

新規免疫治療法開発に向けた肝癌微小環境の解明

金沢大学 医薬保健研究域 保健学系
村居 和寿

肝細胞がん（HCC；hepatocellular carcinoma）はC型及びB型肝炎ウイルスに起因するものが約7割を占めており、全世界において年間約70万人の人々が肝細胞がんにより死亡している。HCCに対する治療法は外科的手術・ラジオ波焼灼療法・肝動脈塞栓療法・分子標的薬などにより格段に進歩したが、進行性肝がんの5年生存率は依然として低く、新規治療戦略の確立が喫緊の課題である。

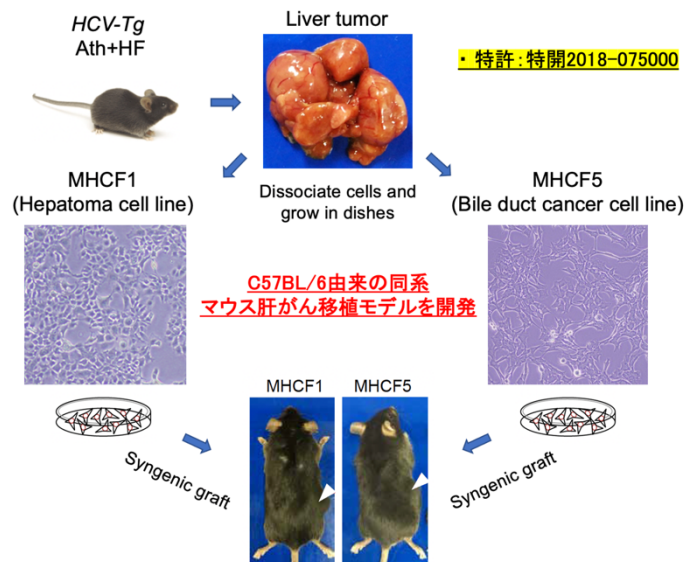
近年、免疫チェックポイントと呼ばれる免疫抑制系分子を標的とした「がん免疫療法」が確立されつつある。その治療概念は、宿主免疫の抑制系を解除することで免疫細胞の

再活性化を引き起こし、腫瘍の退縮を目指すというものである。中でもT細胞上に発現する免疫抑制分子「PD-1（programmed cell death-1）」を標的とした免疫チェックポイント阻害療法は、悪性黒色腫をはじめとした多種の固形がんに対し高い治療効果を示しているが、HCC患者に対する治療効果は非常に低いことが報告されている。本研究では、HCCにおいて免疫チェックポイント阻害治療抵抗性を惹起する腫瘍側因子を同定し、それらを標的とした新規治療法の考案を目指した。

新規治療薬の開発のためには動物試験、とりわけマウスでの前臨床動物試験が重要である。それにも関わらず、肝がんの動物モデルは極めて限られており、患者に即したデータを取り得る有用な動物モデルはほとんど存在しない。当研究室では以前、C型肝炎ウイルス（HCV）全長を発現するトランスジェニックマウス（HCV-Tg）を作成し、肝がんを発症するマウスモデルを確立した（Gastroenterology, 2002）。そして近年、このHCV-Tgマウスに対し動脈硬化高脂肪食（Ath+HF）を負荷したHCV Tg/Ath+HFマウスから、新規のマウス肝がん細胞株MHCF1と、胆管がん細胞株MHCF5を樹立した（特開2018-075000）。MHCF1とMHCF5はimmuno-competentなC57L/B6マウスを用いた同系マウス肝がん移植モデルの作成が可能であり、肝がんに克服に向けた免疫治療開発に非常に有用な細胞株である。本研究により、肝がん微小環境をマウスモデルで評価するための研究基盤を確立した（図1）。

近年、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に関連するがん組織像の特徴が明らかになりつつあり、腫瘍浸潤リンパ球（TIL；Tumor-infiltrating lymphocytes）が多い炎症性の“Hot”な腫瘍では治療効果が高く、TILの少ない非炎症性の“Cold”な腫瘍では治療効果が不良であることが報告されている。しかしながら、なぜリンパ球浸潤度が高い組織型と低い組織型が存在するのか、そのメカニズムに関しては不明な点が多い。申請者は、リンパ球浸潤度を規定する因子が腫瘍細胞側に存在すると考え、100症例の肝がん組織を対象に網羅的遺伝子発現解析を行った。この解析から、T細胞マーカーである“CD3”発現と逆相関する遺伝子として“GeneX”を同定した。臨床サンプルを用いた解析から、GeneX低発現のHCC患者群では、全生存率（OS；overall survival）及び無病生存率（DFS；disease-free survival）が有意に高いことが明らかになった。また、肝がんに加え、膵がん・肺がんといった予後不良ながんの組織中においてGeneXが高発現

図1. C57BL/6由来同系マウス肝がん移植モデルの開発



していることが明らかになった
(図2)。

GeneX ノックアウト細胞
(GeneX-KO)を作製しマウスへの
移植実験を行った。すると、野
生型と比較し、GeneX-KO 腫瘍に
おいて ①腫瘍体積の縮小、②マ
ウス生存率の改善、③腫瘍内浸
潤リンパ球の増加、④細胞傷害
性 T リンパ球の活性化、⑤抗原
特異的 T 細胞の増加 (約 10 倍)
が認められた (図 3)。また大
変興味深いことに、抗 PD-1 抗体
及び抗 CTLA-4 抗体による免疫チェックポイント阻害治療効果は GeneX-KO 腫瘍において著しく改善された (図
4)。以上の結果から GeneX は腫瘍内へのリンパ球浸潤を負に制御することで腫瘍免疫を抑制し、免疫チェッ
クポイント阻害治療効果を低下させている可能性が示唆された。

図2. 臨床サンプルを用いた DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

100症例の肝癌組織を対象とした網羅的遺伝子発現解析
T細胞マーカーである“CD3”発現と逆相関する遺伝子として“GeneX”を同定

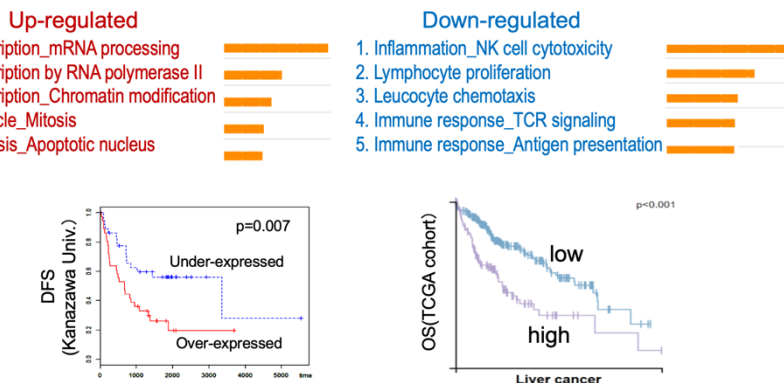


図3. GeneX が腫瘍形成・マウス生存率に与える影響

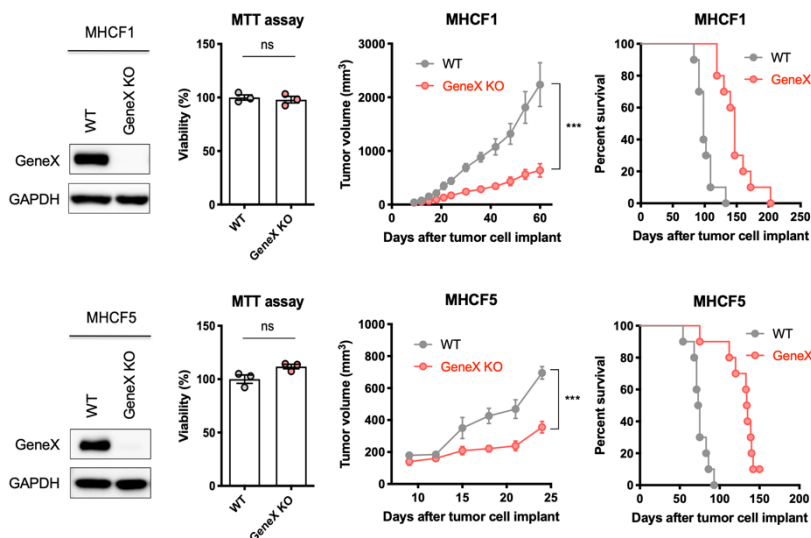
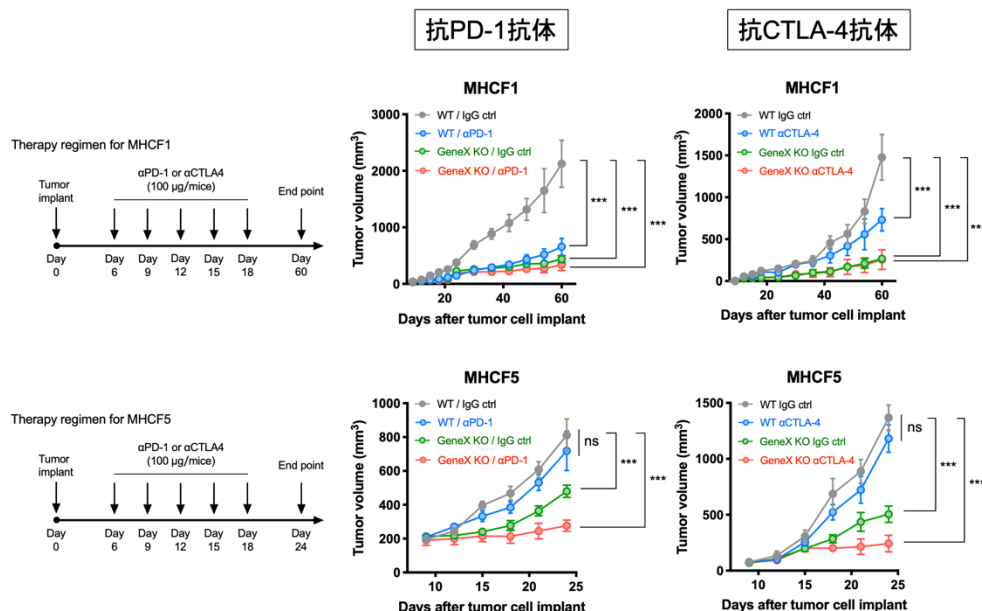


図4. GeneX が免疫チェックポイント阻害治療効果に与える影響



GeneX は転写因子としての機能を有することが報告されている。肝がん微小環境下における GeneX の転写因子としての機能を明らかにするために、ChIP-seq 解析（クロマチン免疫沈降シーケンス解析）と RNA-seq 解析の統合解析を行った。この解析から GeneX の転写標的となる候補遺伝子を 4 因子同定した（図 5）。これら 4 因子の過剰発現は、腫瘍体積を著しく増加させた。

本研究から、GeneX の阻害による腫瘍体積の減少と生存率の改善・腫瘍浸潤リンパ球数の増加・腫瘍内 CTL の cytolytic activity の上昇・免疫抑制系の活性化・免疫チェックポイント阻害療法の効果の改善が認められた。GeneX は肝癌をはじめとした難治の癌に対する有効な新規治療標的になり得ると考えられる（図 6）。

肝がんに対する免疫チェックポイント阻害療法の課題として、治療抵抗性メカニズムの解明や、新規治療標的の探索、治療効果の期待できる症例の選択（患者層別化マーカーの同定）などが挙げられる。これら課題を達成するため、基礎医学のおよび臨床医学的観点から肝がん微小環境を明らかにしていくことが必要不可欠である。今後の研究展開として、scRNA-seq（Single cell RNA-seq；単一細胞トランスクリプトーム）解析により、肝がん微小環境を構築する細胞の特徴を単一細胞レベルで理解し、免疫チェックポイント阻害療法における適切な治療標的細胞・治療標的因子の同定を試みる予定である。

図 5. GeneX の転写標的候補遺伝子の解析

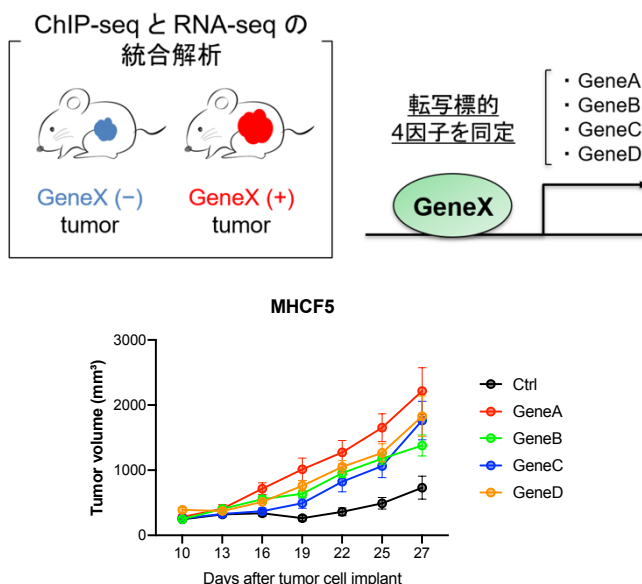
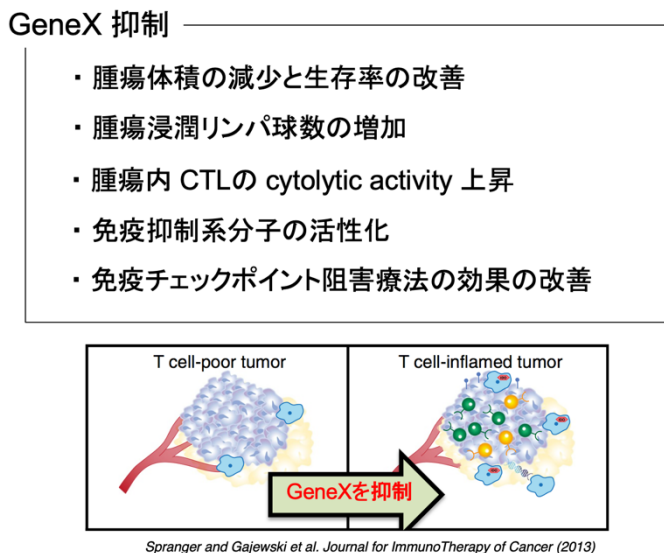


図 6. 本研究で得られた知見



GeneXは、肝癌をはじめとした難治の癌に対する有効な新規治療標的になり得る。