



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14988
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86027
Type	doctoral thesis
File Information	YOSHIDA_Yuichi.pdf



学位論文

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)

2022 年 3 月

北海道大学

吉田 祐一

学位論文

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)

2022 年 3 月

北海道大学

吉田 祐一

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
研究方法	10 頁
研究結果	14 頁
考察	40 頁
総括および結論	43 頁
謝辞	44 頁
利益相反	45 頁
引用文献	46 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yuichi Yoshida, Sachiyo Yoshio, Taiji Yamazoe, Taizo Mori, Yuriko Tsutsui, Hironari Kawai, Shiori Yoshikawa, Takasuke Fukuhara, Toru Okamoto, Yoshihiro Ono, Yu Takahashi, Ryuki Hashida, Takumi Kawaguchi, Akinobu Taketomi and Tatsuya Kanto.
Phenotypic Characterization by Single-Cell Mass Cytometry of Human Intrahepatic and Peripheral NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma.
Cells. 10(6):1495. 2021

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 吉田祐一、川口巧、由雄祥代
Effect of exercise therapy on the immune system in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma
第24回肝臓学会大会 2020年11月7日 神戸

要旨

【背景と目的】

肝臓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効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、CD56^{dim} 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。CD56^{bright} 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变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Siglec-9の発現が報告されており、Siglec-7およびSiglec-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 CD56^{dim} NK 細胞が減少した。表面マーカーの検討では、CD160⁺ Siglec-7⁺ CD49a⁻ CD56^{dim} 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⁺ CD56^{dim} NK 細胞の増加を認めた。また、CD56^{bright} NK 細胞においては、Siglec-10 および ILT2 発現を伴う末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} 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 CD56^{dim} 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⁺ CD56^{dim} 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⁺ CD56^{dim} NK 細胞が減少し、Siglec-10 を発現する CD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞が増加した。CD56^{dim} 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相関しており、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、CD56^{dim} 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

Ca, cancer,	癌部
HBV, hepatitis B virus,	B型肝炎ウイルス
HCC, hepatocellular carcinoma,	肝細胞癌
HCV, hepatitis C virus,	C型肝炎ウイルス
HIV, Human Immunodeficiency Virus,	ヒト免疫不全ウイルス
HLA, Human Leukocyte Antigen,	ヒト白血球抗原
HV, healthy volunteer,	健常者
ICP-TOF-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry Time-of-Flight mass spectrometer,	誘導結合プラズマ飛行時間型質量分析計
IHL, intrahepatic lymphocyte,	肝内リンパ球
ILT2, immunoglobulin-like transcript 1	
IQR, inter-quartile range,	四分位範囲
KIR, Killer cell Immunoglobulin-like Receptor	
MAIT, mucosal associated invariant T cell,	MAIT細胞
MSI, mean signal intensity,	平均信号強度
mDC1, myeloid dendritic cell,	ミエロイド系樹状細胞
NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease,	非アルコール性脂肪性肝疾患
Nca, non-cancer,	非癌部
NCR, natural cytotoxicity receptor	
NK, natural killer cell,	NK細胞
NKT, natural killer T cell,	NKT細胞
PBMC, peripheral blood mononuclear cells,	末梢血単核球
pDC, plasmacytoid dendritic cell,	形質細胞様樹状細胞
PD-1, programmed cell death 1	
PD-L1, programmed cell death ligand 1	
Siglec, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin,	シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン
TACE, Transcatheter Arterial Chemo Embolization,	肝動脈化学塞栓療法
Tfh, T follicular helper,	濾胞ヘルパーT細胞
TIGIT, T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	
TIM-3, T-cell immunoglobulin mucin-3,	

緒言

肝癌は世界の部位別癌死亡数の第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(Villanueva, 2019)。本邦ではその成因はB型肝炎ウイルス(HBV)が約15%、C型肝炎ウイルス(HCV)が約55%、非B非C型肝炎(NBNC)が約30%を占めており、年間約3万人弱の死亡者を認めている(Tateishi et al., 2019)。HCCは通常、上述したようなウイルス性肝炎、アルコール性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎などの肝硬変へと進行する慢性肝疾患を背景に発症するため、手術加療後も再発率は高い事が知られている(Kamiyama et al., 2009)。肝硬変または門脈圧亢進症の病歴のない早期肝がん患者には術切除が推奨されるが、術後5年間での再発率は60~70%であり(Kuo et al., 2021)、切除後もさらなる治療を繰り返す必要がある。5年生存率は後述するような治療法の発達に伴い徐々に延長されてきたがHCC全体では約40%であり、依然として低い(Kudo, 2018)。2000年代初頭まで、切除不能進行HCCにおいて他癌腫のように有効性が確立された全身化学療法はなく、肝動脈化学塞栓療法、肝動注化学療法に対し不適格・不応となった際の後治療は存在せず、予後不良であった(Llovet JM et al., 2008)。こうした状況の中、2007年に進行肝がん患者に対する新規分子標的治療薬ソラフェニブ(マルチキナーゼ阻害剤)の2つの世界的な大規模臨床試験(SHARP 試験およびAsia Pacific 試験)の結果が報告された。いずれの試験においても、プラセボ群と比較しソラフェニブ群で全生存期間、病勢制御率、無病生存期間の有意な延長が示された(Llovet JM et al., 2008; Cheng et al., 2009)。この結果を受け、2009年に本邦で初めて進行肝癌に対する全身化学療法薬としてソラフェニブが承認され、ここ10年間では切除不能進行肝細胞癌に対して利用できる唯一の第一選択薬となる分子標的薬であったが、生存期間に対する上乗せ効果はわずか3ヶ月前後であった(Llovet JM et al., 2008)。切除不能進行HCCに対する治療選択肢は、免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1および抗PD-L1)の出現があり、ここ数年で大幅に改善された(Forner et al., 2018)が、その奏効率はいまだ不十分である。進行したHCCの予後を改善するには、免疫学的治療の新しい治療標的を探索することが依然として必要である。

ナチュラルキラー細胞(NK細胞)は自然免疫系に属するリンパ球で、初期の感染制御や腫瘍に対する生体防御機構において重要であり、免疫応答の調節に重要な役割を果たしている(Böttcher et al., 2018; Smyth et al., 2002)。具体的な抗腫瘍効果として、グランザイムやパーフォリンなどの顆粒を介して細胞死を誘導する経路、TRAILやFas Ligandといったデスレセプターを介してアポトーシスを誘導する経路およびIFN- γ を介して腫瘍増殖を抑制する経路など、いくつかのメカニズムが報告されている(Smyth et al., 2002)。また、さまざまな腫瘍微小環境下における免疫チ

チェックポイント療法に対する応答性を決定している (Barry et al., 2018)。NK 細胞に発現する免疫チェックポイント因子として、PD-1 の他、KIR2DL1 等の KIRs、ILT-2、TIGIT と CD96、LAG-3、TIM-3、CLA-4 などが報告されており (Khan et al., 2020)、肝がん患者における NK 細胞を検証することは、免疫学的治療戦略が新たな局面を迎えるための喫緊の課題と言える。

ヒト NK 細胞は、CD56 および CD16 の発現に応じて 2 つのサブセットに分類される (Cooper et al., 2001; Caligiuri, 2008)。CD56^{dim} CD16⁺ NK 細胞は高い細胞毒性活性を示し (Farag et al., 2003)、末梢血 NK 細胞集団の 90~95% を占める (Cooper et al., 2001)。CD56^{bright} CD16⁺ NK 細胞は強力なサイトカイン産生細胞 (Carson et al., 1997) 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% 程度を占める程度だが、肝臓において NK 細胞は肝内リンパ球 (IHL) の 30~50% を占めており (Tian et al., 2013)、肝臓内での自然免疫の重要な要素である事が知られている。ヒト NK 細胞の成熟は、CD34 および C-KIT (CD117) の発現の喪失と、それに続く CD94、CD16、および KIR の連続的な発現の上昇によって特徴付けられ (Freud and Caligiuri, 2006)、その他の自然リンパ球から区別される。NK 細胞の機能は、HLA クラス I 特異的抑制性受容体 (KIR および CD94) 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。代表的な非 HLA 特異的活性化マーカーとしては、NCR (NKp30、NKp44、および NKp46)、NKG2C、NKG2D、CD160、DNAM-1、および 2B4 などが挙げられ (Piñeiro et al., 2019)、抑制性受容体としては、先に述べた免疫チェックポイントである NKG2A、ILT2、PD-1、PD-L1、TIGIT、Tim-3、および CD96 などが挙げられる (Favier et al., 2010; Sivori et al., 2020) (図 1)。

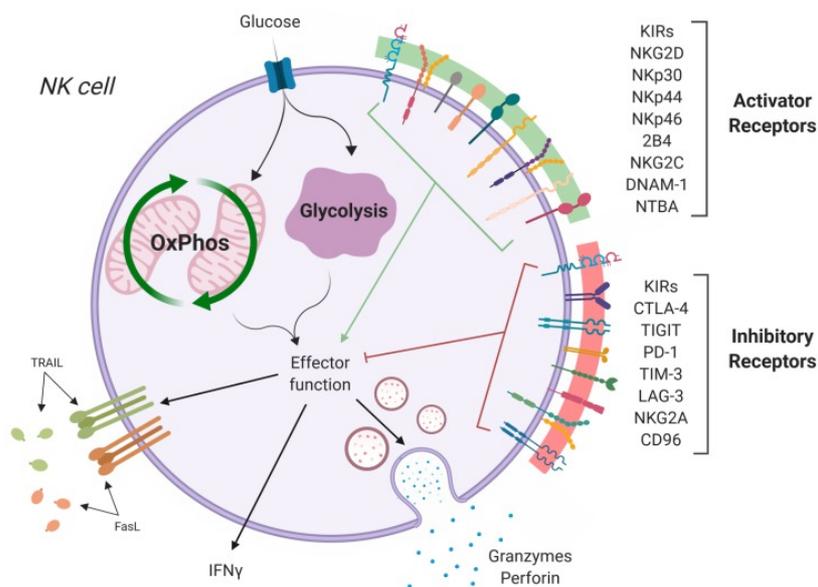


図 1 NK 細胞の活性化、抑制性マーカーの概況

(Piñeiro Fernández J, et al. Int J Mol Sci. 2019 より引用)

シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec; sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) は、マクロファージやNK細胞といった自然免疫細胞の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 (Varki and Angata, 2006; Crocker et al., 2007)。ヒトではSiglec-1から-12, および-14, -15, -16の15種類が報告され, その多くはシアル酸を含む糖鎖をリガンドとして反応することによって, 様々な免疫細胞の機能低下に寄与する (Siddiqui, et al., 2019; Hudak et al., 2014) (図2)。シアル酸は脊椎動物や棘皮動物を含む後口動物と一部の微生物のみが発現するまれな糖であり, 後口動物にとってはシアル酸で修飾された細胞は自己, シアル酸を持たない細胞(微生物)は非自己という区別が基本的には成り立っている (Angata and varki, 2002)。細胞のがん化に伴って糖鎖の構造が変化しシアル酸の発現が亢進し, Siglecが免疫系細胞とがん細胞の相互作用に関わり, がん細胞による免疫サーベイランスの回避に関与している (Bull et al., 2014)。

NK細胞では主にSiglec-7およびSiglec-9の発現が報告されており (Jandus et al., 2014)、Siglec-7およびSiglec-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 (Brunetta., 2009; Varchetta et al., 2016)。具体的には, HBV/HCV慢性肝炎患者や HIV感染患者においてSiglec-7の発現が陽性の方が陰性に比べNK細胞の細胞傷害活性, およびサイトカイン産生能が高い (Varchetta et al., 2016) が, Siglec-7陽性NK細胞の頻度は低下している事 (Varchetta et al., 2013; Varchetta et al., 2016)、NAFLDにおいて, Siglec-7⁻ CD57⁺ PD-1⁺ の機能低下しているNK細胞の頻度が末梢血にて上昇している事が報告されている (Sakamoto et al., 2021)。

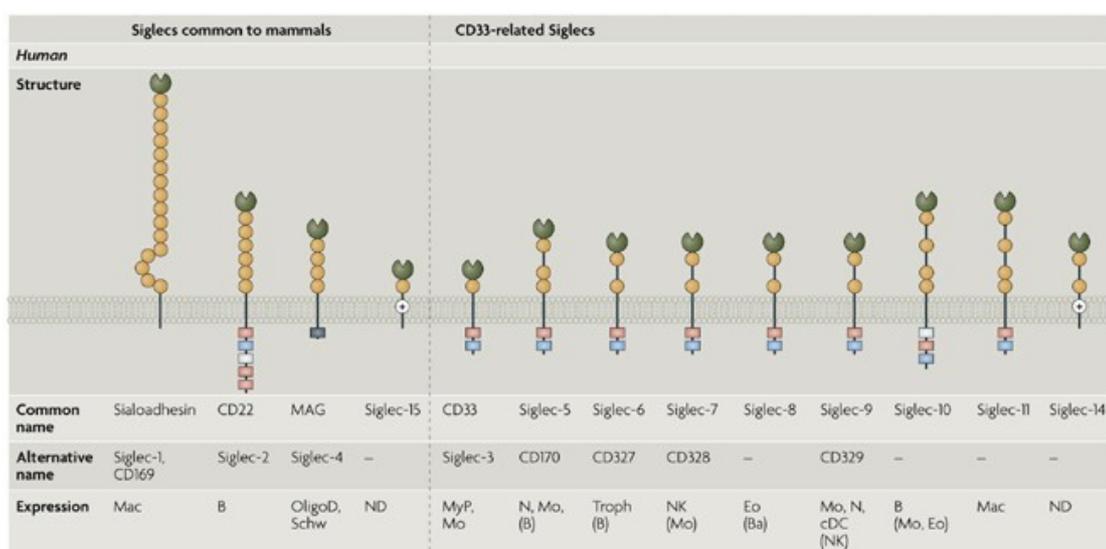


図2 ヒトにおける Siglec 発現
(Crocker PR et al. Nat Rev Immunol. 2007. より引用)

肝がん患者の末梢血または肝臓組織のいずれかにおけるNK細胞の頻度と機能に関する報告は多数あり、ほとんどの研究では肝がん患者のNK細胞の頻度と機能の低下が報告されており(Cai et al., 2008; Wu et al., 2013)、これらは予後と相関している(Chew et al., 2012; Hoechst et al., 2009)。一方、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(Liu et al., 2017; Tao et al., 2020)。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(Liu et al., 2017; Sun et al., 2017; Sun et al., 2019a; Sun et al., 2019b; Zhang et al., 2015)。

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。NK細胞の複数のパラメーターの関係を理解するために、マスサイトメトリーを使用して、PBMCとIHLの間のNK細胞を分析した。Siglecと免疫チェックポイント分子を含む肝がん患者の末梢血および腫瘍内NK細胞上の32分子の変化と共局在を分析した。本研究では、PBMCおよびHCC組織において、CX3CR1、Siglec-10、ILT2、およびPD-1の発現が増強されたCD49a⁺ CD56^{dim} NK細胞の新規亜集団を同定した。また、CD160およびCD49aは、肝がん患者においてそれぞれ末梢血CD56^{dim} NK細胞の活性化および抑制性表現型のサロゲートマーカーである事を同定した。

方法

1. 対象

本研究のPBMCは2019年3月から2020年3月まで久留米大学でHCCと診断され、肝動脈注入化学療法(TACE)で治療された肝硬変患者39名の患者を対象とした。また、肝疾患や悪性腫瘍の明らかな病歴がなく、HBs抗原、HIV抗原、抗HIV抗体、およびHCV抗体がいずれも陰性の健常成人8名を対照とした(表1)。また、HCC患者の肝内NK細胞を比較するため、2018年5月から2020年11月まで日本癌研究会がん研有明病院で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。また、これらの内8名は癌部組織および非癌部組織の他、PBMCも評価した(case1~8、表2)。

なお、本研究は国立国際医療研究センターを主体とした多施設共同研究であり、同倫理委員会により承認された課題名「癌関連線維芽細胞機能制御に基づく新規肝がん治療法の開発」に基づき行われた。また、各施設の倫理委員会の承認を得て行われ、研究参加に際しては書面による同意が得られた症例を対象とした。

2. 末梢血単核球(PBMC)の抽出方法

PBMCの抽出は、Ficoll-Paque (d=1.077、Nacalai Tesque、Kyoto、Japan)を用いた標準的な密度勾配遠心分離法によって分離した。全血を1×phosphate buffered saline (PBS) (Nacalai Tesque)を1:1で希釈し、Ficoll-Paqueの上に積層し、20°C、500xgで20分間遠心分離した。分離されたPBMCの薄い層を採取し、PBSを加え混和した後20°C、500xg、5分間で遠心分離し洗浄。洗浄は2回繰り返した。セルバンカー溶液(ZENOAQ RESOURCE CO Ltd、Fukushima、Japan)にて-150°Cで保存した。

3. 肝浸潤リンパ球(IHL)の抽出方法

がん研有明病院において、肝がん患者16症例に対して施行された治療的肝切除の際に採取した癌部組織および非癌部肝組織を用いた。標本採取後すぐに2mM L-グルタミン(Gibco、Carlsbad、CA、USA)、25 mM HEPES (Nacalai Tesque)、10%FCS (HyClone、South Logan、VT、USA)、および100U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン(Nacalai Tesque)を含むRPMI 1640 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)で冷蔵保存し、可及的に国立国際医療研究センター肝炎免疫研究センターへ輸送した後、以下の手順で肝浸潤リンパ球を抽出した。肝浸潤リンパ球の抽出方法は、既報論文を参考に施行した(Morsy et al., 2005)。

〈肝組織から浸潤リンパ球抽出までの手順〉

- i. 摘出した肝組織を2% FCS および0.6% BSA を含むHBSS (Gibco) で2回洗浄する。
- ii. 10cm dish 上で、肝切片 1mm 四方より小さく刻む。
- iii. DNase I 50 μ g/L (Promega, Madison, WI, USA) と collagenase IV 500 mg/L (Nordmark Arzneimittel GmbH&Co, KG, Uetersen, Germany) を添加した溶液に浸し、CO₂ インキュベーターにて37°C、5% CO₂ 下、40 rpm で、30-60 分間酵素反応させる。
- iv. 適宜肝組織を濾しながら、40 μ m セルストレイナー (Greiner Bio-One Inc, Frickenhausen, Germany) を通す。
- v. 得られた抽出液を回収し、リンパ球分離液Ficoll-Paque (Nacalai Tesque) を用いて密度勾配遠心分離法で肝浸潤リンパ球を抽出する。
- vi. MACS システム (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を使用してCD45⁺ IHL を回収し、セルバンカー溶液 (ZENOAQ RESOURCE CO Ltd) にて-150°Cで保存した。

4. Mass Cytometry (Cytometry Time-of-Flight; CyTOF) を用いた解析方法

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、細胞内在性成分による自家蛍光の影響を受けないため、細胞表面と細胞内タンパク(シグナル伝達系)を37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。本研究ではHelios™ マスサイトメータ CyTOF (Fluidigm, San Francisco, CA, USA) を用いて分析した。

方法は、冷凍保存されていた細胞検体を解凍し、1mM シスプラチン(Fluidigm)をPBSで2000倍に希釈したものを添加し洗浄後、細胞膜表面タンパク質に対する金属結合抗体を添加。室温で30分インキュベートし、1.6%パラホルムアルデヒド(Fluidigm)で固定し、シングレットとダブレットを区別するためにCell-ID™ Intercalator-Ir (Fluidigm)で標識してCyTOFを用いて分析した。CyTOFシグナルは、EQビーズ(EQ Four Element Calibration Beads, 201078, Fluidigm)を使用し、製造元の指示に従ってノーマライズした。データファイルは、Cytobankソフトウェア(Cytobank, Santa Clara, CA, USA)を使用して分析した。Heliosの概要を図3に示す。1サンプルあたり合計300,000のCD45⁺細胞を分析した。分析に使用した抗体を表4(パネル1)および表5(パネル2)に示した。図4は、NK細胞(CD45⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD56⁺)、CD4⁺ T細胞(CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8a⁻)、CD8⁺ T細胞(CD45⁺

CD3⁺ CD4⁻ CD8a⁺)、B 細胞(CD45⁺ CD3⁻ CD19⁺)、濾胞ヘルパーT (Tfh) 細胞(CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CXCR5⁺)、 γ δ T 細胞(CD45⁺ CD3⁺ TCR-Vdelta2⁺)、MAIT 細胞(CD45⁺ CD3⁺ CD161⁺ TCR-Va7.2⁺)、NKT 細胞(CD45⁺ CD3⁺ TCR-Va24-Ja18⁺)、単球(CD45⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁺)、ミエロイド系樹状細胞タイプ 1 (mDC1 : CD45⁺ CD3⁻ CD14⁻ CD19⁻ CD56⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD123⁺)、および形質細胞様樹状細胞 (pDC; CD45⁺ CD3⁻ CD19⁻ CD14⁻ CD56⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁻ CD123⁺) を同定するために使用したゲーティングストラテジーを示した。CyTOF から生成されたデータファイルは、visNE アルゴリズムに基づく次元削減メソッドを施し、これにより多次元データ構造を保持しながら、多次元サイトメトリーデータを 2 次元で表示する事が可能である (Kimball et al., 2018)。visNE 分析では、各ドナーから合計 15,000 個の NK 細胞が含まれ、データは平均信号強度 (MSI) に基づいてクラスター化した。

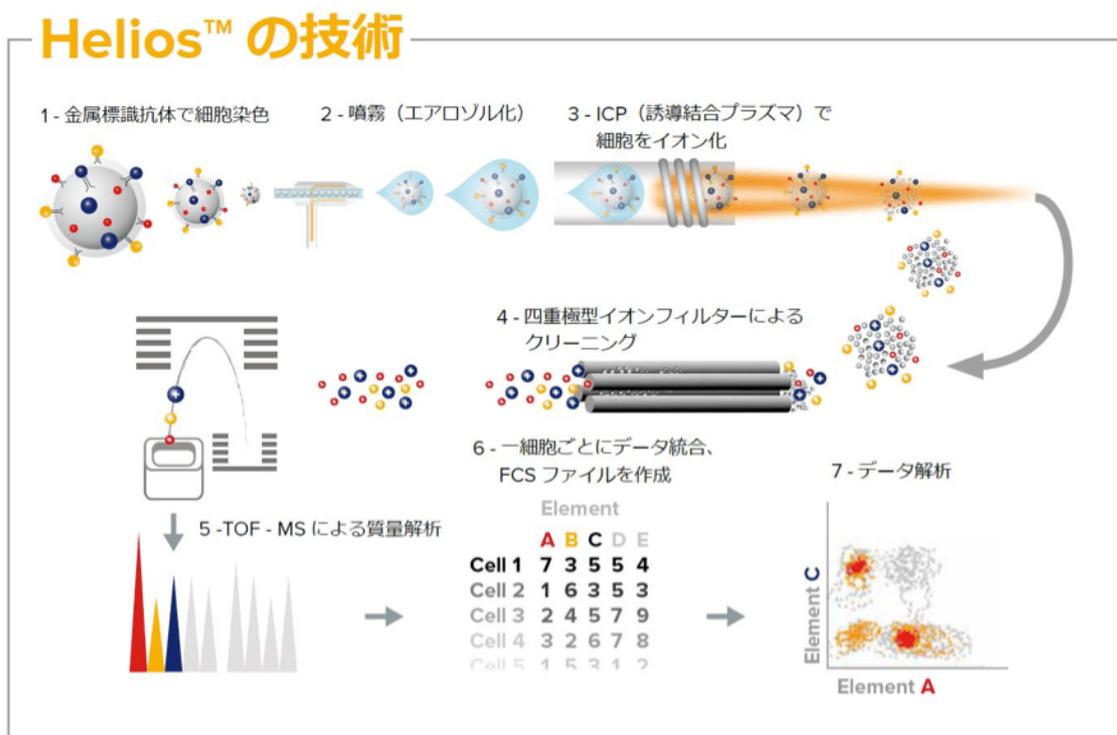


図3 ヘリオスの技術の概要

(<https://jp.fluidigm.com/japan-news/pages/helios> より引用)

5. 統計解析

2 群間の比較には対応がないものは Mann-Whitney U-test を、対応のあるものは Wilcoxon signed-rank test を使用し、他群間の比較には Kruskal-Wallis with Dunn' s multiple comparison test を使用した。相関の検討では、Spearman 順位相関係数を用いた。統計解析ソフトは、Prism software version 7 (GraphPad, La Jolla, CA, USA)、JMP Pro version 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA)、R software packages (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用し、P 値は 0.05 未満を有意とした。

結果

本研究における対象症例の臨床データおよびマスサイトメータ CyTOF での測定項目を表 1~5 に示す。

表 1 PBMC の解析を行った肝がん患者および健常者の臨床病理学的背景

	HV	HCC
Gender (male/ female)	8 / 0	19 / 20
Age (years)	31.4 ± 6.7	80.4 ± 8.3
Etiology		HBV 2 / HCV 24 / NAFLD 10 / other 3
Child pugh score		6.1 ± 1.1
Child pugh classification (A / B / C)		26 / 13 / 0
Ascites +/-		8 / 31
Varix +/-		4 / 35
T factor (1/2/3/4)		3 / 14 / 18 / 4
N factor (0/1)		38 / 1
M factor (0/1)		38 / 1
Stage (I/II/IIIa/IIIb/IV)		3 / 14 / 18 / 3 / 1
Hb (g/dl)	14.5 ± 1.0	11.5 ± 2.0
Platelet (×10 ⁴ /μl)	25.5 ± 5.6	11.8 ± 5.8
AST (IU/l)	22 ± 6	98 ± 102
ALT (IU/l)	21 ± 8	61 ± 73
gGTP (IU/l)	23 ± 7	117 ± 187
ChE (U/L)	N.T.	173 ± 69
T-Bil (mg/dl)	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.5
Alb (g/dl)	4.2 ± 0.3	3.2 ± 0.5
PT (%)	N.T.	91 ± 20
Cre (mg/dl)	0.85 ± 0.08	0.86 ± 0.31
T-chol (mg/dl)	N.T.	169 ± 39
AFP (ng/ml)	N.T.	7554 ± 31953
DCP (mAU/ml)	N.T.	3998 ± 7797
Fib-4 index	N.T.	9.8 ± 6.4
NH3 (μg/dL)	N.T.	52 ± 40

Hb, ヘモグロビン; AST, アスパラギン酸アミノ基転移酵素; ALT, アラニンアミノ基転移酵素; gGTP, γ-グルタミルトランスフェラーゼ; ChE, コリンエステラーゼ; T-Bil, 総ビリルビン; Alb, アルブミン; PT, プロトロンビン時間; T-chol, 総コレステロール; Cre, クレアチニン; AFP, α-フェトプロテイン; DCP, Des-γ-carboxy prothrombin; HBV, B 型肝炎ウイルス; HCV, C 型肝炎ウイルス; NAFLD, 非アルコール性脂肪性肝疾患; N.T., 未検査

表2 NK細胞の表面マーカーを解析した肝がん患者の臨床病理学的背景

	HCC
Gender (male/ female)	3 / 5
Age (years)	80.5 ± 13.1
Etiology	HBV 2 / HCV 4 / NAFLD 2
Child-Pugh score	6.1 ± 1.1
Child-Pugh classification (A / B / C)	5 / 3 / 0
Ascites +/-	3 / 5
Varix +/-	2 / 6
T factor (1/2/3/4)	1 / 3 / 3 / 1
N factor (0/1)	8 / 0
M factor (0/1)	8 / 0
Stage (I/II/IIIa/IIIb/IV)	1 / 3 / 3 / 1 / 0
Hb (g/dl)	11.4 ± 1.2
Platelet (× 10 ⁴ /μl)	12.0 ± 7.3
AST (IU/l)	115 ± 64
ALT (IU/l)	50 ± 27
gGTP (IU/l)	76 ± 61
ChE (U/L)	146 ± 48
T-Bil (mg/dl)	1.1 ± 0.5
Alb (g/dl)	3.3 ± 0.5
PT (%)	89 ± 19
Cre (mg/dl)	0.74 ± 0.21
T-cholesterol (mg/dl)	158 ± 39
AFP (ng/ml)	24512 ± 64739
DCP (mAU/ml)	3412 ± 6283
Fib-4 index	11.2 ± 5.3
NH3 (μg/dL)	52 ± 32

Hb, ヘモグロビン; AST, アスパラギン酸アミノ基転移酵素; ALT, アラニンアミノ基転移酵素; gGTP, γ-グルタミルトランスフェラーゼ; ChE, コリンエステラーゼ; T-Bil, 総ビリルビン; Alb, アルブミン; PT, プロトロンビン時間; T-cholesterol, 総コレステロール; Cre, クレアチニン; AFP, α-フェトプロテイン; DCP, Des-γ-carboxy prothrombin; HBV, B型肝炎ウイルス; HCV, C型肝炎ウイルス; NAFLD, 非アルコール性脂肪性肝疾患.

表3 IHLの解析を行った肝がん患者の各々の臨床病理学的背景

Case	Age	Gender	Etiology	Laboratory data							Tumor / Liver Characteristics					Observation period (month)	
				CH or LC	PBMC	Plt x10 ⁴ (/ul)	Alb (g/dl)	PT (%)	PIVKA-II	AFP	F stage	T factor	Differentiation	Size (cm)	St / Mt		Outcome
1	81	M	NASH	LC	○	14.8	3.5	121.6	419	3.9	4	3	mod	3.6	St	Dead	5
2	64	M	C	CH	○	8.4	4	128.3	302	30.8	3	4	mod	7	Mt	Alive	8
3	87	F	NASH	LC	○	18.5	4.1	110.7	1793	6.4	4	2	mod	6.5	St	Alive	12
4	84	M	NASH	CH	○	22.6	3.7	130	332	2.4	2	1	well	1	St	Alive	14
5	77	M	NASH	CH	○	19.3	4.4	130	51	4.9	2	2	poorly	7	St	Alive	3
6	59	M	C	CH	○	8.2	3.5	82	50000	200.8	3	2	mod	8	St	Rec	18
7	81	M	NASH	CH	○	22.2	4.4	96	2959	6.7	2	2	mod	6.5	St	Alive	19
8	69	M	Alc	CH	○	15.5	4.4	100	866	48.7	N.T.	2	mod	5	St	Rec	25
9	77	F	C	CH	N.T.	10.6	4.1	100	23	45.8	3	1	poorly	1.5	St	Alive	33
10	70	F	C	LC	N.T.	10	3.7	91	67	63.4	4	3	mod	6.7	St	Alive	31
11	74	M	Alc	CH	N.T.	21.1	4	100	118	3.4	N.T.	2	mod	7.8	St	Alive	30
12	85	M	NASH	CH	N.T.	16.2	4.5	95	765	91.4	N.T.	2	mod	4.3	St	Alive	30
13	45	M	B	LC	N.T.	14.2	4.2	100	1200	28.6	4	2	mod	1	Mt	Alive	29
14	65	M	Alc	LC	N.T.	12	4.3	92	N.T.	N.T.	4	1	mod	1.5	St	Alive	28
15	45	M	B	LC	N.T.	16.8	4.7	84	371	6.8	4	4	mod	3.5	Mt	Alive	27
16	58	M	C	CH	N.T.	14.5	4.5	90	4182	3586.5	3	3	mod	3	St	Dead	26

PBMC, 末梢血単核球; Plt, 血小板; Alb, アルブミン; PT, プロトロンビン時間; PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence or antagonist II AFP, α -フェトプロテイン; F stage, 肝線維化ステージ; T factor, 日本肝癌研究会の定める病期分類法に基づいた腫瘍因子; St, 単発腫瘍; Mt, 多発腫瘍; NASH, 非アルコール性脂肪肝炎; C, C型肝炎; B, B型肝炎; Alc, アルコール性肝炎; CH, 慢性肝炎; LC, 肝硬変; N.T., 未検査; mod, moderate; Rec, 再発.

表4 パネル1で使用した金属抗体

Channel	Isotope	Marker	Function of Markers	Clone	Staining Method	PC/IH
89	Y	CD45	lymphocytes identification	HI30	surface	PC
142	Nd	CD19	B cell identification	HIB19	surface	PC
143	Nd	HLA-DR	DC identification	L243	surface	PC
145	Nd	CD4	CD4 T identification	PRA-T4	surface	PC
147	Sm	CD11c	mDC identification	Bu15	surface	PC
151	Eu	CD123 (IL-3R)	pDC identification	6H6	surface	PC
154	Sm	TCR Va7.2	MAIT identification	3C10	surface	PC
155	Gd	CD56 (NCAM)	NK identification	B159	surface	PC
160	Gd	CD14	monocytes identification	M5E2	surface	PC
164	Dy	CD161	MAIT inhibitory	HP-3G10	surface	PC
167	Er	CD3	T cell inhibitory	UCHT1	surface	PC
168	Er	CD8a	CD8a T identification	SK1	surface	PC
170	Er	TCR Va24-Ja18	iNKT cell identification	6b11	surface	PC
171	Yb	CD185 (CXCR5)	Tfh cell identification	RF8B2	surface	PC
172	Yb	CD45RA	Naïve T identification	HI100	surface	PC
173	Yb	TCR VDelta2	$\gamma\delta$ T identification	B6	surface	IH
209	Bi	CD16	cytotoxicity NK identification	3G8	surface	PC

HLA-DR, human leukocyte antigen-DR; TCR, T cell receptor; DC, 樹状細胞; mDC, 骨髄系樹状細胞; pDC, 形質細胞様樹状細胞; MAIT, mucosal associated invariant T cell; NK, ナチュラルキラー細胞; Tfh, 濾胞性ヘルパーT細胞; IH, in-house (labeling kit); PC, pre-conjugated.

表5 パネル2 で使用した金属抗体

Channel	Isotope	Marker	Function of Markers	Clone	Staining Method	PC/IH
89	Y	CD45	lymphocytes identification	HI30	surface	PC
106	Cd	CD3	T cell identification	UCHT1	surface	IH
112	Cd	CD85j (ILT2)	NK inhibition	292305	surface	IH
113	Cd	CD314 (NKG2D)	NK activation	149810	surface	IH
114	Cd	CD56 (NCAM)	NK identification	HCD56	surface	IH
116	Cd	TIGIT	inhibitory immune checkpoint	741182	surface	IH
141	Pr	CD27	NK differentiation	O323	surface	IH
144	Nd	CD69	NK activation	FN50	surface	PC
145	Nd	KIR2DL1	NK inhibition	MAB1844	surface	IH
146	Nd	CXCR6	NK differentiation	56811	surface	IH
147	Sm	CD159c (NKG2C)	NK activation	MAB1381	surface	IH
148	Nd	Siglec-10	Siglec family	AF2130	surface	IH
149	Sm	Siglec-9	Siglec family	K8	surface	IH
150	Nd	CXCR1	NK activation	42705	surface	IH
151	Eu	CD96	NK activation	MAB6199	surface	IH
152	Sm	CD328 (Siglec-7)	Siglec family	194211	surface	PC
153	Eu	TIM-3	inhibitory immune checkpoint	F38-2E2	surface	PC
154	Sm	CD49a	NK differentiation	AF5676	surface	PC
155	Gd	CX3CR1	NK differentiation	AF5825	surface	IH
156	Gd	CD94	NK inhibition	131412	surface	IH
159	Tb	CD337 (NKp30)	NK activation	Z25	surface	PC
160	Gd	CD14	monocytes identification	M5E2	surface	PC
162	Dy	CD335 (NKp46)	NK activation	BAB281	surface	IH
164	Dy	TRAIL	NK activation	RIK-2	surface	IH
165	Ho	CD223 (LAG-3)	inhibitory immune checkpoint	11C3C65	surface	PC
167	Er	CD158e1 (KIR3DL1)	NK inhibition	DX9	surface	PC
168	Er	CD160	NK activation	688327	surface	IH
169	Tm	CD159a (NKG2A)	NK inhibition	Z199	surface	PC
170	Er	CD244 (2B4)	NK activation	MAB10393	surface	IH
171	Yb	CD226 (DNAM-1)	NK activation	DX11	surface	PC
172	Yb	FasL	NK activation	NOK-1	surface	IH
173	Yb	CD158b (KIR2DL2/L3)	NK inhibition	DX27	surface	PC
174	Yb	CD279 (PD-1)	inhibitory immune checkpoint	EH12.2H7	surface	PC
175	Lu	CD336 (NKp44)	NK activation	MAB22491	surface	IH
209	Bi	CD16	cytotoxicity NK identification	3G8	surface	PC

ILT2, Ig-like transcript 2; human leukocyte antigen-DR; TIGIT, T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains; KIR, Killer cell Immunoglobulin-like Receptor; Siglec, シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン; TIM-3, T- cell immunoglobulin and mucin domain 3; TRAIL, tumor necrosis factor- related apoptosis-inducing ligand; LAG-3, Lymphocyte activation gene 3; DNAM-1, DNAX Accessory Molecule-1; PD-1, programmed cell death-1; IH, in-house (labeling kit); PC, pre-conjugated.

1. 肝がん患者の末梢血におけるNK細胞

1.1 肝がん患者において末梢血 CD56^{dim} NK細胞の減少を認めた

我々はまずCyTOFを用いて8名の健常者と39名の肝がん患者の末梢血の免疫細胞動態を検証した。患者背景を表1に示す。各種抗体の測定は表4に示したパネル1を使用し、それぞれの免疫細胞のゲーティングは図4の通りである。肝がん患者ではNK細胞、CD8⁺ T細胞、MAIT細胞、CD4⁺ T細胞、Tfh細胞、B細胞、T細胞、pDCが減少し、単球とmDC1が増加した(図5)。CD56^{dim} NK細胞の頻度は、健常者と比較してHCCの患者で減少したが、CD56^{bright} NK細胞の頻度は同等であった(図6)。

なお、これらの結果を得る前に、パイロット研究として肝癌患者の一部の検体を用いてTACE前後の各種免疫細胞の頻度も検証しているが、NK細胞に有意差は見られなかった(図7)。

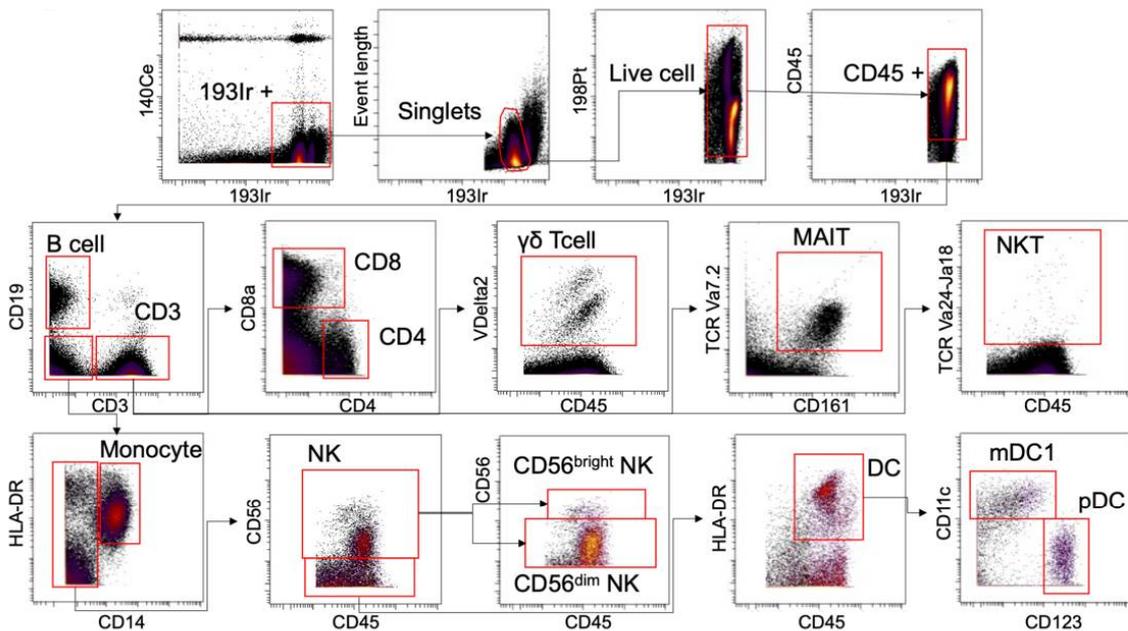


図4 各種免疫細胞のゲーティングストラテジー

マスサイトメトリ-CyTOFでの各種免疫細胞を同定するためのゲーティングスキームを示した。

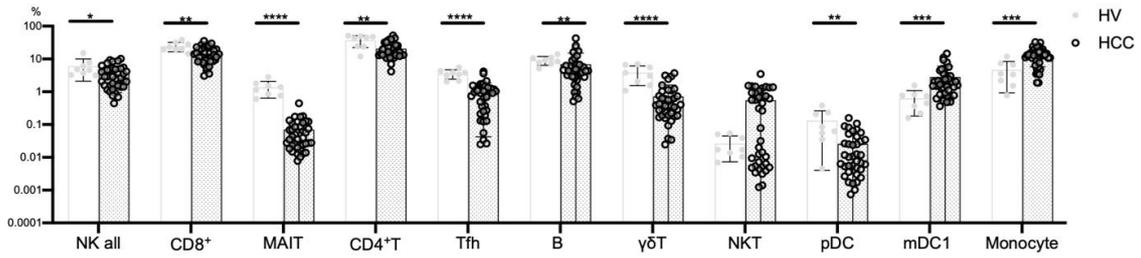


図5 肝がん患者および健常者の免疫細胞の頻度

肝がん患者 (HCC=39) と健常者 (HV=8) の各種免疫細胞の頻度を比較した。それぞれのグラフは平均値±標準誤差で示した。* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001。

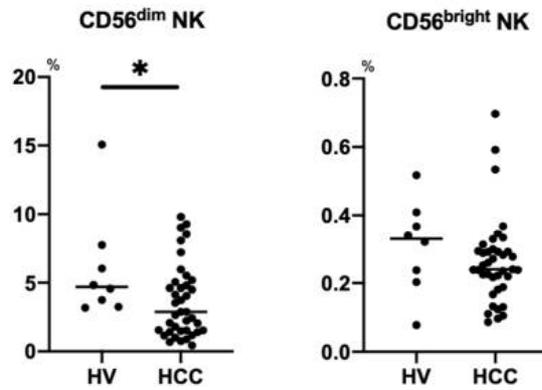


図6 肝がん患者と健常者における CD56^{dim} NK 細胞と CD56^{bright} NK の頻度
肝がん患者 (HCC=39) および健常者 (HV=8) の CD56^{dim} および CD56^{bright} NK 細胞の頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデータと平均値を示した。* p<0.05。

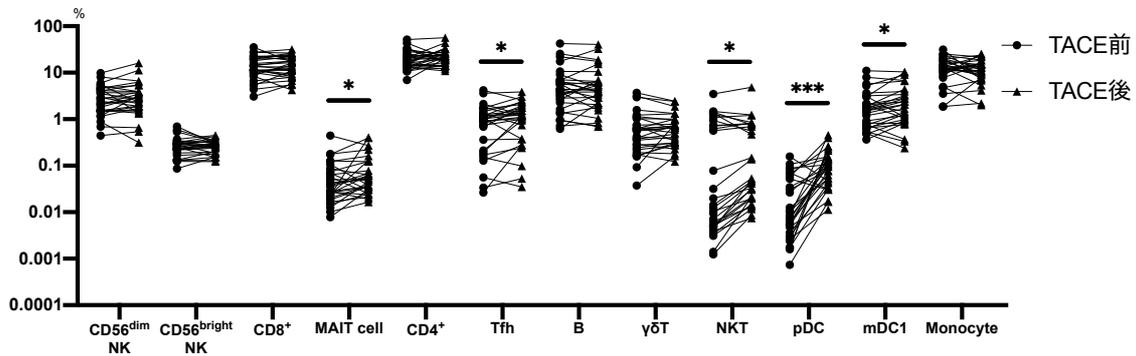


図7 TACE 治療前後の免疫細胞の頻度

肝がん患者 (HCC=30) の PBMC における TACE 治療前後の各種免疫細胞の頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。* p<0.05; *** p<0.001。

1.2 肝がん患者において、CD160⁺ Siglec-7⁺ CD49a⁻ CD56^{dim} 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⁺ CD56^{dim} NK 細胞の増加を認めた

次に、表 5 に示すパネル 2 を使用して、肝がん患者と健常者の間で末梢血 CD56^{dim} NK 細胞上の 32 個の表面マーカーの発現パターンを比較した。8 人の肝がん患者と 8 人の健常者における 32 個の表面マーカーのそれぞれの発現をヒートマップで示し、デンドログラムを作成し階層的クラスタリング解析を行った(図 8)。肝がん患者と健常者は異なるクラスターに分類された。肝がん患者および健常者の PBMC を用いた CyTOF 分析の代表的な visNE プロットを図 9A に示し、その等高線プロットを図 9B に、群間比較のドットプロットを図 9C に示した。赤い円で示した部は肝がん患者には存在しない、健常者特有の CD56^{dim} NK 細胞の亜集団であり、その特徴は CD160⁺ Siglec-7⁺ CD49a⁻であった。一方、青い円で示した部は肝がん患者に特徴的に存在する CD56^{dim} NK 細胞の亜集団であり、その特徴は CD160⁻ Siglec-7⁻ CD49a⁺であり、その一部は Siglec-10、ILT2、または PD-1 を発現していた。Gallazzi らは炎症性および血管新生促進性の特徴を有する末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} NK 細胞は、前立腺癌の患者で増加することを報告したが(Gallazzi M et al., 2020)、本研究では末梢血 CD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞も増加し、肝がん患者の抑制性マーカー(Siglec-10、ILT2、および PD-1)を発現することを同定した。CD56^{dim} NK 細胞における CD160、Siglec-7、NKp46、および NKp30 の発現レベルと頻度は、健常者と比較して肝がん患者で有意に減少し、CD49a、ILT2、および PD-1 の発現レベルと頻度が増大した(図 9)。その他の表面マーカーは肝がん患者と健常者の間で有意差を示さなかった(図 10)。要約すると、CD160、Siglec-7、NKp46、NKp30 の発現の減少、および ILT2 と PD-1 による CD49a の発現の増加は、肝がん患者の末梢血 CD56^{dim} NK 細胞特有の特徴であった。

CD160⁺ CD56^{dim} NK 細胞の頻度は、Siglec-7⁺、NKp46⁺、および NKp30⁺ CD56^{dim} NK 細胞の頻度と正の相関を認めた(図 11)。また、CD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞の頻度は、Siglec-10⁺、および ILT2⁺ CD56^{dim} NK 細胞の頻度と正の相関を認めた(図 11)。これらのデータは、CD160 および CD49a が、肝がん患者における末梢 CD56^{dim} NK 細胞の活性化および抑制性表現型の代理マーカーであることを示唆していた。

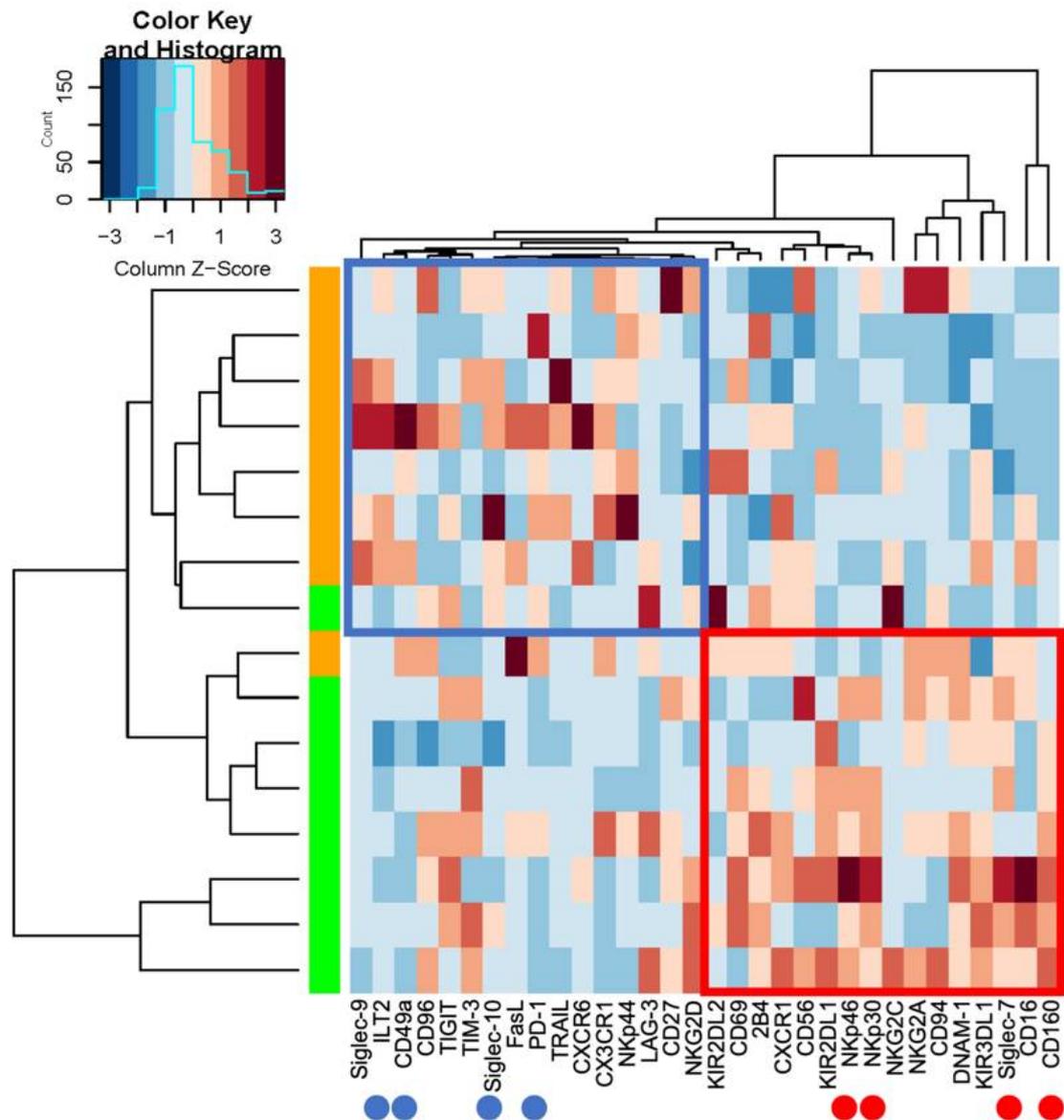


図8 末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの階層的クラスタリング解析
 肝がん患者 (n=8) (縦軸：橙) および健常者 (n=8) (縦軸：緑) の末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの発現 (横軸) のヒートマップおよびデンドログラムを用いた階層的クラスタリング解析を示した。青で囲われた領域は肝がん患者で発現が亢進している部で、赤く囲われた領域は健常者で発現が亢進している部を表している。それぞれ丸がついているマーカーは肝がん患者と健常者の発現で有意差を認めたマーカーを示した。

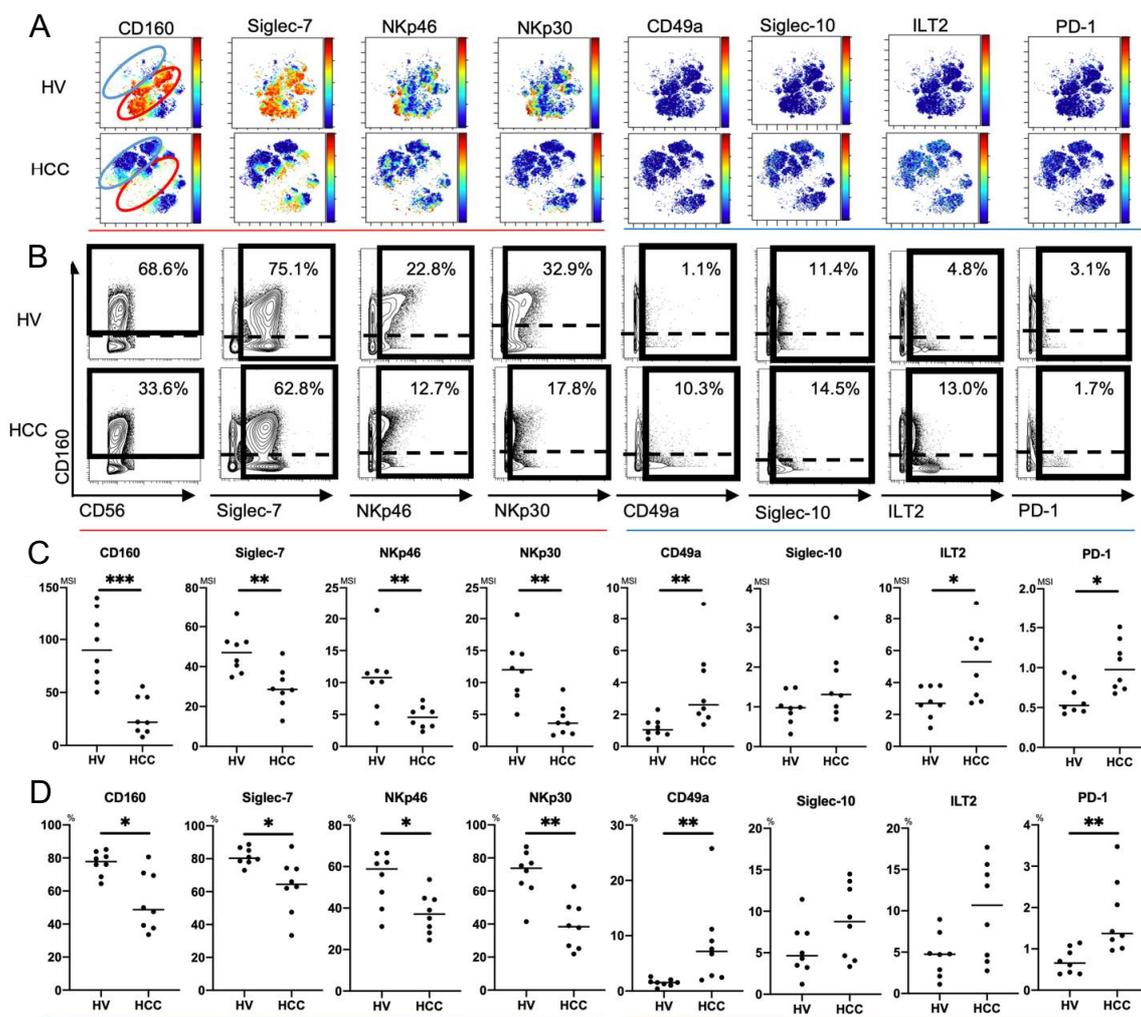


図9 肝がん患者および健常者の末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカー
 末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーを肝がん患者(n=8)と健常者(n=8)で比較した。
 (A) 代表的な viSNE プロットを示した。カラースケールは各表面マーカー発現強度を
 赤(高)~青(低)で示している。赤い円は健常者で、青い円は肝がん患者で特異的に検
 出された亜集団を示している。(B) 代表的なマスサイトメトリープロットを示した。
 (C) 肝がん患者と健常者の各表面マーカーの発現強度(MSI)を比較した。(D) 肝がん患
 者と健常者の各表面マーカーの発現頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデー
 タと平均値を示した。*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001。

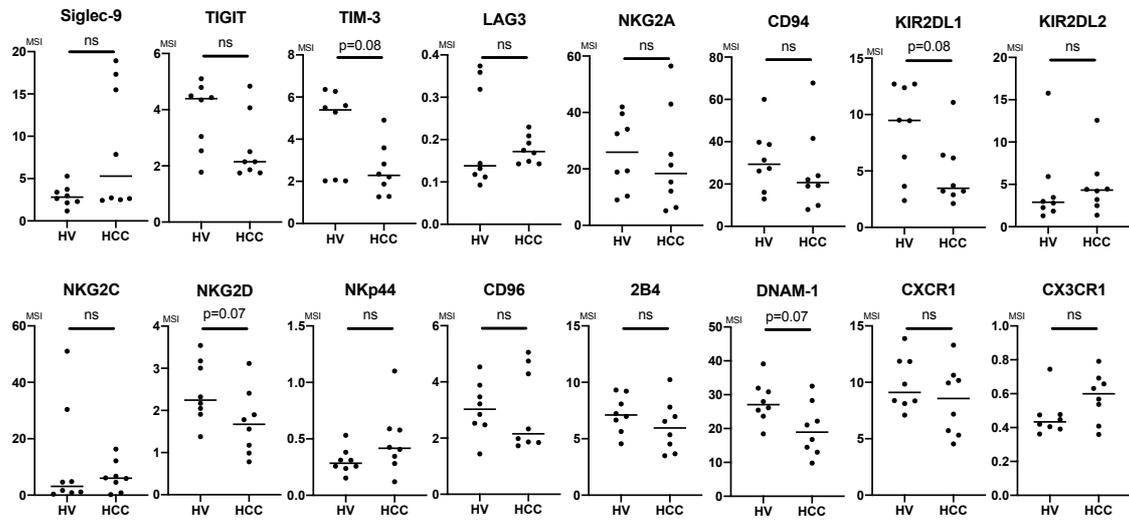


図10 肝がん患者および健常者の末梢血 CD56^{dim} NK 細胞のその他の表面マーカー
 末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を肝がん患者 (n=8) および健
 常者 (n=8) で比較した。それぞれのグラフは個別のデータと平均値を示した。

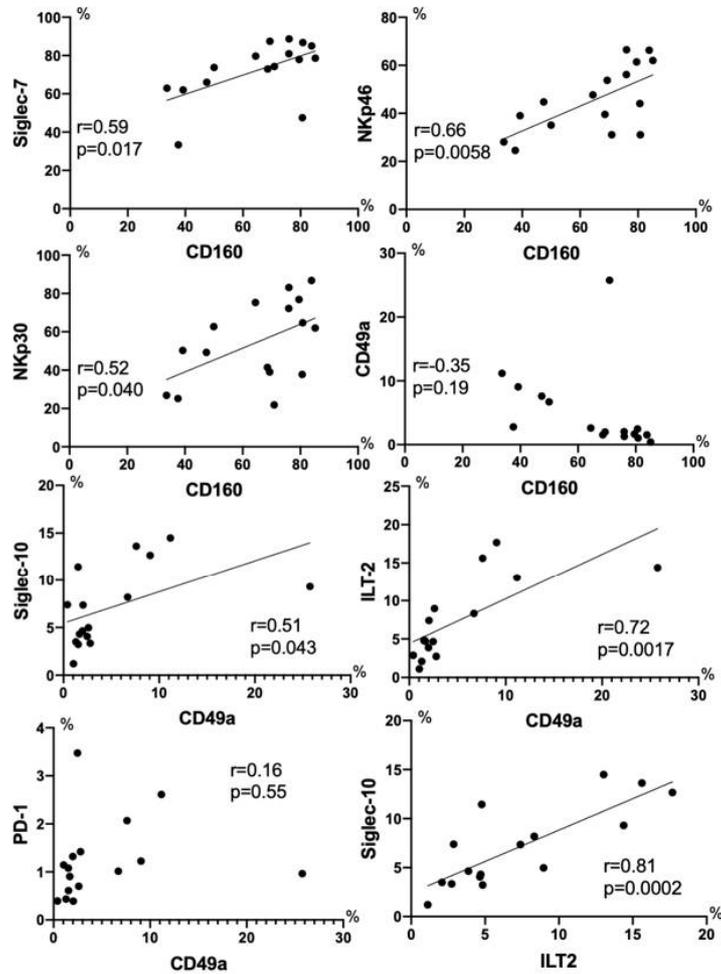


図 11 末梢血 CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカー同士の相関関係

末梢血 CD56^{dim} NK 細胞における CD160 と Siglec-7、NKp46、NKp30、CD49a、Siglec-10、ILT-2、および PD-1 の発現頻度の相関を示した。p 値と相関係数(r)は、スピアマンの相関検定によって算定した。

1.3 肝がん患者において Siglec-10 および ILT2 発現を伴う末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} NK 細胞の増加を認めた

次に、先ほどの表 5 で示したパネル 2 を使用して、肝がん患者と健常者の間で末梢血 CD56^{bright} NK 細胞上の 32 個の表面マーカーの発現パターンを同様に比較した。肝がん患者と健常者は異なるクラスターに分類されなかった(図 12)。NKp46 発現の減少と CD49a、Siglec-10、および ILT2 の発現の増加は、肝がん患者の末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の特徴であった(図 13A～図 13C)。CD56^{dim} NK 細胞とは異なり、CD160 または Siglec-7 陽性の CD56^{bright} NK 細胞の頻度は、肝がん患者では減少しなかった(図 13A～図 13C)。その他の表面マーカーは肝がん患者と健常者の間で有意差を示さなかった(図 14)。健常者のデータとの比較から、末梢血 CD56^{bright} NK 細胞は、末梢血 CD56^{dim}

NK 細胞よりも低い CD160 および Siglec-7 発現レベルを示した (図 15)。Sun らは HCC 組織における肝内 CD49a⁺ CXCR6⁺ NK 細胞の蓄積を報告している (Sun et al., 2019b)。また、Gallazzi らは炎症性および血管新生促進性の特徴を有する末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} NK 細胞は、前立腺癌の患者で増加することを報告している (Gallazzi M et al., 2020)。ここでは、末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} NK 細胞が増加し、肝がん患者で抑制性マーカーである Siglec-10 と ILT2 が発現していることを同定した。

なお、これらの結果を得る前にパイロット研究として、パネル 1 で測定した検体の一部を用いて、末梢血 CD56^{dim} NK 細胞および CD56^{bright} NK 細胞表面の各種免疫チェックポイント分子 (TIGIT, TIM-3, PD-1, LAG-3)、および Siglec-7, -9, -10 の発現を TACE 治療前後で検証したが、いずれも有意差を認めなかった (図 16)。

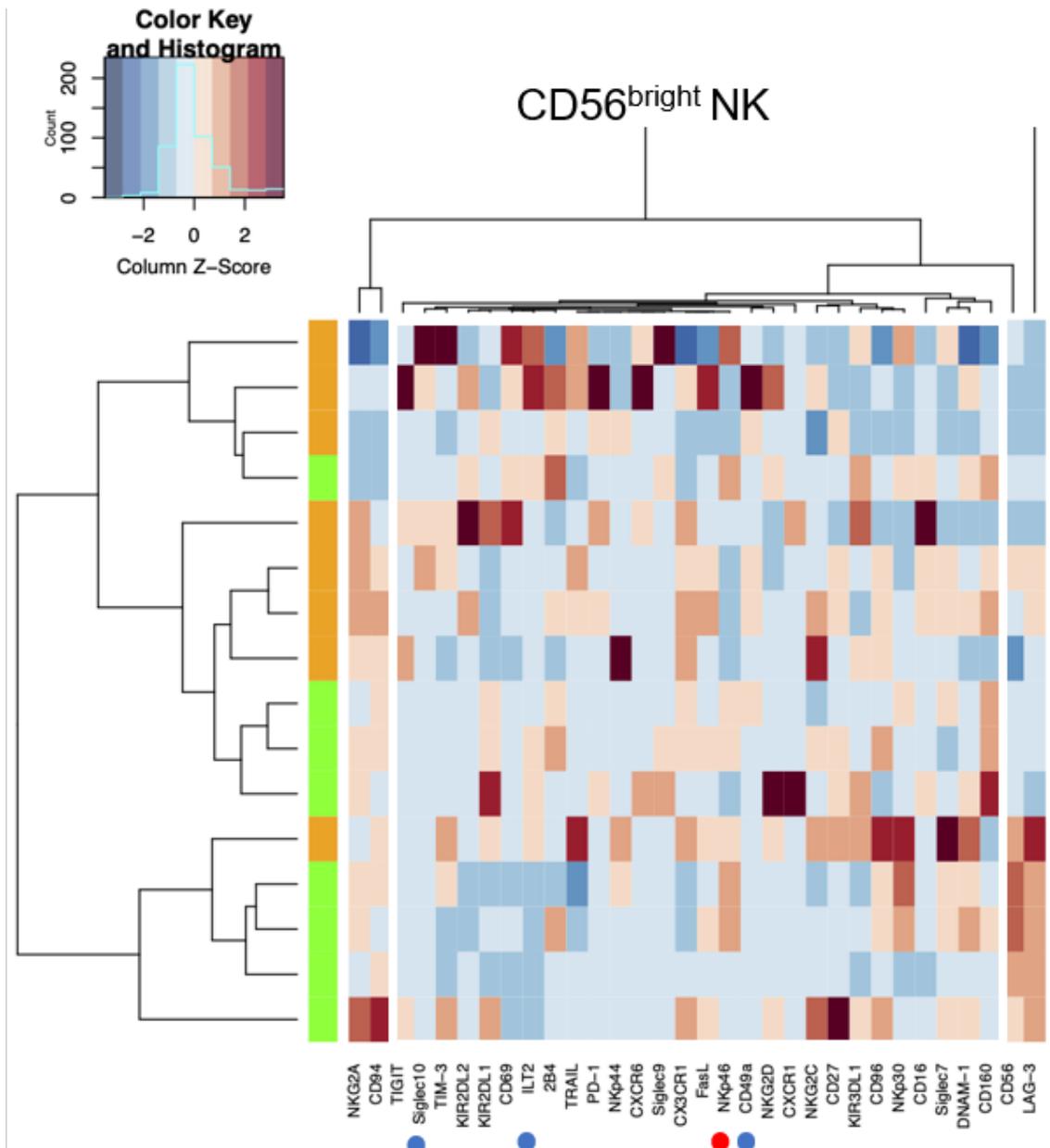


図12 末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーの階層的クラスタリング解析
 肝がん患者 (n=8) (縦軸：橙) および健常者 (n=8) (縦軸：緑) の末梢血 CD56^{bright} NK 細胞
 の表面マーカーの発現 (横軸) のヒートマップおよびデンドログラムを用いた階層的ク
 タスタリング解析を示した。それぞれ丸がついているマーカーは肝がん患者と健常者
 の発現で有意差を認めたマーカーを示した。

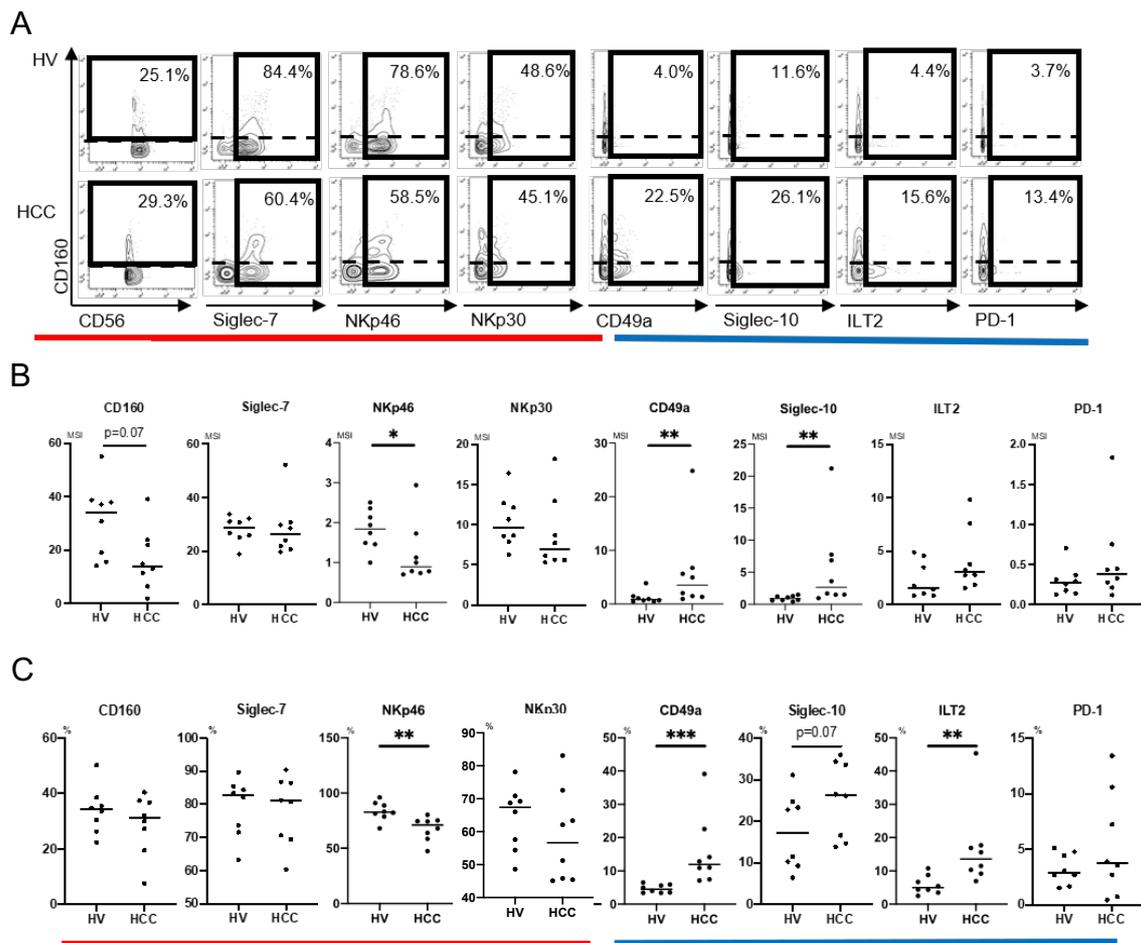


図 13 肝がん患者および健常者の末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカー
 末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーを肝がん患者 (n=8) と健常者 (n=8) で比較し
 た。(A) 代表的なマスマイトメトリープロットを示した。(B) 肝がん患者と健常者の各
 表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。(C) 肝がん患者と健常者の各表面マーカー
 の発現頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデータと平均を示した。* p < 0.05;
 ** p < 0.01; *** p < 0.001。

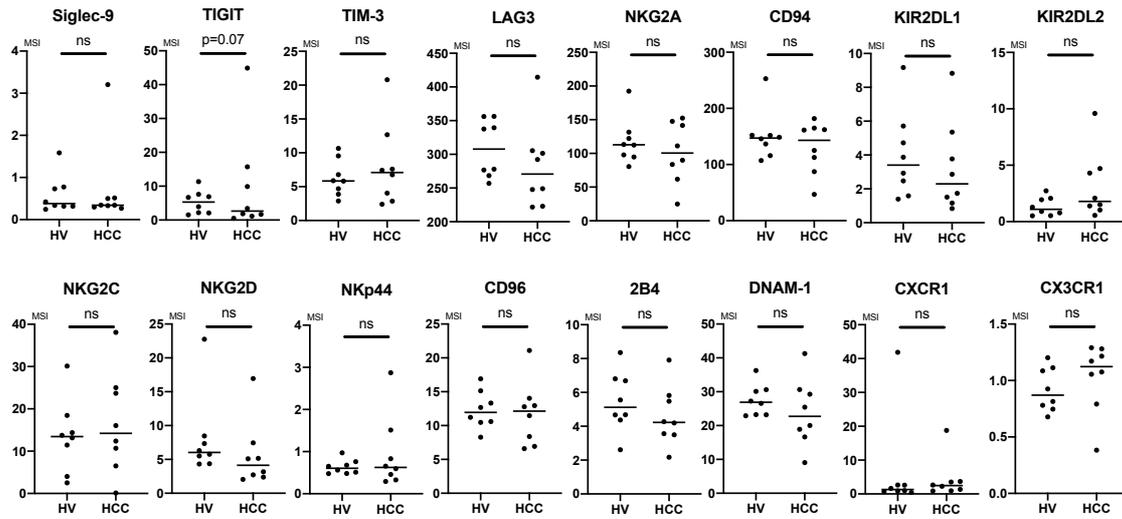


図 14 肝がん患者および健常者の末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカー
 末梢血 CD56^{bright} NK 細胞の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を肝がん患者 (n=8) および
 健常者 (n=8) で比較した。それぞれのグラフは個別のデータと平均を示した。

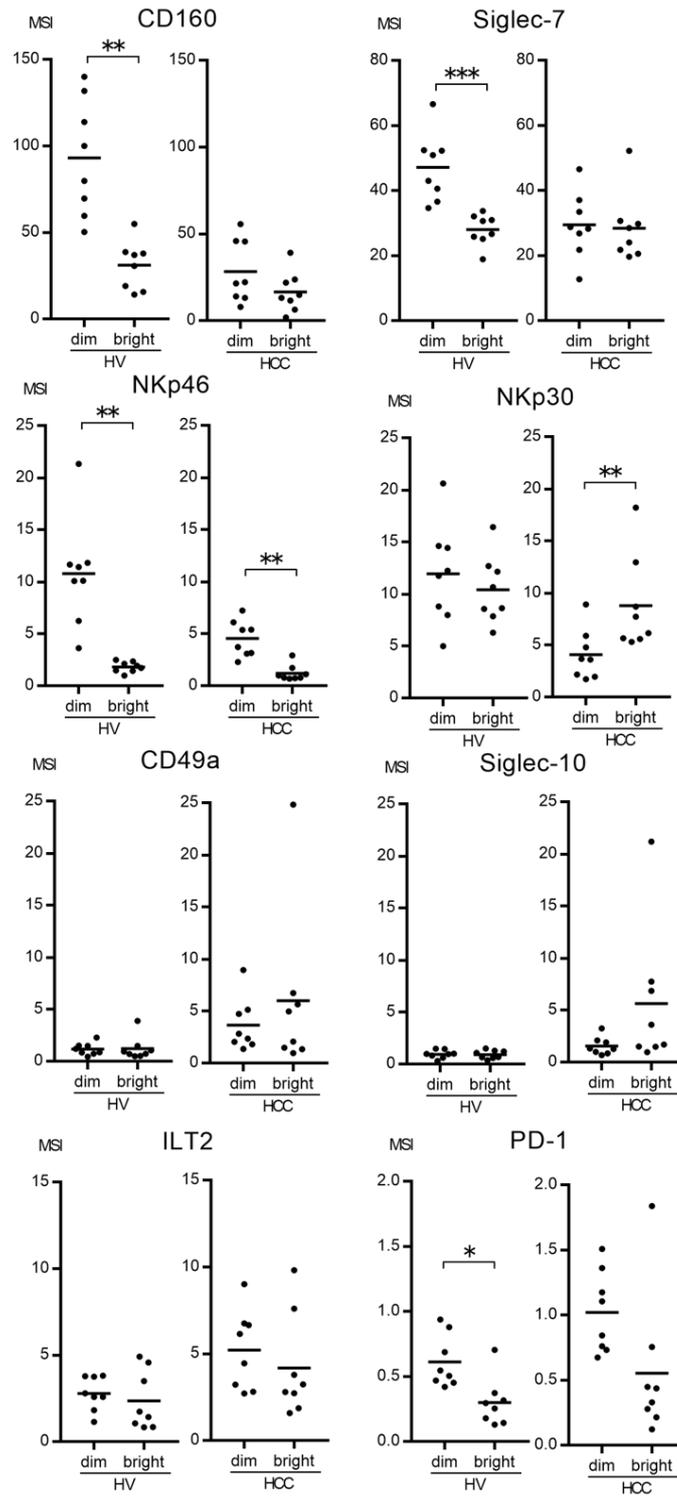


図 15 末梢血 CD56^{dim} および CD56^{bright} NK の表面マーカーの発現強度の比較
 肝がん患者および健常者の末梢血 CD56^{dim} および CD56^{bright} NK 細胞における CD160、
 Siglec-7、NKp46、NKp30、CD49a、Siglec-10、ILT2 および PD-1 の発現強度 (MSI) の
 比較を示した。* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001。

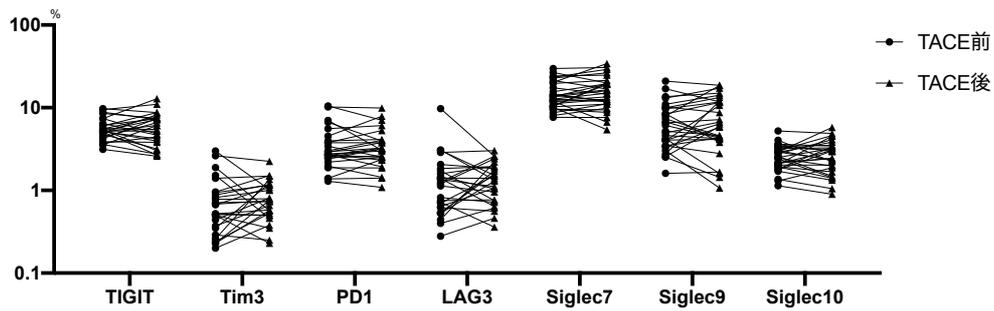


図 16 肝癌患者のNK細胞表面マーカーの治療前後の変化

肝がん患者(HCC=30)の末梢血 CD56^{dim}および CD56^{bright}NK細胞における TACE 治療前後の各種免疫チェックポイント分子および Siglec の発現を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。

2. 肝がん患者の肝臓組織における NK 細胞

2.1 肝がん患者の癌部組織において CD56^{dim} NK 細胞の頻度の減少を認めた

まず、肝がん患者における癌部組織 (Ca) および隣接する非癌部組織 (NCa) からの肝内 NK 細胞の違いを明らかにした。16 人の肝がん患者で NCa-NK 細胞と Ca-NK 細胞のそれぞれの頻度を検証した (表 3)。Ca-CD56^{dim} NK 細胞の頻度は、これまでも報告されたように (Cai et al., 2008)、NCa-CD56^{dim} NK 細胞の頻度と比較して減少していたが、CD56^{bright} NK 細胞の頻度は同等であった (図 17)。

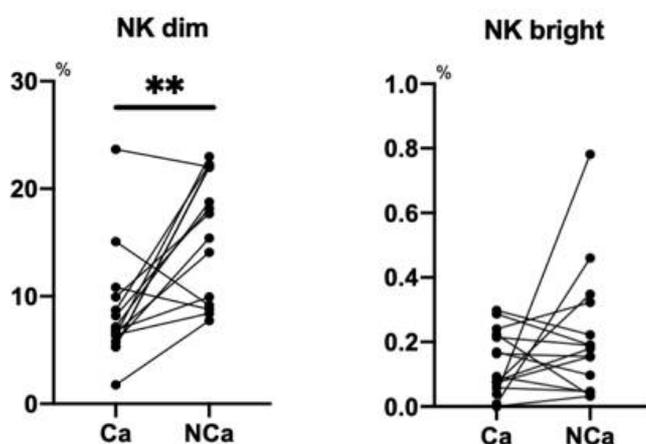


図 17 CD56^{dim} および CD56^{bright} NK 細胞の肝臓組織内での頻度の比較

肝がん患者の癌部 (Ca) および非癌部 (NCa) 組織における、CD56^{dim} および CD56^{bright} NK 細胞の頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。** $p < 0.01$ 。

2.2 肝がん患者において Siglec-10、ILT2、PD-1 および CX3CR1 の発現を伴う腫瘍内 CD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞の増加を認めた

次に、肝がん患者 (n=16) でパネル 2 を使用して、Ca-CD56^{dim} NK 細胞と NCa-CD56^{dim} NK 細胞において 32 個の表面マーカーの発現パターンを比較した。図 18 は、NCa-CD56^{dim} NK 細胞と比較した Ca-CD56^{dim} NK 細胞の MSI の対数変化を示している。2B4 の発現は Ca-CD56^{dim} NK 細胞で減少した (図 19)。逆に、CD49a はこれまで報告されたように Ca-CD56^{dim} NK 細胞で高度に発現された (図 19) (Sun et al., 2019b)。CD49a に加えて、Siglec-10、ILT2、PD-1、CX3CR1 の発現レベルおよび頻度が Ca-CD56^{dim} NK 細胞で有意に増加していることを同定した (図 19)。その他の表面マーカーは癌部と非癌部の間で有意差を示さなかった (図 20)。CD49a⁺ Ca-CD56^{dim} NK 細胞の割合は、Siglec-10⁺ および CX3CR1⁺ Ca-CD56^{dim} NK 細胞の割合と正の相関を認めたが、ILT2⁺ および PD-1⁺ Ca-CD56^{dim} NK 細胞の割合とは正の相関を認めなかった (図 21)。CD49a、Siglec-10、および CX3CR1 は HCC 組織で共発現していた。NK 細胞はケモカイン受容

体 CCR1、CCR2、CCR5、CXCR3、CXCR4、CX3CR1 を発現し、炎症部位と腫瘍微小環境に移動する (Bernardini et al., 2016)。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 (Miao et al., 2020)。

続いて、Ca-CD56^{bright} NK 細胞と NCa-CD56^{bright} NK 細胞において 32 個の表面マーカーの発現パターンを比較した。図 22 は、NCa-CD56^{bright} NK 細胞の MSI に対する、Ca-CD56^{bright} NK 細胞の 32 個の表面マーカーの MSI の対数変化を示している。NCa-CD56^{bright} NK 細胞と比較して Ca-CD56^{bright} NK 細胞では 2B4 の減少と CX3CR1 の発現の増加が認められた (図 23)。NKp30 の発現レベルと頻度は、以前に報告されたように (Mantovani et al., 2019; Zecca et al., 2021)、NCa-CD56^{bright} NK 細胞と比較して Ca-CD56^{bright} NK 細胞で増加した (図 23)。その他の表面マーカーは癌部と非癌部の間で有意差を示さなかった (図 24)。

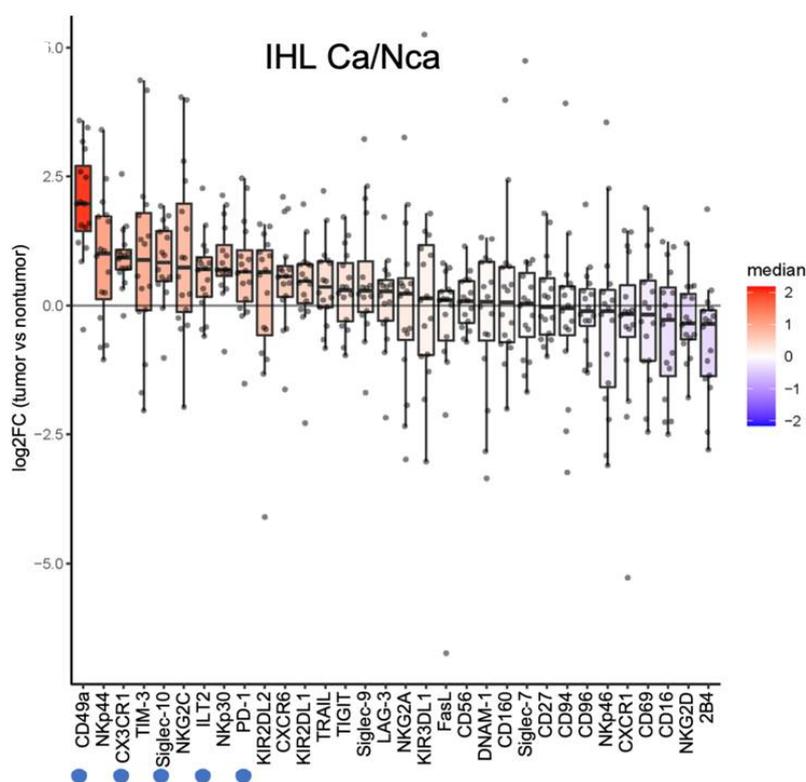


図 18 癌部/非癌部における CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの相対的発現
 肝がん患者 (n=16) の CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーにおける非癌部に対する癌部の相対的な発現を示した。縦軸は NCa-CD56^{dim} NK 細胞に対する Ca-CD56^{dim} NK 細胞の発現強度 (MSI) の対数変化を、横軸は各種表面マーカーを示している。それぞれのボックスプロットは Tukey の手法を用いて中央値、四分位範囲、および 1.5IQR の最大最小値を示した。

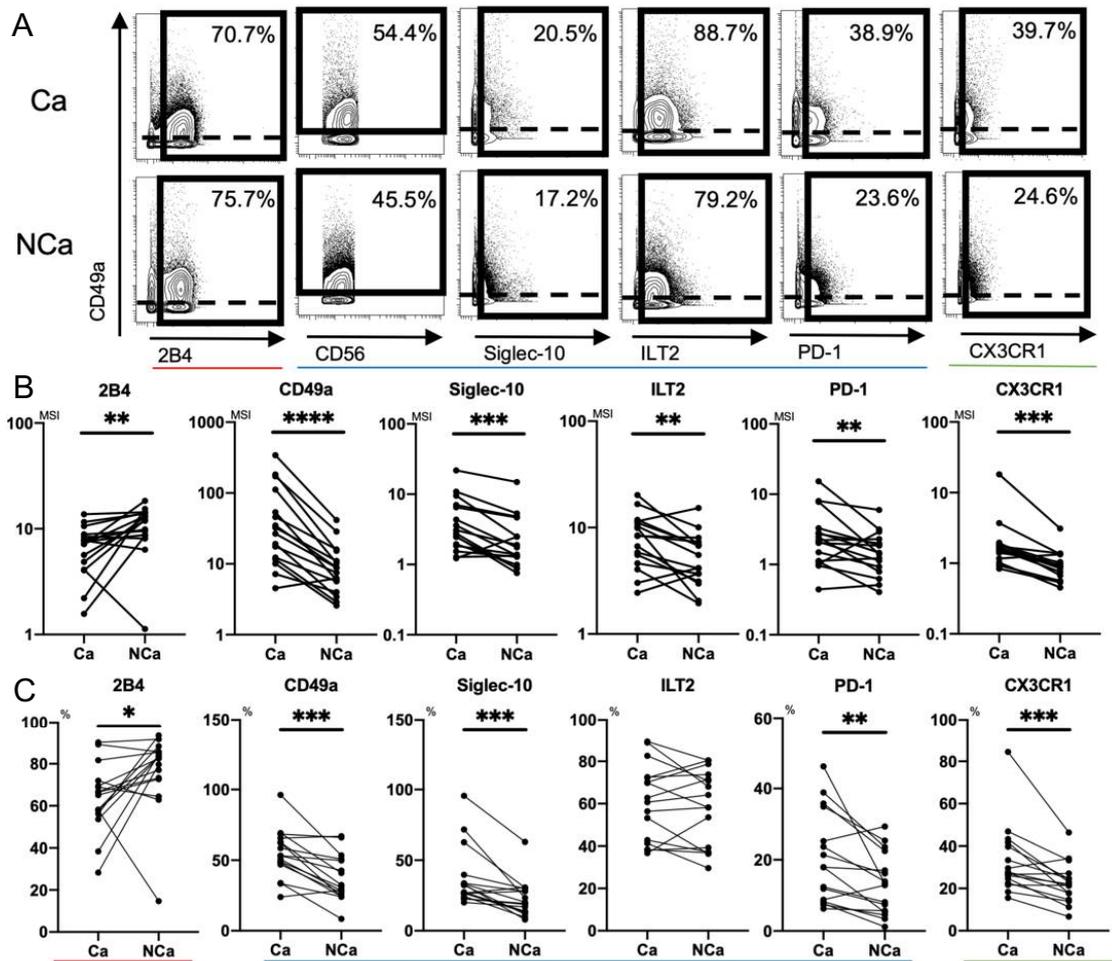


図 19 肝臓組織内における CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの比較

肝がん患者 (n=16) の肝臓組織内 (癌部および非癌部) の CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーを比較した。(A) 代表的なマサイトメトリープロットを示した。(B) 癌部および非癌部の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。(C) 癌部および非癌部の各表面マーカーの発現頻度を比較した。赤い線のマーカーは活性化マーカーを、青い線、緑の線はそれぞれ抑制性マーカー、ケモカインレセプターである事を示している。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; **** p < 0.0001。

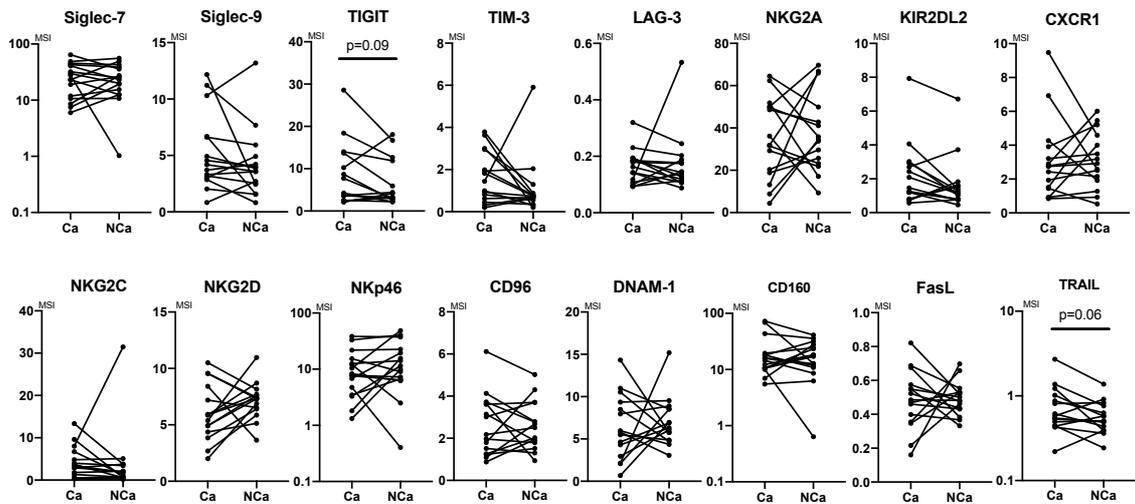


図 20 肝臓組織内における CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの比較

肝がん患者 (n=16) の肝臓組織内 (癌部および非癌部) の CD56^{dim} NK 細胞の表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。

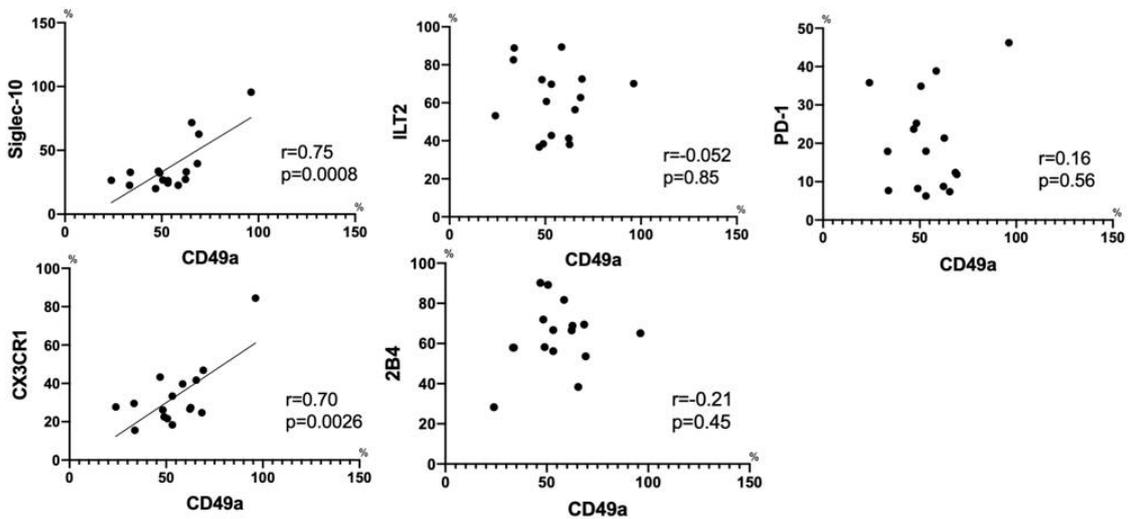


図 21 癌部組織の CD56^{dim} NK 細胞におけるマーカー同士の相関

肝がん患者 (n=16) の癌部組織の CD56^{dim} NK 細胞における CD49a と Siglec-10、ILT2、PD-1、CX3CR1、CD160、Siglec-7、NKp46、NKp30 および 2B4 の発現頻度の相関を示した。p 値と相関係数 (r) は、スピアマンの相関検定によって算定した。

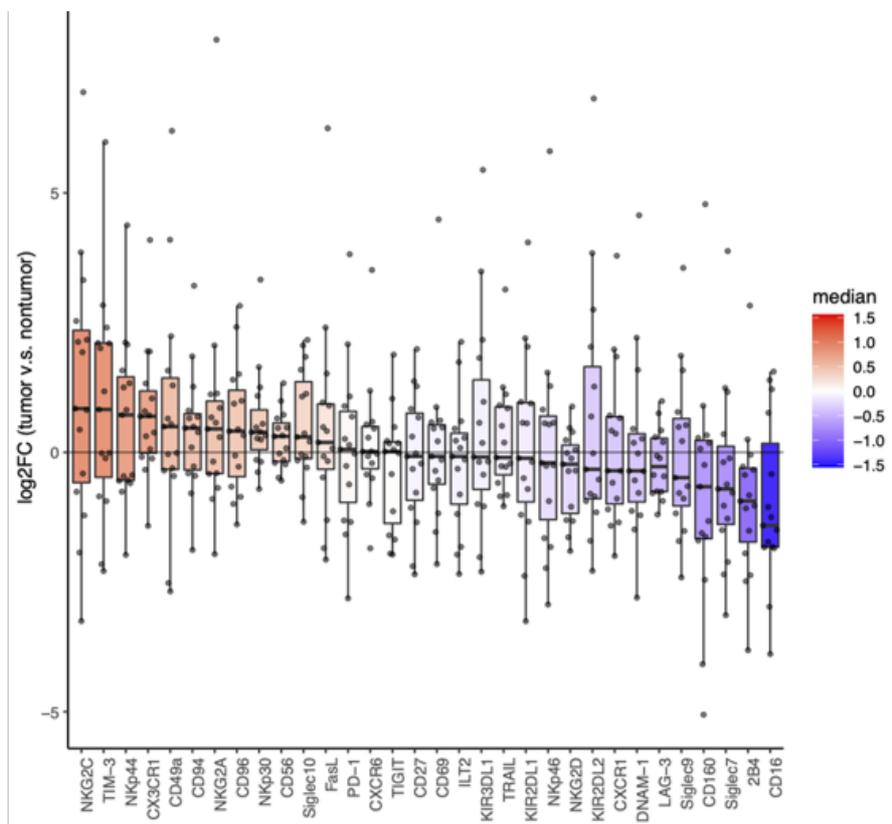


図 22 癌部/非癌部における CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーの相対的発現
 肝がん患者 (n=16) の CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーにおける非癌部に対する癌部の相対的な発現を示した。縦軸は NCa-CD56^{dim} NK 細胞に対する Ca-CD56^{bright} NK 細胞の発現強度 (MSI) の対数変化を、横軸は各種表面マーカーを示している。それぞれのボックスプロットは Tukey の手法を用いて中央値、四分位範囲、および 1.5IQR の最大最小値を示した。

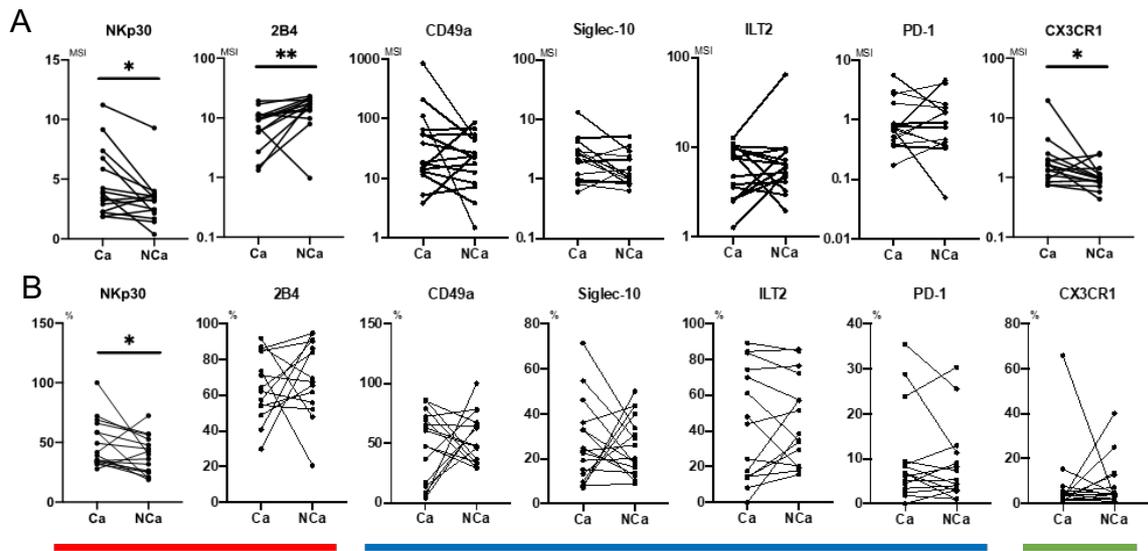


図 23 肝臓組織内における CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーの比較

肝がん患者 (n=16) の肝臓組織内 (癌部および非癌部) の CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーを比較した。(A) 癌部および非癌部の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。(B) 癌部および非癌部の各表面マーカーの発現頻度を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。赤い線のマーカーは活性化マーカーを、青い線、緑の線はそれぞれ抑制性マーカー、ケモカインレセプターであることを示している。* p < 0.05; ** p < 0.01。

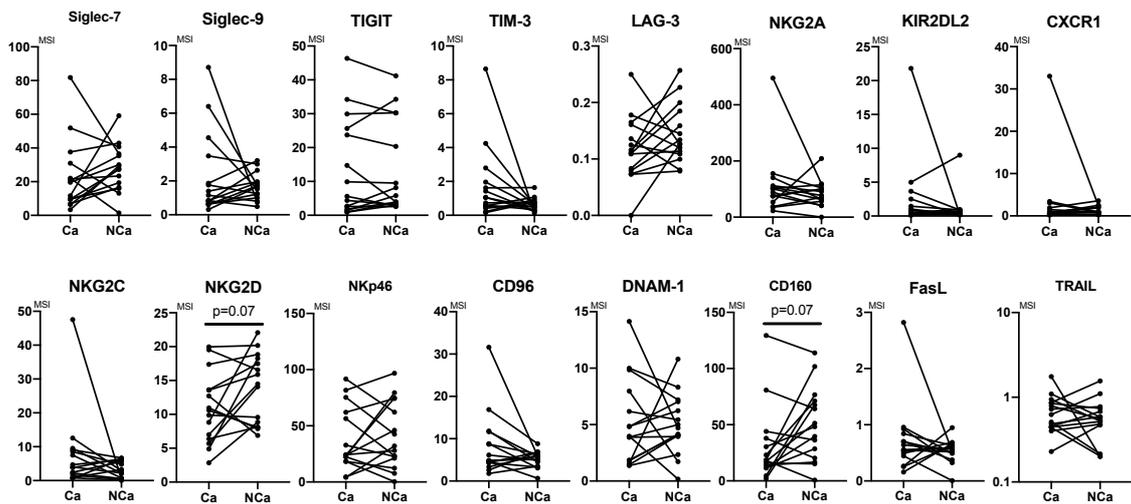


図 24 肝臓組織内における CD56^{bright} NK 細胞の表面マーカーの比較

肝がん患者 (n=16) の肝臓組織内 (癌部および非癌部) の CD56^{bright} NK 細胞の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。それぞれのグラフは個別のデータを示し、同一患者を線で繋いだ。

3. 肝がん患者における末梢血および肝臓組織内のNK細胞の比較

最後に、肝がん患者の末梢血および肝内NK細胞間の表現型の違いを検証した。肝がん患者(n=8)の末梢血NK細胞、肝内NCa-NK細胞、およびCa-NK細胞の32個の表面マーカーを比較した。末梢血NK細胞はCD160⁺ Siglec-7⁺ DNAM-1⁺表現型を示した(図25A、赤い円)。CD160、Siglec-7、DNAM-1に加えて、CD94、CD96、KIR2DL1、KIR2DL2、NKG2C、LAG3、TIM-3、およびNkp30の発現レベルは、NCa-NK細胞よりも末梢血NK細胞の方が高かった(図25B、Cおよび図26)。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(図25A、青い円)。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(図25B、C)。また、これらの表面マーカーと肝がん患者の腫瘍因子や患者背景、肝機能などの臨床データとの相関では、末梢血CD56^{dim} NK細胞において、Siglec-10発現レベルは腫瘍サイズ(Tステージ)と正の相関を認めた(図27)。

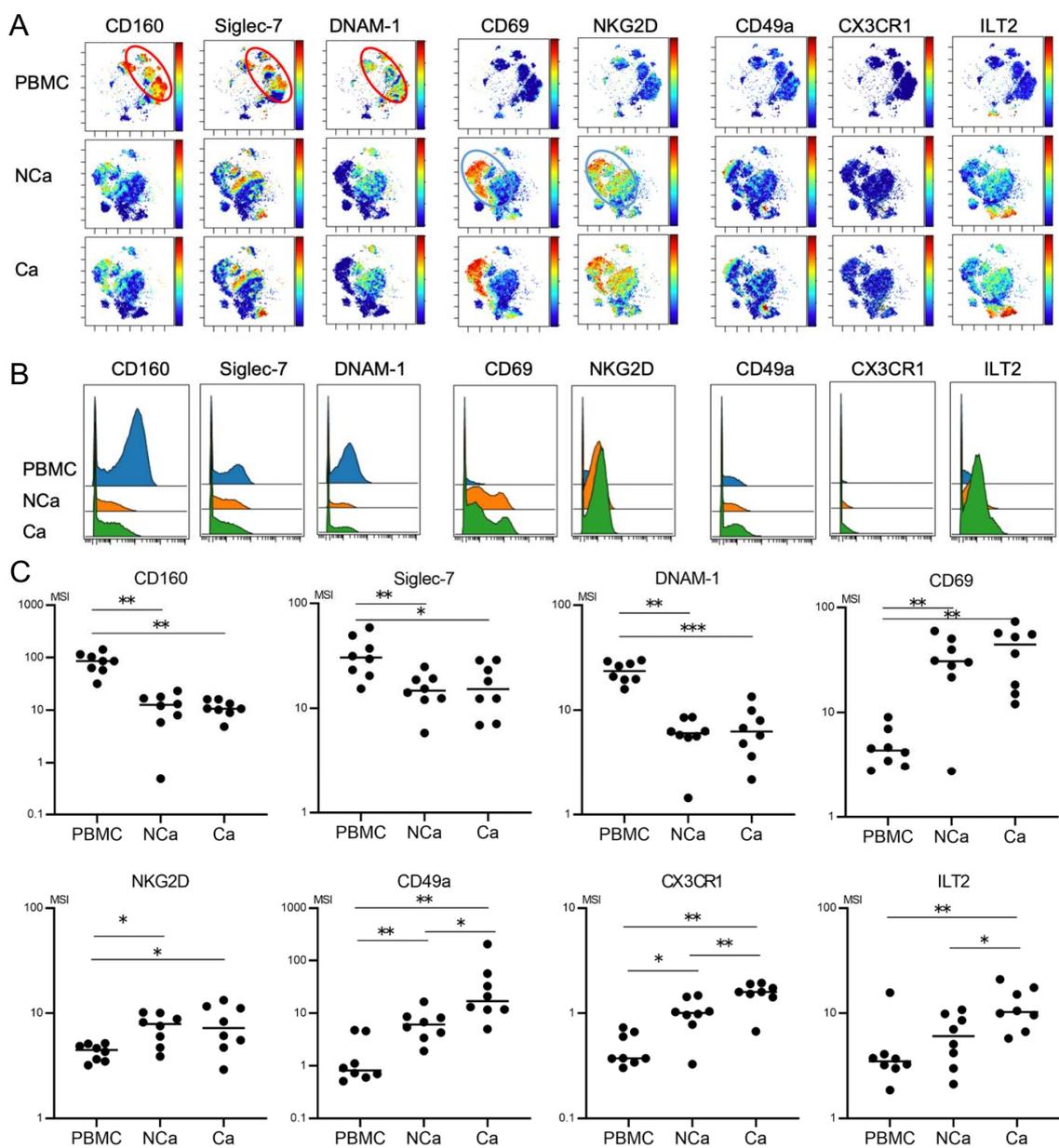


図 25 肝がん患者の末梢血および肝内NK細胞間の表現型の比較

(A) 末梢血および肝内NK細胞の代表的なviSNEプロットを示した。カラースケールは各表面マーカー発現強度を赤(高)~青(低)で示している。赤い円はPBMCで、青い円は肝臓内で発現の多い亜集団を示している。(B) 代表的なヒストグラムを示した。(C) 末梢血および肝内NK細胞の各表面マーカーの発現強度(MSI)を比較した。それぞれのグラフは個別のデータと平均を示した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

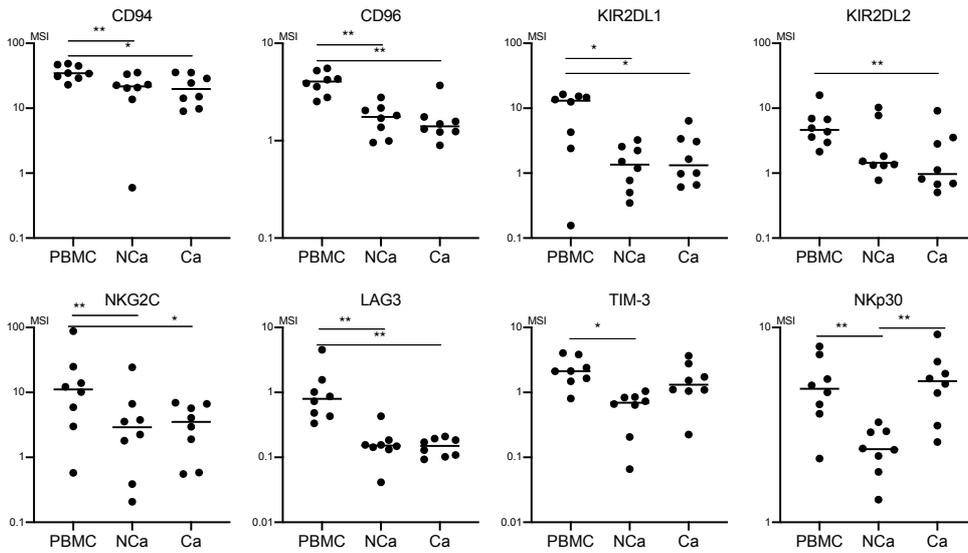


図 26 肝がん患者の末梢血および肝内 NK 細胞の表面マーカーの比較
末梢血および肝内 NK 細胞の各表面マーカーの発現強度 (MSI) を比較した。それぞれのデータは個別のデータと平均を示した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

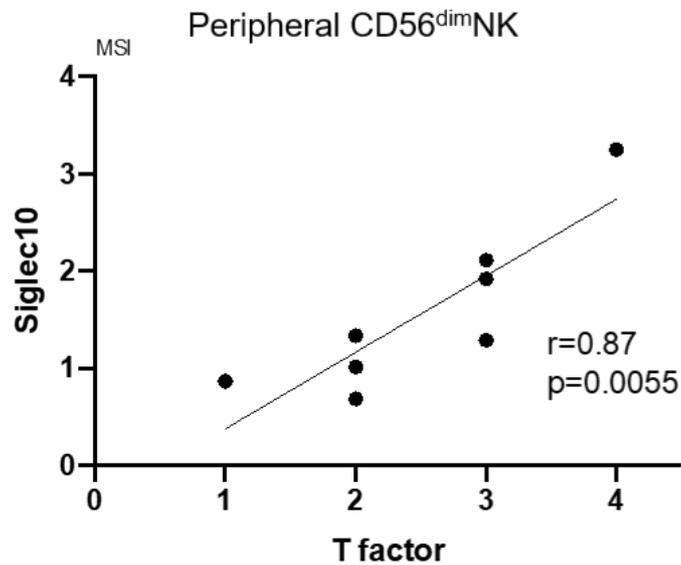


図 27 $CD56^{dim}$ NK 細胞での Siglec-10 発現と HCC 患者の T 因子との相関
肝がん患者 ($n=8$) における末梢血 $CD56^{dim}$ NK 細胞での Siglec-10 の発現強度 (MSI) と TNM 分類における T 因子との相関を示した。p 値と相関係数 (r) は、スピアマンの相関検定によって算定した。T 因子は日本肝癌研究会が定めた原発性肝癌取り扱い規約 (第 6 版) に則った。①腫瘍個数: 単発である、②腫瘍径が 2cm 以下である③脈管侵襲が無い ($Vp0, Vv0, B0$) の内、T1: ①②③の全て合致、T2: 2 項目合致、T3: いずれか 1 項目合致、T4: 全て合致せず、もしくは破裂肝細胞癌。

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、HCCに対する潜在的な新しい免疫療法の標的となる受容体を探索するために、末梢血および肝内NK細胞の表面マーカーの包括的な分析を施行した。肝がん患者の末梢血CD56^{dim} NK細胞は、CD160、Siglec-7、NKp46、およびNKp30の発現が低下していたことを同定した(図8~図11および図28)。Siglec-10、ILT2、およびPD-1を共発現するCD49a⁺ CD56^{dim} NK細胞からなる肝がん患者特有のNK細胞の新規亜集団を同定した(図8~図11および図28)。このような亜集団である、Siglec-10、ILT2、およびPD-1を含むCD49a⁺ CD56^{dim} NK細胞は、非癌部組織または末梢血からの同じ表現型のCD56^{dim} NK細胞と比較して、癌部組織でCX3CR1をより発現していた。

免疫細胞の特徴的な亜集団を特定することにはいくつかの利点があり、そのひとつは細胞機能と臨床状態が密接に相関している事である。肝がん患者の実臨床では、特にPBMCにおけるこのような亜集団は、癌の発生と再発、または治療的介入の有効性を監視するためのバイオマーカーとして機能する可能性がある。この研究では、末梢血CD56^{dim} NK細胞上のCD160およびCD49aが、それぞれ既知の活性化または抑制性分子と有意に相関しており、それぞれサロゲートマーカーの候補であることを示している(図11)。

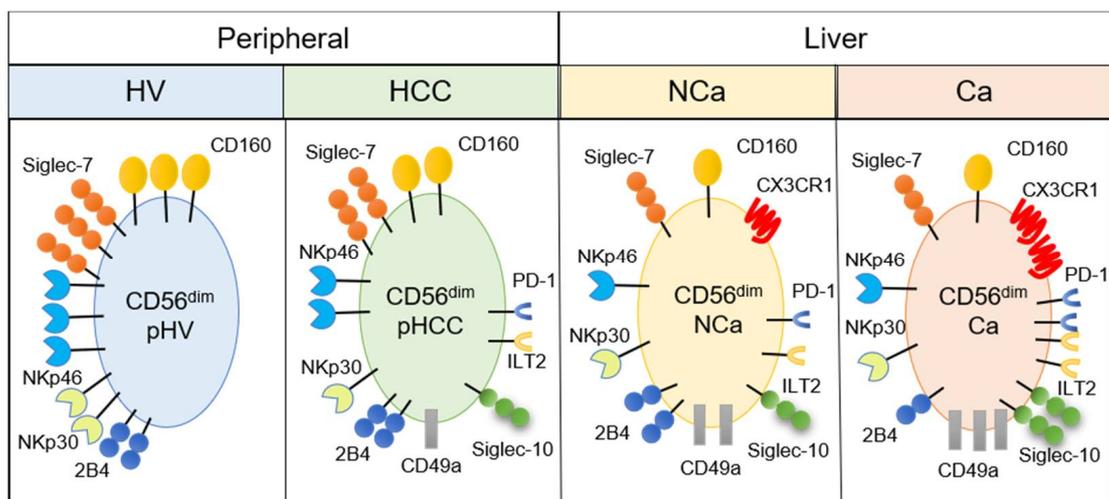


図28 肝がん患者の末梢血および肝内CD56^{dim}NK細胞における表現型の変化
 健常者の末梢血CD56^{dim} NK細胞を対照として、肝がん患者の末梢血、癌部および非癌部のCD56^{dim} NK細胞の表面マーカーの違いを示した。

CD160 はNK 細胞に特異的に発現し最も強力な細胞毒性機能を持ち(Maiza et al., 1993)、IFN- γ 産生に不可欠である(Tu et al., 2015)。CD160 発現の低下は、慢性B 型肝炎患者の末梢血NK 細胞(Marotel et al., 2021)および肝がん患者の腫瘍内NK 細胞(Sun et al. 2015)で報告されている。腫瘍内NK 細胞でのCD160 の高発現は、肝切除を伴う肝がん患者の良好な予後と関連している(Sun et al. 2018)。本研究では、CD160 が明らかにダウンレギュレーションされ、肝がん患者の末梢血CD56^{dim} NK 細胞の活性化受容体であるSiglec-7、NKp46、およびNKp30 と正の相関があることを示した。本研究で末梢血NK 細胞の分析に登録された肝がん患者は、すべて肝硬変を患っていた(表2)。したがって、末梢血CD56^{dim} 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。これらの活性化受容体のダウンレギュレーションの根底にある未知のメカニズムを調査することは、肝がん患者の予後を改善する可能性があると考えられる。

CD49a(インテグリン α 1)はLiver-resident NK 細胞(CD49a⁺ CXCR6⁺ NKG2C⁺ CD16⁻)のマーカーである(Marquardt et al., 2015)。さらに、肝内CD49a⁺ NK 細胞は、抑制性および血管新生の表現型を反映しており、腫瘍微小環境におけるCD49a⁺ NK 細胞の蓄積は、肝がん患者の予後不良との関連が報告されている(Sun et al., 2019b; Zecca et al., 2021)。本研究では、マスサイトメトリーによってNK 細胞の新規亜集団を同定した。これは、肝がん患者で有意に増加し、その表現型は、Siglec-10、ILT2、およびPD-1 を含むCD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞であった(図5~11、図18~21 および図28)。このようなNK 細胞の亜集団は、肝臓だけでなく、HV と比較して肝がん患者の末梢血にも見られた(図5~図11 および図28)。したがって、肝がん患者では、バイオマーカーとしての末梢血NK 細胞に対するCD160 およびCD49a のさらなる検証が必要である。肝硬変の肝がん患者における末梢血CD56^{dim} NK 細胞のこれらの表現型の変化(図5-10)は、肝硬変そのもの、もしくはHCC 自体によって誘発される可能性がある。そのため、末梢血CD56^{dim} NK 細胞に対するHCC 自体の影響かどうかを明らかにするためには、年齢と性別の比率が類似しているサンプルを、健常者、HCC のない慢性肝炎患者、HCC のある慢性肝炎患者、HCC のない肝硬変患者およびHCC のある肝硬変患者の間で比較する必要があり、今後の課題と考えられる。

本研究では8人の肝がん患者での末梢血、癌性組織および非癌性組織における異なる局在化の間でNK 細胞の表現型を比較した。NK 細胞の表面分子の発現パターンには3つの特徴が見られた。まず1つ目は、肝臓よりも末梢でより多く発現した分子は、CD160、Siglec-7、およびDNAM-1、ならびにCD94、CD96、KIR2DL1、KIR2DL2、NKG2C、LAG3、およびTIM-3 であった事である(図25 および26)。例外的に、NKp30 は末梢血NK 細胞と比較して非癌部NK 細胞で減少したが、癌部NK 細胞では末梢血NK 細胞で同じレベルまで増加した(図26)。CD160、Siglec-7、およびDNAM-1 が発現して

いるNK細胞は非常に機能的であることが報告されている。したがって、これらの表面マーカーのダウンレギュレーションは、HCCの有無に関わらず肝臓での免疫寛容を反映している可能性がある。2つ目は、CD69、およびNKG2Dを発現するNK細胞は、末梢血NK細胞よりも、癌部・非癌部に関わらず肝臓に存在するCD56^{dim}NK細胞で高度に発現した事である(図25)。3つ目は、NK細胞でのCD49aとCX3CR1の発現は、末梢血よりも肝臓でより高かった事である。Siglec-10とILT2も、末梢よりも肝臓で高くなる傾向を認めた。特に興味深いのは、CD49a、CX3CR1、Siglec-10、およびILT2が、非癌部NK細胞よりも癌部NK細胞でより多く発現していたことである(図19、20および25)。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。HCCの腫瘍微小環境におけるNK細胞に対するこれらの表面マーカーの誘導と作用のメカニズムを明らかにするには、さらなる検証が必要である。

末梢血CD49a⁺CD56^{bright}NK細胞および腫瘍内CD49a⁺CD56^{dim}NK細胞が増加し、肝がん患者でSiglec-10を発現した。Siglec-10とそのリガンドであるCD24との腫瘍細胞上での相互作用は、腫瘍の免疫回避のメカニズムである(Barkal et al., 2019; Yin et al., 2020)。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している(Zhang et al., 2015)。本研究での肝がん患者では、末梢血CD56^{dim}NK細胞でのSiglec-10発現レベルは腫瘍サイズ(Tステージ)と正の相関を認めた(図27)。おそらく患者数が少ないためと考えられるが、既報で述べられている予後と関連している因子である腫瘍因子、肝機能、および臨床パラメーターとの間に相関関係は観察されなかった(Aoki et al., 2014)。Siglecとそのリガンドが、さまざまな悪性腫瘍の患者の新しい免疫チェックポイントとして機能する可能性があることは明らかであり、Siglecリガンドのまだ明らかとはなっていない分子プロファイルの特定、およびHCCの治療標的としてSiglecファミリーを検討することは我々の今後の研究課題である。

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(図28)。また、癌部

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(図28)。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調査するため、さらなる研究の必要性を示している。

結論

1. 肝がん患者において、末梢血 CD160⁺ Siglec-7⁺ CD49a⁻ CD56^{dim} 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⁺ CD56^{dim} NK 細胞の増加を認めた。
2. 肝がん患者において Siglec-10 および ILT2 発現を伴う末梢血 CD49a⁺ CD56^{bright} NK 細胞の増加を認めた。
3. 肝がん患者において癌部の CD56^{dim} NK 細胞の頻度の減少を認めた。
4. 肝がん患者において Siglec-10、ILT2、PD-1 および CX3CR1 の発現を伴う腫瘍内 CD49a⁺ CD56^{dim} NK 細胞の増加を認めた。
5. 肝がん患者における末梢血と肝臓組織内の NK 細胞の比較では、末梢血 NK 細胞は CD160⁺ Siglec-7⁺ DNAM-1⁺ 表現型を示した。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。

今後はこれらの表面マーカーの変容が肝硬変の影響か HCC 自体の影響かを検討するために、年齢と性別の比率が類似しているサンプルを、健常者、HCC のない慢性肝炎患者、HCC のある慢性肝炎患者、HCC のない肝硬変患者および HCC のある肝硬変患者の間で比較する必要がある。

また、これらの表面マーカーの変容が HCC の病勢に及ぼす影響や全身療法の治療効果の新しい治療標的となり得る可能性を調査するため、肝がん患者の長期的な予後を観察するとともに、機能解析が必要と考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、研究のご指導を賜りました国立国際医療研究センター 考藤達哉肝炎・免疫研究センター長、由雄祥代肝疾患先端治療研究室 長、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武富紹信教授に深く 謝意を表します。また、貴重な検体、臨床資料、ご助言、技術のご指導を 賜りました関連施設の先生方、北海道大学消化器外科学教室 I の先生方、 ならびに肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部の皆様に、厚くお礼申し上げます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED, grant number 20fk0210045、21fk0210094、21fk0210055) と、科学研究費補助金 (grant number 19K17509) より、研究助成を得たものである。

利益相反

考藤達哉は、Gilead Sciences and Merck, Sharp, & Dohme より、講演料を得ていることを開示する。

他の著者は、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Angata, T., and Varki, A. (2002) *Chem. Rev.* *102*, 439-470.
- Aoki, T., Kokudo, N., Matsuyama, Y., Izumi, N., Ichida, T., Kudo, M., Ku, Y., Sakamoto, M., Nakashima, O., Matsui, O., et al. (2014). Prognostic impact of spontaneous tumor rupture in patients with hepatocellular carcinoma: An analysis of 1160 cases from a nationwide survey. *Ann. Surg.* *259*, 532-542.
- Barkal, A.A., Brewer, R.E., Markovic, M., Kowarsky, M., Barkal, S.A., Zaro, B.W., Krishnan, V., Hatakeyama, J., Dorigo, O., Barkal, L.J., et al. (2019). CD24 signalling through macrophage Siglec-10 is a target for cancer immunotherapy. *Nature.* *572*, 392-396.
- Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., et al. (2018). A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat. Med.* *24*, 1178-1191.
- Bernardini, G., Antonangeli, F., Bonanni, V., Santoni, A. (2016). Dysregulation of Chemokine/Chemokine Receptor Axes and NK Cell Tissue Localization during Diseases. *Front. Immunol.* *7*, 402.
- Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammicheli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., and Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell.* *172*, 1022-1037.
- Brunetta, E., Fogli, M., Varchetta, S., Bozzo, L., Hudspeth, K.L., Marcenaro, E., Moretta, A., and Mavilio, D. (2009). The decreased expression of Siglec-7 represents an early marker of dysfunctional natural killer-cell subsets associated with high levels of HIV-1 viremia. *Blood.* *114*, 3822-3830.
- 4) Bull, C., den Brok, M. H., and Adema, G. J. (2014). Sweet escape: sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim. Biophys. Acta.* *1846*, 238-246.

Cai, L., Zhang, Z., Zhou, L., Wang, H., Fu, J., Zhang, S., Shi, M., Zhang, H., Yang, Y., Wu, H., et al. (2008). Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients. *Clin. Immunol.* *129*, 428-437.

Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood.* *112*, 461-469.

Carson, W. E., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (1997). CD56^{bright} natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.* *27*, 354-360.

Cheng, A. L., Kang, Y. K., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J. S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T.S., et al. (2009). Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* *10*, 25-34.

Chew, V., Chen, J., Lee, D., Loh, E., Lee, J., Lim, K.H., Weber, A., Slankamenac, K., Poon, R.T., Yang, H., et al. (2012). Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut.* *61*, 427-438.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* *22*, 633-40.

Crocker, P. R., Paulson, J. C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 255-266.

Favier, B., Lemaoult, J., Lesport, E., and Carosella, E. D. (2010). ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse. *FASEB J.* *24*, 689-699.

Forner, A., Reig, M., and Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet.* *391*, 1301-1314.

- Farag, S. S., Van Deusen, J. B., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2003). Biology and clinical impact of human natural killer cells. *Int. J. Hematol.* *78*, 7-17.
- Freud, A.G., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* *214*, 56-72.
- Gallazzi, M., Baci, D., Mortara, L., Bosi, A., Buono, G., Naselli, A., Guarneri, A., Dehò, F., Capogrosso, P., Albinì, A., et al. (2020). Prostate Cancer Peripheral Blood NK Cells Show Enhanced CD9, CD49a, CXCR4, CXCL8, MMP-9 Production and Secrete Monocyte-Recruiting and Polarizing Factors. *Front. Immunol.* *11*, 586126.
- Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekelashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2009). Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology.* *50*, 799-807.
- Hudak, J. E., Canham, S. M., and Bertozzi, C. R. (2014). Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 69-75.
- Jandus, C., Boligan, K.F., Chijioke, O., Liu, H., Dahlhaus, M., Démoulin, T., Schneider, C., Wehrli, M., Hunger, R.E., Baerlocher, G.M., et al. (2014). Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *The Journal of Clinical Investigation.* *124*, 1810-1820.
- Kamiyama, T., Nakanishi, K., Yokoo, H., Kamachi, H., Tahara, M., Suzuki, T., Shimamura, T., Furukawa, H., Matsushita, M., and Todo, S. (2009). Recurrence patterns after hepatectomy of hepatocellular carcinoma: Implication of Milan criteria utilization. *Ann. Surg. Oncol.* *16*, 1560-1571.
- Khan, M., Arooj, S., and Wang, H. (2020). NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front. Immunol.* *11*, 167.

Kimball, A.K., Oko, L.M., Bullock, B.L., Nemenoff, R.A., van Dyk, L.F., and Clambey, E.T. (2018). A Beginner's Guide to Analyzing and Visualizing Mass Cytometry Data. *J. Immunol.* *200*, 3-22.

Kudo, M., (2018). Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan as a World-Leading Model. *Liver Cancer.* *7*, 134-147.

Kuo, M.J., Mo, L.R., and Chen, C.L. (2021). Factors predicting long-term outcomes of early-stage hepatocellular carcinoma after primary curative treatment: the role of surgical or nonsurgical methods. *BMC Cancer.* *21*, 250.

Liu, Y., Cheng, Y., Xu, Y., Wang, Z., Du, X., Li, C., Peng, J., Gao, L., Liang, X., and Ma, C. (2017). Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene.* *36*, 6143-6153.

Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., et al. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *359*, 378-390.

Maïza, H., Leca, G., Mansur, I.G., Schiavon, V., Bounsell, L., and Bensussan, A. (1993). A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J. Exp. Med.* *178*, 1121-1126.

Mantovani, S., Oliviero, B., Lombardi, A., Varchetta, S., Mele, D., Sangiovanni, A., Rossi, G., Donadon, M., Torzilli, G., Soldani, C., et al. (2019). Deficient Natural Killer Cell NKp30-Mediated Function and Altered NCR3 Splice Variants in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* *69*, 1165-1179.

Marotel, M., Villard, M., Drouillard, A., Tout, I., Besson, L., Allatif, O., Pujol, M., Rocca, Y., Ainouze, M., Roblot, G., et al. (2021). Peripheral natural killer cells in chronic hepatitis B patients display multiple molecular features of T cell exhaustion. *Elife.* *10*, 60095.

Marquardt, N., Béziat, V., Nyström, S., Hengst, J., Ivarsson, M.A., Kekäläinen, E., Johansson, H., Mjösberg, J., Westgren, M., Lankisch, T.O., et al. (2015). Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a⁺ NK Cells. *The Journal of Immunology*. *194*, 2467-2471.

Miao, S., Lu, M., Liu, Y., Shu, D., Zhu, Y., Song, W., Ma, Y., Ma, R., Zhang, B., Fang, C., et al. (2020). Platelets are recruited to hepatocellular carcinoma tissues in a CX3CL1-CX3CR1 dependent manner and induce tumour cell apoptosis. *Mol. Oncol.* *14*, 2546-2559.

Piñero Fernández, J., Luddy, K.A., Harmon, C., and O'Farrelly, C. (2019). Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 4131.

Sakamoto, Y., Yoshio, S., Doi, H., Mori, T., Matsuda, M., Kawai, H., Shimagaki, T., Yoshikawa, S., Aoki, Y., Osawa, Y., et al. (2021). Increased Frequency of Dysfunctional Siglec-7(-)CD57(+)PD-1(+) Natural Killer Cells in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Immunol.* *12*, 603133.

Siddiqui, S.S., Matar, R., Merheb, M., Hodeify, R., Vazhappilly, C. G., Marton, J., Shamsuddin, S. A., and Al Zouabi, H. (2019). Siglecs in Brain Function and Neurological Disorders. *Cells*. *8*, 1125.

Sivori, S., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Quatrini, L., Munari, E., Vacca, P., Tumino, N., Mariotti, F. R., Mingari, M. C., Pende, D., et al. (2020). Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* *11*, 2156.

Sivori, S., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Quatrini, L., Munari, E., Vacca, P., Tumino, N., Mariotti, F. R., Mingari, M. C., Pende, D., et al. (2020). Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer. *Front. Immunol.* *11*, 2156.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. *2*, 850-861.

Sun, C., Xu, J., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Zhang, C., Wang, J., Song, J., Zheng, M., Sun, H., et al. (2017). High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology*. *6*, e1264562.

Sun, H., Xu, J., Huang, Q., Huang, M., Li, K., Qu, K., Wen, H., Lin, R., Zheng, M., Wei, H., et al. (2018). Reduced CD160 Expression Contributes to Impaired NK-cell Function and Poor Clinical Outcomes in Patients with HCC. *Cancer Res*. *78*, 6581-6593.

Sun, H., Huang, Q., Huang, M., Wen, H., Lin, R., Zheng, M., Qu, K., Li, K., Wei, H., Xiao, W., et al. (2019a). Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. *70*, 168-183.

Sun, H., Liu, L., Huang, Q., Liu, H., Huang, M., Wang, J., Wen, H., Lin, R., Qu, K., Li, K., et al. (2019b). Accumulation of Tumor-Infiltrating CD49a(+) NK Cells Correlates with Poor Prognosis for Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. *7*, 1535-1546.

Tateishi, R., Uchino, K., Fujiwara, N., Takehara, T., Okanoue, T., Seike, M., Yoshiji, H., Yatsushashi, H., Shimizu, M., Torimura, T., et al. (2019). A nationwide survey on non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: 2011-2015 update. *Journal of gastroenterology*. *54*, 367-376.

Tao, L., Wang, S., Yang, L., Jiang, L., Li, J., and Wang, X. (2020). Reduced Siglec-7 expression on NK cells predicts NK cell dysfunction in primary hepatocellular carcinoma. *Clin. Exp. Immunol*. *201*, 161-170.

Tian, Z., Chen, Y., and Gao, B. (2013). Natural killer cells in liver disease. *Hepatology*. *57*, 1654-1662.

Tu, T.C., Brown, N.K., Kim, T.J., Wroblewska, J., Yang, X.; Guo, X., Lee, S.H., Kumar, V., Lee, K.M., and Fu, Y.X. (2015). CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J. Exp. Med*. *212*, 415-429.

Varchetta, S., Lusso, P., Hudspeth, K., Mikulak, J., Mele, D., Paolucci, S., Cimbro, R., Malnati, M., Riva, A., Maserati, R., et al. (2013). Sialic acid-binding Ig-like lectin-7 interacts with HIV-1 gp120 and facilitates infection of CD4pos T cells and macrophages. *Retrovirology*. *10*, 154.

Varchetta, S., Mele, D., Lombardi, A., Oliviero, B., Mantovani, S., Tinelli, C., Spreafico, M., Prati, D., Ludovisi, S., Ferraioli, G., et al. (2016). Lack of Siglec-7 expression identifies a dysfunctional natural killer cell subset associated with liver inflammation and fibrosis in chronic HCV infection. *Gut*. *65*, 1998–2006.

Varki, A., and Angata, T. (2006). Siglecs—the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* *16*, 1R–27R.

Villanueva, A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *380*, 1450–1462.

World Health Organization. (2018). Liver Factsheet. Globocan <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>.

Wu, Y., Kuang, D.M., Pan, W.D., Wan, Y.L., Lao, X.M., Wang, D., Li, X.F., and Zheng, L. (2013). Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology*. *57*, 1107–1116.

Yin, S.S., and Gao, F.H. (2020). Molecular Mechanism of Tumor Cell Immune Escape Mediated by CD24/Siglec-10. *Front. Immunol.* *11*, 1324.

Zecca, A., Barili, V., Rizzo, D., Olivani, A., Biasini, E., Laccabue, D., Dalla Valle, R., Ferrari, C., Cariani, E., and Missale, G. (2021). Intratumor Regulatory Noncytotoxic NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cells*, *10*, 614.

Zhang, P., Lu, X., Tao, K., Shi, L., Li, W., Wang, G., and Wu, K. (2015). Siglec-10 is associated with survival and natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma. *J. Surg. Res.* *194*, 107–113.