

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：20K17018

研究課題名（和文）CD4陽性キラーT細胞の走化性を誘導する新規肝がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel liver cancer therapy by inducing chemotaxis of CD4-positive killer T cells

研究代表者

内藤 達志（Naito, Tatsushi）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：60529329

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、免疫のヘルパー作用を有すると考えられてきたCD4陽性細胞の中で、新規に認識されつつある直接細胞傷害活性を有するCD4陽性キラーT細胞（CD4+CTL）の肝癌腫瘍組織内での動態を明らかにするものである。研究期間においてマウス肝癌細胞株BNL 1ME A.7R.1（BNL）のマウス同所性肝癌モデルを確立した。同時7色の多重染色を行えるTSA免疫組織化学染色を用いて、CD4+CTL、CD8+CTL、ヘルパーT細胞、制御性T細胞、マクロファージといった免疫細胞の腫瘍内局在とポピュレーションを解析した。また、背景肝と肝癌でのT細胞の局在の違いを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌腫瘍組織において背景肝と腫瘍部で異なる免疫細胞が分布していることが明らかとなった。T細胞およびマクロファージにおいても、腫瘍の進展と制御において形態・役割の異なった細胞が存在し関与していることが示唆された。白血球を遊走させるケモカインを制御することで、癌部にCD4+CTLを誘導するという新たな治療戦略が考えられる。本研究成果は、再発を繰り返す予後不良な癌腫である肝細胞癌において新規の抗癌治療法の確立に寄与するという社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the dynamics of CD4+ killer T cells (CD4+CTL) with direct cytotoxic activity in hepatocellular carcinoma tumor tissue, a newly recognized class of CD4-positive cells that have been considered to have helper activity in immunity. During the study period, we established a mouse orthotopic hepatocellular carcinoma model using the mouse hepatoma cell line BNL 1ME A.7R.1 (BNL). Using TSA immunohistochemical staining, which allows simultaneous 7-color multiple staining, we analyzed the intratumoral localization and population of immune cells such as CD4+CTLs, CD8+CTLs, helper T cells, regulatory T cells, and macrophages. In addition, differences in T cell localization between background liver and hepatocellular carcinoma were identified.

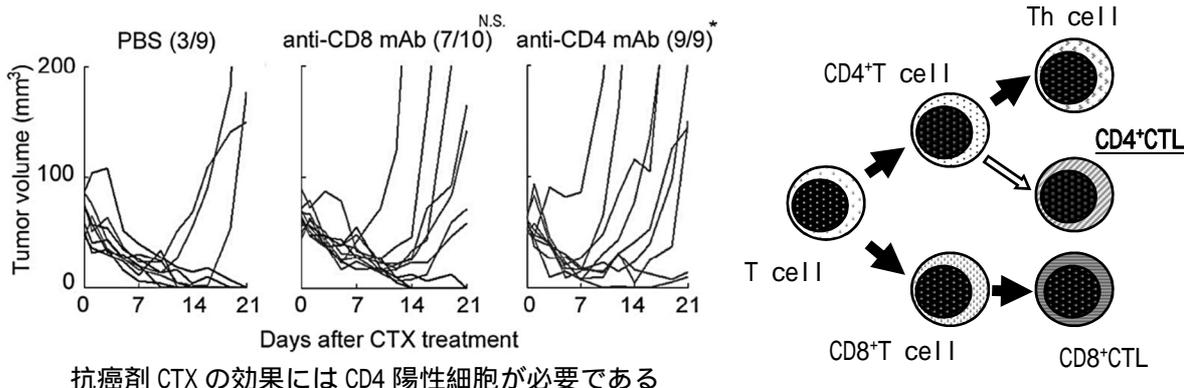
研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CD4陽性キラーT細胞 肝癌 ケモカイン 多重染色 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は再発を繰り返す予後不良な癌腫であり、集学的治療の開発が望まれている。一方、近年 CD4 陽性 T リンパ球のサブセットのうち、ヘルパー T 細胞とは異なり細胞傷害活性を有する CD4 陽性キラー T 細胞 (CD4+CTL) の存在が注目されている。しかしながら実際の腫瘍の増大・進展に CD4+CTL が与える影響に関して、他の免疫担当細胞との関連を含めて明らかにしたものはなかった。

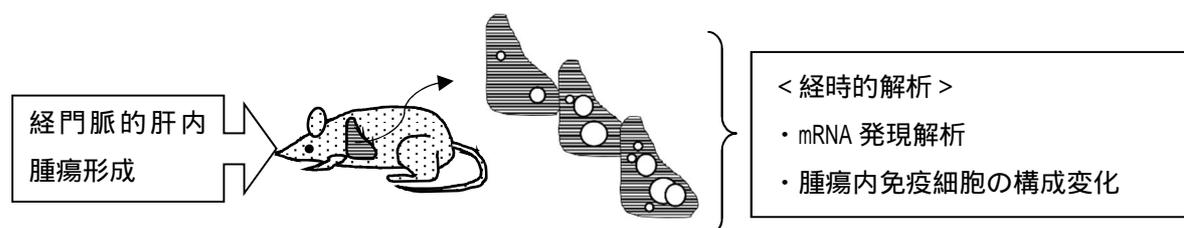


2. 研究の目的

本研究では、マウス同所性肝細胞癌モデルとヒト肝細胞癌組織を用いて、CD4+CTL の動態を経時的に解析する。さらに、ケモカイン CCL3 による CD4+CTL を介した抗腫瘍活性の増強効果を明らかにする。これによりケモカイン制御による新規の抗癌治療の確立が期待できる。

3. 研究の方法

- (1) 同時 7 色の多重染色を行える TSA 免疫組織化学染色を用い、CD4+CTL、ヘルパー T 細胞、Treg、CD8+CTL、マクロファージといった免疫細胞の腫瘍内局在とポピュレーションの変化を一枚の切片上で網羅的かつ定量的に解析する。
- (2) 種々の大きさの患者肝癌組織を用いてヒト腫瘍内でも CD4+CTL および他の免疫細胞の動態を 7 色多重免疫染色で明らかにする。
- (3) マウスに CTX、白金製剤、5-FU による抗癌化学療法を行い、腫瘍内の免疫細胞の割合の変化を観察する。
- (4) マウス、ヒトの上記肝癌組織に対して RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的にケモカイン、免疫関連遺伝子の発現を解析する。
- (5) 申請者がこれまでに同定したケモカイン CCL3 を腫瘍へ局所投与し、腫瘍容量、腫瘍数を計測し、さらに腫瘍内での CD4+CTL およびその他の免疫細胞の動態を観察する。



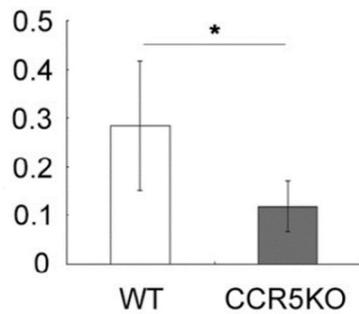
4. 研究成果

本研究では、マウス同所性肝細胞癌モデルとヒト肝細胞癌組織を用いて、CD4+CTL の動態を経時的に解析した。さらに、ケモカイン CCL3 による CD4+CTL を介した抗腫瘍活性の増強効果を明らかにする。これによりケモカイン制御による新規の抗癌治療の確立を目指した。

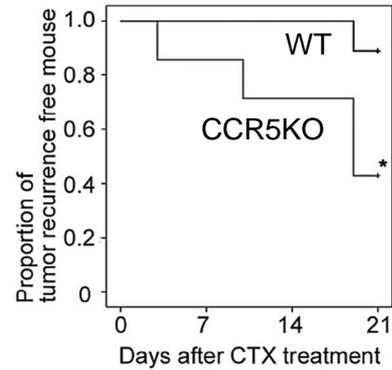
- (1) マウスの門脈よりマウス肝癌細胞株 BNL 1ME A.7R.1 (BNL) を注射することで、マウス同所性肝癌モデルを確立した。
これによって、経時的に肝腫瘍と周囲肝組織を採取し、CD4+CTL およびその他の免疫細胞の局在性と構成細胞の変化に関して、腫瘍進展の各経過において検討ができるようになった

た。

・腫瘍内における CD4+CTL の割合 (%)



・CCR5 欠損マウスと野生型マウスに対する
抗癌剤 CTX 治療後の肝癌再発



<CCR5 受容体 (CCR5) 欠損マウスでは腫瘍内 CD4+CTL が減少し、治療後再発が多い>

- (2) ヒト肝癌患者切除標本組織に関して、同時 7 色の多重染色を行える TSA 免疫組織化学染色を用いて、CD4+CTL、CD8+CTL、ヘルパー T 細胞、制御性 T 細胞 (Treg)、マクロファージといった免疫細胞の腫瘍内局在とポピュレーションを解析した。
- (3) 肝癌領域と背景肝で CD4 と CD8 陽性細胞の局在に差異があることが分かった。
- (4) 肝内には形態の異なる 2 種のマクロファージが存在していることが判明し、それらの局在の違いから、それぞれが肝腫瘍進展に異なる役割を有している可能性が示唆された。
- (5) さらに、肝癌治療中の患者血中の循環腫瘍細胞を検討したところ、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) による治療効果の有効性の有無により症例を分類した際、ICI 投与前後の循環腫瘍細胞に差異があることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naito Tatsushi, Nosaka Takuto, Takahashi Kazuto, Ofuji Kazuya, Matsuda Hidetaka, Ohtani Masahiro, Hiramatsu Katsushi, Imamura Yoshiaki, Ishizuka Tamotsu, Nakamoto Yasunari	4. 巻 14
2. 論文標題 A case of immune checkpoint inhibitor-related colitis with a distinctive endoscopic finding of colonic pseudolipomatosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1431 ~ 1436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-021-01459-7	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 該当する

1. 著者名 Naito Tatsushi, Nosaka Takuto, Takahashi Kazuto, Ofuji Kazuya, Matsuda Hidetaka, Ohtani Masahiro, Hiramatsu Katsushi, Imamura Yoshiaki, Yamauchi Takahiro, Nakamoto Yasunari	4. 巻 15
2. 論文標題 Successful early diagnosis of monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma manifesting as chronic diarrhea and hypokalemia using video capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 913 ~ 919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01676-8	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤達志, 平松活志, 中本安成
2. 発表標題 新生児・乳児消化管アレルギーの診断における内視鏡検査の意義
3. 学会等名 第107回 消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsushi Nait, Katsushi Hiramatsu, Yasunari Nakamoto
2. 発表標題 Usefulness of DBE EN-580XP, a slim double-balloon endoscope, in pediatric colonoscopy
3. 学会等名 第101回 日本消化器内視鏡学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内藤達志, 平松活志, 中本安成
2. 発表標題 大腸内視鏡検査におけるAIを用いたレポート作成支援システム (AR-C1) の有用性の検討
3. 学会等名 第101回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2022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

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