

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791445

研究課題名(和文) 肝細胞癌のT細胞不活化経路を標的とした癌治療法の臨床導入を目的とした研究

研究課題名(英文) Research for realization of cancer therapy targeted for T cell negative pathway of hepatocellular carcinoma

研究代表者

北東 大督 (Hokuto, Daisuke)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70526821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞不活化経路の一つであるHVEMに着目した研究を行った。HVEMとはHerpesvirus-entry mediatorのことで、ウイルス感染やアレルギー、免疫に関連する因子として注目されてきた。近年、HVEMが腫瘍免疫に関与することが報告された。今回我々は肝細胞癌のHVEMの発現に着目して研究を行った。肝細胞癌のHVEMの発現は独立した予後不良因子であった。腫瘍内浸潤リンパ球とリンパ球内の細胞障害性顆粒であるグランザイムB、パーフォリンについて検討すると、HVEMの発現はこれらと逆相関した。これは肝細胞癌のHVEMの発現が腫瘍免疫に関わる腫瘍内浸潤リンパ球の活動を阻害していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Herpes virus entry mediator (HVEM) also known as TNFR superfamily 14 (TNFRSF14) is known to regulate immune response in immunity of infection, transplantation and tumor. However expression of HVEM in human cancer has not been well studied. This study aimed to clarify clinical importance of HVEM in human hepatocellular carcinoma. We studied HVEM expression in 150 HCC patients to explore its clinical relevance, prognostic value, and tumor infiltrating T cells. High HVEM expression was significantly correlated with vascular invasion, PIVKA-II level, and TNM Stage. And it was inversely correlated with tumor-infiltrating CD4, CD8 and CD45RO lymphocytes and expression of perforin, granzyme B, IFN in HCC. More importantly, the HVEM status was identified as an independent prognostic factor. Conclusion: HVEM expression in HCC induces malfunction of TILs and tumor immunity. Therefore, HVEM may be a new therapeutic target for human hepatocellular carcinoma.

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：若手研究B

キーワード：HVEM 腫瘍免疫 T細胞不活化経路 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌は癌死の中で世界第3位を占める重要な疾患である。画像診断、手術手技、血管塞栓術、ラジオ波焼灼術などの進歩により治療成績は向上しつつあるものの、いまだ十分とはいえない。特に高い再発率と、進行症例に対する有効な全身化学療法が限られていることが問題である。再発を抑制する有効な治療の開発と効果の期待できる全身化学療法が開発が望まれている。ソラフェニブが全身化学療法剤として保険適応となったが、大規模臨床試験の結果において進行・再発症例の生存期間の延長効果はわずか3か月である。また、ソラフェニブの術後補助療法としての効果は臨床試験において否定された。現存で術後補助療法として一般的に普及している薬剤はない。

(2) 今回、我々はHVEM (herpes virus entry mediator)に着目した。HVEMはTNF受容体スーパーファミリーのひとつであり、腫瘍細胞上のHVEMがT細胞上のBTLAやCD160に結合することでT細胞の機能を抑制するとされている。われわれはこの現象を食道癌において確認した。一方で肝細胞癌において腫瘍内浸潤リンパ球と予後との関連が指摘されている。われわれはこの二つの事象に着目し、肝細胞癌にHVEMが発現することで腫瘍内浸潤リンパ球が減少し予後に影響を与えるのではないかと仮説を立て、検証する実験を行った。

(3) 研究代表者が所属する奈良県立医科大学は、附属病院の消化器・総合外科において年間30例前後の肝細胞癌に対する肝切除が行われていた。研究に使用するインフォームドコンセントを得た肝細胞癌のパラフィンブロックが150例以上存在し、また新鮮凍結標本も50例程度存在した。このことから実際の臨床検体を用いた実験、及びその予後との関連をみる環境は整っており、今回化学研究費助成事業の申請をするに至った。

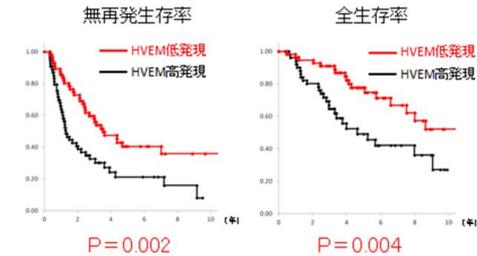
2. 研究の目的

肝細胞癌におけるHVEMの発現と臨床病理学的因子、及び予後との関連を検討する。予後と関連のある場合にはその機序についての解明、すなわち腫瘍内浸潤リンパ球との関連について検討する。また、腫瘍のHVEMの発現が独立した予後不良因子となりうるかどうかを検証し、肝細胞癌の治療選択の判断材料の一助になるかどうかを検討した。また、HVEMが肝細胞癌の新規治療のターゲットとなりうる可能性があるかどうかを検証した。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌のHVEMの発現と予後の関連を検討した。肝細胞癌の切除標本のパラフィンブロックから未染スライドを作成し抗

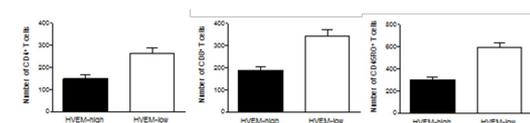
ヒトHVEM抗体にて同一条件において染色した。150症例について検討し、肝細胞癌の50%以上に発現している症例を高発現群、50%未満に発現している症例を低発現群として比較検討した。その結果、肝細胞癌の術後の無再発生存率、全生存率ともにHVEM高発現群で有意に不良であった。



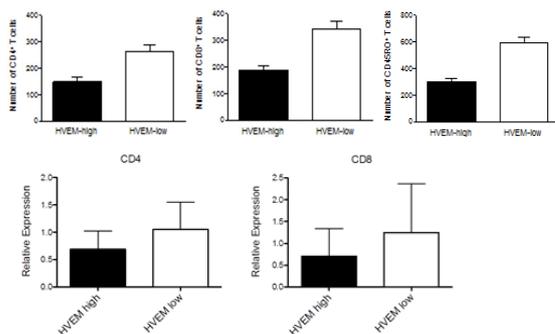
(2) HVEMの発現と臨床病理学的因子についての関連を検討した。HVEMは血中PIVKA-高値(100U/ml以上): p=0.031、脈管侵襲陽性: p=0.022、TNMのステージ(Ⅲ以上): p=0.036と有意に関連を認めた。その一方で、AFP値、腫瘍径とは関連を認めなかった。

(3) HVEMが独立した予後不良因子であるかどうかの検討を行った。今回検討した150症例における単変量解析での予後不良因子は、血中AFP高値(30ng/ml以上): p=0.021、血中PIVKA-高値(100U/ml以上): p<0.001、腫瘍径(5cm以上): p<0.001、脈管侵襲陽性: p=0.004、HVEM高発現: p=0.002であった。多変量解析を行ったところAFP高値(30ng/ml以上): p=0.050、腫瘍径(5cm以上): p=0.001、HVEM高発現: p=0.001であり、HVEM高発現が独立した予後不良因子であることが明らかとなった。

(4) HVEMの発現と腫瘍内浸潤リンパ球の関連の検討。HVEMの免疫染色を行った同部位の未染スライドにおいて、それぞれにCD4染色、CD8染色、CD45RO染色を行った。染色したスライドそれぞれにおいて腫瘍内に浸潤するリンパ球数をカウントした。その方法は200倍視野で5か所において染色された腫瘍内浸潤リンパ球数を測定し合計を比較するというものであった。結果は、腫瘍内浸潤リンパ球は、CD8陽性細胞、CD4陽性細胞、CD45RO陽性細胞いずれもHVEM高発現群で低いという結果であった。このことは、肝細胞癌のHVEMの発現がリンパ球の腫瘍への浸潤を阻害しているという可能性を示しているものと考えられた。



(5) HVEMの発現が腫瘍内浸潤リンパ球に与える影響をRNAレベルで検討した。新鮮凍結標本50症例を用いてreal-time PCR法にてCD4、CD8、IFN、パーフォリン、グランザイムBについて発現を検討した。その結果、HVEM高発現群においてはRNAレベルでのCD4、CD8、IFN、パーフォリン、グランザイムBの発現がいずれも低下していた。このことは腫瘍にHVEMが発現することで腫瘍内浸潤リンパ球数が減少するのみならず、その活性も阻害されていることを示唆する結果であると考えられた。



(6) HVEMの発現と再発形式との関連について検討した。HVEMの高発現と低発現で比較するとHVEM高発現は肝外再発、及び2年以内の早期再発の割合が有意に高かった。肝細胞癌の再発には既存病変の転移によって生じるものと、多中心性再発により別の病変が生じるものがある。2年以内の再発は一般的に既存病変の転移と考えられるので、今回の結果からはHVEMの高発現群は既存病変の転移の再発に関与している可能性が示唆された。

4. 研究成果

(1) 今回初めて肝細胞癌のHVEM発現が肝細胞癌の独立した予後不良因子であることが示された。HVEMの発現が腫瘍内へのリンパ球の浸潤、およびその活性を阻害しているということも確認できた。このことはHVEMをターゲットとした新規治療の可能性を示すものであると考えられる。具体的にはHVEMのインヒビターを用いることで腫瘍内へのリンパ球の浸潤の阻害がなくなり抗腫瘍効果が惹起される可能性が考えられる。肝細胞癌の予後に腫瘍内浸潤リンパ球が関与することは以前から報告されており、今回腫瘍に発現するHVEMがこれらを調整している可能性が確認された。

(2) HVEM高発現群の再発形態は肝外転移や2年以内の早期再発が多かった。肝細胞癌には既存病変の再発と新規病変の多中心性再発が存在する。一般的に2年以内の再発や遠隔転移は既存病変の再発であるとされ

る。肝細胞癌の再発予防において既存病変からの再発予防と新規病変の再発予防は異なる。新規病変からの再発予防は肝庇護とともにウイルス肝炎が存在する場合にはその治療、アルコール性肝炎がある場合には禁酒等が必要となる。その一方で既存病変の再発とは肝内、または肝外転移であり抗腫瘍薬が治療の中心となる。HVEMの高発現に対しては肝内・肝外転移の再発危険群として既存病変による術後補助療法、及びフォローアップ期間の短縮などの対処が望まれる。

(3) 近年、B型肝炎の急性増悪にHVEMが関与するとの報告がみられた。肝細胞癌の多くは慢性肝炎を母地として発症する。HVEM経路の阻害は肝細胞癌の治療のみならずウイルス肝炎に対しても何らかの治療効果をもたらす可能性があり、今後さらなる検討が期待される。

(4) HVEMをターゲットとした治療は肝細胞癌への治療効果、ウイルス肝炎への治療効果を検証する一方、HVEMは肺、肝、腎のほかにT細胞、B細胞、NK細胞等のリンパ組織にも発現していることが確認されている。また、そのレセプターもBTLA、CD160のほかにもLIGHTなどがある。HVEMの結合によってリンパ球に対して抑制的なシグナルを伝達する経路もあれば促進的なシグナルを伝達する経路も存在する。このことは、HVEMをターゲットとした治療は多彩な副反応を惹起する可能性があるものと考えられる。臨床応用に至るまでには様々な慎重な検証が求められる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

第112 日本外科学会 示説
ヒト肝細胞癌におけるHVEM発現の臨床病理学的意義

北東大督、庄 雅之、山田高嗣、野見武男、山戸一郎、赤堀宇広、安田里司、尾原伸作、川口千尋、金廣裕道、中島祥介

第48回 日本癌治療学会 示説
ヒト肝細胞癌におけるHVEM発現の臨床病理学的意義および獲得免疫機構との関連

北東大督、庄 雅之、山田高嗣、野見武男、山戸一郎、赤堀宇広、安田里司、尾原伸作、川口千尋、金廣裕道、中島祥介

学術論文については現在英文雑誌に投稿中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北東大督 (DAISUKE HOKUTO)

研究者番号：70526821