

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860533

研究課題名(和文) CCL1阻害剤を用いた肝細胞癌のマクロファージ治療

研究課題名(英文) The effect of CCL1 antisense ODN for monocytes from patients with hepatocellular Carcinoma on tumor progression

研究代表者

朝井 章 (Asai, Akira)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：30622146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は、様々な治療法があるにもかかわらず5年生存率は23%と非常に難治性の癌である。進行期肝細胞癌患者では末梢血において、M2b単球が優位に認められ、そのM2b単球は、肝細胞癌の増殖を抑制することができなかった。M2b単球の性状維持にCCL1が必要であることから、CCL1 antisense oligodeoxynucleotideによる遺伝子治療を行うと抗腫瘍免疫を持つM1単球を導くことが可能となった。以上のことから進行期肝細胞癌患者に対してCCL1を目標とした遺伝子治療が可能である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Despite major advances in curative and palliative approaches, hepatocellular carcinoma (HCC) is still the third leading cause of cancer-related death worldwide. M1 monocytes play a key role in host antitumor defenses in HCC. The majority of monocytes from early HCC stage patients switched to the M1 phenotype (IL-12+IL-10⁻iNOS⁺cells), whereas the majority of monocytes from advanced HCC stage patients did not switch to the M1 phenotype and continued to express M2b phenotypic properties (IL-12⁻IL-10⁺CCL1+iNOS⁻ cells). Monocytes from advanced HCC stage patients showed M1 polarization after treatment with CCL1 antisense oligodeoxynucleotide (ODN). Therefore, our study indicates that anti-HCC defenses of advanced HCC stage patients may be improved after CCL1 antisense ODN treatment.

研究分野：肝臓

キーワード：単球 肝細胞癌 CCL1

1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルス、酸化ストレスによる慢性炎が原因と考えられる肝細胞癌は、日本では4番目に多い悪性腫瘍で、年間3万5千人が死に至る難治性の癌である。外科的切除、内科的治療、放射線治療といった様々な治療を行うも、その5年生存率は23%しかなく、新たな治療法の開発が切望されている。宿主の抗腫瘍免疫を改善させる事が有効な治療方法の一つと考えられるが、担癌患者に出現するM2bMφ/単球は、腫瘍殺傷性1型細胞(CTL、NK細胞、M1Mφ)の出現を強力に妨害するので、肝細胞癌患者の腫瘍抵抗性は殆ど機能されない状態になっている。以前私達は、M2bMφから産生されるCCL1をブロックすると、そのMφがレジデントMφに先祖返りする事を見出した。

2. 研究の目的

進行期肝細胞癌に対して、その難治性から治療の新たな取り組みが必要視されている。本研究は、個体の腫瘍抵抗性を介して肝細胞癌の制御を目指すものである。担癌個体は、腫瘍免疫に対抗する細胞の宿主でもあるので、腫瘍抵抗性が機能しない。進行期肝細胞癌患者の腫瘍抵抗性を無力化する細胞が例外なくlong-life spanのM2bMφであり、M2bMφはその性状維持に自己産生CCL1が必須であるという実験成績を得ている。この成績をもとに、CCL1阻害剤でM2bMφをQuiescent Mφに先祖返りさせ、次に先祖返りしたMφを腫瘍細胞殺傷作用を有するM1Mφに誘導する事で、個体の腫瘍抵抗性が回復されると考えている。

本研究の目的は、CCL1阻害剤を使用して進行期肝細胞癌患者由来M2bMφ/単球から腫瘍殺傷能力をもつM1Mφ/単球へと導きうるかどうかである。

3. 研究の方法

Barcelona clinical liver cancer staging systemに基づき、Stage 0の早期肝細胞癌患者をGroup-1 HCC patients、Stage Aの早期肝細胞癌患者をGroup-2 HCC patients、stage Bの進行期肝細胞癌患者をGroup-3 HCC patients、Stage Cの進行期肝細胞癌患者をGroup-4 HCC patientsと定義した。

Group-2の肝細胞癌患者及びGroup-3の肝細胞癌患者各20人から得た血液より、CD14⁺細胞をmagnet分離法にて単離する。得られた単球の特性を様々な方法にて検討する。まず効果的な免疫細胞を持たないNSGマウスに各Group由来単球を移入し、さらに右大腿にHepG2細胞を移植する。その後癌の増殖を数週間にかけて比較する。

患者由来の単球に対してCD14、IL-10にて蛍光免疫染色を行なった後、顕微鏡にて観察する。また同様に単球をIL-12、IL-10、CCL17、CCL1、CXCL13にて染色したのち細胞内発現を

Flow cytometryにて調べる。また別に各groupの患者から単球を単離し、48時間培養し、その培養上清中の各種サイトカインの分泌量を比較検討する。

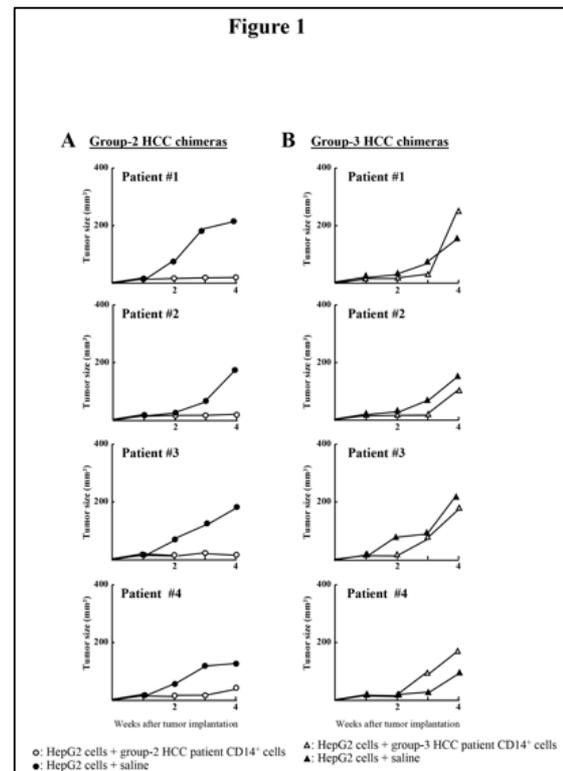
さらに単球をCpG DNAにて刺激を行なった後、HepG2細胞と共培養し抗腫瘍殺傷能を見るのとともに、mRNAを回収しM1Mφ/単球の特性であるiNOS mRNAの発現をreal time PCRにて調べる。

次に各groupから得られた単球に対して、CCL1 antisense oligodeoxynucleotides (ODN)にて治療した後、上記と同じ様に実験を行い、M1Mφ/単球に変化したかを検討する。

さらにNSGマウスに対して患者由来単球の移入とHepG2細胞の移植を行い、同マウスに対してCCL1 antisense ODNによる治療を行い、その後数週間に渡って癌の増大を比較検討する。

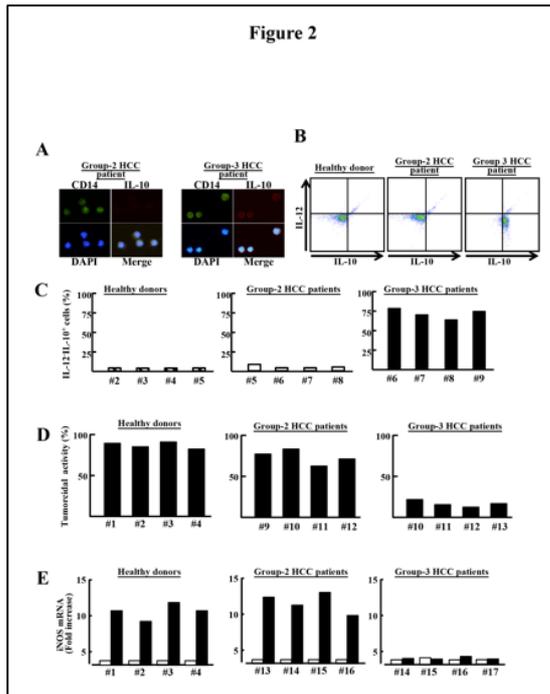
4. 研究成果

早期肝細胞癌患者由来の単球(Group-2)を移入したNSGマウスではHepG2細胞は大きくならなかったが、進行期肝細胞癌患者由来単球(Group-3)を移入したマウスでは、何も細胞を持たないマウスと同様の癌の増殖を認めた。(Fig. 1)

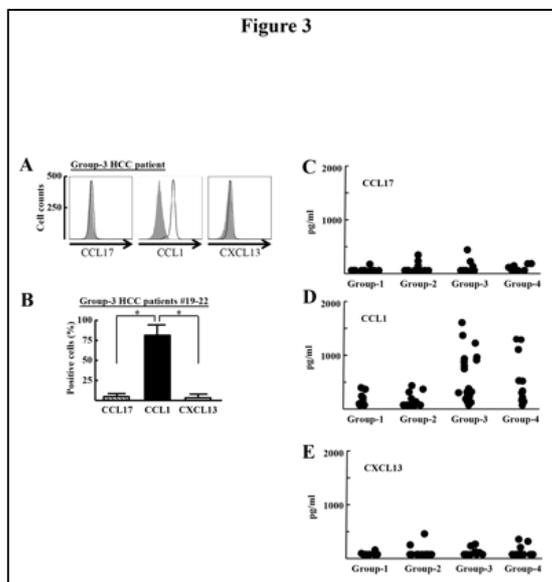


次にGroup-2とGroup-3の肝細胞癌患者由来単球の性質を免疫染色、Flowcyte metry、サイトカインの産生、腫瘍殺傷能力、iNOSの発現で調べた。その結果は、Group-2の早期肝細胞癌患者由来単球はIL-12⁻IL-10⁻細胞であり、刺激によりiNOSを発現し、腫瘍殺傷能力を獲得した。しかしGroup-3進行期肝細胞癌患者由来単球はIL-12⁺IL-10⁺細胞であり、刺

激にでも iNOS を発現せず、腫瘍殺傷能力を認めなかった。(Fig. 2)



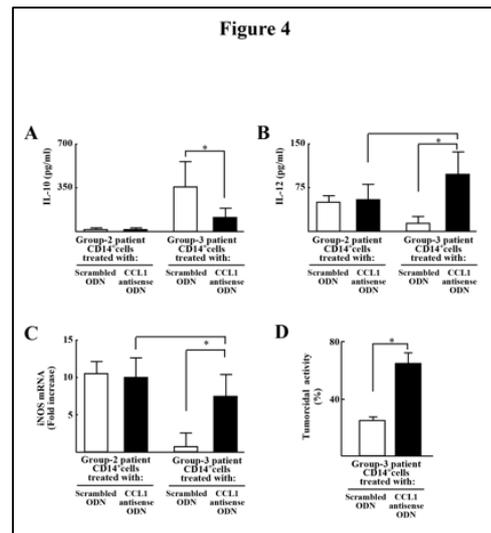
さらに各 Group のサイトカイン分泌を ELISA にて検討したところ、Group-1 と Group-2 の早期肝細胞癌患者由来単球は、IL-12⁻IL-10⁺CCL17⁺CCL1⁺CXCL13⁻細胞であった。しかし、Group-3 と Group-4 の進行期肝細胞癌は、IL-12⁺IL-10⁺CCL17⁺CCL1⁺CXCL13⁻細胞であった。(Fig. 3)



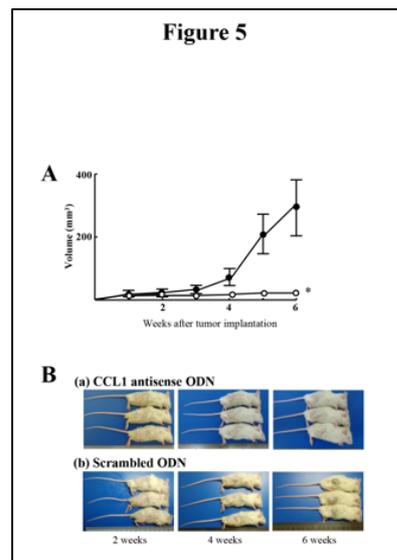
以上のことから早期肝細胞癌患者由来の単球は、quiescent 単球の性質を持つと考えられ、進行期肝細胞癌患者由来の単球は M2b 単球の性質をもつと考えられた。

次に患者由来単球に対する CCL1 antisense ODN 治療の影響を検討した。Group-2 由来単球は CCL1 antisense ODN にて刺激を行うと、IL-10 を産生する能力を消失し、刺激により IL-12 を産生し、iNOS を発現し、腫瘍殺傷能

力を獲得できる様になった。(Fig. 4)



最終的に CCL1 antisense ODN 治療がヒト化キメラマウスにて抗腫瘍効果があるかについて検討した。NSG マウスに Group-3 由来単球を移入し、さらにそのマウスに CCL1 antisense ODN による治療を行なった。その結果、CCL1 antisense ODN を投与すると癌の増殖を認めなかった。(Fig. 5)



結語

進行期肝細胞癌に対する単球を介した CCL1 antisense ODN 治療は、癌の増殖を抑制する可能性があると考えられた。

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 Akira Asai, Yusuke Tsuchimoto, Hideko Ohama, Shinya Fukunishi, Yasuhiro Tsuda, Makiko Kobayashi, Kazuhide Higuchi, Fujio Suzuki, Host antitumor resistance improved by the

macrophage polarization in a chimera
model of patients with HCC. 、
OncoImmunology、査読有、Vol. 6、No. 4、
2017 、 e1299301 、 DOI:
10.1080/2162402X.2017.1299301

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝井 章 (Akira Asai)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：30622146

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Fujio Suzuki
University of Texas Medical Branch・
Internal Medicine/Infectious Diseases・
Professor