

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390320

研究課題名(和文) 肝癌の微小環境における炎症の機序解明とPD-1シグナル制御による革新的治療の開発

研究課題名(英文) Microenvironment in hepatocellular carcinoma

研究代表者

調 憲 (Shirabe, Ken)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70264025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)： 肝細胞癌(HCC)は腫瘍関連マクロファージ(TAM)の集簇により悪性化していた。HCCの切除標本において、PD-L1とHLA IとTAMを検討した。PD-L1陽性HCCでは TAMが多く、PD-L1低/HLA I高発現例は予後良好で、PD-L1経路の遮断が有効な治療となる可能性がある。膵癌においては、PD-L1の発現が免疫抑制かつ上皮間葉転換と関連していることが明らかになった。

IFN感受性の肝癌細胞株を作成し、皮下腫瘍モデルを作成した。IL17KO、IFN- KOマウスを交配し、ダブルKOマウスを作成したが、IL17KO形質発現が安定せず、現在再入手の上、実験を継続中である。

研究成果の概要(英文)： We have shown tumor associated macrophage (TAM) accelerates malignant potential in hepatocellular carcinoma (HCC). Expression of programmed cell death 1 (PD L1) and human leukocyte antigen class I (HLA I) were examined in HCC in the resected specimens. PD-L1 expression was significantly correlated with TAM accumulation and the patients with PD-L1 negative and HLA I positive HCC had favorable prognosis. This suggests that blockade of PD-L1 and PD-1 pathway might be effective therapeutic strategy. In our recent study, PD-L1 expression was significantly correlated with immune suppression and epithelial mesenchymal transition of cancer cells in pancreatic cancer. To clarify the relationship among IL-17, TAM, PD-1, and PD-L1, subcutaneous tumor model, using IFN sensitive mouse HCC cell line, was established. This model was planned to be applied to IL17KO, and IFN- KO mouse. Nevertheless, IL17 expression was unstable and we have gotten new KO mouse and we have continued this experiment.

研究分野：肝臓外科学

キーワード：肝臓外科学 PD-L1 HLA I 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

われわれは腫瘍の微小環境が肝癌の進展に重要なことを報告してきた。すなわち、腫瘍局所への腫瘍関連マクロファージ(TAM)やリンパ球浸潤が重要であることが明らかになっていた。

すなわち、われわれは腫瘍関連マクロファージ(TAM)の集簇が肝細胞癌の悪性化を促進していることを肝切除による切除標本、肝移植における摘出肝において示した。

まず、TAM 集簇によって肝細胞癌の STAT3 のリン酸化がすすんでいること、それに伴う BCL2 の発現が認められ、抗アポトーシスの状態となっていることを示した。(Mano Y, ..., Shirabe K, et al. Pathobiology 2013; 80:146-54)

さらに TAM の集簇のバイオマーカーとして末梢血好中球/リンパ球比(NLR)の上昇が認められること(Mann Y, Shirabe K, ..., et al. Ann Surg 2013; 258:301-5)を示した。

さらに肝細胞癌に対する肝移植症例では TAM の集簇が肝癌再発の危険因子となること、NLR がバイオマーカーとなることを示した。さらに TAM とともに腫瘍周囲の IL17 産生細胞(Th17)の集簇が見られ、再発例では有意に末梢血における IL 17 の濃度が高いことが示された (Motomura T, Shirabe K, et al. J Hepatol 2013; 58: 58-64)。

IL-17 や PD-L1 は癌の進展に重要とされる報告がある。このような背景からがんの微小環境における TAM は免疫抑制性の微小環境の構築に働いている可能性があり、IL-17 や PD-L1 発現が癌の進展に有利な環境を助長している可能性がある。その分子機序を切除標本、マウスモデルにて検証することが本研究の目的である。

2. 研究の目的

がんの免疫抑制性の微小環境の構築における PD-L1、TAM と IL-17 の浸潤の意義とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)PD-L1、PD-1 経路をはじめとした免疫抑制系の微小環境の検討:

肝細胞癌切除標本を用いて、PD-L1 と HLA class I の発現を免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的意義と予後に与える影響を検討した。

(2)IL17 発現の意義の検討:

第一段階として TAM、PD-L1、PD 1 の連関の中における IL17 の意義を明らかにするために皮下腫瘍モデルを用いて検討する。

第一段階として、C57BL6 マウスにおける安定的な肝細胞癌の皮下腫瘍モデルを作成する。

第二段階として樹状細胞に感受性を有する安定的な細胞株を樹立する。

第三段階として IL17K0 マウスにおける樹状細胞療法の効果を検討する。

4. 研究成果

(1) PD-L1 の発現を肝細胞癌切除症例において免疫組織化学染色を用いて評価した。PD-L1 の発現は肝癌細胞に見られ、TAM の多寡と相関した。すなわち、PD-L1 高発現の腫瘍では有意に TAM の集簇が多かった。さらに PD-L1 の発現は CD3 陽性 T 細胞とは逆相関していた。これらの現象を合わせると、免疫抑制系の TAM の集簇により、肝細胞癌は PD-L1 を発現するようになり、免疫抑制性の微小環境を構成するようになることが明らかになった。現在、われわれがこの TAM の集簇が、肝細胞癌の被膜の繊維組織内に存在する myofibroblast がケモカインを介して起こっている可能性を明らかにしている(実験中)

予後の解析では PD-L1 の発現単独では予後不良因子とはならなかったが、HLA class I 発現との関連検討すると、予後に大きな差がみられた。すなわち、PD-L1 低発現、かつ HLA class I の高発現の症例の予後は他の症例と比べて有意に良好であった。したがって、PD-L1 の発現がなく、HLA class I が高発現のグループは腫瘍免疫機構が働いている可能性があると考えられる。逆に、他のグループ、とくに PD-L1 の高発現のグループでは腫瘍免疫が抑制されており、現在、注目を集めておりわが国でもある種の癌種で臨床検討がすすんでいる免疫チェックポイント阻害剤のターゲットとなる可能性がある。さらに同様の検討を膵癌症例でも行った。すなわち、膵癌の症例ではさらにいわゆる上皮間葉転換(EMT)と PD-L1 の発現が関連があることを見出している。

(2) IL-17 陽性細胞の肝癌における陽性例は肝細胞癌に対する肝移植症例の有意な予後不良因子であった(Motomura T, et al. J Hepatol 58: 58-64.)。そこで、これらの症例では Th17 細胞の浸潤、血清中の IL17 の濃度が高値症例で TAM の集簇も多かった。そこで現在、肝細胞癌の皮下腫瘍モデルを作成し、IL-17K0 マウスにおいて樹状細胞療法の効果を検討し、IL17 の微小環境における役割を明らかにする予定である。

C57BL6 マウス肝癌細胞株である Hepa1-6 を 1×10^5 マウスへ皮下注射し、繰り返し腫瘍形成を行った。5 回のマウスへの腫瘍皮下接種を繰り返すことで、約 80% の生着率をもつ細胞亜型が選択された。本細胞株は形態的にも、正常肝細胞に比べて低いいものアルブミン産生能を有しており、肝細胞由来の癌細胞の形質を保っていた。

この細胞株に樹状細胞療法を行い、安定した治療効果を認める亜型である Hepa1-6-5 細胞株を樹立した。本細胞株に対する細胞障害性 T リンパ球(CTL)アッセイを行ったところ、Hepa1-6-5 細胞株に対するマウス脾臓細胞の CTL の感作状況は 54% であった。

IL 17K0 マウスはヘテロの形質を有するマウス同志を交配し、生まれた IL 17+/+, +/-,

-/+、+/+から IL 17-/-マウスを選別する予定であったが、IL 17 の形質発現が不安定であること、交配に時間がかかることから、現在再度 IL 17K0 マウスを入手し、交配を行っているところである。動物施設に再申請し、新たな IL 17 K0 マウスを入手し、交配を行っているところである。動物施設に再申請し、新たな K0 マウスを導入したところから、最終的な結論までには至っていないが、実験を継続中である。

以上まとめると、肝細胞癌や膵癌の臨床検体を用いた検討では、免疫チェックポイントと言われる PD-L1, PD 1 経路を通じて、癌が免疫抑制性の微小環境を形成していること、この原因として腫瘍関連マクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかになった。われわれが従来報告してきた末梢血中の好中球 / リンパ球比 (NLR) 高値である肝細胞癌や膵癌においては TAM の主要内集積が推測され、PD-L1 経路を遮断する免疫チェックポイント阻害剤が治療戦略として、有用な可能性が見出された。これらの現象における IL 17 の関与についてさらに研究をすすめ、難治性癌の免疫寛容の機序を明らかにし、引いては外科手術療法の効果を高める戦略を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Umemoto Y, Okano S, Matsumoto Y, Nakagawara H, Matono R, Yoshiya S, Yamashita Y, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Harada M, Aishima S, Oda Y, Shirabe K, Maehara Y. Prognostic impact of programmed cell death 1 ligand 1 expression in human leukocyte antigen class I-positive hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. J Gastroenterol. 2015 ;50:65-75.

[学会発表](計 2 件)

1. 調憲、山下洋市、井口友宏、二宮瑞樹、池上 徹、吉住朋晴、岡野慎士、前原喜彦 第 50 回日本肝臓研究会 平成 26 年 6 月 5・6 日 京都国際会議場 シンポジウム「進行・大型肝臓に対する治療戦略」: 炎症肝臓における炎症マーカーの意義
2. 今井大祐、調憲、山下洋市、吉住朋晴、池上 徹、播本憲史、伊藤心二、武石一樹、木村光一、松本佳大、別城悠樹、王 歆林、吉田佳弘、栗原 健、富野高広、川中博文、岡野慎士、相島慎一、前原喜彦 第 36 回癌免疫外科研究会 平成 27 年 5 月 14、15 日 奄美観光ホテル、

一般演題 膵癌における間葉系形質の獲得と PD-L1 の発現に関する臨床病理学的検討

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

調 憲 (SHIRABE KEN)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号: 70264025

(2) 研究分担者

竹之山 光広 (TAKENOYAMA MITSUHIRO)
九州がんセンター臨床研究センター・その他部局等・呼吸器腫瘍科科长
研究者番号: 10309966

副島 雄二 (SOEJIMA YUJI)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 30325526

副島 雄二 (SOEJIMA YUJI)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号: 30325526

米満 吉和 (YONEMITSU YOSHIKAZU)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号: 40315065

前原 喜彦 (MAEHARA YOSHIHIKO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 80165662

吉住 朋晴 (YOSHIZUMI TOMOHARU)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号： 80363373

池上 徹 (IKEGAMI TORU)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号： 80432938

岡野 慎士 (OKANO SHINJI)
九州大学・医学研究院・准教授
(H24-H26.9)
研究者番号： 10380429

相島 慎一 (AISHIMA SHINICHI)
九州大学・医学研究院・准教授
(H24-H25)
研究者番号： 80165662

(3) 連携研究者
なし