

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20804

研究課題名（和文）MYC遺伝子関連肝臓における癌免疫微小環境の解析と革新的治療の開発

研究課題名（英文）The tumor microenvironment and the novel therapy of MYC-associated hepatocellular carcinoma

研究代表者

谷合 智彦（Taniai, Tomohiko）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60961860

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）：申請者は統合ゲノム解析の結果に基づき、マウス肝細胞癌株にてTrp53ノックアウト、MYC強制発現を行い、高悪性度肝細胞癌株を作製した。同細胞株は細胞周期異常増殖性の増強を示唆する所見がin vitroの実験で確認され、同細胞株の同種移植マウスモデルにて、高度な増殖性を有する腫瘍が形成された。同腫瘍を摘出し、各種免疫染色を施行したところ、MYC強制発現肝細胞癌は免疫抑制性の癌免疫微小環境を有し、その原因としてVETCと呼ばれる構造が関係しており、レンバチニブによってVETCを制御することで免疫チェックポイント阻害剤の奏功に寄与す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

本研究はMYC過剰発現を特徴とした予後不良な肝細胞癌の癌免疫微小環境の詳細およびその形成過程について明らかにした。また、同腫瘍が示すvessels encapsulating tumor clusters (VETC) と呼ばれる特徴的な異常腫瘍血管構造の形成をレンバチニブが制御する可能性があり、それに伴い免疫不応答な癌微小環境を免疫応答性へと改善させ、免疫チェックポイント阻害剤の奏功改善に寄与する可能性があることを示した。

研究成果の概要（英文）：Based on comprehensive genome and transcriptome analysis, we established aggressive subtype hepatocellular carcinoma (HCC) cell line by tro53 knockout and MYC overexpression. This cell line showed abnormal cell cycle, and syngeneic mice model showed rapid tumor progression. We performed immunohistochemistry for resected tumor. It revealed immune-cold tumor microenvironment and abnormal vessel structure named vessels encapsulating tumor clusters (VETC). We also performed treatment of lenvatinib for this tumor. Lenvatinib disrupted the formation of VETC and induced tumor infiltrating lymphocytes. These results indicated that MYC-associated hepatocellular carcinoma showed immune-cold tumormicroenvironment, and lenvatinib may regulate the formation of VETC, resulting in the improvement of the efficacy of immune checkpoint inhibitors.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 癌微小環境 複合免疫療法

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の分子生物学的特徴が統合ゲノム解析により明らかにされつつある。近年、肝細胞癌が MS1-3 の 3 つのサブタイプに分類され、中でも MS1 は P53 変異、MYC 経路の活性化を特徴とする予後不良なサブタイプであることが報告された (EBioMedicine. 2019;40:457-70.)。MYC は種々の癌で予後不良因子として知られるがん遺伝子の 1 つであり、肝癌においても MYC の増幅が造腫瘍性に関与することが報告されている (Hepatology. 2021;74:1932-51.)。しかし、MYC 遺伝子関連肝癌の癌免疫微小環境の詳細は明らかにされておらず、依然として予後不良である肝細胞癌において癌免疫微小環境の解明は喫緊の課題である。我々は MYC 遺伝子関連肝癌を模倣するモデル細胞株を作製するため、統合ゲノム解析の結果をもとに、C57BL/6 マウス由来の肝細胞癌株に対して、Trp53 ノックアウト株およびさらに MYC を強制発現させた株を樹立した。作製株はオリジナル株に比べ、核内に複数の核小体が密に存在しており、細胞分裂の亢進が示唆された。同細胞株の細胞周期をフローサイトメトリーで解析すると、作製株はオリジナル株に比べ S 期、G2/M 期の細胞数が増加しており、細胞周期が亢進していた。以上から、作成株は造腫瘍性の高い細胞株であることが示唆された。作製株をヌードマウスに皮下移植し、造腫瘍性を確認した後、腫瘍から初代培養にて樹立した細胞株を同系統 C57BL/6 マウスに皮下移植したところ、高度な造腫瘍性を有する腫瘍が形成されることを確認した。

また、肝細胞癌において複合免疫療法が近年使用されているが、癌免疫微小環境に及ぼす分子生物学的影響の詳細は未解明である。複合免疫療法は一部の症例において劇的な奏功を示す一方、奏効率はおよそ 30% (N Engl J Med. 2020;382:1894-905.)と、未だ十分ではない。複合免疫療法の奏効率の改善には、複合免疫療法が癌免疫微小環境に及ぼす分子生物学的影響の解明が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合ゲノム解析の結果をもとに、Trp53 ノックアウト、MYC 強制発現にて高悪性度肝癌のモデル細胞株を樹立し、同腫瘍の癌免疫微小環境の解明および複合免疫療法が癌免疫微小環境に及ぼす分子生物学的影響について明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、以下のステップにて MYC 遺伝子関連肝癌のモデルを作製し、同モデルにおける癌免疫微小環境を解明した。

- (1) 遺伝子編集による MYC 遺伝子関連肝癌モデル細胞株の作製
- (2) モデル細胞のマウス皮下腫瘍における造腫瘍性の確認と癌免疫微小環境の評価
- (3) 網羅的解析による造腫瘍性に起因する標的因子の同定
- (4) 標的因子ノックアウト株の作製
- (5) (4)作製株のマウス皮下腫瘍における造腫瘍性の確認と癌免疫微小環境の評価
- (6) (1), (4)作製株のマウス皮下腫瘍に対する複合免疫療法の奏功と癌免疫微小環境の評価

4. 研究成果

申請者は統合ゲノム解析の結果に基づき、マウス肝細胞癌株にて Trp53 ノックアウト、MYC 強制発現を行い、高悪性度肝細胞癌株を作製した。

同細胞株は細胞周期異常や核小体異常といった増腫瘍性の増強を示唆する所見が *in vitro* の実験で確認され、同細胞株を同系統 C57BL/6 マウスに皮下移植したところ、高度な増腫瘍性を有する腫瘍が形成されることを確認した。

上記の腫瘍を摘出し、癌免疫微小環境について各種免疫染色を施行したところ、同腫瘍内部には CD3、CD8 陽性細胞といった T 細胞は乏しく、Arginase-1 陽性の M2 マクロファージが豊富に存在することが確認され、同腫瘍が免疫抑制性の癌免疫微小環境を有することが示唆された。また、CD31 にて血管内皮細胞を染色すると、vessels encapsulating tumor clusters (VETC) と呼ばれる、癌細胞を血管内皮細胞が取り囲む構造を形成していた。VETC と癌免疫微小環境との関連を評価するため、経時的にマウスの皮下腫瘍を摘出したところ、移植後 14 日の時点では VETC は形成されておらず、腫瘍内のリンパ球も豊富に存在していたが、移植後 21 日においては、VETC の形成を認め、腫瘍内のリンパ球はほとんど確認されなかった。以上から、VETC の形成と免疫抑制性の癌免疫微小環境の関連が示唆された。

さらに、同皮下移植モデルに対して、レンバチニブによる治療実験を行ったところ、治療群の摘出検体では VETC が消失し、腫瘍内に T リンパ球が確認され、免疫チェックポイント阻害剤の奏功が期待された。

オリジナル株と作製株を RNA シークエンスで解析することで、造腫瘍性に起因する標的因子 X を同定した。因子 X をノックアウトすると、レンバチニブ投与時と同様に VETC 構造が消失し、腫瘍浸潤リンパ球の誘導を認めた。

以上の実験から、MYC 強制発現肝細胞癌は免疫抑制性の癌免疫微小環境を有し、その原因とな

して VETC と呼ばれる構造が関係している可能性が示唆された。また、レンパチニブや遺伝子 X の制御によって VETC 構造を破壊することで、腫瘍浸潤リンパ球を誘導し、免疫不応答な癌免疫微小環境を免疫応答性に改善させることで免疫チェックポイント阻害剤の奏功に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taniai Tomohiko, Furukawa Kenei, Haruki Koichiro, Yanagaki Mitsuru, Hamura Ryoga, Akaoka Munetoshi, Tsunematsu Masashi, Onda Shinji, Shirai Yoshihiro, Uwagawa Tadashi, Ikegami Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Multimodal Management for Refractory Biliary Stricture After Living Donor Liver Transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2023.04.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniai Tomohiko, Haruki Koichiro, Furukawa Kenei, Yanagaki Mitsuru, Hamura Ryoga, Akaoka Munetoshi, Tsunematsu Masashi, Onda Shinji, Shirai Yoshihiro, Uwagawa Tadashi, Ikegami Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Open Thoracic Drainage Followed by Proximal Splenic Artery Embolization for Massive Hydrothorax Before Living Donor Liver Transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation Proceedings	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transproceed.2023.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniai Tomohiko, Furukawa Kenei, Igarashi Yosuke, Shirai Yoshihiro, Haruki Koichiro, Onda Shinji, Iwase Ryota, Matsumoto Michinori, Fujioka Shuichi, Ikegami Toru	4. 巻 49
2. 論文標題 Dynamics of the prognostic nutritional index in preoperative chemotherapy in patients with colorectal liver metastases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 101966 ~ 101966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.suronc.2023.101966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 谷合智彦, 島田 周, 秋山好光, 椛島綾乃, 下川雅弘, 八木宏平, 赤星径一, 春木孝一郎, 田邊 稔, 池上 徹, 田中真二
2. 発表標題 肝細胞癌におけるVETC/MTMの臨床的意義とマウスモデルを用いた免疫療法奏功の検討
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷合智彦, 島田 周, 秋山好光, 樺島綾乃, 下川雅弘, 田中真二
2. 発表標題 予後不良型肝細胞癌における免疫微小環境の解明と免疫療法奏効の検討
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷合智彦, 春木孝一郎, 古川賢英, 白井祥睦, 安田淳吾, 恩田真二, 恒松 雅, 五十嵐陽介, 坂本太郎, 後町武志, 松本倫典, 池上 徹
2. 発表標題 Vessels encapsulating tumor clusters陽性肝細胞癌の臨床病理学的特徴と複合免疫療法奏功の可能性
3. 学会等名 第55回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiko Taniai, Koichiro Haruki, Kenei Furukawa, Mitsuru Yanagaki, Muneetoshi Akaoka, Toru Ikegami
2. 発表標題 The clinical significance and tumor microenvironment of vessels encapsulating tumor clusters (VETC)-positive hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷合智彦, 島田 周, 秋山好光, 樺嶋綾乃, 下川雅弘, 丹治芳明, 五十嵐陽介, 月原 秀, 春木孝一郎, 赤星径一, 池上 徹, 田邊 稔, 大木隆生, 田中真二
2. 発表標題 癌微小環境に着目した高悪性度肝細胞癌の分子生物学的特徴及び免疫療法の奏功
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷合智彦, 島田 周, 春木孝一郎, 秋山好光, 五十嵐陽介, 丹治芳明, 古川賢英, 後町武志, 池上 徹, 田中真二.
2. 発表標題 MTM/VETC陽性肝がんの癌免疫微小環境及び臨床的特徴とマウスモデルを用いた免疫チェックポイント阻害剤の奏功
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷合智彦, 島田 周, 秋山好光, 丹治芳明, 赤星径一, 池上 徹, 田中真二
2. 発表標題 癌微小環境に着目した進行肝細胞癌に対する免疫療法
3. 学会等名 第21回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------