



Title	肝がんにおけるDGK 阻害による抗腫瘍効果の機序解明に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	岡田, 尚樹
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15111号
Issue Date	2022-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/86899
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2728
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	OKADA_Naoki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 岡 田 尚 樹

学 位 論 文 題 名

肝がんにおける DGK α 阻害による抗腫瘍効果の機序解明に関する研究
(Studies on the antitumor effects of DGK α inhibition on hepatocellular carcinoma)

【背景と目的】 肝細胞癌 (HCC) は肝がんのなかで最も多く、予後不良である。手術加療以外にもチロシンキナーゼ阻害剤であるソラフェニブやレンバチニブが進行肝細胞癌に対する全身療法として出てきたがその効果は十分ではなく、より高い抗腫瘍効果を発揮し有害事象の少ない新しい治療薬が望まれる。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロールをフォスファチジン酸に変換することにより細胞内シグナル伝達に重要な役割を担う。1 型アイソザイムの DGK α は活性化することにより肝がん細胞の増殖を促進し、メラノーマ細胞のアポトーシスを抑制している。DGK α は HCC 患者の腫瘍組織でも発現上昇しており、DGK α の高発現が予後不良因子であるとされている。また、DGK α は T 細胞での発現が高く、CD4 陽性 T 細胞において Ras シグナルを抑制することにより免疫寛容状態へ誘導するとされる。

本研究では、DGK α 阻害の腫瘍増殖抑制および抗腫瘍免疫増強といった 2 方向の抗腫瘍効果を解明することを目的とし、肝がん細胞株および肝がん担がんマウスモデルを用いて検証した。さらに、抗 PD-L1 抗体による併用治療の抗腫瘍効果について検証した。

【材料と方法】 DGK α 阻害剤 (DGKAI) の抗腫瘍効果を検証するため、ヒト肝がん HLF 細胞およびマウス肝がん Hepa1-6 細胞に各濃度の DGKAI を添加し、細胞増殖アッセイで増殖率を比較検討した。また、DGKAI の免疫賦活作用を検討するため、ヒト末梢血単核球 (PBMC) およびマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用い ELISA 法により IL-2 産生量を測定した。さらに、機序解明のため ERK や JNK のリン酸化をウエスタンブロッティング法で検討した。生体内における DGKAI の抗腫瘍効果を検証するため、m-Cherry 蛍光タンパクを導入した Hepa1-6 細胞をマウス脾臓内へ移植することにより肝がん担がんマウスモデルを構築した。これらのマウスに DGKAI を経口投与し、移植後 14 日目に生体イメージング法および HE 染色・免疫組織化学染色により腫瘍量を計測した。また、これらのマウスの生存率も検討した。さらに、DGK α 阻害が免疫状態に及ぼす効果を検証するため、移植後 14 日目の腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数および CD11c 陽性樹状細胞数を免疫組織化学染色で計測し、MHC 発現やサイトカインおよびケモカインレセプター発現をフローサイトメトリーにより検討した。また、抗原特異的サイトカイン産生の検証のため、OT-1 および OT-2 トランスジェニックマウスより CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞を採取し、OVA 刺激を与えた際のサイトカイン産生を ELISA 法で測定した。抗腫瘍エフェクター細胞を同定するため、肝がん担がんマウスモデルに CD8 除去抗体および CD4 除去抗体を投与し、肝臓の腫瘍量を生体イメージング法および HE 染色・免疫組織化学染色で検討した。さらに、肝がん担がんマウスモデルを用いて DGKAI と抗 PD-L1 抗体による併用治療効果検討のため、腫瘍量および生存率を検討した。さらに、HCC 切除検体からティッシュマイクロアレイを作成し、がん細胞や T 細胞における DGK α の発現を免疫組織化学染色により検討した。

【結果】 DGK α を阻害することにより HLF 細胞および Hepa1-6 細胞の細胞増殖を抑制した。さらに、ヒト PBMCs およびマウス BMDCs では、DGKAI 投与により、CD3 および CD28 刺激時の IL-2 産生が増加した。また、DGKAI は、CD3 および CD28 刺激下において ERK や JNK のリン酸化を誘導した。肝がん担がんマウスモデルにおいて DGKAI 投与により腫瘍量が低下し、生存率は延長した。

さらに、DGKAI 投与は、移植後 14 日目の腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数および CD11c 陽性樹状細胞数を増加させた。DGKAI による治療は樹状細胞における MHC class I、class II の発現を上昇させなかったが、IFN- γ 産生 CD8 陽性 T 細胞数を増加させた。さらに、抗原特異的刺激を与えた際の IL-2 産生を増加させ、CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ およびグランザイム B 産生を増加させた。肝がん担がんマウスモデルへの CD8 除去抗体投与により DGKAI の抗腫瘍効果が減弱し、その際には腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数が減少していた。さらに、肝がん担がんマウスモデルにおいて、移植後 14 日目の肝臓における PD-L1 発現細胞は DGKAI 治療群において増加していた。そして、DGKAI および抗 PD-L1 抗体での併用治療により、移植後 14 日目の腫瘍量は減少していた。HCC 切除検体では、がん細胞や CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞において DGK α は高発現であった。

【考察】 本研究では、DGKAI の経口投与は肝腫瘍の形成を著明に抑制し、担がんマウスの生存率を延長させたが、DGKAI と抗 PD-L1 抗体との併用治療は *in vivo* で特に強力な抗腫瘍効果を示した。DGKAI の作用メカニズムは既存の治療薬と異なっており、単剤治療でも併用治療でも HCC に対する新規治療薬になり得るものと考えた。

DGK α は HCC 患者の腫瘍組織に高発現していた。肝がんにおける DGK α の発現上昇は腫瘍増殖促進や MEK/ERK シグナル経路のリン酸化促進に関与している。そのため、DGK α 阻害はソラフェニブなどのマルチキナーゼ阻害薬とは異なる抗腫瘍効果を示す可能性がある。本研究では、担がんマウスモデルにおいて DGK α 阻害が CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ およびグランザイム B 産生を有意に増加させることを、そして、CD8 陽性細胞の除去で DGKAI の抗腫瘍効果がキャンセルされることを示した。本研究のこのモデルでは肝臓において DGK α 阻害は CD8 陽性 T 細胞の誘導と活性化を増強していると推測した。そのため、DGK α 阻害は腫瘍微小環境において、CD8 陽性キラー T 細胞などの抗腫瘍エフェクター細胞の導入することにより、臨床においても有効ながん免疫治療であると思われる。

IFN- γ による刺激はがん細胞表面の PD-L1 や MHC class I の発現を上昇させる。本研究では、*in vivo* で DGKAI の経口投与により、CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生が上昇することを示した。また、本研究では、CD8 陽性 T 細胞含めた抗腫瘍エフェクター細胞が DGKAI 投与マウスにおいて蓄積したことを示唆した。DGKAI 投与マウスにおいて、IFN- γ により PD-L1 発現が上昇しており、抗 PD-L1 抗体は肝臓での腫瘍増生をより強力に抑制すると考えた。期待通り、DGKAI 治療に抗 PD-L1 抗体治療を加えると腫瘍増生は有意に抑制され、この併用療法は HCC に対する有力な治療戦略となる可能性が示唆された。

【結論】 肝がんに対する DGK α 阻害治療効果は、がん細胞の増殖を直接的に抑制することだけでなく、抗腫瘍エフェクター細胞を局所に導入する事という 2 つの抗腫瘍効果を示した。さらに、腫瘍環境中の IFN- γ 産生上昇ががん細胞の PD-L1 発現を上昇させることにより、DGKAI と抗 PD-L1 抗体との併用治療による相乗効果が示された。これらの結果から、DGK α 阻害は HCC に対する新しい治療戦略となりうると言える。