

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15425

研究課題名(和文) Immunomeのシングルセル解析に基づいた肝癌新規分類法の確立

研究課題名(英文) New classification of hepatocellular carcinoma by single cell analysis of immunome

研究代表者

水腰 英四郎 (Mizukoshi, Eishiro)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90345611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、肝細胞癌組織浸潤免疫細胞の発現遺伝子解析によって、免疫関連分子の発現レベルが症例ごとに大きく異なっていることを明らかにした。これらの違いは、特に肝細胞癌の背景肝疾患に影響され、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)由来の肝細胞癌症例ではB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス由来の肝細胞癌に比べて、免疫関連分子の発現が低下しており、免疫細胞プロファイルにも大きな違いが認められた。また、NASH関連肝細胞癌では他の二者に比べて、腫瘍抗原特異的なT細胞のfrequencyが低く、こうしたT細胞の免疫応答は特定の免疫細胞プロファイルと相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified that the type and expression levels of immune molecules expressed in tumor infiltrating immune cells are different in each hepatocellular carcinoma (HCC) patient. We also identified that the differences are deeply associated with the etiology of HCC and the expression levels of many immune molecules in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-related HCC patients are lower than those in hepatitis B or C-related HCC patients. In addition, immune cell profiles are also different in the 3 groups. The frequency of tumor-associated antigen-specific T cells is lower in NASH-related HCC patients compared with that of other 2 groups and it is correlated with the specific immune cell profiles.

研究分野：消化器内科

キーワード：細胞傷害性T細胞 ヘルパーT細胞 免疫治療 免疫応答 T細胞レセプター 免疫細胞プロファイル
制御性T細胞 抗腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

これまで肝細胞癌(肝癌)の分類は他の癌と同様に癌細胞が形成する組織形態や癌細胞が産生する蛋白によって病理学的思考に基づいて行われてきた。一方、臨床現場では癌に対する革新的治療として、細胞内シグナル伝達を介し、癌細胞の増殖に寄与する分子や T 細胞上に存在する PD-1 や CTLA-4 といった免疫チェックポイント分子を標的にした治療などが行われるようになってきており、従来の抗癌剤による治療と比較すると、現在の癌治療は大きく変化している。特に腫瘍免疫における最新の研究報告では腫瘍内浸潤免疫細胞をはじめとする、担癌患者の免疫細胞ネットワーク(immunome)がその治療効果に深く関係することが報告されている(Science, 348:56-61, 2015.)。

これまでに我々は肝癌に特異的な腫瘍抗原とその細胞傷害性 T 細胞(CTL)エピトープを同定し、肝癌に対する免疫応答の特徴を見出してきた(Hepatology, Mizukoshi et al. 2006, 2011, 2013)。また、免疫抑制細胞として、制御性 T 細胞(Treg)や Myeloid-derived suppressor cell (MDSC)にも注目し、肝癌患者で増加していること、治療効果や患者予後と相関することを明らかにしてきた(Cancer Immunol Immunother, Mizukoshi et al. 2013)。これらの研究結果は、肝癌患者においても複雑な immunome が形成されていることを示している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、肝癌の immunome を構成する免疫細胞の種類と機能を同定し、immunome 解析に基づいた肝癌新規分類法を確立するための基盤情報を整備することを目的とした。

肝癌を癌細胞そのものではなく、immunome 構成細胞にフォーカスを当てて

研究する手法は極めて特色的であり、immunome 解析によって肝癌を分類する試みはこれまでに例がなく、本研究によって肝癌 immunome の基盤情報が整備されれば、immunome 解析によって治療効果や予後に関連する肝癌の新規分類法を確立することができると思われる。さらにこうした肝癌 immunome の基盤情報は治療アルゴリズムの作成や創薬といった臨床分野で利用できるとともに、肝発癌機構や抗腫瘍免疫機序の解明といった肝臓病学の発展にも貢献できると考えられる。近年では、分子生物学の手法が発達したことにより、ゲノム解析、メタボローム解析など新しい手法によって肝癌の特徴が明らかにされつつあるが、これらはいずれも癌細胞そのものに焦点を当てた研究である。癌細胞に直接的細胞障害活性を示す抗癌剤や分子標的薬の開発には、こうした癌細胞そのものの研究が重要である。一方、先述した PD-1 や CTLA-4 をはじめとする免疫チェックポイント分子に対する抗体治療や T 細胞レセプターを用いた新しい癌治療は、癌細胞そのものではなく、宿主の免疫系を構成する細胞に作用する薬剤や治療方法である。こうした治療は新しい機序に基づく抗腫瘍効果を有するだけでなく、癌の種類に関係なく治療効果が期待できるという点において、近年新たな癌治療のツールとして注目されている。今後こうした治療法の開発や効果予測には癌細胞そのものの研究ではなく、癌に影響を及ぼす宿主側の細胞を担癌環境において研究することが癌種によらない普遍的な手法を開発するうえで重要と考えられる。こうした考えに基づき、癌細胞を標的として解析するのではなく、癌細胞をとりまく微小環境に存在する免疫細胞にフォーカスを絞って研究を行うことによって、実臨床に有用な肝癌新規分類法を確立することを最終目標とし、本研究ではそのための基盤情報

を整備する。

本研究において、肝癌における immunome の基盤情報が整備され、予後や治療効果と関連する肝癌の新規分類法が確立された場合、これまでに行われてきた肝癌の治療体系がパラダイムシフトする可能性を有している。具体的な例として、これまで肝癌の外科的切除は肝臓の予備能が比較的保たれており、臨床病期が早期の症例を適応としていたが、immunome 解析により外科的切除後も高率に遠隔転移や肝内再発が予測される結果であった場合、外科的切除ではなく、抗癌剤や分子標的薬での治療、もしくは新規の免疫治療が選択されるようになると考えられる。本研究成果はこれまでの生命化学の研究手法では成し得なかった癌の新規分類法を確立することによって、肝発癌機構の解明・抗腫瘍免疫の理解・創薬（免疫学的機序から開発される新しい治療薬）への利用といった基礎・臨床医学への貢献が期待できる。

3. 研究の方法

本研究は以下に示すような順で実施した。

1) 腫瘍内浸潤免疫細胞をシングルセルレベルで取得し、RNA を抽出する手法を確立する。2) 取得した細胞の発現遺伝子解析により、細胞の同定ならびに機能予測を行う。3) 取得した細胞が T 細胞であった場合は、T 細胞レセプターの同定とレパートリー解析を行う。4) 癌組織全体の発現遺伝子解析データと取得細胞の種類、機能、TCR レパートリー解析結果を総合的に解析し、肝癌 immunome の全体像を明らかにする。5) 4) で得られたデータと臨床データをリンクさせ、治療効果・予後に関連する immunome の同定を行い、immunome 解析により肝癌の新規分類を行うための基盤情報を取得する。

以下に各ステップの具体的な方法を記載

する。

1) 腫瘍内浸潤免疫細胞をシングルセルレベルで取得し、RNA を抽出する手法を確立する

腫瘍内浸潤免疫細胞の取得は外科的に切除された肝癌組織検体を用いて行った。当施設で治療が施行され、末梢血免疫細胞の解析が終了し、経過観察が行われている患者のサンプルを用いた。同サンプルは本研究用に独自のプログラム設定を行った gentleMACS™ Octo Dissociator システムを用いて調整・凍結保存されており、サンプルの融解後生きた免疫細胞を回収し、使用した。ステップ1ではまずこうした既存の検体を用いて検討を行った。本ステップでは細胞分離をシングルセルで回収できるチップを用いて行った。

2) 取得した細胞の発現遺伝子解析により、細胞の同定ならびに機能予測を行う

本工程ではシングルセルから抽出した RNA から cDNA を作製し、増幅させた後、発現遺伝子解析を行った。

3) T 細胞レセプターの同定とレパートリー解析を行う

このステップでは、本研究代表者らが富山大学との共同研究により開発した、TCR の迅速クローニングシステムを使用した (Nat Med. 19:1542-1546, 2013.)。

4) 癌組織全体の発現遺伝子解析データと取得細胞の種類、機能、TCR レパートリー解析結果を総合的に解析する

腫瘍内浸潤免疫細胞の解析を行ったサンプルでは、同時に切除検体を用いて癌細胞や支持組織を含む癌組織全体のマイクロアレイによる発現遺伝子解析を行い、癌細胞の発現遺伝子を含めたデータを取得した。得られた癌組織全体の発現遺伝子情報と、同定した免疫細胞の種類ならびに機能、TCR レパートリー解析結果のデータを統合し、癌組織の発現遺伝子パターンとの関連性を

解析した。また、免疫細胞の同定に関しては遺伝子解析だけではなく、多重染色を用いたフローサイトメトリーによる測定を行った。

5) 治療効果・予後に関連する immunome の同定を行い、immunome 解析により肝癌の新規分類を行うための基盤情報を取得する 2) ~ 4) のステップで得られた解析データを患者の臨床データと統合し解析した。この臨床データには血液生化学所見のみならず、肝癌の病理検査結果、進行度、治療効果、生存期間、末梢血での免疫細胞解析結果を含み、本解析によってこれらの因子と関連する肝癌 immunome の同定を行った。最後に治療効果（術後の再発率や再発形式）・予後（無再発生存期間や全生存期間）に関連する immunome の特徴とその関連機序を明らかにし、immunome 解析による肝癌の新規分類を行うための基盤情報を取得した。

4. 研究成果

本研究では、まず外科的に切除された肝癌組織検体を用いて、腫瘍内浸潤免疫細胞をシングルセルレベルで取得し、RNA を抽出する手法を確立した。本手法を用いて腫瘍内浸潤免疫細胞の同定を行ったところ、肝癌組織内には各種表面マーカーを発現する T 細胞、NK 細胞、B 細胞等の免疫担当細胞が認められた。肝癌組織全体による発現遺伝子解析と併せて解析を行ったところ、各肝癌症例において免疫細胞由来と考えられる免疫関連分子の発現は大きく異なっており、特に肝癌の背景肝疾患に影響されるものが多かった。臨床データとの比較解析からは、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景とする肝癌において統計学的に有意な免疫細胞プロファイルの違いを認めた。特に NASH 由来の肝癌症例では他の二

者に比べて、免疫関連分子の発現が低下しており、末梢血における免疫細胞プロファイルにも大きな違いが認められた。また、腫瘍抗原に対する免疫応答の解析では NASH 関連肝癌では他の二者に比べて、抗原特異的な T 細胞の frequency が有意に低く、こうした T 細胞の免疫応答は末梢血における特定の免疫細胞プロファイルと統計学的に有意な相関を認めた。

次に腫瘍内浸潤免疫細胞のシングルセル解析の結果に基づいて行った浸潤免疫細胞の免疫染色と治療効果・患者予後との関連を解析したところ、手術後の予後や術後再発時の後治療効果と関連する腫瘍浸潤免疫細胞プロファイルを同定することができた。

さらに副次的な成果として、T 細胞レセプターの同定とレパートリー解析に関する研究では、これまでに同定したアルファフェトプロテイン (AFP) やヒトテロメラゼ逆転写酵素 (hTERT) を認識する T 細胞レセプターに関して新たなレパートリーを同定でき、その遺伝子の取得に成功した。また、本研究では新たに多剤耐性関連蛋白質 (MRP3) を認識する T 細胞レセプター遺伝子の取得に成功した。

以上の結果から本研究では、肝癌の immunome を構成する免疫細胞の種類と機能を同定し、immunome 解析に基づいた肝癌新規分類法を確立するための基盤情報を整備した。

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 3 件)

- 1) Kaji K, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Fushimi K, Nakagawa H, Yamada K, Terashima T, Kitahara M and Kaneko S. Cellular

Immune Responses for Squamous Cell Carcinoma Antigen Recognized by T Cells 3 in Patients with Hepatocellular Carcinoma. PLoS One. 12:e0170291, 2017. 査読有

- 2) Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Tamai T, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Kitahara M, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Iida N, Fushimi K, Muraguchi A and Kaneko S. Association Between High-Avidity T-Cell Receptors, Induced by -Fetoprotein-Derived Peptides, and Anti-Tumor Effects in Patients With Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology. 152:1395-1406, 2017. 査読有
- 3) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Kitahara M, Nakagawa H, Iida N, Fushimi K and Kaneko S. Myeloid-derived suppressor cells correlate with patient outcomes in hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 65:715-725, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

- 1) Seike T, Mizukoshi E, Tamai T, Terashima T, Iida N, Yamashita T, Arai K, Yamada K, Kaneko S. The CD25 expression on CD4+FoxP3-Tcells in non-alcoholic fatty liver disease. 68th AASLD, Washington D.C, USA, 2017
- 2) Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Terashima T, Fushimi K, Kaji K, Kitahara M and Kaneko S. Analysis of immune responses in hepatocellular carcinoma patients vaccinated with alpha-fetoprotein-derived peptides.

67th AASLD, Boston, MA, USA, 2016

- 3) Kaji K, Mizukoshi E, Yamamiya D, Fushimi K, Tamai T, Nakagawa H, Kitahara M, Iida N, Honda M, Kaneko S. Identification of novel CD8+ T-cell epitopes in HLA-A24-positive patients with hepatitis B virus. 67th AASLD, Boston, MA, USA, 2016

〔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〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水腰 英四郎 (MIZUKOSHI EISHIRO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90345611

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)

本多 政夫 (HONDA MASAO)

山下 太郎 (YAMASHITA TARO)

橋本 真一 (HASHIMOTO SHINICHI)