



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Description	配架番号 : 2722
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14988号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85865
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIDA_Yuichi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 吉田 祐一

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)

【背景と目的】

肝癌は世界の部位別癌死亡の第 3 位で、その罹患率は第 4 位であり、その 90% を肝細胞癌(HCC)が占めている。HCC は通常、肝硬変へと進行する慢性肝疾患を背景にするため、手術加療後も再発率は高くなる。切除不能進行 HCC に対する分子標的薬の奏功率は依然として低く、ここ最近では免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-1 および抗 PD-L1）を含め、大幅に改善されたが、新しい免疫療法の標的の探索は不可欠である。ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)は腫瘍に対する免疫応答の調節に重要な役割を果たし、腫瘍微小環境下における重要なチェックポイント阻害剤に対する応答性の決定因子である。ヒト NK 細胞は、2 つのサブセットに分類され、CD56dim NK 細胞は高い細胞毒性活性を示し、末梢血 NK 細胞集団の 90~95% を占める。CD56bright NK 細胞は強力なサイトカイン産生細胞であるが、末梢血中には比較的少ない。末梢血では、NK 細胞は全末梢血単核球(PBMC)中の 10% 程度を占める。肝臓において NK 細胞は肝内リンパ球(IHL)の 30~50% を占める。NK 細胞の機能は、HLA クラス I 特異的抑制性受容体および多数の非 HLA 特異的受容体によって調節されている。肝がん患者で報告されている表現型の変化は、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のためにやや複雑である。例えば、Siglec-7、NKp46、および NKp30 の発現の減少、および PD-1 の発現の増加が末梢血で報告されている。肝臓組織では、腫瘍内 NK 細胞で CD160 の発現が減少し、CD49a、Siglec-10、PD-1、CD96、および NKG2A の発現が増加することが報告されている。シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec) は、シアル酸の認識を介して、主に阻害シグナルを伝達する細胞表面に発現する受容体型レクチンのファミリーである。NK 細胞は主に Siglec-7 および-9 の発現が報告されており、Siglec-7 および-9 への特定の抗体またはリガンドの結合は NK 細胞の機能を阻害し、それらの発現低下は NK 細胞の機能不全を示す事が報告されている。本研究では、潜在的な免疫療法の標的となる受容体を見つけるために、肝がん患者の NK 細胞の表現型について検証した。

【対象と方法】

肝動脈注入化学療法(TACE)で治療された肝がん合併肝硬変患者 39 名の患者の PBMC を対象とし、対照群として健常成人 8 名の PBMC も検討した。また、肝がん患者の肝内 NK 細胞を比較するため、HCC の診断で肝切除を受けた 16 名の患者の癌部組織および隣接する正常な肝臓組織(非癌部組織)を対象とした。この内 8 名は HCC の癌部組織および非癌部組織の他、PBMC も評価した。これら PBMC 検体および癌部組織および非癌部組織の IHL をそれぞれ抽出し、マスサイトメトリーを用いて、各種免疫細胞の頻度および表面マーカーを解析した。マスサイトメトリーとは細胞を 1 細胞レベルで高速に解析をするフローサイトメトリーと、元素の質量に基づいて物質を高次元、高分解能で解析できる誘導結合プラズマ飛行時間型質量分析(ICP-TOF-MS)を融合した技術であり、金属安定同位体を標識した抗体を

使用することで、シグナルのオーバーラップがなく、自家蛍光の影響を受けないため、細胞表面タンパクを 32 種類のパラメーターを用いて同時に解析する事が可能である。データは平均信号強度 (MSI) に基づいてクラスター化し、各種表面マーカーの発現を統計学的に検討した。

【結果】

PBMC の比較では、健常者と比べて肝がん患者において末梢血 CD56dim NK 細胞が減少した。表面マーカーの検討では、CD160+ Siglec-7+ CD49a- CD56dim NK 細胞の減少、および Siglec-10、ILT2、および PD-1 の発現を伴う CD160- Siglec-7- CD49a+ CD56dim NK 細胞の増加を認めた。また、CD56bright NK 細胞においては、Siglec-10 および ILT2 発現を伴う末梢血 CD49a+ CD56bright NK 細胞が増加した。肝がん患者の肝臓組織における NK 細胞の検討では、癌部組織において CD56dim NK 細胞の頻度が減少し、Siglec-10、ILT2、PD-1 および CX3CR1 の発現を伴う腫瘍内 CD49a+ CD56dim NK 細胞が増加した。また、末梢血および肝内 NK 細胞間の表現型の違いを検証した結果では、末梢血 NK 細胞は CD160+ Siglec-7+ DNAM1+ 表現型を示し、CD160、Siglec-7、および DNAM-1 の発現レベルは、非癌部 NK 細胞よりも末梢血 NK 細胞の方が高かった。肝内 NK 細胞は、局在に関係なく CD69 および NKG2D を高度に発現していた。CD49a および CX3CR1 の発現レベルは、末梢血 NK 細胞よりも肝内 NK 細胞の方が高く、非癌部組織よりも癌部組織で多く発現していた。

【考察】

免疫細胞のマスサイトメトリー分析により、単一細胞レベルでの複数の表面タンパク分子と細胞内タンパク分子を同時に分析する事が可能となった。本研究では Siglec-7、NKp46、および NKp30 を発現する CD160+ CD56dim NK 細胞が減少し、Siglec-10 を発現する CD49a+ CD56dim NK 細胞が増加した。CD56dim NK 細胞上の CD160 および CD49a は、肝がん患者における NK 細胞の他の共発現している活性化または抑制性分子と有意に関連しており、CD160 および CD49a がサロゲートマーカーであることを示唆している。HCC 組織では CX3CR1、Siglec-10、ILT2、および PD-1 の発現を伴う CD49a+ NK 細胞の蓄積が見られた。CX3CR1 のリガンドである CX3CL1 (フラクタルカイン) は HCC 細胞によって産生されるため、CX3CR1+ NK 細胞は腫瘍微小環境に蓄積する可能性が考えられる。また、腫瘍内 NK 細胞での Siglec-10 の高発現は、肝がん患者の予後不良と関連が報告されており、HCC の治療標的として Siglec ファミリーを検討することは免疫学的治療戦略が新たな局面を迎えるためにも大変意義があると考えられる。IHL と PBMC の比較検討では、CD160、Siglec-7、および DNAM-1 の発現レベルは、末梢血 NK 細胞よりも非癌部 NK 細胞の方が低く、CD56dim NK 細胞上の CD160 のダウンレギュレーションは、HCC を伴う肝硬変による全身性免疫消耗に起因する可能性がある。CD49a、CX3CR1 の、Siglec-10、および ILT2 の発現レベルは、末梢血 NK 細胞よりも肝内 NK 細胞の方が高く、非癌部組織よりも癌部組織で多く発現しており、これらの結果は、CD49a、CX3CR1、Siglec-10、および ILT2 が HCC によって誘導される可能性があることを示唆している。

【結論】

本研究では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た。健常者と比較して、肝硬変の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、HCC 組織では CX3CR1、Siglec-10、ILT2、および PD-1 の発現を伴う CD49a+ NK 細胞の蓄積が見られた。これらの発見は、CD160、CD49a、Siglec-10、ILT2 が全身療法の治療効果の新しい治療標的または病勢評価のバイオマーカーである可能性を示しており、今後のさらなる研究が必要である。