

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20804

研究課題名(和文) 循環腫瘍細胞由来オルガノイドを用いた肝細胞癌完全個別化がんワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer vaccine therapy for hepatocellular carcinoma using circulating tumor cell-derived organoids

研究代表者

真島 宏聡 (Mashima, Hiroaki)

広島大学・医系科学研究科(医)・専門研究員

研究者番号：90907057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌患者の末梢血中に存在する循環腫瘍細胞からオルガノイドを樹立し、そのオルガノイドを樹状細胞ワクチンのがん抗原として応用するがんワクチン療法の開発に取り組んでいる。我々は肝細胞癌の約8割に発現しているGlypican-3を標的とした循環腫瘍細胞の検出法をこれまでに確立しており、本研究においても引き続き多くの症例を集積し、肝細胞癌の予後因子として循環腫瘍細胞の有用性をより確たるものとしている。一方、循環腫瘍細胞の培養・増殖にはまだ至っておらず、今後は検出法・培養法を見直しオルガノイドの樹立を目指していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は根治的手術が達成されても再発する可能性が高い疾患であり、現在も再発リスクの評価方法や再発抑制のための新規治療の開発が求められている。本研究では患者末梢血中の循環腫瘍細胞の存在の有無が術後の生存率・再発率の予測に有用であることが示された。循環腫瘍細胞をがんワクチンに応用することができれば、個々の患者の現在の癌の性質に対応した新規がん治療の開発が期待され患者の予後改善に寄与できる可能性があるため、引き続き研究に取り組んでいきたい。

研究成果の概要(英文)：We have aimed to develop a cancer vaccine therapy for hepatocellular carcinoma using circulating tumor cell-derived organoids. We previously reported that the presence of Glypican-3 expressing circulating tumor cells in peripheral blood is one of the independent prognostic factors for patients of hepatocellular carcinoma, and it has become more certain in this research. However, it is still challenging to establish circulating tumor cell-derived organoids due to the limited number of recovered cells from peripheral blood, leading to difficulty for stable cell culture. To overcome such issues, it is necessary to revise the methods of detection method of circulating tumor cells to obtain sufficient number of cells for stable culture. Furthermore, establishment of a cell culture method condition specialized for organoid is also needed.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 がん免疫 がん免疫療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝切除手術手技の進歩やウイルス性肝炎治療の発展により肝細胞癌の治療成績は向上しつつあるが、依然として高い再発率が課題である。また有効な化学療法のレジメンも少なく、他臓器癌に比べ治療選択肢が限られており、がんワクチンを含むがん免疫療法の肝細胞癌の新たな選択戦略として期待されている。樹状細胞ワクチン療法は様々な癌腫において有効性と安全性が報告されているがん免疫療法である。肝細胞癌においても新規治療法としての可能性が期待されているが、十分な臨床効果がまだ得られていない。その原因として、これまでに同定された肝細胞癌のがんワクチン療法の標的となる抗原の種類が限られていることや、肝細胞癌は heterogeneity (不均一性) が高い癌腫であるため、単一もしくは少数の抗原を標的としても十分なワクチン効果を得難い可能性が考えられる。また、少数の抗原を標的としてもがん免疫逃避機構によりワクチン効果が減弱してしまうことが予想される。そもそも、標的となりうる抗原を発現していない腫瘍に対しては有効な免疫応答を誘導することができない。これらの課題を克服するために、我々は樹状細胞に負荷する抗原の種類に着目した。樹状細胞ワクチンのがん抗原として腫瘍細胞自体を樹状細胞に取り込ませる手法は過去に報告されている。腫瘍細胞そのものを抗原ソースとして用いることで、まだ同定されていないがん共通抗原のみならず、患者固有の遺伝子変異に由来するがん新生抗原を含めた多種多様な抗原に対する免疫誘導が期待でき、肝細胞癌のような heterogeneity が高い癌腫に対してはより効果的なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

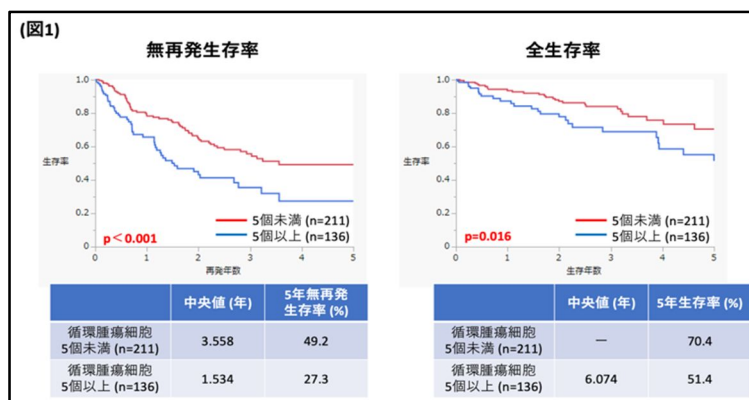
腫瘍細胞を樹状細胞に負荷するためには針生検や切除手術などで腫瘍組織を採取する必要がある。これらの処置は比較的高侵襲であり、患者に種々の合併症のリスクが生じる。また、腫瘍の部位によっては組織の採取自体が不可能となる。近年、腫瘍組織から血液中に侵入し全身を循環することでがんの転移や再発に寄与するとされる「循環腫瘍細胞」の存在が注目されており、予後や治療効果判定の新規バイオマーカーとしての有用性が肝細胞癌を含む複数の癌腫で報告されている。循環腫瘍細胞はがんの分子生物学的特徴や遺伝子変異など、個々の患者の現在のがんの特徴をリアルタイムで反映する有用な情報源であるとされている。循環腫瘍細胞をがん抗原として樹状細胞に取り込ませることができれば、がん共通抗原から患者固有の遺伝子変異に由来するがん新生抗原まで、多種多様な抗原に対して免疫応答を誘導可能なリアルタイム・完全個別化がんワクチン療法の開発が可能なのではないかと考えた。循環腫瘍細胞から腫瘍組織を得ることが可能となれば、組織採取による患者への侵襲も低減される。本研究では、肝細胞癌患者の末梢血中から採取した循環腫瘍細胞を培養・増殖させる方法の確立、および樹立した腫瘍組織を樹状細胞ワクチンに応用した新規がんワクチン療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、肝細胞癌の約8割に発現している膜糖タンパクであり、がん共通抗原としても注目される Glypican-3 を標的として、磁気活性化細胞選別による肝細胞癌患者の血液中の循環腫瘍細胞の検出法を開発した(文献1)。本手法により得られた循環腫瘍細胞は、肝細胞癌に対する肝切除の予後予測のバイオマーカーとして有用である可能性を示した。本研究においても同様の手法にて肝細胞癌患者の血中循環腫瘍細胞を検出し、臨床病理学的因子や肝切除術後の予後との関連を引き続き検討するとともに、循環腫瘍細胞を血中から分離・回収し培養することで、循環腫瘍細胞から腫瘍組織(オルガノイド)を作成することをヒトおよびマウスモデルで試みた。

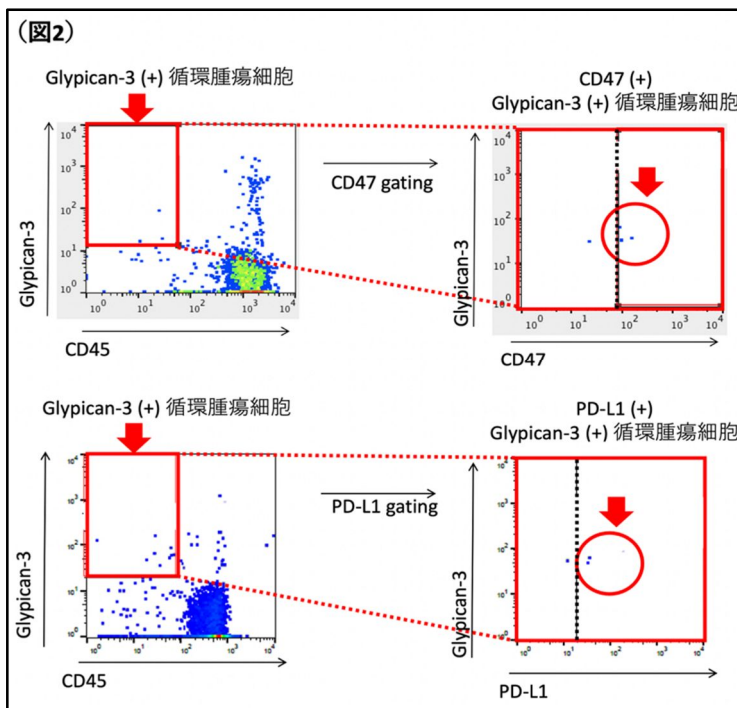
4. 研究成果

肝細胞癌に対して初回肝切除を実施した患者を対象とし、術前の末梢血中の循環腫瘍細胞の存在と予後の関連を検討したところ、循環腫瘍細胞が多く存在する患者は術後の全生存率・無再発生存率とも有意に不良であり、循環腫瘍細胞の存在は肝細胞癌術後の独立した予後不良因子であった(図1)。この結果は、過去の我々の報告(文献1)における結果をより強固にするものであった。循環腫瘍細胞は免疫機構から逃避することで全身を循環しがんの再発・転移に寄与している可能性が示唆されている。そこで、PD-1/PD-L1系や SIRP /CD47系といった免疫逃避に関連し



た細胞表面分子の発現についても検討を進め、がんの進展における循環腫瘍細胞の役割についての解明を目指している(図2)。

一方、分離した循環腫瘍細胞の培養・増殖が困難であり、循環腫瘍細胞由来オルガノイドの樹立には未だ至っていない。その原因としては、現在の手法で検出される末梢血中の循環腫瘍細胞の頻度が数個/8ml程度と少数であるため、安定して培養・増殖させることが困難である可能性が考えられる。また、磁気活性化細胞選別による分離過程で細胞に種々の負荷・修飾がかかり、増殖能が低下している可能性が考えられた。そこで、マウスでも循環腫瘍細胞モデルの構築を試みた。C57BL/6マウスのコリン欠乏高脂肪食による肝癌



自然発癌モデルや、マウス肝癌細胞株 Hepa1-6 の尾静脈注射や肝臓局所注入(もしくは腫瘍切片の移植)により担癌マウスを作成。緑色蛍光タンパク質や上皮細胞接着分子 EpCAM など、磁気活性化細胞選別に依存しないマーカーを標的としたマウス循環腫瘍細胞の検出・分離方法について検討中である。また、遺伝子導入により Hepa1-6 に Glypican-3 を強制発現させた細胞株を作成し、マウスでの Glypican-3 を標的とした循環腫瘍細胞モデルの作成も試みている。他癌腫で循環腫瘍細胞から腫瘍オルガノイドを作成した過去の報告では従来の 2 次元での培養ではなく 3 次元培養が用いられており、培養の際の基質や添加する種々の成長因子など、細胞培養条件についても今後検討が必要である。

循環腫瘍細胞からがんオルガノイドを作成することができれば、がんワクチン療法に応用し肝細胞癌の治療成績を向上させる新規がん治療法の開発や、がんの転移・免疫逃避メカニズムの解明にもつながる可能性があるため、引き続き研究に取り組んでいきたい。

(文献)

1. Hamaoka M., et al. Clinical significance of glypican-3-positive circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma patients: A prospective study. PLoS One. 2019 May 29;14(5):e0217586. doi: 10.1371/journal.pone.0217586. eCollection 2019.

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