例:抗 PD-L1 抗体)を加える。そして、アポトーシスアッセイや細胞障害アッセイを行い、抗腫瘍効果の増強が得られているかを *in vitro* で検証する。期待した抗腫瘍効果が得られない場合には、他の免疫チェックポイント分子を標的とする抗体や、免疫抑制細胞に対する阻害薬(例:Treg に対するシクロフォスファミド)、免疫抑制性サイトカインに対する中和抗体等を用いて、最も抗腫瘍効果の高い組み合わせを選び出す。

次に動物実験を行いその有効性を検証する。肝癌細胞株を生着させたラット肝癌モデルを作製し、無治療群、動脈塞栓術単独群、ガン免疫逃避阻害剤単独群、および併用治療群(動脈塞栓術+ガン免疫逃避阻害剤)に分ける。動脈塞栓術後、定期的に CT 検査や US 検査を行い、腫瘍増大速度を各群で比較し有効性を検証する。

## 4. 研究成果

まず、ラット肝細胞癌株である N1S1 とラット由来 CD8 陽性細胞を抗ヒト PD-L1 抗体を共培養させ、ラット肝細胞癌株である N1S1 と抗ヒト PD-L1 抗体との結合性を免疫蛍光染色で調べた。2 次抗体として Sample1: A11013、Sample2: 709-545-149 を使用した。結果はいずれの 2 次抗体も染色され、ラット肝細胞癌株である N1S1 と抗ヒト PD-L1 抗体との結合を認めた。

次に抗ヒト PD-L1 抗体による抗腫瘍効果の変化を Annexin-V アポトーシスアッセイキットを使用し Flow Cytometry で調べた。(A)N1S1 単独培養、(B)N1S1+ラット由来 CD8 陽性細胞の共培養、(C) N1S1+ラット由来 CD8 陽性細胞+抗ヒト PD-L1 抗体(1 µg)の共培養、(D) N1S1+ラット由

来 CD8 陽性細胞+抗ヒト PD-L1 抗体(10 µg)の共培養をそれぞれ Flow Cytometry でアポトーシスアッセイを行ったところ、抗ヒト PD-L1 抗体が増加するほどアポトーシスの割合が増加した。以上の結果をもとに次にラット肝癌モデルを用いた動物実験で、動脈塞栓術と抗 PD-L1 抗体併用治療の有用性を検証した。

まず体重 300g 程度の SD ラット (9 週令、雄) を使用した。全身麻酔下にて開腹し肝左様へ肝癌細胞株 (N1S1、 $5 \times 10^6$  cells/100 µl) を注入し移植した。移植から 9 日後、ラット尻尾の静脈にルート確保した上で、ソナゾイドを用いて造影 US で肝細胞癌の血流とサイズを評価し、腫瘍径が 10mm 以上のモデルを対象とした。対象ラットは 無治療群、TAE 単独群、抗 PD-L1 抗体単独群、TAE+抗 PD-L1 抗体併用群、腹腔内生食投与群と分けた。TAE は全身麻酔下にて、ラットの左頸動脈を 20G サーフロー針で穿刺しアクセスルートを確保した。続いて X 線透視下に 1.6Fr マイクロカテーテルと 0.014-inch のマイクロガイドワイヤーを用いて肝動脈を選択し塞栓物質を動注した。塞栓物質には 75 µm Embosphere を使用し塞栓した。抗 PD-L1 抗体は 10mg/kg を週 3 回で腹腔内投与した。造影 US で肝細胞癌を確認した 1 週間後にラットを犠牲死させ腫瘍を摘出し、病理組織学的評価を行った。腫瘍の壊死率は H&E 染色、腫瘍内部と腫瘍辺縁での PD-L1 や CD8 の発現を程度を検討した。今回の検討では TAE + 抗 PD-L1 抗体による併用治療による治療成績の向上は見られなかった。ただ PD-L1 の発現は腫瘍内部と腫瘍辺縁ともに TAE していない群と比較して TAE 単独群と TAE + 抗 PD-L1 抗体群で有意に発現していた。また CD8 の発現は腫瘍内部では無治療群と比較して TAE 単独群と TAE + 抗 PD-L1 抗体群で有意に発現あり、腫瘍辺縁では無治療群と比較して TAE 単独群、抗 PD-L1 抗体単独群、TAE + 抗 PD-L1 抗体群で有意に発現していることを確認した。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------