



Title	肝がん患者における肝内および末梢血NK細胞のマスサイトメトリーを用いた表現型に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	吉田, 祐一
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14988号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/85865
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2722
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	YOSHIDA_Yuichi_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 吉田 祐一

主査 教授 清野 研一郎
審査担当者 副査 准教授 森川 賢一
副査 准教授 山田 雅文

学位論文題名

肝がん患者における肝内および末梢血 NK 細胞の
マスサイトメトリーを用いた表現型に関する研究
(Study on Phenotypic Characterization by Single-Cell Mass Cytometry of Human
Intrahepatic and Peripheral NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma)

申請者は本研究において、マスサイトメトリーを用いて潜在的な免疫療法の標的となる受容体を見つけるため、肝がん患者の肝内および末梢血 NK 細胞の表現型特性の包括的な分析を施行し、肝がん患者の末梢血 NK 細胞では CD160、Siglec-7、NKp46、および NKp30 の発現が減少し、CD49a、Siglec-10、PD-1、および ILT2 の発現が増加することを同定した。また、肝細胞癌 (HCC) 組織において CX3CR1、Siglec-10、ILT2、および PD-1 の発現を伴う CD49a⁺ NK 細胞が増加している事を同定した。本研究で得られた知見は、今後全身療法における疾患評価のための新しい治療標的またはバイオマーカーの可能性を検討するためのさらなる研究に役立つ事が期待される。

審査にあたりまず副査の山田准教授より、①今回同定された新規亜集団の NK 細胞の悪性度や予後との関連について、②HCC に対する NK 細胞の抗腫瘍効果の詳細について、の質問があった。申請者は①の質問に対し、本研究の **Limitation** でもあるが観察期間が短く長期予後のフォローができていないため、この新規亜集団と予後や悪性度との関連については現時点では評価不能と回答した。②の質問に対しては、一般的な NK 細胞の抗腫瘍効果は脱顆粒で細胞死を誘導する経路やデスレセプターを介してアポトーシスを誘導する経路、IFN- γ を介して腫瘍増殖を誘導する経路などが報告されているが、HCC に関してはその局在に応じた NK 細胞の活性化および抑制性受容体の動的変化があるため複雑であり、これまで様々な報告はあるが体系的にはまだ不詳であると回答した。また、今後この研究を治療に応用するためにどのような方向に発展していくのがいいかとの質問があり、申請者は新規亜集団をソーティングし、**K562** との共培養や **IL12**、**IL18** での刺激による機能解析の必要性があると回答した。また、学位論文に関する誤字などについてご指摘頂いた。

次に副査の森川准教授より①対照が肝がん患者と比較して非常に若く NK 活性は年齢によって影響を受けるが、それが免疫応答に与えた影響はあるのか、②肝がんは炎症性発癌が

発癌機序のベースとなり、C型肝炎は cytotoxic なウイルスなのでまさに炎症がベースとなるが B型肝炎は RNA への Integration が背景にありかならずしも炎症性発癌ではない。フェノタイプ毎のサブ解析は試行しているか、③今後マーカーの検索を目指した臨床応用を考えたときに、マスサイトメトリーを継続するのか、分泌タンパクの検索を行うのとどうするのがいいのか、について質問があった。申請者は①の質問に対して、NK細胞における新規亜集団やその他のマーカーと年齢含め臨床データとの相関を確認しているが、腫瘍因子の T 因子の他は年齢も含め相関関係を認めなかったもので、年齢によって新規亜集団が変化することは考えづらいと回答した。②の質問に対し、ある程度の対象数が揃った時点で、フェノタイプ毎の検討を行おうと思っていたが、現時点の対象数でフェノタイプに分けた検討は試行していないと回答した。また、③の質問に対し、マスサイトメトリーはあくまで網羅的に状況を把握する、いわゆる拾い上げに大変有用な実験手法であり、拾い上げた因子をさらに検証していくためには、機能解析や予後解析と並行して分泌タンパクとの連関を検索していくと回答した。それに対して森川准教授より、今回は横断的研究であり、長期的な予後の観察や、発癌前の状態から継続して検証していければ、より臨床に即した研究になっていくだろうとご助言をいただいた。

最後に主査の清野教授より、①中間審査の資料と異なっているが方針を変えた理由は何か、②マスサイトメトリーの機序とはどのようなものか、③フェノタイプの評価で機能解析がうまくいかなかったのであれば、動物実験で何か似た様な実験は言われているのか、について質問があった。申請者は①の質問に対し、本研究は元々 TACE 前後の免疫細胞の状態を運動群と非運動群に分けて検討しており、その時は Siglec を含む小さな新規亜集団において有意差が出ていたが、対象数が増えていくに従い統計学的有意差が証明されなくなったため、TACE 前後の変化でなく、健常者と肝がん患者で比較検討することに変更したと回答した。それに対して清野教授は学位論文とは基礎論文と異なり、詳細な背景やパイロット試験、ネガティブデータを盛り込んで記載するものであり、これらの過程をさらに盛り込んでよかったとのご助言を頂いた。②の質問に対して、マスサイトメトリーの原理は基本的にシングルセル解析であり、1細胞ごとにイオン化し、質量差による飛行時間を1細胞ごとに測定しそのデータを統合する ICO-TOF-MS の技術を用いていると回答した。また、③の質問に対しては、今回はマスサイトメトリーの技術を用いたからこそ同定された亜集団であり、マウスで個別の因子について論じた報告はあるが、同様の亜集団に対する機能解析や予後評価をしたものは検索した限りは見られなかった。また、Siglec はヒトとマウスでは発現する種類が一部同じものもあるが、基本的には遺伝子型は異なっておりマウスでの実験ができないことが挙げられると回答した。それに対して、ヒトでの検討が難しい場合にはマウスで実験を検討する様にご助言いただいた。

この論文は、HCC 患者における免疫チェックポイント治療のターゲット因子の可能性として、CD160、CD49a、Siglec-10、ILT2 を同定した点を高く評価された。今後全身療法における疾患評価のための新しい治療標的またはバイオマーカーの可能性を探索していく基盤となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。