

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16954

研究課題名（和文）HLA分子とPD-1経路を中心とした肝がん治療における免疫学的マーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration of immunological markers in liver cancer treatment focusing on HLA molecules and PD-1 pathway

研究代表者

松田 秀岳（Hidetaka, Matsuda）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・講師

研究者番号：20464084

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）：肝細胞癌（HCC）に対する治療がより多様化していくと予想される中で、効率的な治療法の選択が重要となる。本研究では、HCC症例における免疫学的な微小環境と経時的なサイトカイン動態を解析し、治療効果予測に有用なマーカーを同定することを目的として検討を行った。HCC臨床検体を用いた検討により、C型肝炎ウイルス感染症例とウイルス排除後症例では、免疫調節性の腫瘍内微小環境の組成が異なることが示唆された。また、循環腫瘍細胞の幹細胞性は治療効果やがん進展の予測に有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌（HCC）は背景肝の状態により、腫瘍内微小環境の免疫学的組成が異なる可能性が確認され、HCC治療における個々の結節の特性を踏まえたテーラーメイド医療を構築する重要性が示唆された。また、循環腫瘍細胞解析がHCC治療効果やがん進展の予測に有用なバイオマーカーとなる可能性も示された。本研究の成果の応用により、HCCの生物学的多様性を踏まえた効率的な治療法選択が可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：As treatment for hepatocellular carcinoma (HCC) is expected to become more diversified, it is important to select an efficient therapy. In this study, we analyzed the immunological microenvironment and cytokine dynamics over time in HCC cases with the aim of identifying markers useful for predicting therapeutic efficacy. The results suggest that the composition of the immunomodulatory intratumor microenvironment differs between hepatitis C virus-infected and post-virus eliminated cases. In addition, stemness of circulating tumor cells was shown to be a potentially useful biomarker for predicting therapeutic efficacy and cancer progression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 微小環境 循環腫瘍細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国では、年間約 3 万人が死亡する肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) への疾病対策は急務である。近年、進行 HCC に対する新規の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が次々と実用化されている。また、このような新規治療薬と従来治療 (手術、局所穿刺治療、化学動脈塞栓療法、重粒子線治療、等) との併用の有効性も示されつつある。今後、HCC 治療は更に多様化すると予想される中で、効率的な治療法の選択が重要となる。

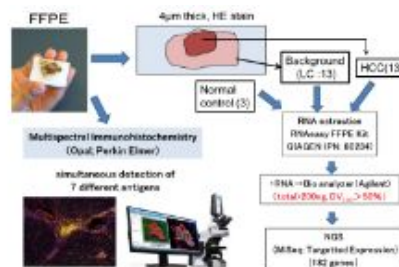
(2) 申請者らは、HCC の進展 / 抑制に作用する腫瘍内微小免疫環境の解析とその結果顕在的に表出される免疫動態解析が、HCC の治療奏効性や転移・再発予測に有効であると仮定した。そこで、腫瘍内における免疫チェックポイントである PD-1 経路と、腫瘍の immune escape の key molecule と想定される HLA 分子との相関を主軸に、付随・関連する抗腫瘍反応を検討する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、HLA 分子と PD-1 経路を中心とした HCC 症例における免疫学的な微小環境と経時的なサイトカイン動態を解析し、治療効果予測に有用なマーカーを同定することを目的とした。腫瘍免疫は多数の担当細胞が複雑に連携する。また、基礎疾患や服薬の有無により対象は不均一化し、有害事象や併存症の出現により症例毎に体内環境も変化する。本研究により、HCC 治療の選択 / 継続 / 変更の指標となりうる、特徴的かつ普遍的な免疫動態の把握を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝切除を施行した肝癌 38 例 (C 型肝炎 28 例, C 型肝炎ウイルス排除後肝癌 10 例) を対象とした。癌部と非癌部より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて免疫関連分子の発現解析を行った。次に、腫瘍浸潤免疫細胞を解析するため蛍光多重免疫染色を行った (図 1)。



(2) 2020 年 9 月から 2022 年 4 月にかけて、Atezolizumab-Bevacizumab 併用療法 (Atezo-Bev) で治療した切除不能肝細胞癌 13 例を対象とし、治療前、3 週後、効果判定時 (mRECIST で評価) に末梢血を採取した。末梢血循環腫瘍細胞 (CTC) を分離し、濃縮した細胞を CD45、CD90、CD133、Pan-CK, EpCAM, Vimentin などの細胞表面抗原を標的としたモノクローナル抗体で染色した。フローサイトメトリーにより細胞を計数した。濃縮細胞から RNA を抽出し、幹細胞マーカーなどの mRNA の発現量解析した。また、次世代シーケンサーと遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) により、幹細胞機能とがん進行に関連する 373 個の遺伝子を調査した。血清サイトカイン値を、マルチプレックス法で測定した。

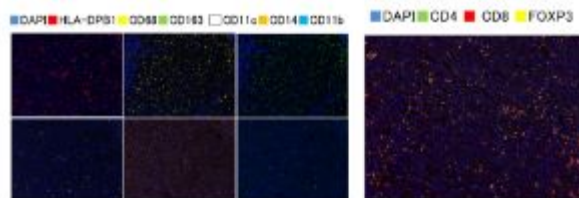


図 1. 免疫関連分子の発現解析と蛍光多重免疫染色

(3) 肝発がんにいたる背景肝の免疫学的動態解析のため、様々な原因により発症した急性ならびに慢性肝疾患の、肝組織内の免疫担当細胞の分布状況や血清サイトカイン動態を検討した。

4. 研究成果

(1) 癌部・非癌部における HLA 関連遺伝子の RNA 発現を解析した結果、非癌部においては C 型肝炎とウイルス排除後肝癌との間に差はみられなかったが、癌部においては HLA class I、class II とともにウイルス排除後肝癌で発現が有意に低下していた (class I; 549 vs 320,  $p < 0.001$ , class II; 324 vs 93,  $p < 0.001$ , 図 2)。さらに癌部の CD4、CD8、CD68、FoxP3 発現についてもウイルス排除後肝癌で有意に低下していた。これらの発現の違いについて、計 9 種類の抗体

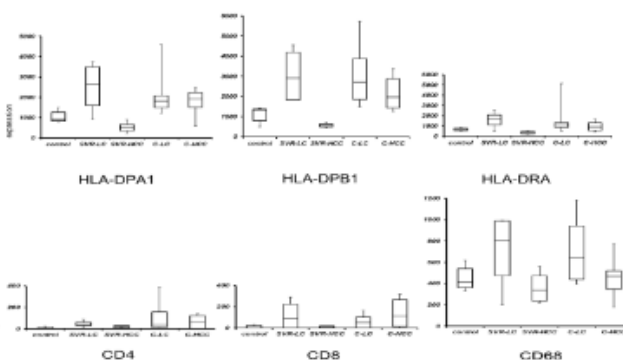


図 2. HCV 感染状態と HCC 癌部の HLA class II 分子・免疫担当細胞発現の関連解析

(HLA-DPB1, CD68, CD163, CD11c, CD11b, CD14, CD4, CD8, FoxP3)による蛍光多重免疫染色で解析したところ(事前の検討によりPD-L1解析は見送った)C型肝癌の癌部ではHLA-DPB1陽性かつCD68, CD163陽性を示すM2マクロファージとFoxP3陽性CD8細胞が多く浸潤しており、ウイルス排除後肝癌ではこれらの免疫抑制性細胞の腫瘍内浸潤が有意に低下していた。

(2)PR/SD群のCTC数の中央値は、治療前と比較して減少した(141 ± 43 vs. 58 ± 6, p < 0.05)一方、PD群では有意な変化は見られなかった。CTC数のサブタイプ解析では、PR/SD群でVimentin陽性CTCが減少していた。CTCのRNA発現解析では、CD90, CD133, 幹細胞マーカー(SOX2, c-Myc, NANOG)がPR/SD群で減少し、PD群で増加した。CTCのターゲットRNA-Seq解析では、PD群のCTCではTGF-βとMAPKのシグナル伝達経路が有意に濃縮されていることが示された。48種類のサイトカインでは、Atezo-Bev中のすべての時点で、PD群の血清HGFおよびM-CSF濃度が高値だった。

(3)COVID-19に伴って肝障害を発症した症例における肝内微小環境を解析した結果、門脈域の高度な成熟CD4/CD8陽性T細胞浸潤と類洞の拡張、肝細胞の小滴性脂肪変性を呈していたことが示された。また、肝酵素の経時変化と一致した血清IL-6, IL-10, TNF-αの推移が確認された(図3、4)。

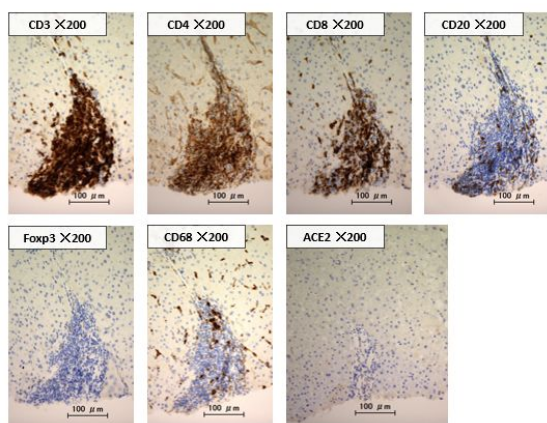


図3. COVID-19肝障害症例における肝組織中の免疫担当細胞の分布

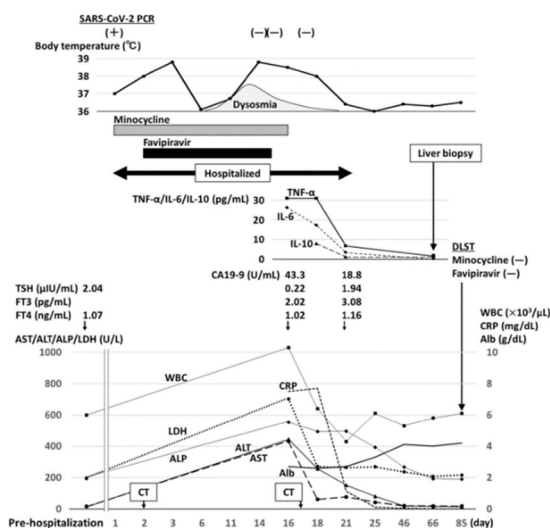


図4. COVID-19肝障害症例における血清サイトカイン動態

(4)異常の研究過程より、C型肝癌では腫瘍内にHLA分子を発現するM2マクロファージやFoxP3陽性のCD8細胞が浸潤することにより免疫抑制性の微小環境が形成されていたが、ウイルス排除後肝癌ではこれらの特徴は明らかではないことが示唆された。また、肝癌複合免疫療法におけるCTC数や幹細胞関連遺伝子の発現変化が治療効果を反映することが示された。さらに、幹細胞シグナル経路の亢進や血清サイトカイン値の推移から幹細胞性ががん進展と関連することが示唆された。CTCの幹細胞性は治療効果やがん進展の予測に有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuda Hidetaka, Nosaka Takuto, Hiramatsu Katsushi, Takahashi Kazuto, Naito Tatsushi, Ofuji Kazuya, Ohtani Masahiro, Imamura Yoshiaki, Iwasaki Hiromichi, Nakamoto Yasunari	4. 巻 16
2. 論文標題 Histology and cytokine levels in hepatic injury accompanying a case of non-severe COVID-19	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 270 ~ 278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-023-01755-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 村田陽介, 野阪拓人, 内藤達志, 高橋和人, 大藤和也, 松田秀岳, 大谷昌弘, 平松活志, 中本安成
2. 発表標題 肝細胞癌に対するアテゾリズマブ+ベバシズマブ併用療法と肝動脈化学塞栓療法でのCirculating tumor cellにおける幹細胞マーカーの比較検討
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Murata Y, Nosaka T, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nakamoto Y
2. 発表標題 Comparison of Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Treated by Atezolizumab-Bevacizumab and Transcatheter Arterial Chemoembolization
3. 学会等名 The Liver Meeting 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 活志, 松田 秀岳, 斉藤 恭志, 野阪 拓人, 高橋 和人, 内藤 達志, 大藤 和也, 大谷 昌弘, 中本 安成
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス排除後肝癌の微小環境に関する分子免疫学的検討
3. 学会等名 第62回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田 秀岳, 野阪 拓人, 中本 安成
2. 発表標題 軽症・中等症COVID-19における肝胆道系酵素上昇の臨床的意義と肝組織所見に関する検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Murata Y, Nosaka T, Naito T, Takahashi K, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y
2. 発表標題 Stem Cell Signature of Peripheral Circulating Tumor Cells correlated with therapeutic effects of Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable HCC patients
3. 学会等名 The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 秀岳, 野阪 拓人, 中本 安成
2. 発表標題 軽症・中等症COVID-19感染病態における肝障害の臨床的意義に関する検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 秀岳, 野阪 拓人, 高橋 和人, 内藤 達志, 大藤 和也, 大谷 昌弘, 平松 活志, 中本 安成
2. 発表標題 軽症・中等症 COVID-19 治療経過中に認めた肝機能異常の臨床的意義と肝組織所見に関する 検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学第二内科 facebook  
<https://ja-jp.facebook.com/fukuininai/>

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