

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07984

研究課題名（和文）肝癌惹起性HBx変異の存在下で形成される腫瘍微小免疫環境の解析

研究課題名（英文）Analysis of tumor microimmune environment formed in the presence of liver cancer-induced HBx mutations

研究代表者

萩原 智（Satoru, HAGIWARA）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40460852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：HBx C1485T変異の存在下では活性酸素の産生亢進やJNK経路の活性化が誘導される結果、肝癌の発症が促進されていることを見出した。またHBxC1485T変異の存在下に誘導される腫瘍微小免疫環境を解明では、TAMsやMDSCsの細胞数が抑制されており、抗腫瘍効果の要因の一つであることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌惹起性ウイルス性病原因子の存在下において形成される腫瘍微小免疫環境の解明した。HBxC1485T変異の存在下で形成される腫瘍微小免疫環境の解明を通して、HBV関連肝癌の新規治療標的を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：It was found that the onset of liver cancer was promoted as a result of increased production of active oxygen and activation of the JNK pathway in the presence of the HBx C1485T mutation. In addition, elucidation of the tumor microimmune environment induced in the presence of the HBxC1485T mutation proved that the cell numbers of TAMs and MDSCs were suppressed, which is one of the factors of the antitumor effect.

研究分野：Tumor microimmune environment

キーワード：肝癌惹起性HBx変異 腫瘍微小免疫環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(Hepatitis B Virus, HBV)は慢性肝炎・肝硬変・肝癌を引き起こす。HBVの慢性持続感染症例に対して、核酸アナログ製剤が導入され、肝発癌が抑制されることが明らかになった。しかしながら、HBV関連肝癌の割合は依然として、肝癌全体の約15%を占めており、減少傾向を示していない。外科的切除術やラジオ波焼灼術がHBV関連早期肝癌に対する根治療法として用いられるが、HBV関連進行肝癌に対する根治療法は開発されていない。HBV関連肝癌の約20%が進行期に発見されることを考えると、HBV関連肝癌の新規治療法の開発が期待される。HBV関連肝癌に対する新規治療法の開発のためには、病態生理の理解が不可欠である。

HBV関連発癌はHBV(ウイルス)側の病原因子と宿主側の因子がお互いに影響を及ぼしあって、発症すると考えられている(Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12:681-700)。HBVはDNAウイルスであり、宿主のゲノムDNAに組み込まれて発癌作用を引き起こすと想定されている。HBx遺伝子(HBx)はHBV-DNAのなかで最も高頻度に肝癌において検出される。また、本邦のHBV関連肝癌ではHBxの遺伝子変異(C1485TおよびC1653T変異)が肝癌の発症に関わることが知られている(J Hepatol 2006;45:646, J Hepatol 2006;45:805)。しかしながら、HBxC1485TおよびC1653T変異がHBV関連発癌を引き起こすメカニズムは解明されていない。最近、申請者らは「HBxがHBV関連肝癌の発症に果たす役割」について解明を試み、以下の事実を明らかにした(Hagiwara S et al. Scientific Report 2017;7:10440、図1参照)。

- 1) HBxの各種変異(C1485T, C1653T, C1470A, C1479A, C1575G)とHBV関連肝癌の発症との関連について調査した結果、HBxC1485T及びC1653T変異が肝癌発症の危険因子であった。
- 2) HBxC1485T変異とHBxC1653T変異の比較では、HBxC1485T変異のオッズ比の方が高値である(図1A参照)。
- 3) 肝硬変はHBV関連発癌の宿主側因子である。
- 4) 新規に作成したC1485T HBx強制発現(C1485T-HBx Transgenic, C1485T-HBx Tg)マウスは野生型HBx強制発現マウスと比べ、diethylnitrosamine (DEN)投与により誘導される実験肝癌モデルに高い感受性を示す(図1B参照)。
- 5) C1485T-HBx Tgマウスの肝細胞では活性酸素の産生亢進・JNK経路の活性化を介して、発癌が促進される。

このように、申請者らは「HBxC1485T変異がHBV関連肝癌におけるウイルス側の病原因子である」ことを臨床症例及び新規HBx Tgマウスの解析を通して、明らかにした。

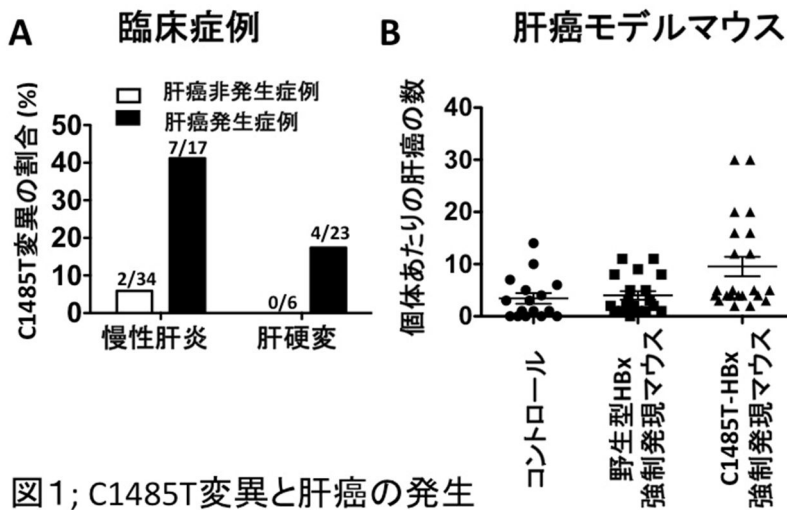


図1; C1485T変異と肝癌の発生

HBV 関連肝癌は慢性肝炎・肝硬変を背景とする高度の炎症の結果、肝細胞に遺伝子異常が蓄積して発症する「炎症発癌」の一つである。従って、HBVの慢性持続感染が引き起こす宿主の免疫反応がHBV関連発癌の発症に深く関わっていると考えられている。そこで、申請者らは「肝

癌惹起性 HBxC1485T 変異が宿主にどのような免疫反応を誘導することによって、肝癌の発症を促進するのか？」という問いに答えるために、本研究を計画した。本研究において、申請者らは自らが樹立した新規 HBx Tg マウスを用い、肝癌惹起性ウイルス性病原因子の存在下において形成される腫瘍微小免疫環境の解明を目指す。さらに、HBxC1485T 変異の存在下で形成される腫瘍微小免疫環境の解明を通して、HBV 関連肝癌の新規治療標的を同定する。

## 2. 研究の目的

申請者らはHBV慢性持続感染症例80例の調査と新規HBxTgマウスの解析を通して、HBxC1485T変異が肝癌の発症に関わるウイルス側の病原因子であることを証明した (Hagiwara S et al. Scientific Report 2017;7:10440 参照)。しかしながら、HBxC1485T変異の存在下で形成される腫瘍微小環境の詳細は明らかになっていない。活性酸素の産生やJNK経路の活性化には免疫細胞が産生するCytokineが関与することから、宿主側の免疫反応が関与すると考えられる。実際に、申請者らは肝癌を発症したC1485T-HBx Tgマウスの肝臓ではIL-6の発現が野生型-HBxTgマウスの肝臓と比べて、著明に高いことを見出している。そこで、本研究では肝癌惹起性HBxC1485T変異の存在下で形成される腫瘍微小免疫環境を解明と治療標的の同定を目指す。

PD-1 および CTLA-4 等の免疫チェックポイント分子を標的とする新たな癌免疫療法が大きな注目を集めている。肝癌においても、PD-1 あるいは CTLA4 経路の阻害が有効である可能性がある (Oncology 2017;90:50)。本研究では「HBV 関連肝癌において、免疫チェックポイント阻害薬が有用であるかどうか?」という視点からも解析を進める予定である。このように、本研究は申請者らが独自に樹立したHBxTgマウスと臨床検体の双方を用いて行う研究であり、「ウイルス由来の病原因子が宿主の免疫反応に及ぼす効果」を明らかにすることを目指す。本研究の成果はHBV関連肝癌の新規治療標的の同定につながる可能性があり、独自性・新規性・創造性の高い研究であると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では肝癌惹起性C1485T HBx変異の存在下で形成される腫瘍微小免疫環境を解明することを目指す。HBV関連肝癌の発症を促進する腫瘍微小免疫環境について、液性因子(Cytokine, Chemokine)、浸潤する免疫細胞の種類、免疫チェックポイント分子の機能、腸内細菌叢に注目し

て明らかにする。具体的には以下の項目を検討する。

**(1) HBV関連肝癌の発症に関わるCytokineを明らかにする (平成30～令和元年度);**

申請者らは C1485T HBx Tg マウスでは肝細胞において、活性酸素の産生亢進や JNK の活性化が生じていることを見出している。活性酸素の産生や JNK の活性化には免疫細胞が産生する Cytokine が重要な役割を果たすことから、C1485T-HBx Tg における実験肝癌の発症には 免疫細胞が産生する Cytokine が関与する可能性が高い。本研究では、DEN 投与実験肝癌を 誘導した C1485T-HBx Tg マウスと野生型-HBx Tg マウスの肝臓における Cytokine・Chemokine の Profile を比較する。同定した Cytokine・Chemokine の遺伝子改変マウスや中和抗体を用いた実験により、これらの液性因子の機能を確認する。これらの手法により、HBV 関連肝癌の発症に関わる Cytokine・Chemokine を同定する。

**(2) HBV関連肝癌の発症に関わる免疫細胞を明らかにする(平成30～令和2年度);**

肝癌の腫瘍微小免疫環境の構成細胞として、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage, TAM)・骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)・制御性 T 細胞 (Regulatory T cells, Treg)等が挙げられる。本研究では DEN 投与実験肝癌を誘導した C1485T-HBx Tg マウスと野生型-HBx Tg マウスの肝臓における TAM, MDSC, Treg の動態を Flow-cytometry により検討する。これらの免疫細胞を肝癌モデルマウスの肝臓より分離し、産生する Cytokine や細胞表面分子の発現をマイクロアレイにより、網羅的に解析する。また、C1485T-HBx Tg マウスより分離した TAM・MDSC・Treg の野生型-HBx Tg マウスへの移入実験を通して、腫瘍微小免疫環境の維持に関わる免疫細胞を同定する。これらの手法により、腫瘍微小免疫環境において、最も腫瘍促進効果を示す免疫細胞を同定する。

**(3) HBV関連肝癌の発症に関わる免疫チェックポイント分子を明らかにする(平成30～令和元年度);**

DEN 投与実験肝癌を誘導した C1485T-HBx Tg マウスと野生型-HBx Tg マウスの肝臓における免疫チェックポイント関連分子 (PD-1, PDL1, PDL2, CTLA4, B7-1, B7-2)の発現を検討する。これらの免疫チェックポイント分子に加えて、共刺激分子(CD40, CD40L, OX40, OX40L, ICOS, ICOSL)の発現を検討する。PCR と Flow-cytometry の検討により HBV 関連肝癌の発症に関わる免疫チェックポイント分子と共刺激分子を同定する。さらに、PD-1 欠損マウスと HBxTg マウスを交配し、HBxTg・PD-1 欠損マウスを作成し、実験肝癌に対する感受性を検討する。これらの手法により、免疫チェックポイント分子が HBV 関連肝癌の発症に果たす役割を明らかにする。

**(4) HBV関連肝癌の発症に関わる腸内細菌叢を明らかにする(平成30～令和2年度);**

肝癌の発症には腸内細菌に対する免疫反応が関与することが明らかになっているが、腸内細菌に対する免疫反応が HBV 関連発症の発症に果たす役割は明らかになっていない。そこで、抗生剤投与により腸内細菌を除去した C1485T-HBx Tg マウスと野生型-HBx Tg マウスに実験肝癌を誘導し、肝癌に対する感受性を検討する。さらに、マウスの便・腸管の腸内細菌叢について次世代 Sequencer を用いて解析する。これらの手法により、HBV 関連肝癌の発症に関わる腸内細菌を同定する。

(5) 腫瘍微小免疫環境について、臨床検体を用いて明らかにする(平成30～令和2年度);

1)-3)で同定した HBx-Tg マウスでの肝癌発生に関わる Cytokine・免疫細胞・免疫チェックポイント分子の発現や局在について、HBV 関連肝癌の腫瘍組織を用いて検討する。4)の腸内細菌については HBV 関連肝癌患者の便検体を用いて、検討する。結果については HBx 各種変異(C1485T, C1653T, C1470A, C1479A, C1575G)の有無と比較し、動物実験の結果と併せて、最適な治療標的を同定する。

#### 研究代表者、研究分担者の具体的な役割

動物実験は研究代表者が実施する。研究分担者の工藤正俊教授には主に立案などご指導いただく。

#### 4. 研究成果

HBx 遺伝子導入発癌モデルマウスにおいて PD-1 抗体と Lenvatinib 併用療法は、各々単独療法と比較して有意に腫瘍増殖を抑制していることを確認した。また腫瘍抑制されていなかった群と比較すると、TAMs や MDSCs の細胞数が抑制されており、抗腫瘍効果の要因の一つと考えられた。NOD1, NOD2 欠損マウスを用いた肝癌モデルでは、NOD1 あるいは NOD2 の欠損下では肝癌が著明に増殖することが判明した。

HBV の慢性持続感染症例に対して、核酸アナログ製剤が導入され、肝発癌が抑制されることが明らかになった。しかしながら、HBV 関連肝癌の割合は依然として、肝癌全体の約 15%を占めており、減少傾向を示していない。外科的切除術やラジオ波焼灼術が HBV 関連早期肝癌に対する根治療法として用いられるが、HBV 関連進行肝癌に対する根治療法は開発されていない。HBV 関連肝癌の約 20%が進行期に発見されることを考えると、HBV 関連肝癌の新規治療法の開発が期待される。HBV 関連肝癌に対する新規治療法の開発のためには、病態生理の理解が不可欠である。HBV 関連発癌は HBV(ウイルス)側の病原因子と宿主側の因子がお互いに影響を及ぼしあって、発症すると考えられている (Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2015;12:681-700)。HBV は DNA ウィルスであり、宿主のゲノム DNA に組み込まれて発癌作用を引き起こすと想定されている。HBx 遺伝子(HBx)は HBV-DNA のなかで最も高頻度に肝癌において検出される。また、本邦の HBV 関連肝癌では HBx の遺伝子変異(C1485T および C1653T 変異)が肝癌の発症に関わることが知られている (J Hepatol 2006;45:646, J Hepatol 2006;45:805)。申請者らは、HBx C1485T 変異の存在下では活性酸素の産生亢進や JNK 経路の活性化が誘導される結果、肝癌の発症が促進されていることを見出した。また HBxC1485T 変異の存在下に誘導される腫瘍微小免疫環境を解明では、TAMs や MDSCs の細胞数が抑制されており、抗腫瘍効果の要因の一つであることが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	工藤 正俊  (KUDO Masatoshi)  (10298953)	近畿大学・医学部・教授    (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関