学位論文

肝がんにおけるDGKα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 DGKα inhibition on hepatocellular carcinoma)

2022年6月

北海道大学

岡田尚樹

学位論文

肝がんにおけるDGKα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 DGKα inhibition on hepatocellular carcinoma)

2022年6月

北海道大学

岡田尚樹

目次

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．Okada N, Sugiyama K, Shichi S, Shirai Y, Goto K, Sakane F, Kitamura H, Taketomi A.
Combination therapy for hepatocellular carcinoma with diacylglycerol kinase alpha inhibition and anti-programmed cell death-1 ligand blockade.
Cancer Immunology Immunotherapy, (2021), 印刷中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

１．Naoki Okada , Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi
Diacylglycerol kinase alpha inhibitor exerts bifunctional antitumor effects.
The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, 2018.

２．Naoki Okada, Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura, Akinobu Taketomi
Inhibition of diacylglycerol kinase alpha augments anti-tumor effector T cells in tumor-bearing host.
ASCO-GI-2019, San Francisco, 2019.

３．岡田尚樹, 武冨紹信, 杉山昂, 北村秀光, 坂根郁夫.
Diacylglycerol kinaseα阻害による腫瘍免疫を介した肝がん治療効果の検討.
第119回日本外科学会定期学術集会, 大阪, 2019.

４．Naoki Okada, Akinobu Taketomi, Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura
Inhibition of diacylglycerol kinase alpha activates anti-tumor effector T cells in tumor-bearing host.
The 38th Sapporo International Cancer Symposium Sapporo, 2019.

要旨

【背景と目的】

肝細胞がん（HCC）は肝がんのなかで最も多く、予後不良である。最近、手術療法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がんに対する全身療法として認可され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し、これらのバランスをと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DGKα は活性化することにより HCC の増殖を促進し、メラノーマ細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている。DGKα は HCC 患者の腫瘍組織で発現上昇しており、DGKα の高発現が予後不良因子であるとされている。また、DGKα 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、DGKα 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】

DGKα 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、mCherry 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、DGKα 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 CD3 陽性腫瘍内浸潤 T 細胞(TIL)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、肝がんマウスモデルに CD8 陽性細胞を除去する抗体または CD4 陽性細胞を除去する抗体を投与し、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、肝がん細胞を移植する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 DGKα の発現を免疫組織化学染色により検討した。

【結果】

in vitro 培養系において、DGKα を阻害することによりヒト肝がん HLF 細胞およびマウス肝がん Hepa1-6 細胞の細胞増殖が抑制された。また、DGKAI 投与により、CD3 および CD28 刺激時のヒト PBMC およびマウス BMDC における IL-2 産生を増加させ、マウス脾臓細胞で ERK や JNK のリン酸化を誘導した。肝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 CD3 陽性 TIL 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。加えて、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、その際には腫瘍内に浸潤している CD3 陽性 T 細胞の数が減少していた。肝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 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において DGKα 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増殖を著明に抑制し、担がんマウスの生存率を延長させた。また、DGKAI と抗 PD-L1 抗体との併用治療は *in vivo* 生体モデル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。

DGKα は HCC 患者の腫瘍組織に高発現していた。肝がんにおける DGKα 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、DGKα 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 DGKα 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 の抗腫瘍効果が抑制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 DGKα 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、DGKα 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* 生体モデルで 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形成は有意に抑制され、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 DGKα 阻害治療は、がん細胞の増殖を直接的に抑制することだけではなく、抗腫瘍エフェクター細胞を局所に導入するという 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、DGKα 阻害は HCC に対する新しい治療戦略となり得る。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
DGK	diacylglycerol kinase
DGKAI	diacylglycerol kinase alpha inhibitor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HCC	hepatocellular carcinoma
JNK	c-Jun N-terminal kinase
OVA	ovalbumin
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
TCR	T cell receptor
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte

緒言

肝細胞がん（HCC）は肝がんのなかで最も多く、予後不良である。世界で罹患率第六位、死亡率第二位であり増加傾向にある(Ferlay et al., 2015)。肝切除や肝移植などの手術加療は HCC に対する有効な治療法であるが、治癒率は決して高くはない。1998 年から 2009 年までの日本における 100,394 人の統計では生存期間の中間値は 53.95 ヶ月で、5 年および 10 年生存率はそれぞれ 46.6%と 24.7%であった(Kudo et al., 2020)。化学療法や手術法の進歩によりその生存率は上昇しているが、依然として低い状態である。

HCC の治療としては、化学療法、肝切除、肝移植、ラジオ波焼灼療法があるが、切除不能 HCC に対する治療は限られている。これまでに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 HCC に対する全身療法として認可されたが、一部の HCC は化学療法抵抗性を有すると考えられ、全例には行われていない(Kato et al., 2001 ; Jiang et al., 1997)。さらに、進行 HCC 患者は通常背景肝疾患を有しており、全身化学療法に対して抵抗力が低く、重篤な有害事象の発生に常に配慮する必要がある。そのため、切除不能 HCC 治療に対しては、より高い抗腫瘍効果があり有害事象の少ない新しい治療薬が必要である。

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。ヒトでは 10 種類のアイソザイムが同定されている(Sakane et al., 2016 ; Goto et al., 2006 ; Merida et al., 2008 ; Topham et al., 2009)。DGKα は肝がん細胞、メラノーマ細胞で発現が上昇しており(Yanagisawa et al., 2007)、活性化することにより肝がん細胞の増殖を促進し(Takeishi et al., 2012)、肝がん細胞(Liu et al., 2016)およびメラノーマ細胞(Yamaki et al., 2019)のアポトーシスを抑制している。DGKα の活性化により細胞内のフォスファチジン酸量が増加し、そのことにより NF-κB や mTOR、MEK/ERK などが活性化し、これらの事象を引き起こすとされている (Sakane et al., 2021)。DGKα は HCC 患者の腫瘍組織でも発現上昇しており(Takeishi et al., 2012 ; Merida et al., 2017)、DGKα の高発現が *in vitro* 培養系で肝がん細胞の増殖を促進、MEK/ERK のリン酸化を促進する(Takeishi et al., 2012)。腫瘍細胞における DGKα の発現亢進は HCC 患者の予後不良因子であった(Takeishi et al., 2012)。

抗腫瘍エフェクター細胞の抑制はがん治療において重大であり、抗 CTLA4 抗体や抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体といった免疫チェックポイント阻害薬は

一部の進行がんには劇的な治療効果を発揮するが、全てのがん種に対して効果が示されず(Larkin et al., 2015 ; Topalian et al., 2015 ; Kruger et al., 2019 ; Sharma et al., 2015)、異なる免疫抑制メカニズムが存在する可能性が示唆される(Quail et al., 2013 ; Binnewies et al., 2018) 。HCC に関しては、切除不能 HCC 患者に対する抗 PD-L1 抗体 (Atezolizumab) と抗 VEGF 抗体 (Bevacizumab) の併用療法は、ソラフェニブによる治療と比較し安全かつ有効で、全生存率や無増悪生存率は良好であったことが報告されている(Finn et al., 2020)が、さらなる治療効果獲得のためには宿主免疫を向上させる新たなターゲットが必要である。また、間質性肺炎などの重篤な有害事象が起こる可能性が指摘されており、より安全性の高い治療薬の開発は依然として必要である。

DGKα はがん細胞や免疫細胞での発現が高く、特に T 細胞での発現が高い (Jung et al., 2018 ; Arranz et al., 2018 ; Riese et al., 2013 ; Sakane et al., 1990 ; Yamada et al. 1989)。DGKα は 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効果を有する(Zha et al., 2006)。その結果、インターロイキン 2 産生を抑制する (Olenchock et al., 2006)など、DGKα は抗腫瘍免疫を調整しており (Olenchock et al., 2006 ; Riese et al., 2016 ; Guo et al., 2008 ; Merida et al., 2015 ; Zhou et al., 2014)、担がん宿主免疫抑制に関与していることが示唆される。そのため、DGKα 阻害が切除不能肝がん患者への新規治療法となりうると考えられる。

本研究では、DGKα 阻害の腫瘍細胞増殖抑制やアポトーシスの促進といった直接的な腫瘍抑制効果および抗腫瘍免疫増強の 2 方向からの抗腫瘍効果を、肝がん細胞株および肝がんマウスモデルを用いて検討した。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確認した。これらの結果は肝がん治療の新規ターゲットを明らかにすると考えられる。

方法

１．試薬

DGKAI は小野薬品工業株式会社より提供された(IC50 = 0.01 μM)。DGKAI の IC50 値を表 1 に示す。T リンパ球では主に DGKα、DGKδ、DGKζ が発現しており(Shulga et al., 2011)、本研究では DGKα 阻害剤として使用した。また、CU-3 は近年報告された DGKα 阻害作用を有する化合物であり (Liu et al., 2016)、その IC50 値も表 1 に示す。

抗 DGKα 抗体(11547-1-AP)は Proteintech (Rosemont, IL, USA)より購入した。phycoerythrin (PE)-Cy7 標識抗マウス CD45 (30-F11)抗体、allophycocyanin (APC)標識抗マウス CD8a (53-6.7)抗体および抗マウス CD4 (RM4-5)抗体、PE 標識抗マウス CD274 (B7-H1, PD-L1)抗体および抗 CD16/32 (2.4G2)抗体、fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗マウス H2-Kb (AF6-88.5)抗体、PE 標識抗マウス I-Ab (AF6-120.1)抗体、APC 標識抗マウス CCR7 (4B12)抗体、PE 標識抗マウス CCR5 (HM-CCR5)抗体、PE 標識抗マウス CD40 (3/23)抗体、FITC 標識抗マウス CD86 (GL1)抗体、抗ヒト CD3 (OKT3)抗体、抗ヒト CD28 (CD28.2)抗体、抗マウス CD3e (145-2C11)抗体、抗マウス CD28 (37.51)抗体は BioLegend (San Diego, CA, USA)あるいは BD Biosciences (San Diego, CA, USA)より購入した。PE 標識抗マウス interferon (IFN)-γ (XMG1.2)抗体および抗マウス granzyme B 抗体は eBioscience (Tokyo, Japan)より購入した。7-amino-actinomycin D (AAD)は Beckman Coulter (Marseille Cedex, France)より購入した。ウエスタンブロッティング用の抗 p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Erk1/2) (137F5) (#4695)抗体、抗 stress-activated protein kinase (SAPK)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) (#9252)抗体、抗 phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) (#4370)抗体、抗 phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (98F2) (#4671)抗体、抗 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (D16H11) (#5174)抗体、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ラビット IgG (#7074)抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)より購入した。CD8 の除去抗体 (clone 53.6.7)、CD4 の除去抗体 (GK1.5)、PD-L1 に対するアンタゴニスティック抗体 (10F.9G2)は Bio X Cell (West Lebanon, NH, USA)より購入した。コントロール用の抗ラット IgG は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)より購入した。

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、A23187 calcium ionophore は

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。ovalbumin (OVA)323-339 タンパクは Sigma- Aldrich Japan (Tokyo, Japan)より購入した。granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) は Toray (Tokyo, Japan)より購入した。

表1. IC50 of DGKI (μM)

DGKアイソザイム	α	β	γ	δ	η	κ	ε	ζ	ι	θ
CU-3	0.6	>10	>10	>10	7	>10	8	>10	>10	>10
DGKAI	0.01	0.01	<0.01	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

* IC50 (DGKα), R59022: 25 μM, R59949: 18 μM

２．細胞株

マウス肝がん Hepa1-6 細胞株(ATCC® CRL-1830™)およびマウス肝がん BNL 1MEA.7R.1 細胞株 (ATCC® TIB-75™) は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)より購入した。ヒト肝がん HLF 細胞株(JCRB0405)は JCRB (Osaka, Japan)より購入した。これらの細胞は、10% fetal bovine serum (FBS) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)、200 U/ml penicillin、100 μg/ml streptomycin、10 mM HEPES (Sigma-Aldrich Japan) を添加した DMEM (Wako Pure Chemical Industries)を使用し、37° C、5% CO2 下で培養した。すべての細胞株はマイコプラズマ感染の無いことを確認した。

３．実験動物

野生型 C57BL/6 マウスおよび野生型 BALB/c マウスは Charles River Japan (Kanagawa, Japan)より購入した。OT-I and OT-II T 細胞レセプタートランスジェニックマウスは Jackson Laboratory(ME, USA)より購入した。すべてのマウスは北海道大学遺伝子病制御研究所動物実験施設の指針に基づき特定病原体不在(SPF)下で飼育され、6-8 週齢にて実験に使用した。本研究の遂行に伴う動物実験の計画(19-0036)は、北海道大学の審査を受け承認された後に実行された。また、実験動物は全て北海道大学の動物実験に関する規定に従って行った。

４．インフォームドコンセント

ヒト臨床検体を用いた研究計画については、北海道大学大学院医学研究院 (14-043) 、遺伝子病制御研究所 (14-005, 14-0004)の各倫理委員会の承認

を得て行った。患者から臨床研究について説明し、文書による同意を得、また個人情報の保護を厳密に行なって実施した。2005 年から 2010 年にかけて北海道大学で手術を実施した総計 265 名の肝細胞がん患者がこの研究に登録された。

５．細胞増殖アッセイ

HLF 細胞および Hepa1-6 細胞を 96 ウェルプレートに播種し(2.0x10^3個/ウェル)、 DGKAI (10-100 μM)もしくは DMSO (コントロール)を添加して 4 日間培養した。播種直後、1 日目、2 日目および 4 日目に Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan)を用いて細胞増殖アッセイを行った。吸光度(450 nm) は吸光度計 (EZS-ABS, IWAKI Ltd, Tokyo, Japan) を用いて計測した。

６．アポトーシスアッセイ

HLF 細胞（1.0x10^4個/ウェル）を 96 ウェルプレートに播種し、DGKAI 10μM および DMSO（コントロール）を添加し 24 時間培養した後、Apo-ONE® Homogenous caspase-3/7 Assay(Promega, USA)を用いてアポトーシスアッセイを行った。

７．ヒト末梢血単核球（PBMC）

健康な被験者より採取した血液を Ficoll-Hypaque PLUS (Amersham Bioscience, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, NJ, USA)を用いて遠心分離することによりヒト PBMC を採取した。

８．マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）

野生型 C57BL/6 マウスの骨髄を 10% FBS および GM-CSF (20 ng/ml)含有 RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries)により 6-8 日間培養し、BMDC を誘導した。

９．マウス脾臓細胞からの CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の単離

OT-1 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスの脾臓細胞から CD8 陽性 T 細胞を、OT-2 T 細胞レセプタートランスジェニックマウスの脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を CD8+ T Cells アイソレーションキットおよび CD4+ T Cell アイソレーションキット(Miltenyi Biotec, Germany)を用いてポジティブセレクションで単離した。

１０．ELISA法

ヒトPBMCおよびマウス脾臓細胞(1.0x10^6個/ウェル)を96ウェルプレートに播種し、抗CD3抗体と抗CD28抗体(50 ng/ml)を添加した培地で24時間培養した後、OptEIA™ Human IL-2、OptEIA™ Human IFN-γ、OptEIA™ Mouse IL-2、and OptEIA™ Mouse IFN-γ ELISA kits (BD Biosciences)を用いてIL-2およびIFN-γ 産生量を測定した。また、OT-II T細胞レセプタートランスジェニックマウス由来のCD4陽性T細胞（1.0x10^5個/ウェル)、OT-I T細胞レセプタートランスジェニックマウス由来のCD8陽性T細胞(1.0x10^5個/ウェル)、野生型C57BL/6マウス由来のBMDC（2.0x10^4個/ウェル）を96ウェルプレートに播種し、濃度を調整したOVA（10 or 25 μg/ml)を添加し24時間培養した後にIL-2およびIFN-γ 産生量を測定した。

１１．ウエスタンブロッティング

野生型C57BL/6マウスの脾臓細胞を抗CD3抗体および抗CD28抗体(50 ng/ml)で20分（JNK)ないし30分（ERK)刺激し、DGKAI（10 μM)を添加しさらに2時間培養した後、全およびリン酸化ERKとJNK、GAPDHの発現量をウエスタンブロッティング法で測定した。細胞はライシスバッファー（Tris HCl 25 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, sodium deoxycholate 0.5%, EDTA-2Na 1 mM, NaF 5 mM, sodium orthovanadate 5 mM, 0.5 % Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich))を用いて処理した。抽出したタンパク 10 μg をライシスバッファーおよび 4× Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で希釈し、5分間煮沸した。Mini-PROTEAN TGX™ gel electrophoresis (Bio-Rad)のウェルに注入し泳動した後、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。5% BSAで室温にて1時間ブロッキングを行った。転写した膜を抗体希釈液 (phospho-ERK 1:2000, GAPDH 1:5000, other 1:1000) につけ、4° Cで一晩結合させた。HRP標識抗ラビットIgG抗体希釈液(1:5000)に室温で1時間つけた後、ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad)およびSuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA)用いて可視化し、Image Lab Software (Bio-Rad)を用いて定量化した. 膜は Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher Scientific)を用いて抗体を外し、別の抗体を再度反応させた。

１２．フローサイトメトリーによる解析

各細胞の Fc レセプターを抗 CD16/32 抗体で 15 分ブロッキングした後各種蛍光標識抗体で染色し、PD-L1、H-2Kb、I-Ab、CD86、CCR5、CCR7 および CXCR3 の発現量を FACSCanto™ II flow cytometry system (BD Biosciences) により測定した。測定結果は FlowJo™ software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) により解析した。各サンプルの平均蛍光強度(MFI)比率は、以下の式 (ΔMFI (標的サンプル MFI - アイソタイプコントロール MFI) /コントロールサンプル ΔMFI x 100 にて、計算して求めた。

１３．細胞内染色

単細胞浮遊液 (12 ウェルプレートに $1.0x10^6$ 個) を brefeldin A (Sigma-Aldrich)添加下で PMA (25 ng/ml)および A23187 calcium ionophore (1 μg/ml)で 4 時間刺激し、抗 CD8a 抗体および 7-AAD で染色した後 4% paraformaldehyde phosphate buffer solution (PFA)で固定した。透過処理を行い、抗 IFNγ 抗体で染色した。同様にして、OVA(10 μg/ml)で刺激した OT-I T 細胞トランスジェニックマウス由来の CD8 陽性 T 細胞 ($1.0x10^5$ 個) に DGKAI (10 μM)を添加し培養した細胞を抗グランザイム B 抗体で染色した。また、抗 CD45 抗体および 7-AAD で細胞表面染色を行った後、BD Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience)で固定した。蛍光を FACSCanto™ II (BD Bioscience)により検出し、FlowJo™ software (Tree Star)で解析した。いずれの実験もアイソタイプコントロール抗体を使用した。

１４．担がんマウスモデル肝臓からの CD8 陽性 T の細胞の単離

担がんマウスモデルの 14 日目肝臓をホモジナイズし得られた単核球に Fc レセプターを抗 CD16/32 抗体で 15 分ブロッキングした後各種蛍光標識抗体で染色し、FACSAria™、II (BD Biosciences)を用いて 7AAD 陰性の CD45 陽性 CD8 陽性細胞を単離した。

１５．PCR

Hapa1-6 細胞および担がんマウスモデルの 14 日目担がん肝臓由来単核球から単離した CD8 陽性 T 細胞から ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan; #311-07361) を用いて 1μg のトータル RNA を抽出した。NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, #ND-1000)で RNA 濃度を測定し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて 1mg のトータル RNA より単鎖 cDNA を作成した。得られた単鎖 cDNA を

テンプレートとし、各遺伝子について、下記に示す特異的プライマーを用いて（表２）、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)により増幅した。また、マウスDGKα、DGKβ、DGKγ、IFN-γ、Perf1、GrzBおよびβ-actin遺伝子の発現レベルの解析を、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (Toyobo) およびStepOnePlus™ (Applied Biosystems)を用いて定量PCRにより行った。各遺伝子におけるプライマー配列を以下に示す（表２）。各遺伝子の発現はハウスキーピング遺伝子であるβ-actinを用いて標準化し、ΔΔCt法（ΔCt = ΔCtsample －Δctreference)により相対的に比較検討した。

表２．PCRプライマー

Dgka	left	5′ -ggcactggaaatgatctgg-3′
	right	5′ -aatctttctcaaattctcaccttca-3′
Dgkb	left	5′ -ggatggacaaggtttgcag-3′
	right	5′ -tgacaaaaactagaagcggatg-3′
Dgkg	left	5′ -tgctcctctgtcaccattagg-3′
	right	5′ -cagggctctccgtctacttg-3′
Actb	left	5′ -aaggccaaccgtgaaaagat-3′
	right	5′ -gtggtacgaccagaggcatac-3′
Ifn-g	left	5′ -atctggaggaactggcaaaa-3′
	right	5′ -ttcaagacttcaaagagtctgagg-3′
Prf1	left	5′ -gaagaagaaacagcacaaaatgg-3′
	right	5′ -gacgtgacgctcacggtag-3′
Grzb	left	5′ -tgctgctcactgtgaaggaa-3′
	right	5′ -ttaccatagggatgacttgctg-3′

１６．トランスフェクション

Hepa1-6細胞にLipofectamine™ 3000 (ThermoFisher Scientific)を用いて蛍光mCherry cDNA (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)の組み込まれたプラスミドベクターをトランスフェクションした。蛍光はFACSCanto™ II により測定し、蛍光を発する細胞をFACSAria™ II (BD Bioscience)で回収した。

１７．肝がんマウスモデル

mCherry 遺伝子を導入した Hepa1-6 細胞(Hepa1-6/mCherry) を、野生型C57BL/6 マウスの脾臓に$1×10^6$個ずつ移植した。移植から14日後における

肝臓組織の腫瘍形成について、生体イメージングシステム(IVIS Spectrum, Xenogen)および Living Image® Software (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)により解析・評価した(図１)。 DGKAI は投与量を 600 μg/日とし、移植後 1 日後から 13 日後まで経口的に投与した。CD8 除去抗体、CD4 除去抗体およびコントロールラット Rat IgG (200 μg/mouse)は移植前日と移植後 5 日目にマウス腹腔内へと投与した。抗 PD-L1 抗体(100 μg per mouse)は移植後 5 日目および 9 日目に投与した。屠殺したマウスから摘出した肝臓は 細切した後に 30 分間 37℃で collagenase type I (1mg/ml, Wako Pure Chemical Industries)で処理した。その後細胞をホモジナイズしマウス肝臓由来の単核球を Percoll™ Centrifugation Media (GE Healthcare-Life Sciences, Chicago, IL, USA.)を用いて遠心分離により回収した。回収した単核球はフローサイトメトリーによる解析に使用した。

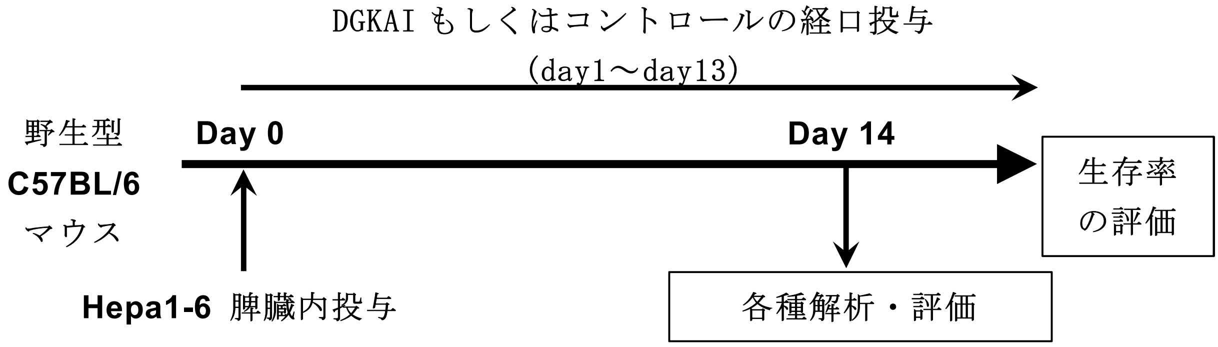

図１．肝がんマウスモデルを用いた肝腫瘍形成能の解析・評価

１８．免疫組織化学染色(IHC)

肝がんマウスモデルから得た肝臓組織について、4% PFA で固定した後パラフィンで包埋した。脱パラフィンした後 HE 染色を行なった。CD3 および CD11c の発現について、試薬キット(415211, Nichirei Bioscience, Inc., Tokyo, Japan)を使用して 95℃で 20 分間抗原を賦活化した後、内因性ペルオキシダーゼを 0.3%の過酸化水素を使用して室温で 10 分間不活化した。トリスバッファーで洗浄後、一次抗体として抗 CD3 抗体(ab134096; Abcam, Cambridge, UK)、抗 CD11c 抗体(GTX74940; GeneTex Inc., Irvine, CA, USA)および抗 PD-L1 抗体(D5V3B; Cell Signaling Technology)を室温で 30 分間反応させた。反応後に 3 回洗浄し、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 マウス/ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Histofine Simple Stain MAX PO, 424144, Nichirei Bioscience)で反応させた。洗浄後にマイヤーヘマトキシリン染色で核染色を行った。3-3’-diaminobezidine-4 HCL を用い

タンパク発現を可視化した。

HCC 切除検体(265 例)からティッシュマイクロアレイを作成した。脱パラフィン後、PT Link™ (Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA)を用いて抗原を賦活化し、内因性ペルオキシダーゼを 0.3%の過酸化水素を使用して室温で 5 分間不活化した。トリスバッファーで洗浄し、抗 DGKα 抗体(11547-1-AP, Proteintech)､抗 CD4 抗体(4B12, Leica)および抗 CD8a 抗体(C8/144G, Dako)で 30 分間染色した。Envision FLEX HRP (Dako)を室温で 30 分反応させ、洗浄後にマイヤーヘマトキシリン染色で核染色を行った。3-3’-diaminobezidine-4 HCL を用いタンパク発現を可視化した。

１９．統計学的解析

In vitro の実験系では少なくとも 3-5 回以上、独立して実験を行った。*In vivo* 生体モデルの実験系では、一群 3-10 匹のマウスを用い、2 回もしくは 3 回の独立した実験を行った。代表的な結を図中に示している。生存率実験では、一群 16-17 匹のマウスを用いて実験を行った。各データについて平均値および標準偏差を計算した。多群間の比較に関しては、one-way ANOVA および Dunnett’s test もしくは Tukey’s test を用いて評価した。また、一部の二群間の比較には two-tailed Student’s t-test を用いた。本研究では、$P < 0.05$ を有意差ありと判定した。生存率の評価は、各群における生存曲線をカプランマイヤー法に従い作成し、log-rank test で比較した。すべての統計学的解析は EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) (Kanada, 2013)を用いて解析した。

結果

１．DGKα 阻害により肝がん細胞の増殖が抑制される

本研究で用いた DGKα 阻害剤(DGKAI)は同じ 1 型アイソザイムである DGKβ および DGKγ にも阻害活性を有している（表１）。そこで、マウス肝がん Hepa1-6 細胞における DGKα、DGKβ および DGKγ の遺伝子発現量を計測したところ、DGKα 遺伝子発現は他の 2 つのアイソザイム遺伝子発現よりも高く、DGKα 阻害が他の 2 つのアイソザイムの阻害よりも肝がん細胞の増殖や生存をより抑制することが示唆された（図 2)。そして、DGKβ および DGKγ 遺伝子発現量はかなり低いため、本阻害剤を DGKα 阻害剤として用いることとした。

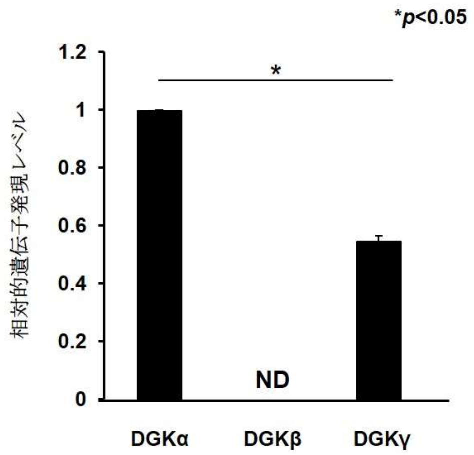

図２．マウス肝がん Hepa1-6 細胞では DGKα の発現が高い。

マウス肝がん細胞株 Hepa1-6 細胞における DGKα、DGKβ、DGKγ の遺伝子発現量を定量的 PCR で比較検討し、平均値と標準偏差を示した（n=4)。*は Dunnett の多重検定による有意差（$p<0.05$）を示す。

初めに、DGKα 阻害の肝がん細胞への増殖抑制効果を *in vitro* 実験で検討した。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 4 日間培養した。4 日目の増殖率は、HLF 細胞では DGKAI 濃度が 10 μM の群で 87%、100 μM の群で 7%と有意に低下した。また、Hepa1-6 細胞では 30μM の群で 88%、100 μM の群で 42%と有意に低下した(図３)。このことから、DGKα 阻害は免疫反応とは別に肝がん細胞の増殖を直接抑制することが示唆された。

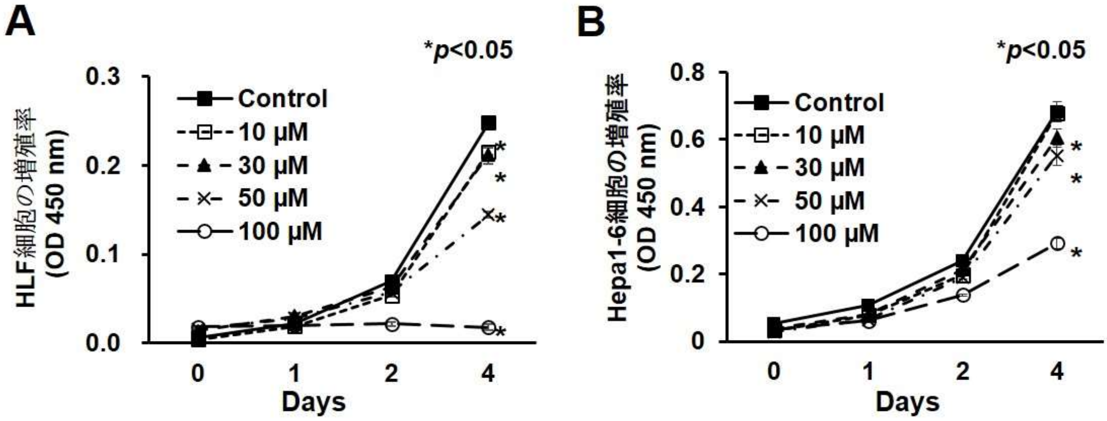

図３．DGKAI は HLF 細胞および Hepa1-6 細胞の増殖を抑制する。

ヒト肝がん細胞株 HLF 細胞およびマウス肝がん細胞株 Hepa1-6 細胞を各種濃度の DGKAI もしくはコントロール添加下に培養し、細胞増殖アッセイで day0, 1, 2, 4 時点での細胞増殖を検討した。(A) HLF 細胞では DGKAI 濃度が 10 μM の群で 87%、100 μM の群で 7%と有意に低下した。(B) Hepa1-6 細胞では 30μM の群で 88%、100 μM の群で 42%と有意に低下した。平均値と標準偏差を示した（n=4)。*は Dunnett の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

また、これまで DGKα 阻害により肝がん細胞のアポトーシスを促進したとの報告があることから、HLF 細胞に DGKAI を添加し 24 時間培養した後にアポトーシスアッセイを行い検討した。刺激を加えない状態ではアポトーシス促進効果はみられなかった（図４）。

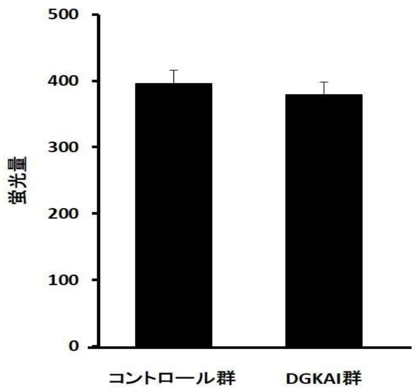

図４．DGKAI による HLF 細胞におけるアポトーシス促進効果の検討。

ヒト肝がん細胞株 HLF に 0μM の DGKAI もしくはコントロール溶媒を添加し 24 時間培養し、アポトーシスアッセイを行い検討した（n=4)。

２．DGKα 阻害によりＴ細胞レセプターを介する免疫応答が活性化される

DGKα 阻害の免疫細胞への作用を検討するにあたり、The Human Protein Atlas datasets で CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞および樹状細胞における DGKA 遺伝子発現を検討したところ、T 細胞において最も発現量が高値であった（図５）

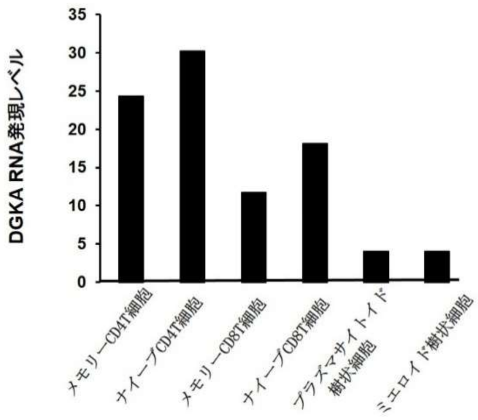

図５．DGKA 遺伝子発現量は T 細胞に多い。

https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065357-DGKA/blood より引用。

また、マウス CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞および BMDC における DGKα 遺伝子発現を調べたところ、こちらも T 細胞で発現が高かった（図６）。

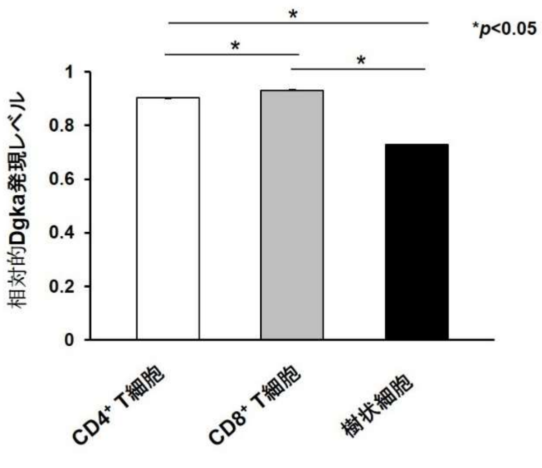

図６．マウスにおいても DGKα 遺伝子発現は T 細胞で高い。

C57BL/6 マウスの脾臓より CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞を単離、または骨髄より BMDC を誘導し、Dgka 遺伝子発現を定量 PCR 法により比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=3)。*は Turkey の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

ヒトPBMCおよびマウスBMDCを用いてDGKAIの免疫賦活作用を *in vitro* で検討したところ、DGKAI投与により、CD3およびCD28刺激時のIL-2産生が増加したがIFN-γ 産生は増加しなかった。また、刺激なしの場合にはIL-2の産生は増加しなかった（図７）。

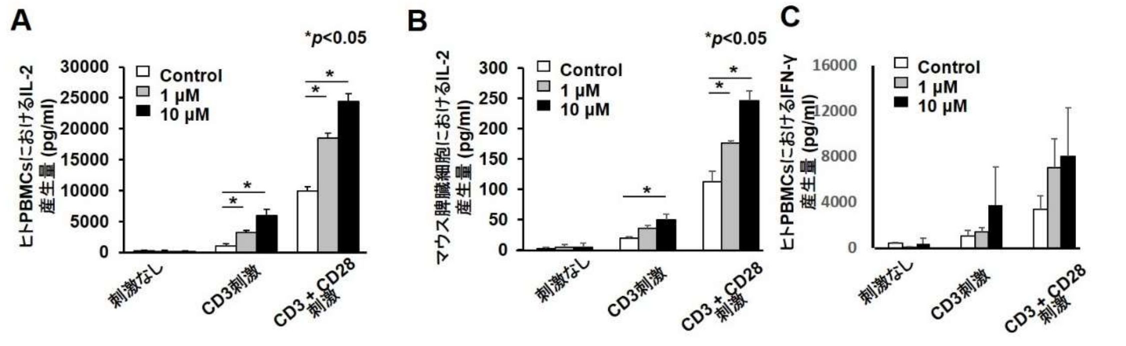

図７．DGKα 阻害は、CD3およびCD3+CD28刺激下において、ヒトPBMCおよびマウスBMDCのIL-2産生を促進する。

ヒトPBMCを健康な被験者より採取し、マウスBMDCをC57BL/6マウの骨髄より誘導し得た。それぞれ、CD3あるいはCD3およびCD28に対する刺激を加え、さらにDGKAIを共培養した際のIL-2およびIFN-γ 産生量をELISA法で測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4)。*はDunnettの多重検定による有意差（$p<0.05$）を示す。

これらのことから、DGKα 阻害はT細胞レセプターを介した免疫応答を賦活化し、IL-2産生を増加させる作用効果を有することが示唆された。

DGKAIの作用メカニズム解明のためウエスタンブロッティング法により各種シグナルカスケードの活性化を検討したところ、免疫細胞内においてDGKAIは、CD3およびCD28刺激下においてT細胞レセプターを介した細胞内シグナル伝達に作用し、ERKやJNKのリン酸化を誘導した（図８）。

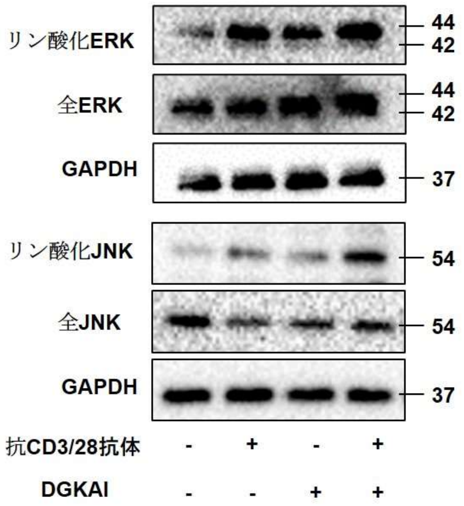

図８.DGKAI は CD3 および CD28 刺激下において ERK や JNK のリン酸化を誘導した。
C57BL/6 マウスの脾臓細胞に対して CD3 および CD28 と DGKAI の組み合わせによる刺激を与えた際の ERK および JNK のリン酸化をウエスタンブロッティング法により検討し、デンシメトリーにより定量化し比較した。

このことから、DGKAI は ERK や JNK など T 細胞レセプターを介したシグナル伝達を活性化し、IL-2 産生を促進することが示唆された。

そこで、DGKα を阻害することは、肝がん細胞の増殖抑制効果と T 細胞の免疫応答活性化効果の 2 方向性からの抗腫瘍効果を発揮するという仮説を立てた（図９）。

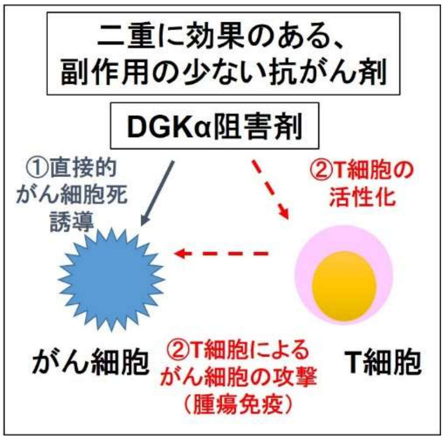

図９.DGKα 阻害剤は 2 方向の異なる作用で抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

３．DGKAI の経口投与はマウス生体内での腫瘍増生を抑制し、生存率を延長する

生体内での DGKAI の抗腫瘍効果の検討のためのマウスモデル構築に当たり、宿主免疫が正常に働く必要があると考え、シンジェニックなマウスモデルを作成することとした。マウス肝がん細胞株の Hepa1-6 細胞および BNL 1ME A.7R.1 細胞をそれぞれ同系統のマウスである B6 マウスおよび BALB/c マウスの脾臓へ移植することにより、肝臓に腫瘍を形成するマウスモデルを作成した（図１０）。

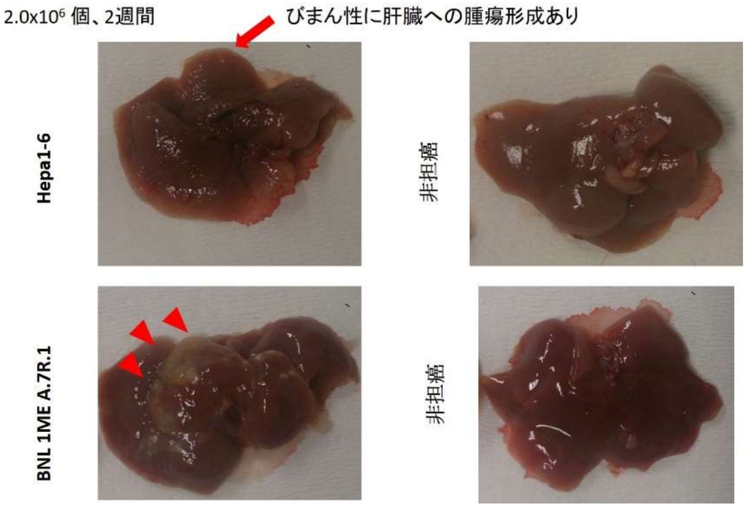

図１０．肝がんマウスモデルの肝臓。

また、複数のモデルでの評価系の構築のため、マウス肝がん細胞株 Hepa1-6 細胞および BNL 1MEA.7R.1 細胞を同系統のマウスの皮内へ投与移植する皮内移植モデルの構築を試みた（図１１）。しかし、腫瘍は自然に消退してしまい、本研究の治療モデルへの応用するためには不適当と判断した。

図１１．マウス肝がん皮内移植モデルの写真。

同時に、*in vivo* 治療モデルでの腫瘍量の評価として、生体イメージングシステムを用いることを考え、マウス肝がん細胞株 Hepa1-6 細胞および BNL 1ME A.7R.1 細胞に mCherry 蛍光タンパクを導入することを試みた結果、Hepa1-6 細胞で安定した細胞株が得られた（図１２）。

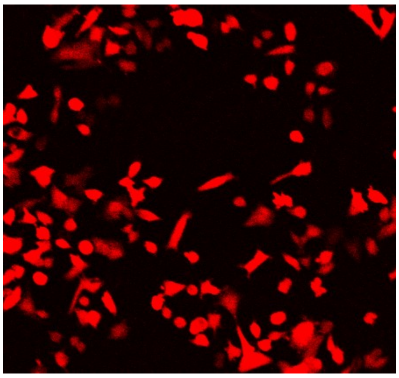

図１２．mCherry 蛍光タンパクを導入した Hepa1-6 の蛍光顕微鏡写真。

さらにその細胞を野生型 C57BL/6 マウスの脾臓内へ移植することにより、蛍光量で腫瘍量が評価できる肝がんマウスモデルを構築した。これらのマウスに DGKAI もしくはコントロール溶媒を移植後 1 日目から 13 日目の間経口投与し、14 日目に各種解析を行う治療モデルとした。この実験系において、観察範囲において DGKAI による明らかな有害事象は確認されなかった（図１３）。

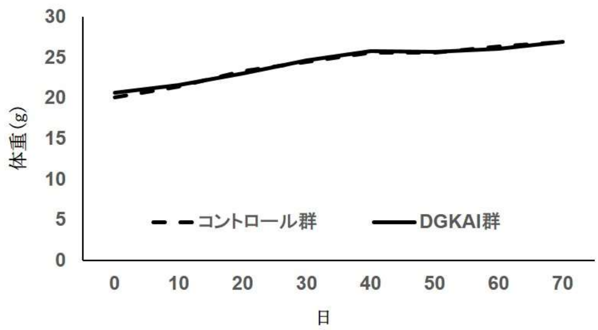

図１３．野生型マウスへの DGKAI 経口投与はで体重減少はみられなかった。
野生型 C57BL/6 マウスに DGKAI もしくはコントロール溶媒を１日１回経口投与し、体重変化を 75 日間観察した。

移植後 14 日目に生体イメージングシステムで肝臓の蛍光量を測定し、相関される腫瘍量を比較検討したところ、DGKAI 投与群において腫瘍増生が有意に抑制されたが（図１４）、 脾臓では差は認められなかった（図１５）。

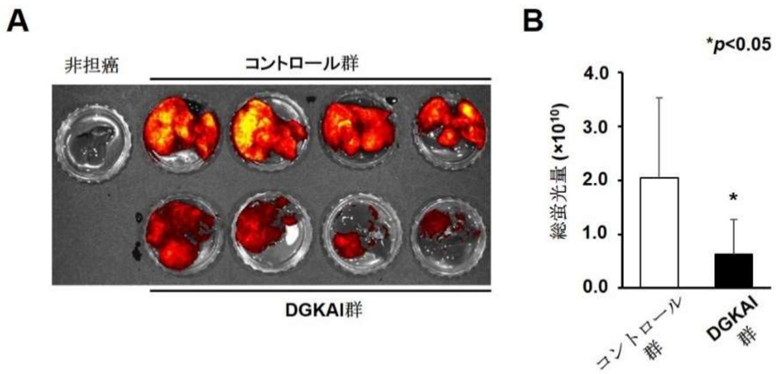

図１４．DGKAI の経口投与により、肝がんマウスモデルでの腫瘍量は減少した。
（A, B）肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目に生体イメージングシステムで肝臓の蛍光量を測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Student の t 検定による有意差（p<0.05）を示す。

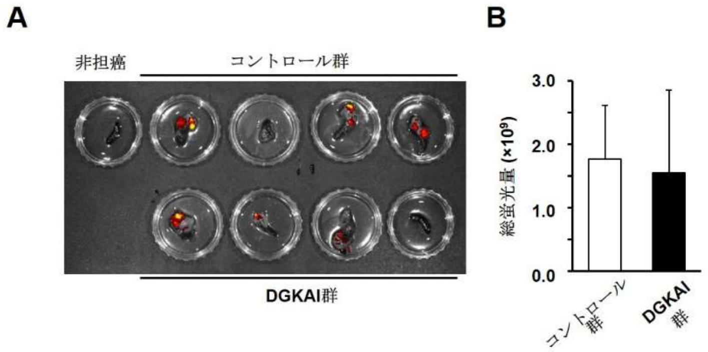

図１５．肝がんマウスモデルの脾臓では DGKAI 投与により腫瘍量は変わらなかった。
（A，B）肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目に生体イメージングシステムで脾臓の蛍光量を測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4)。*は Student の t 検定による有意差（p<0.05）を示す。

そして、その際に DGKAI 投与群では腫瘍面積および腫瘍個数が減少していた（図１６）。

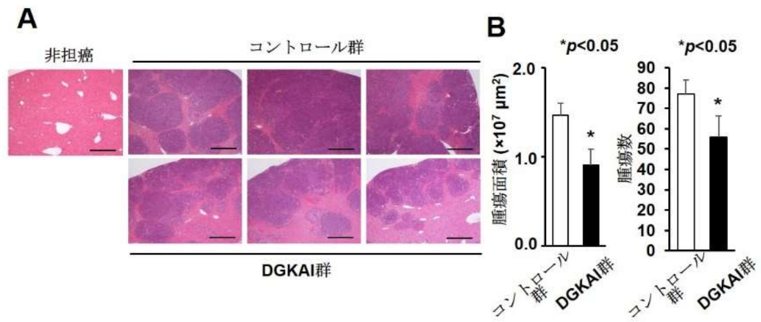

図１６．腫瘍面積および腫瘍数は DGKα 阻害剤投与により減少した。
（A）肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目の肝臓の EH 染色写真。（B）両群で腫瘍面積および腫瘍数を計測し、平均値と標準偏差を示した（n=5)。*は Student の t 検定による有意差（p<0.05）を示す。

さらに、移植後 40 日時点での生存率を比較した結果、DGKAI 群は 64.7%、コントロール溶媒群は 18.8%と DGKAI 群において有意に延長された（図１７）。

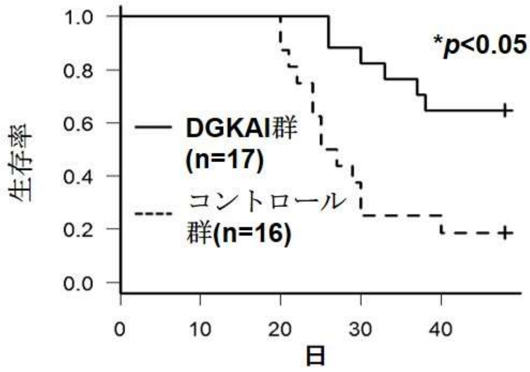

図１７．DGKα 阻害剤投与により、担がんマウスの生存率が延長された。

肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、40 日目における生存率を比較検討した(n=17 もしくは 16)。カプランマイヤー法により生存曲線を作成し、ログランク検定における有意差（p<0.05）を示す。

これらの結果より、DGKα 阻害はマウス生体内において肝腫瘍の増生を抑制し、生存率を延長させることが示された。

４．肝がんマウスモデルにおいて DGKα 阻害は腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞および CD11c 陽性樹状細胞を増加させる

次に、肝がんマウスモデルを用いて、DGKα 阻害が生体内で免疫状態に及ぼす効果を検証した。移植後 14 日目の肝臓に HE 染色および免疫組織学染色を行い、腫瘍浸潤免疫細胞を比較検討したところ、DGKAI の経口投与は、移植後 14 日目の腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞数および CD11c 陽性樹状細胞数を有意に増加させることが明らかとなった（図１８）。

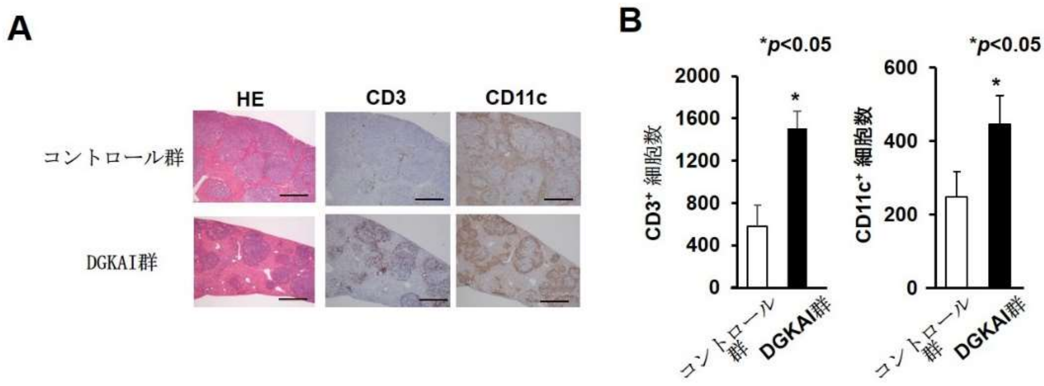

図１８．肝がんマウスモデルにおいて DGKα 阻害は腫瘍浸潤 CD3 陽性 T 細胞および CD11c 陽性樹状細胞を増加させる。

肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目の肝臓に HE 染色および免疫組織学染色を行い、腫瘍浸潤免疫細胞を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=5)。*は Student の t 検定による有意差（$p<0.05$）を示す。

また、担がん状態にある肝臓中の CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーで検討したが、DGKAI 群で増加している傾向は認められたが、その有意差は得られなかった（図１９)。腫瘍浸潤 T 細胞のみを検出できているわけではいこと、腫瘍量が治療群において少ないことが原因として考えられた。

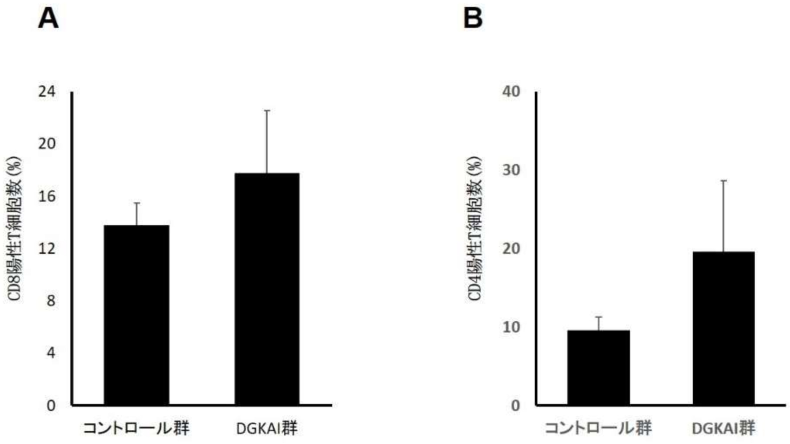

図１９．肝がんマウスモデルにおいて DGKα 阻害による担がん肝臓中の T 細胞の割合増加はみられなかった。

肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目の肝臓に HE 染色および免疫組織学染色を行い、担がん肝臓中の CD8 陽性細胞(A)および CD4 陽性細胞(B)を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=4 および 7)。

DGKAI による治療は樹状細胞における MHC class I、class II やケモカインレセプター(CCR5, CCR7 and CXCR3)の発現を上昇させなかったが、CD86 発現レベルを上昇させた（図２０）。

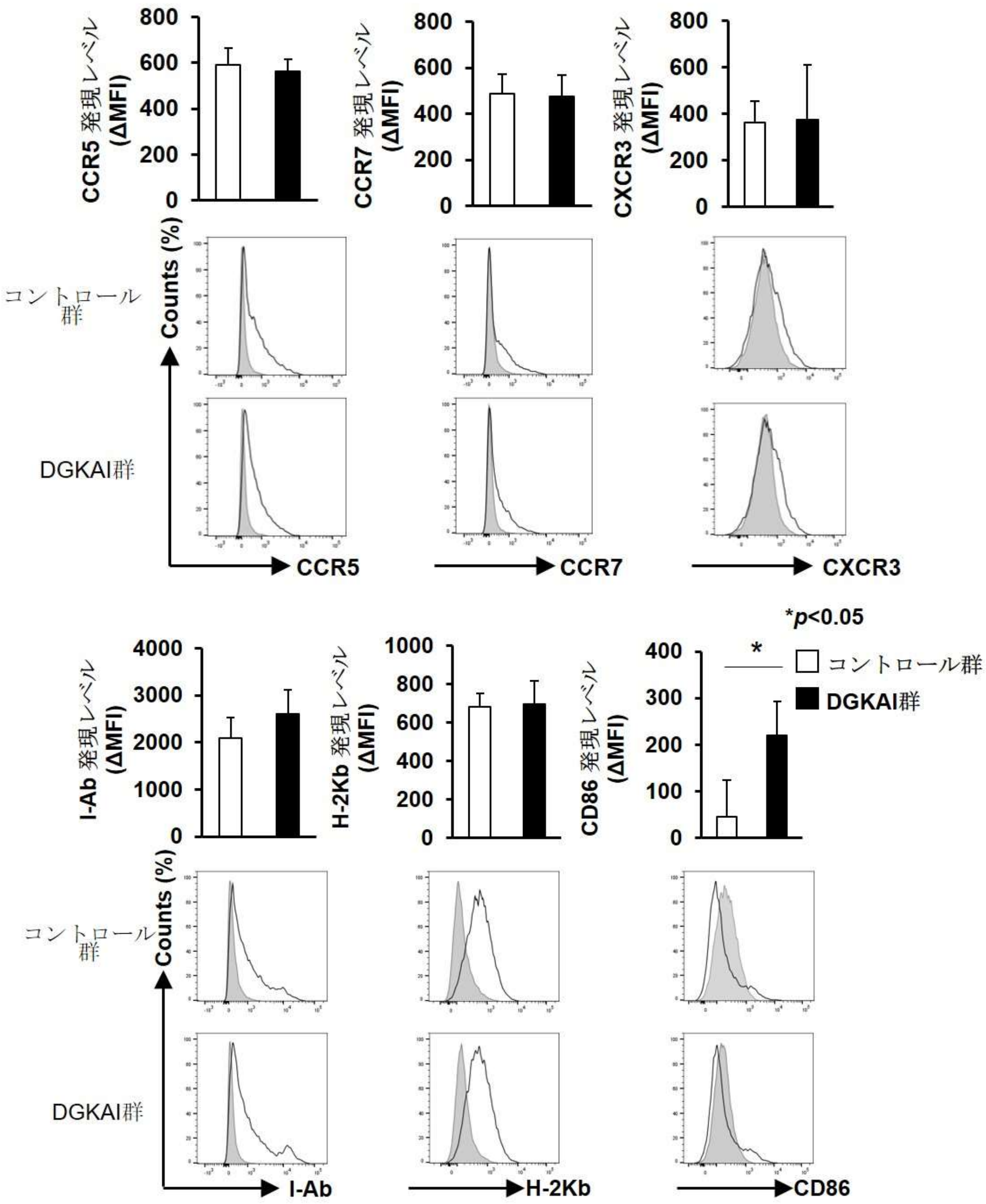

図２０．樹状細胞における MHC および各種ケモカインレセプター発現に対する DGKAI の影響の検討。

C57BL/6 マウスの骨髄から誘導した BMDC に DGKAI に投与し、フローサイトメトリーにより MHC および各種ケモカインレセプターの発現を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Student の t 検定による有意差（p<0.05）を示す。

これらの結果、および DGKα 遺伝子発現レベルは樹状細胞よりも CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において高発現であること（図５）から、このマウスモデルにおいて DGKAI は樹状細胞よりも T 細胞に優先的に作用することが示唆された。

担がん環境下における DGKAI の抗腫瘍効果作用メカニズムの検討を行うため、担がん状態の肝臓をホモジナイズし、フローサイトメトリーで CD8 陽性細胞をソーティングした後、*Ifn-g*、*Prf-1*、*Grzb* の発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。DGKAI 投与によりこれらの遺伝子発現は上昇したものの、軽度の変化であった（図 ２１）。

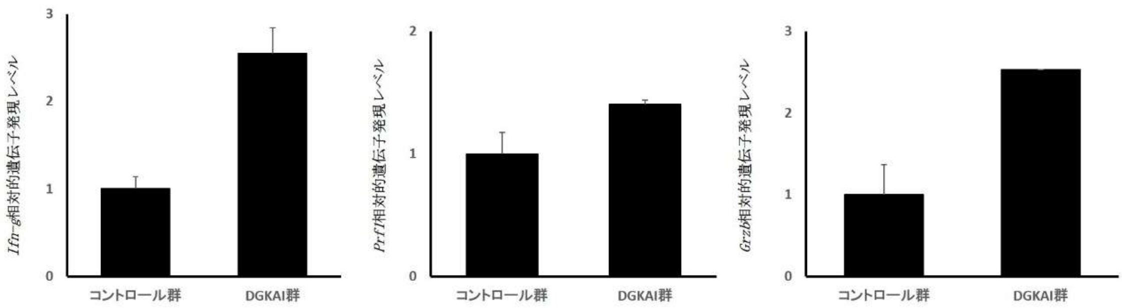

図２１．肝がんマウスモデルにおける DGKα 阻害は担がん肝臓における CD8 陽性 T 細胞の遺伝子発現検討。

肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目の肝臓をホモジナイズした後にフローサイトメトリーで CD8 陽性細胞をソーティングし、リアルタイム PCR 法で *Ifn-g*、*Perf1*、*Grzb* の遺伝子発現量を検討した（n=2）。

フローサイトメトリーによりタンパクレベルでの検討を行ったところ、DGKα 阻害は担がん肝臓中の IFN-γ 産生 CD8 陽性 T 細胞数を増加させた（図２２）。

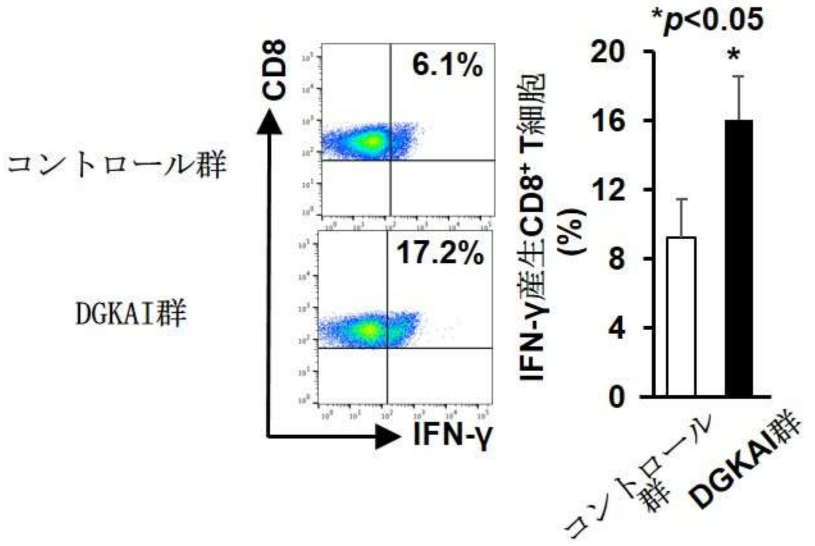

図２２.DGKα 阻害は担がん肝臓中の IFN-γ 産生 CD8 陽性 T 細胞数を増加させる。
肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目の肝臓をホモジナイズし単核球を採取し、IFN-γ 産生 CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーで比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=3)。*Student の t 検定による有意差（p<0.05）を示す。

このことから、DGKAI は肝腫瘍へ IFN-γ 産生エフェクターT 細胞を誘導することが示唆された。遺伝子発現の変化はタンパク発現変化よりも、より早期の段階で起こってくるため、14 日目の解析時点では遺伝子レベルでの発現上昇は認められないと考えた。

同時に、IL-2 産生 CD4 陽性細胞数もフローサイトメトリーで検討したが有意差はみられなかった。腫瘍免疫において IL-2 産生による活性化は、より早い段階で起こっており、移植後 14 日目の担がん肝臓においては差がみられなかったものと考えた。

また、CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的サイトカイン産生の関与を検討するため、OT-II T 細胞レセプタートランスジェニックマウス由来の CD4 陽性 T 細胞と OT-I T 細胞レセプタートランスジェニックマウス由来の CD8 陽性 T 細胞を脾臓より採取し、OVA による抗原特異的刺激を与えた際の DGKAI の影響を検討した。その結果、DGKα 阻害は CD4 陽性 T 細胞 IL-2 産生を増加させるとともに（図２３)、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（図２４)。

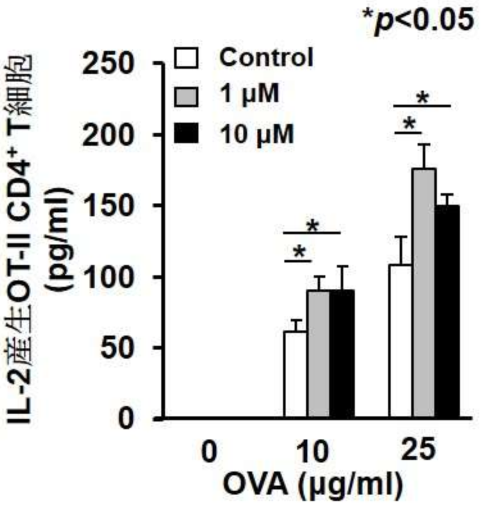

図２３．DGKα 阻害は CD4 陽性 T 細胞の抗原特異的刺激下での IL-2 産生を促進する。
OT-II T 細胞レセプタートランスジェニックマウスの脾臓から CD4 陽性 T 細胞を分離し、OVA および DGKAI を投与した際の IL-2 産生量を ELISA 法で測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4)。*は Dunnett の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

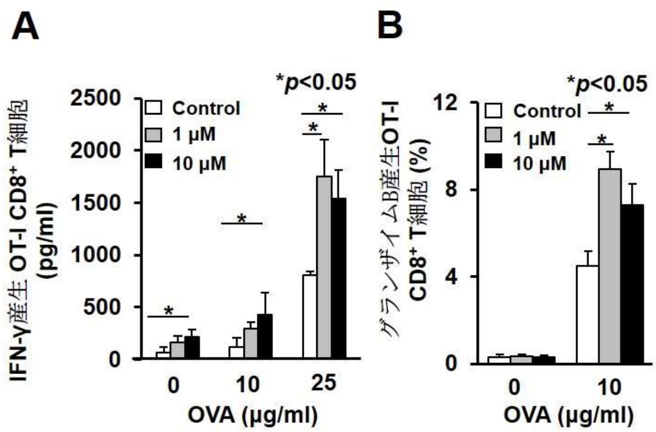

図２４．DGKα 阻害は CD8 陽性 T 細胞の抗原特異的刺激下での IFN-γ 産生およびグランザイム B 産生を促進する。
OT-I T 細胞レセプタートランスジェニックマウスの脾臓から CD8 陽性 T 細胞を分離し、OVA および DGKAI を投与した際の IFN-γ 産生量を ELISA 法で、グランザイム B 産生をフローサイトメトリーで検討した。平均値と標準偏差を示した(n=4)。*は Dunnett の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

これらの結果より、DGKα 阻害は抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性キラーT 細胞、樹状細胞といったエフェクターT 細胞を活性化することが示唆された。

<u>５．肝がんマウスモデルにおいて CD8 陽性細胞の除去は DGKAI の抗腫瘍効果を減弱させる</u>

抗腫瘍エフェクター細胞を同定するために、肝がんマウスモデルにおいて、CD8 除去抗体または CD4 除去抗体を、コントロールとしてコントロール IgG を肝がん細胞移植前日および移植後 5 日目に腹腔内へ投与した。移植後 14 日目に肝臓の蛍光量を測定し、相関される腫瘍量を比較検討したところ、CD8 除去抗体投与群において DGKAI の抗腫瘍効果が減弱した（図２５）。HE 染色による腫瘍面積の検討でも同様の結果であった（図２６）。また、DGKAI 投与群において CD8 除去抗体併用群では腫瘍浸潤 CD3 陽性細胞数が減少していた（図２７）。

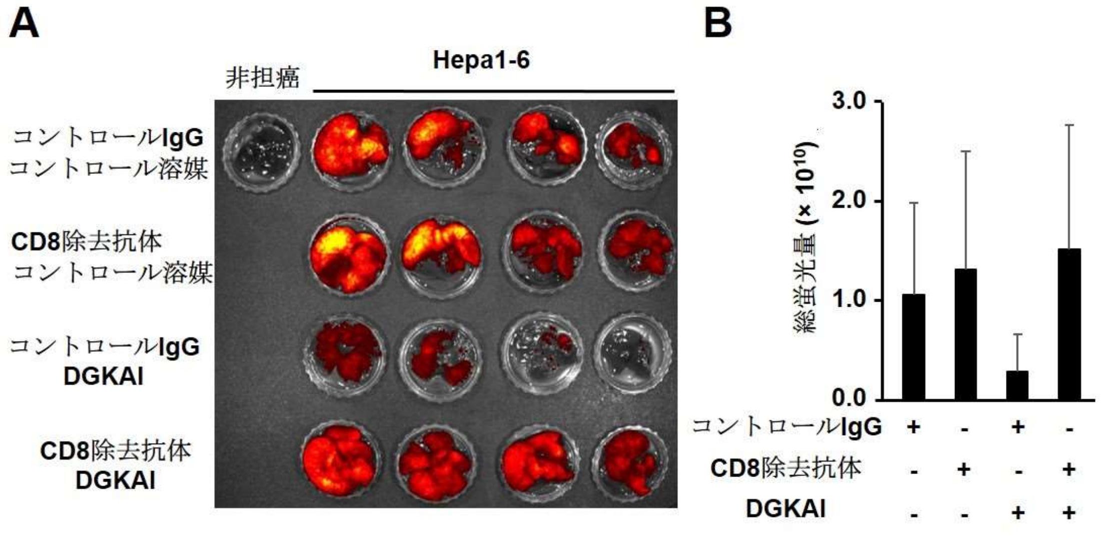

図２５．肝がんマウスモデルにおいて DGKAI 投与群で CD8 陽性細胞の除去を行うと腫瘍量が増加する

（A, B）肝がんマウスモデルへ CD8 陽性細胞の除去抗体もしくはコントロール IgG を腹腔内へ注射し、それぞれ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与した際の移植後 14 日目の肝臓を生体イメージングシステムで蛍光量を測定した。平均値と標準偏差を示した（n=7）。

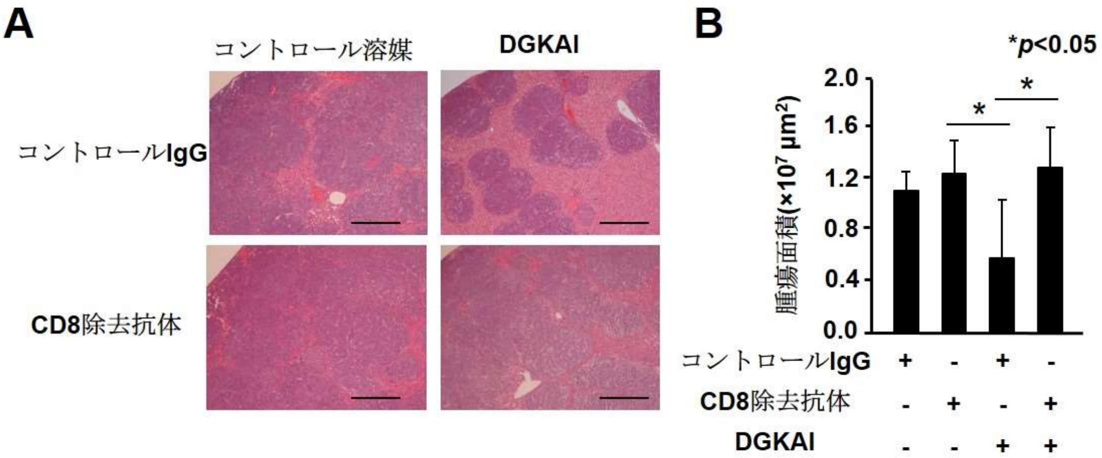

図２６．肝がんマウスモデルにおいて DGKAI 投与群で CD8 陽性 T 細胞の除去を行うと腫瘍面積が増加する

（A, B）肝がんマウスモデルへ CD8 陽性細胞の除去抗体もしくはコントロール IgG を腹腔内へ注射し、それぞれ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与した際の移植後 14 日目の肝臓に HE 染色を行い、各群の腫瘍面積を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Turkey の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

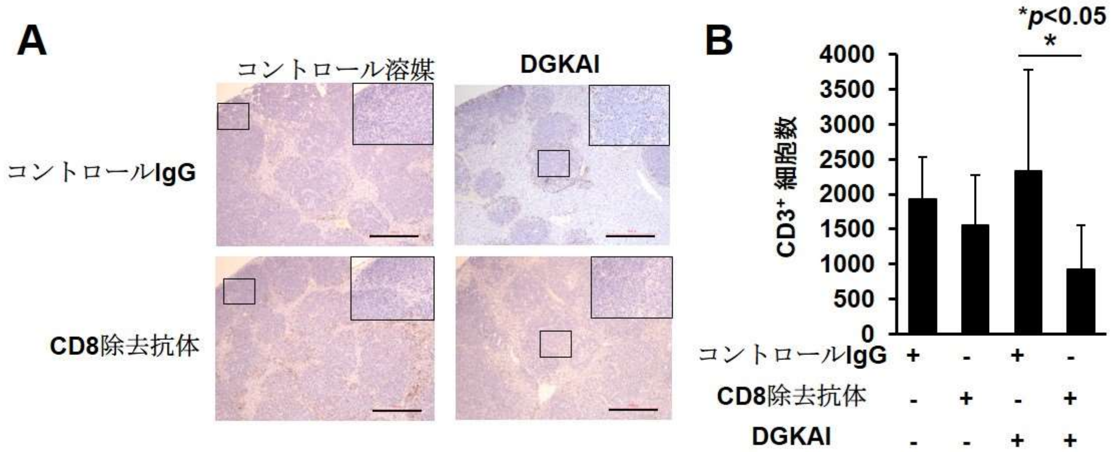

図２７．肝がんマウスモデルにおいて DGKAI 投与群で CD8 陽性 T 細胞の除去を行うと腫瘍浸潤 CD3 陽性細胞数が減少する

（A, B）肝がんマウスモデルへ CD8 除去抗体もしくはコントロール IgG を腹腔内へ注射し、それぞれ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与した際の移植後 14 日目の肝臓に免疫組織化学染色を行い、各群の腫瘍浸潤 CD3 陽性細胞数を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Turkey の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

さらに、CD4 陽性 T 細胞の関与を検証するため、肝がんマウスモデルにCD4 除去抗体もしくはコントロール IgG を投与し、 移植後 14 日目に生体イメージングシステムにより DGKAI の抗腫瘍効果を比較検討したが差は見られなかった（図２８）。

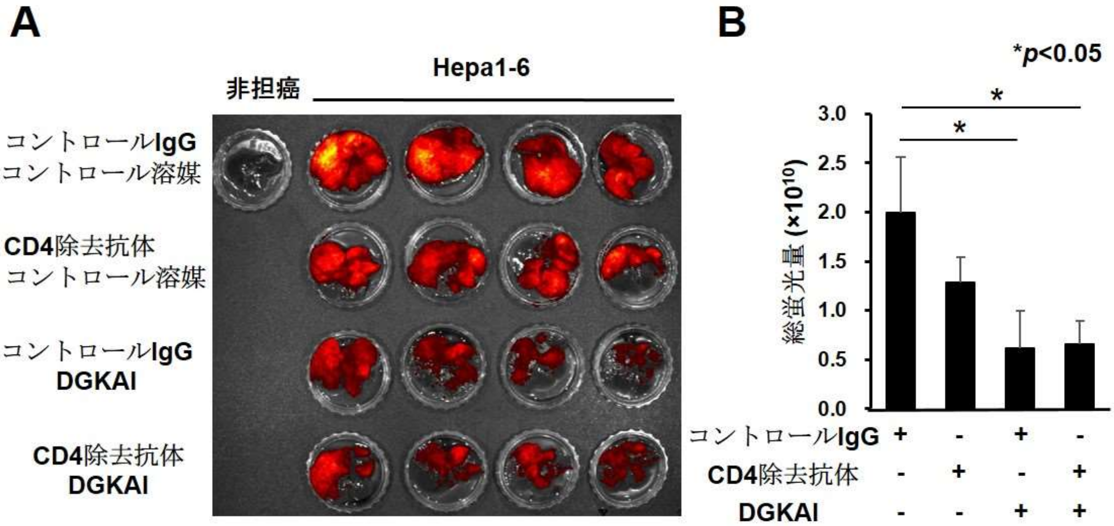

図２８．肝がんマウスモデルにおいて DGKAI 投与群で CD4 陽性 T 細胞の除去による腫瘍量の変化はみられない

（A, B）肝がんマウスモデルへ CD4 陽性細胞の除去抗体もしくはコントロール IgG を腹腔内へ注射し、それぞれ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与した際の移植後 14 日目の肝臓を生体イメージングシステムで蛍光量を測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Turkey の多重検定による有意差（$p<0.05$）を示す。

これらの結果から、DGKα 阻害による抗腫瘍効果には CD4 陽性 T 細胞ではなく、CD8 陽性 T 細胞の関与がより大きいことが示唆された。

６．DGKAI と抗 PD-L1 抗体との併用治療は肝がんマウスモデルにおいて腫瘍増生をより抑制する

担がん環境下での変化を検討するため、マウス肝がん Hepa1-6 細胞を各種サイトカインで刺激した際の表面分子の発現をフローサイトメトリーで検討した。その結果、IFN-γ で刺激した場合に PD-L1 の発現レベルは有意に増加した（図２９）。

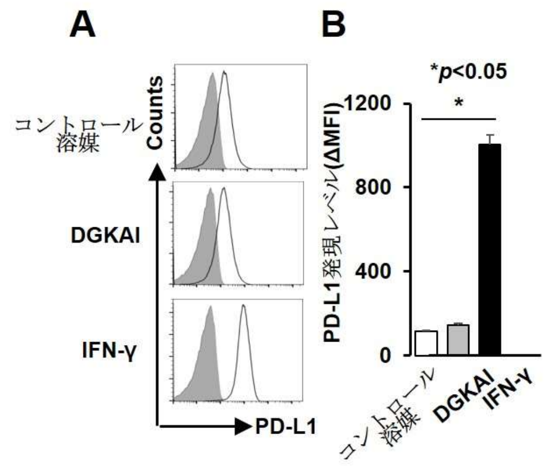

図２９．マウス肝がん細胞 Hepa1-6 を IFN-γ で刺激すると PD-L1 の発現レベルが増加する

マウス肝がん細胞 Hepa1-6 に DGKAI もしくは IFN-γ を添加し培養し、フローサイトメトリーで PD-L1 の発現量を比較検討した。平均値と標準偏差を示した（n=3）。*は Dunnett の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

さらに、肝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 発現細胞を免疫組織学的染色により比較検討したところ、DGKAI 治療群において増加していることが分かった（図３０）。

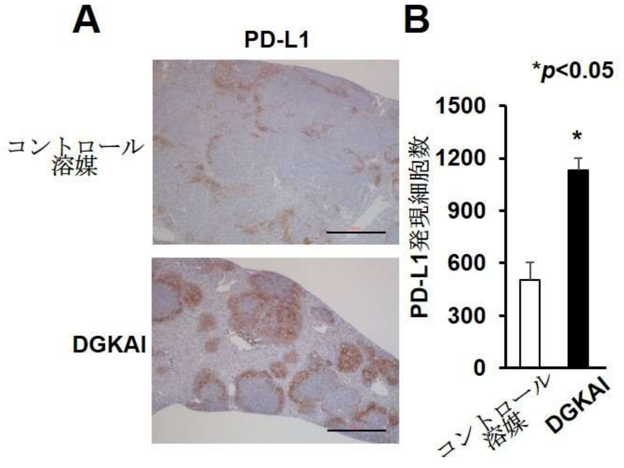

図３０．DGKα 阻害は肝がんマウスモデルにおいて肝臓腫瘍中の PD-L1 発現細胞を増加させる。

（A, B）肝がんマウスモデルへ DGKAI もしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、移植後 14 日目に免疫組織化学染色により肝臓腫瘍中の PD-L1 発現細胞数した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*は Turkey の多重検定による有意差（p<0.05）を示す。

これらの結果より、DGKα 阻害は免疫チェックポイント阻害薬による治療効果を促進する可能性が示唆された。

そこで、肝がんマウスモデルを DGKAI および抗 PD-L1 抗体で治療することにより、併用治療効果を検討した。抗 PD-L1 抗体の投与量を 200μg/マウスとし、移植後 48 日目における生存率を比較検討したが、DGKα 阻害剤投与群において抗 PD-L1 抗体併用による治療上乗せ効果を示すことは出来なかった（図３１）。

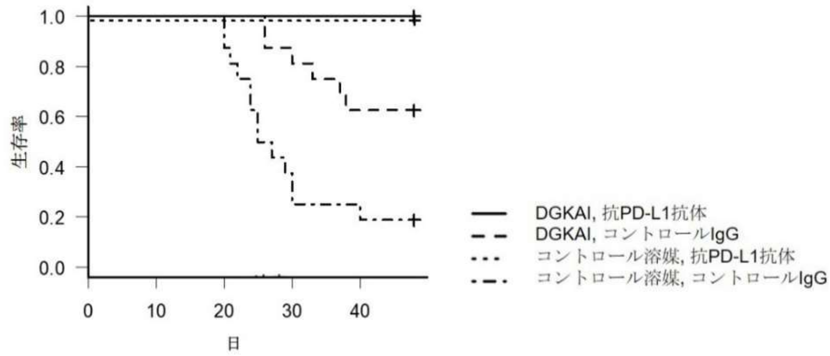

図３１．肝がんマウスモデルにおけるDGKα 阻害と抗PD-L1抗体併用療法による生存率の検討。

肝がんマウスモデルへ抗PD-L1抗体もしくはコントロールIgGを腹腔内投与し、DGKAIもしくはコントロール溶媒を連日経口投与し、48日目における生存率を比較検討した(n=17もしくは16)。カプランマイヤー法により生存曲線を作成し、ログランク検定を行った。

この結果から、抗PD-L1投与量がこのマウスモデルにとっては多いため、抗PD-L1抗体による治療効果が強く出過ぎており、DGKα 阻害剤との併用効果が示せなかった可能性を考えた。そこで、抗PD-L1抗体の投与量を100μg/マウスに減量して移植後14日後の肝臓の腫瘍量を生体イメージングシステムにより比較検討した結果、移植後14日目の肝腫瘍増生はDGKAIと抗PD-L1抗体の併用治療群において有為に抑制されることを確認した（図３２）。

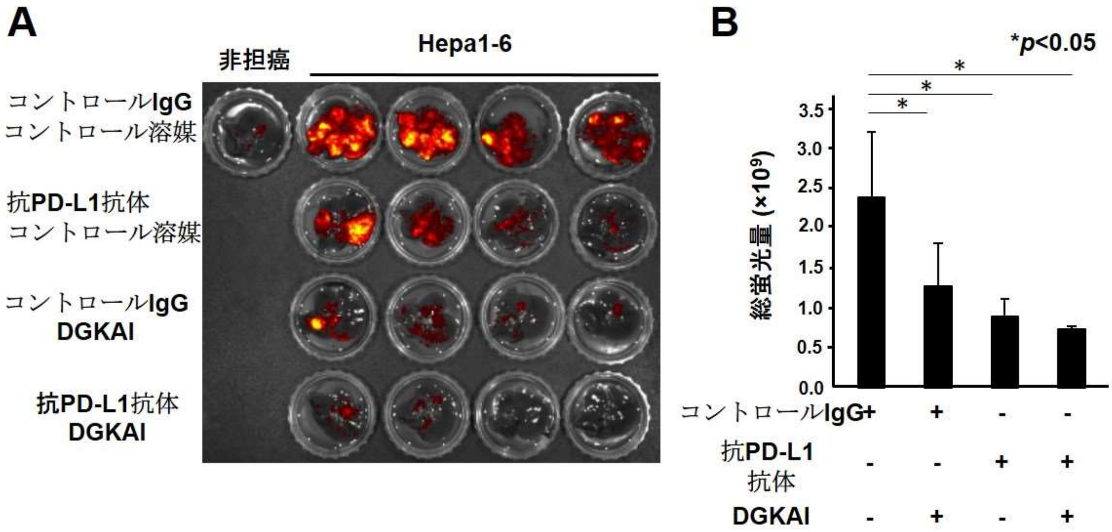

図３２．肝がんマウスモデルにおいてDGKAIと抗PD-LI抗体による併用治療により肝腫瘍量は有意に減少する。

（A, B）肝がんマウスモデルへ抗PD-L1抗体もしくはコントロールIgGを腹腔内へ投与し、それぞれDGKAIもしくはコントロール溶媒を連日経口投与した際の移植後14日目の肝臓を生体イメージングシステムで蛍光量を測定した。平均値と標準偏差を示した（n=4）。*はTurkeyの多重検定による有意差（$p<0.05$）を示す。

これらの結果より、DGKAIと抗PD-L1抗体との併用治療は肝細胞がんに対するより効果的な治療法となる可能性が示唆された。

７．DGKαは肝がん細胞や腫瘍浸潤CD4陽性T細胞および腫瘍浸潤CD8陽性T細胞で高発現である

さらに、HCC切除検体を用いて、がん細胞よび免疫細胞におけるDGKαの発現について、ティッシュマイクロアレイを用いて免疫組織化学染色により検討した。その結果、がん細胞だけではなく腫瘍浸潤CD4陽性T細胞および腫瘍浸潤CD8陽性T細胞においてDGKαは高発現であった（図３３）。

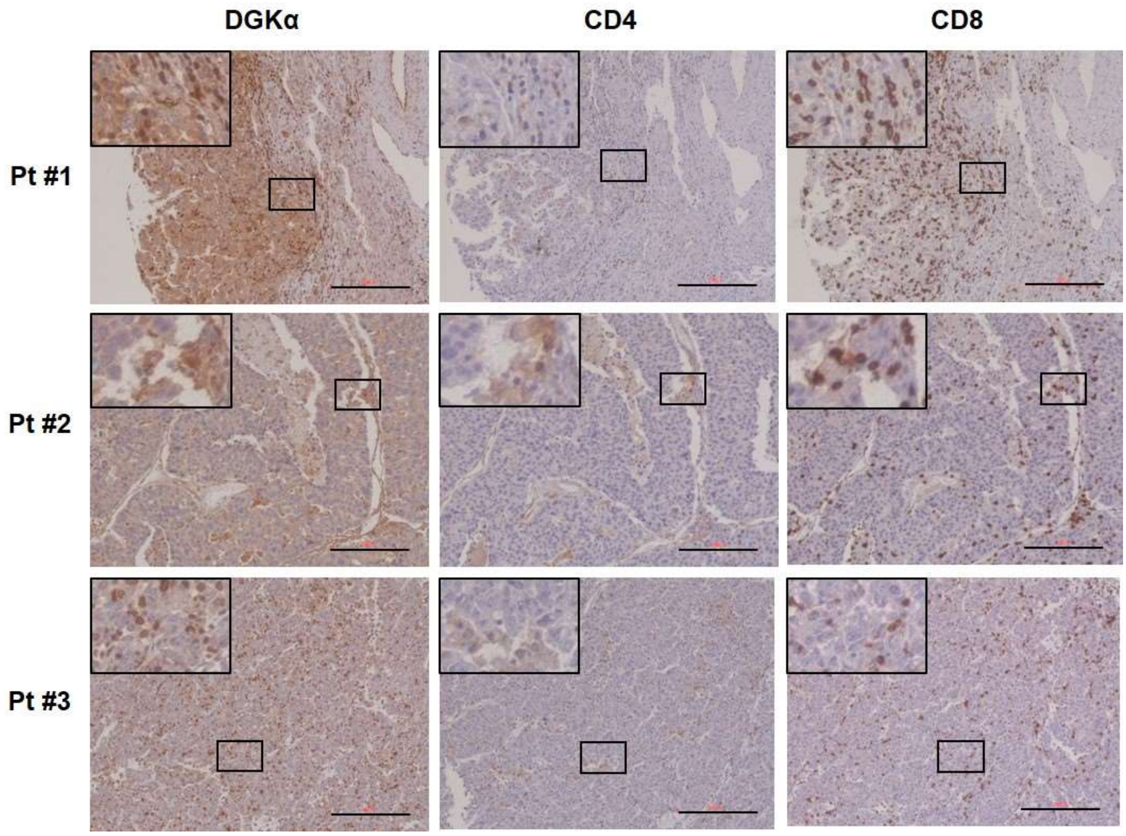

図３３．HCC 切除検体の免疫組織化学染色像。

この結果より、臨床応用の面において、DGKα 阻害は、肝がん細胞への直接的な増殖抑制作用だけではなく、抗腫瘍エフェクターT 細胞への免疫賦活作用も有することが期待された。

考察

本研究では、DGKAI の経口投与は肝腫瘍の増殖を著明に抑制し、担がんマウスの生存率を延長させるとともに、DGKAI と抗 PD-L1 抗体との併用治療は *in vivo* 生体モデルで特に強力な抗腫瘍効果を示した。これまで数多くの臨床試験が HCC 患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の併用療法の有効性を示唆している(Cheng et al., 2019)。最近の第Ⅲ相試験の報告では、切除不能 HCC 患者に対する抗 PD-L1 抗体（atezolizumab）と抗 VEGF 抗体（bevacizumab）の併用療法は、ソラフェニブによる治療と比較し安全かつ有効で、全生存率や無増悪生存率は良好であり(Finn et al., 2020)、すでに本邦でも臨床応用され、治療効果の検討も始まっている(Hatanaka et al., 2022)。そのため、本研究で、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。

最近の報告では、PD-1/PD-L1 経路の阻害は DGKα ノックアウトマウスにおいて、マウス大腸がん細胞の腫瘍増生を著明に抑制した(Arrnz et al., 2021)。また、DGKα 阻害が T リンパ球を再活性化させることにより、AP-1 経路を活性化し T 細胞による抗腫瘍反応を引き起こし、マウス大腸がん MC38 細胞を移植した担がんマウスへの PD-1/PD-L1 相互作用の阻害による治療効果が示されている。本研究では、DGKAI は肝がん細胞の増殖を抑制するだけではなく、刺激時の T 細胞のサイトカイン産生能を増加させることを明らかにした。さらに、DGKAI が T 細胞の IFN-γ 産生を増加させるだけではなく、そのことにより Hepa1-6 細胞の PL-L1 発現が増加することも示した。これらの結果から、DGKα 阻害と抗 PD-L1 抗体による併用治療はより強力な抗腫瘍効果を発揮するものと考えた。

本研究では DGKα 阻害による肝がん細胞への直接的な抗腫瘍効果としてアポトーシスの促進効果をしめすことは出来なかった。メラノーマ細胞での報告では FBS を添加しない培地で培養する方法を行っているものもあること、T 細胞への免疫賦活効果検討においても TCR 刺激を加えない場合には IL-2 産生増加がみられなかったことから、通常の培養条件ではなくがん細胞にも刺激を与えた状態であれば DGKAI によるアポトーシス促進効果がみられた可能性があると考えた。

DGKα は HCC 患者の腫瘍組織に高発現するとともに、肝がんにおける DGKα 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ことが報告されている(Takeishi et al., 2012)。そのため、DGKα

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と考えた。さらに、最近の研究結果から、DGKAI は宿主免疫の賦活化とがん細胞の増殖抑制といった 2 つの経路で腫瘍量を減らすことが期待できると考えられた。

DGKα の活性化は、細胞内の DG 量の減少を引き起こし、腫瘍微小環境において Ras/ERK といった TCR 経路の活性化を阻害し(Noessner, 2017)、CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍免疫を抑制することが報告されている(Prinz et al., 2012)。また、T 細胞において ERK シグナル経路は、パーフォリンやグランザイム B といった溶解性物質の脱顆粒やがん細胞の細胞死に重要であることが示されている(Sun et al., 2018 ; Djeu et al., 2002)。そのため、DGKα 阻害による DG 量の上昇は、腫瘍微小環境においてエフェクターT 細胞の十分な活性化に重要であり、CD8 陽性腫瘍浸潤 T リンパ球の量が多いことは HCC の予後良好因子であると考えられる(Yao et al., 2017)。本研究では、担がんマウスモデルにおいて DGKα 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、CD4 陽性 T 細胞ではなく、CD8 陽性 T 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明らかにした。そして、このモデルでは肝臓において DGKα 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。担がんマウスモデル肝臓におけるフローサイトメトリーでの検討では DGKAI 群の肝臓での CD8 陽性 T 細胞数の増加がみられなかったが、腫瘍のみをホモジナイズし腫瘍中に浸潤した T 細胞のみを検討することが難しく、背景肝に存在する T 細胞も含めての検討となっていることが原因であると考えた。これらのことから、DGKα 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考えられた。

PD-L1 は PD-1 の主要なリガンドであり、腫瘍免疫に重要であり、共刺激分子と相互作用し T 細胞免疫を抑制する。一般に PD-1 と腫瘍の発現する PD-L1 とが結合すると、T 細胞では SHP2 のリン酸化が生じ、TCR 関連シグナルトランスミッターの Lck の脱リン酸化を介して、CD28 関連 Akt シグナルが減弱する。エフェクターT 細胞の誘導は TCR-peptide/MHC recognition と通してのシグナルが減弱することにより阻害されることが報告されている(Liu et al., 2017 ; Hui et al., 2017 ; Yokosuka et al., 2012)。また、抗 PD-L1 抗体による免疫チェックポイント阻害は TCR 関連 Lck を活性化し、Akt のリン酸化を促進する可能性があるが、DGKα の作用により、ERK 関連シグナルが減弱し、プロテインキナーゼ C/NF-kB の活性化が抑制され、

エフェクターT 細胞の誘導が抑えられることが示されている(Noessner, 2017)。従って、免疫チェックポイント阻害剤と DGKAI との併用療法はシグナルカスケードを活性化し、エフェクターT 細胞を誘導する可能性が考えられる(Noessner, 2017 ; Cao et al., 2007)。

IFN-γ による刺激はがん細胞表面の PD-L1 や MHC クラス I の発現を上昇させる(Merida et al., 2017 ; Ohno et al., 2017., Mandi et al., 2016)。本研究では、*in vivo* 生体モデルで 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、*in vitro* で IFN-γ 刺激により肝がん細胞表面での PD-L1 発現が上昇するが、コントロール群と比較し腫瘍増殖は有意に減少することを確認した。これまで、がん患者において CD8 陽性腫瘍浸潤 T 細胞の増加が免疫チェックポイント阻害剤の効果を増強する可能性が考えられている(Tumeh et al., 2014 ; Eroglu et al., 2018 ; Kim et al., 2016)。本研究結果から、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が考えられた。

本研究では、DGKAI 投与マウスにおいて、IFN-γ により PD-L1 発現が上昇することが確認されたことから、DGKAI 投与マウス生体内でも抗腫瘍エフェクター細胞から産生される IFN-γ により、抗 PD-L1 抗体の投与により、肝臓での腫瘍増生をより強力に抑制すると考えた。実際にマウス生体モデルにおいて、DGKAI 治療に抗 PD-L1 抗体治療を加えると腫瘍形成は有意に抑制されたことから、この併用療法は、今後 HCC に対する有力な治療戦略となる可能性が考えられた。

PD-1/PD-L1 経路をターゲットとする免疫チェックポイント阻害剤はがんに対する治療効果が示されており(Abiko et al., 2015 ; Sharma et al., 2015)、PD-1/PD-L1 免疫チェックポイントをターゲットとすることは HCC 治療にも用いられている(Calderaro et al., 2016)。HCC 患者で腫瘍周囲の肝細胞での PD-L1 高発現は再発や転移、腫瘍関連死の有意にリスクとなる(Dai et al., 2017)。HCC 腫瘍微小環境において、PD-L1 は主にクッパー細胞に発現しており、他の抗原提示細胞や腫瘍細胞にも若干発現が認められることが示されている(Zou et al., 2016)。HCC 組織中の CD8 陽性 T 細胞とクッパー細胞は PD-1 と PD-L1 発現が上昇している(Liao et al., 2019)。PD-L1 発現上昇もまた、HCC 患者における予後不良因子である(Liao et al., 2019 ; Wu et al., 2009)。本研究ではまた、腫瘍内に浸潤している CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞に DGKα は HCC 領域に高発現していることを確かめた。従って、DGKα の活性阻害は HCC 患者に対する治療となる可能性が考えられる。

DGKAI を野生型 C57BL/6 に経口投与しても観察中の体重減少や死亡は確認

されなかった。当教室で飼育している DGKα ノックアウトマウスを観察しても野生型マウスと比較し生存などには違いはみられず、死亡しやすいとする報告もみられていない。すなわち、DGKα 阻害剤は治療薬としてその安全性は高いと考える。

DGKα 阻害による抗腫瘍効果は、メラノーマ、膵がん、乳がん、グリオブラストーマおよび大腸がんにおいても報告されており(Yamaki et al., 2019, Arranz et al., 2021 ; Fu et al., 2021, Olmez et al., 2018 ; Dominguez et al., 2013 ; Torres-Ayuso et al., 2014 ; Rainero et al., 2014 ; Kefas et al., 2013)、DGKα 阻害と免疫チェックポイント阻害との併用療法を期待する報告もなされている(Fu et al., 2021 ; Arranz-Nicolás et al., 2021)。HCC だけではなく、これらの腫瘍に対する DGKα 阻害と抗 PD-L1 抗体との併用療法でのさらなる治療効果の可能性が示唆され、適用の拡大も期待される。

結論

①本研究から得られた知見

・DGKα 阻害は、*in vitro* 培養系において、肝がん細胞の増殖を抑制する直接的な抗腫瘍効果と T 細胞の IL-2 産生を増加させる免疫賦活効果を示した。

・肝がんマウスモデルにおいて、DGKα の阻害は肝腫瘍の増殖を抑制し、生存率を延長した。

・肝がんマウスモデルにおいて、DGKα の阻害により、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の IFN-γ 産生が上昇した。

・肝がんマウスモデルにおいて、CD8 除去抗体の投与は DGKα 阻害の抗腫瘍効果を減弱させた。

・*in vitro* 培養系において、IFN-γ 刺激によりマウス肝がん Hepa1-6 細胞の PD-L1 発現が上昇した。

・肝がんマウスモデルにおいて、DGKα 阻害と抗 PD-L1 抗体との併用治療により、抗腫瘍効果が増強した。

②新知見の意義

本研究において、肝がんマウスモデルを使用した検討により、DGKα 阻害が担がん生体内でエフェクターT 細胞の活性化により抗腫瘍効果を発揮するという新しい機序を解明した。肝がん治療と宿主免疫との関係性は明らかとなっていない部分が多く、肝がんに対する新規治療法開発へ寄与することが期待される。

　また、DGKα の阻害は抗 PD-L1 抗体の治療効果を増強する結果が得られたことから、既存の治療法との併用治療による肝がん治療成績の向上の可能性が示され、さらに他がん腫への治療応用へつながる可能性が期待された。

③本研究で得られた新知見に基づいた今後の展開

　本研究により、DGKα 阻害が肝がん治療に対する新規治療法となりうることを確認した。また、抗 PD-L1 抗体との併用治療の可能性も示唆され、肝がん治療の発展が期待される。

　さらに、本研究で得られた研究成果について、将来の臨床応用を目指し、HCC 患者における悪性度および予後との関連性をさらに検討していき

たいと考える。また、抗 PD-L1 抗体によって治療後に切除可能となり手術された症例において、DGKα 発現との関連を検証したいと考えている。

　また、その他の消化器がんにおいても、DGKα 阻害と抗 PD-L1 抗体との併用療法の可能性に関して検証したいと考える。

④今後の課題

　NK 細胞や NKT 細胞など､肝臓に存在する T 細胞以外の免疫細胞への DGKα 阻害による効果を検証する必要があると考える。また､近年他の DGK ファミリー分子の腫瘍免疫を含めた担がん環境下への影響が報告されていることから(Takao et al., 2021 ; Abdel-Magid et al, 2020 ; Sakane et al., 2021 : Gu et al., 2021 ; Liu et al., 2021 ; Zhao et al., 2022 ; Arranz-Nicolás et al., 2020 ; Kai et al., 2017 ; Guo et al., 2018 ; Nakano et al., 2014 ; Cai et al., 2014)、各種抗腫瘍エフェクター細胞について､アイソタイプ特異的な DGK の阻害による抗腫瘍効果の検討､複数の DGK ファミリータンパクを阻害することによる抗腫瘍効果の検討や、さらに､DGK アイソタイプ特異的な阻害と抗 PD-L1 抗体との併用療法の可能性に関しても検討が必要であると考える。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費基盤研究 B（19H03724）および挑戦的研究萌芽(18K1957)、小野薬品工業、秋山記念生命科学振興財団、遺伝子病制御研究所共同研究プログラムの助成を受けたものである。

当教室で研究をする機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I の武冨紹信教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、ご指導とご鞭撻をいただきました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の北村秀光准教授に深謝いたします。

本研究を実施するにあたり、数多くのご協力をいただきました千葉大学理学部の坂根郁夫教授、山形大学医学部の後藤馨教授、神戸大学農学部の白井康仁教授、北海道大学病院病理部の畑中豊先生、北海道大学病院医療・ヘルスサイエンス研究開発機構の畑中佳奈子先生、北海道大学遺伝子病制御研究所免疫機能学分野の項慧慧さんに心より感謝いたします。

ヒト臨床検体を使用した検証、さらに技術的なご指導をいただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I の深井原先生、木井修平先生、杉山昂先生、志智俊介先生、小林希さんに心より感謝いたします。

DGKα 阻害剤を供与頂きました小野薬品工業様に深謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abdel-Magid, A.F. (2021). Cancer Immunotherapy through the Inhibition of Diacylglycerol Kinase Alpha and Zeta. ACS Med. Chem. Lett. *11*, 1083-1085.

Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I., Mandai, M. (2015). IFN-γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. British journal of cancer *112*, 1501-1509.

Arranz-Nicolás, J., Ogando, J., Soutar, D., Arcos-Pérez, R., Meraviglia-Crivelli, D., Mañes, S., Mérida, I., Ávila-Flores, A. (2018). Diacylglycerol kinase α inactivation is an integral component of the costimulatory pathway that amplifies TCR signals. Cancer Immunol. Immunother. *67*, 965-980.

Arranz-Nicolás, J., Martin-Salgado, M., Adán-Barrientos, I., Liébana, R., Del., Carmen, Moreno-Ortíz, M., Leitner, J., Steinberger, P., Ávila-Flores, A., Merida, I. (2021). Diacylglycerol kinase α inhibition cooperates with PD-1-targeted therapies to restore the T cell activation program. Cancer. Immunol. Immunother. *70,* 3277-3289.

Arranz-Nicolás, J., Martin-Salgado, M., Rodriguez-Rodriguez, C., Liébana, R., Moreno-Ortíz, M.C., Leitner, J., Steinberger, P., Ávila-Flores, A., Merida, I. (2021). Diacylglycerol kinase zeta limits IL-2-dependent control of PD-1 expression in tumor-infiltrating T lymphocytes. J. Immunother. Cancer *8*, e001521.

Binnewies, M., Roberts, EW., Kersten, K., Chan, V., Fearon, DF., Merad, M., Coussens, LM., Gabrilovich, DI., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, CC., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nat. Med. *24*, 541-550.

Cai, K., Mulatz, K., Ard, R., Nguyen, T., Gee, SH. (2014). Increased diacylglycerol kinase zeta expression in human metastatic colon cancer cells augments Rho GTPase activity and contributes to enhanced invasion. BMC Cancer *14*, 208.

Calderaro, J., Rousseau, B., Amaddeo, G., Mercey, M., Charpy, C., Costentin, C., Luciani, A., Zafrani, ES., Laurent, A., Azoulay, D., Lafdil, F., Pawlotsky, JM. (2016). Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: Relationship With clinical and pathological features. Hepatology (Baltimore, Md) *64*, 2038-2046.

Cao, X., Cai, SF., Fehniger, TA., Song, J., Collins, LI., Piwnica-Worms, DR., Ley, TJ. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. Immunity *27*, 635-646.

Cheng, AL., Hsu, C., Chan, SL., Choo, SP., Kudo, M. (2020). Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma. J. Hepatol. *72*, 307-319.

Dai, X., Xue, J., Hu, J., Yang, SL., Chen, GG., Lai, PBS., Yu, C., Zeng, C., Fang, X., Pan, X., et al. (2017). Positive Expression of Programmed Death Ligand 1 in Peritumoral Liver Tissue is Associated with Poor Survival after Curative Resection of Hepatocellular Carcinoma. Translational oncology *10*, 511-517.

Dojeu, JY., Jiang, K., Wei, S. (2002). A view of a kill: signals triggering cytoxicity. Clin. Cancer Res. *8*, 636-640.

Dominguez, CL., Floyd, D.H., Xiao, A., Mullins, G.R., Kefas, B.A., Xin, W., Yacur, M.N., Abounader, R., Lee, J.K., Wilson, G.M., et al. (2013). Diacylglycerol kinase α is a critical signaling node and novel therapeutic target in glioblastoma and other cancers. Cancer Discov. *3*, 782-797.

Eroglu, Z., Zaretsky, JM., Hu-Lieskovan, S., Kim, DW., Algazi, A., Johnson, DB., Liniker, E., Ben, K., Munhoz, R., Rapisuwon, S., et al. (2018). High response rate to PD-1 blockade in desmoplastic melanomas. Nature *553*, 347-350.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int. J. Cancer *136*, E359-386.

Finn, RS., Qin, S., Ikeda, M., Galle, PR., Ducreux, M., Kim, TY., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, AO., et al. (2020). Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. N. Engl. J. Med. *382*, 1894-1905.

Fu, L., Li, S., Xiao, W., Yu, K., Li, S., Yuan, S., Shen, J., Dong, X., Fang, Z., Zhang, J., et al. (2021). DGKA Mediates Resistance to PD-1 Blockade. Cancer Immunol. Res. *9*, 371-385.

Goto, K., Hozumi, Y., Kondo, H. (2006). Diacylglycerol, phosphatidic acid, and the converting enzyme, diacylglycerol kinase, in the nucleus. Biochim. Biophys. Acta. *1761*, 535-541.

Gu, J., Wang, C., Cao, C., Huang, J., Holizhauer, S., Desilva, H., Wesley, EM., Evans, D.B., Benci, J., Wichroski, M., et al (2021). Dgkζ ecerts greater control than DGKα over CD8+ T cell activity and tumor inhibition. Oncoimmunology, eCollection 2021.

Guo, R., Wan, CK., Carpenter, JH., Mousallem, T., Boustany, RM., Kuan, CT., Burks, AW., Zhong, XP. (2008). Synergistic control of T cell development and tumor suppression by diacylglycerol kinase alpha and zeta. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *105*, 11909-11914.

Guo, Z., Jai, J., Yao, M., Kang, J., Wang, Y., Yan, X., Zhang, L., Lv, Q., Chen, X., Lu, F. (2018). Diacylglycerol kinase gamma predicts prognosis and functions as a tumor suppressor by negatively regulating glucose transporter 1 in hepatocellular carcinoma. Exp. Cell Res. *373*, 211-220.

Hatanaka, T., Hiraoka, A., Tada, T., Hirooka, M., Kariyama, K., Tani, J., Atsukawa, M., Takaguchi, K., Itobayashi, E., fukunishi, S., et al. (2022). Association of early bevacizumab interruption with efficacy of atezolizumab plus bevacizumab for advanced hepatocellular carcinoma: A landmark analysis. Hepatol. Res. Online ahead of print.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, MJ., Wallweber, HA., Sasmal, DK., Huang, J., Kim, JM., Mellman, I., Vale, RD. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science (New York, NY) *355*, 1428-1433.

Jiang, W., Lu, Z., He, Y., Diasio, RB. (1997). Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil-based chemotherapy. Clin. Cancer Res. *3*, 395-399.

Jung, IY., Kim, YY., Yu, HS., Lee, M., Kim, S., Lee, J. (2018). CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of DGK Improves Antitumor Activities of Human T Cells. Cancer Res. *78*, 4692-4703.

Kai, M., Yamamoto, E., Sato, A., Yamano, HO., Kitajima, H., Harada, T., Aoki, H., Maruyama, R., Yoyota, M., Hatahira, T., et al. (2017). Epigenetic silencing of diacylglycerol kinase gamma in colorectal cancer. Mol. Carcinog. *56*, 1743-1752.

Kanada, Y. (2013). Investigasion of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statictics. Bone Marrow Transplantat. *48*, 452-458.

Kato, A., Miyazaki, M., Ambiru, S., Yoshitomi, H., Ito, H., Nakagawa, K., Shimizu, H., Yokosuka, O., Nakajima, N. (2001). Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection. J. Surg. Oncol. *78*, 110-115.

Kefas, B., Floyd, D.H., Comeau L., Frisbee, A., Dominguez, C., Dipierro, C.G., Guessous, F., Abounader, R., Purow, B. (2013). A miR-297/hypoxia/DGK-alpha axis regulating glioblastoma survival. Neuro. Oncol. *15*, 1652-1663.

Kim, JM., Chen, DS. (2016). Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology *27*, 1492-1504.

Kruger, S., Ilmer, M., Kobold, S., Cadilha, B., Endres, S., Ormanns, S., Schuebbe, G., Renz, B.W., D'Haese, J.G., Schloesser, H., et al. (2019). Advances in cancer immunotherapy 2019-Latest trends. J. Exp. Clin. Cancer Res. *38*, 268.

Kudo, M., Izumi, N., Kubo, S., Kokudo, N., Sakamoto, M., Shiina, S., Tateishi, R., Nakashima, O., Murakami, T., Matsuyama, Y., et al. (2020). Report of the 20th Nationwide follow-up survey of primary liver cancer in Japan. Hepatol. Res. *50*, 15-46.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, JJ., Cowey, CL., Lao, CD., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., et al. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N. Engl. J. Med. *373*, 23-34.

Liao, H., Chen, W., Dai, Y., Richardson, JJ., Guo, J., Yuan, K., Zeng, Y., Xie, K. (2019). Expression of Programmed Cell Death-Ligands in Hepatocellular Carcinoma: Correlation With Immune Microenvironment and Survival Outcomes. Frontiers in oncology *9*, 883.

Liu, K., Kunii, N., Sakuma, M., Yamaki, A., Mizuno, S., Sato, M., Sakai, H., Kado, S., Kumagai, K., Kojima, H., et al. (2016). A novel diacylglycerol kinase α-selective inhibitor, CU-3, induces cancer cell apoptosis and enhances immune response. J. Lipid. Res. *57*, 368-379.

Liu, K., Xue, B., Bai, Z., Zhang, W. (2021). Downregulation of Diacylglycerol kinase zeta (DGKZ) surpresses tumorigenesis and progression of cervical cancer by facilitating cell apoptosis and cell cycle arrest. Bioengineered *1*, 1517-1529.

Liu, Z., Zhao, Y., Fang, J., Cui, R., Xiao, Y., Xu, Q. (2017). SHP2 negatively regulates HLA-ABC and PD-L1 expression via STAT1 phosphorylation in prostate cancer cells. Oncotarget *8*, 53518-53530.

Mandai, M., Hamanishi, J., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T., Konishi, I. (2016). Dual Faces of IFNγ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. Clin. Cancer Res. *22*, 2329-2334.

Merida, I., Avila-Flores, A., Merino, E. (2008). Diacylglycerol kinase: At the hub of cell signaling. Biochem. J. *409*, 1-18.

Merida, I., Andrada, E., Gharbi, S., Avila-Flores, A. (2015). Redundant and specialized roles for diacylglycerol kinase alpha and zeta in the control of T cell functions. Sci. Signal. *8*, re6.

Mérida, I., Torres-Ayuso, P., Ávila-Flores, A., Arranz-Nicolás, J., Andrada, E., Tello-Lafoz, M., Liébana, R., Arcos, R. (2017). Diacylglycerol kinases in cancer. Adv. Biol. Regul. *63*, 22-31.

Merida, I., Graziani, A., Sakane, F. (2017). Editorial: Diacylglycerol Kinase Signalling. Front. Cell Dev. Biol. *5*, 84.

Nakano, T., Iravani, A., kim, M., Hozumi, Y., Lohse, M., Reichert, E., Crotty, TM., Stafforini, DM., Topham, MK. (2014). Diacylglycerol kinase eta modulates oncogenic properties of lung cancer cells. Clin. Trnsl. Oncol. *16*, 26-35.

Noessner, E. (2017). DGK-α：A Checkpoint in Cancer-Mediated Immuno-Inhibition and Target for Immunotherapy. Front. Cell. Dev. Biol. *5*, 16.

Ohno, Y., Toyoshima, Y., Yurino, H., Monma, N., Xiang, H., Sumida, K., Kaneumi, S., Terada, S., Hashimoto, S., Ikeo, K., et al. (2017). Lack of interleukin-6 in the tumor microenvironment augments type-1 immunity and increases the efficacy of cancer immunotherapy. Cancer science *108*, 1959-1966.

Olenchock, BA., Guo, R., Carpenter, JH., Jordan, M., Topham, MK., Koretzky, GA., Zhong, XP. (2006). Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy. Nat. Immunol. *7*, 1174-1181.

Olmez, I., Love, S., Xiao, A., Manigat, L., Randolph, P., McKenna, BD., Neal, BP., Boroda, S., Li, M., Brenneman, B., et al. (2018). Targeting the mesenchymal subtype in glioblastoma and other cancers via inhibition of diacylglycerol kinase alpha. Neuro. Oncol. *20*, 192-202.

Printz, P.U., Mendler, A.N., Masouris, I., Durret, L., Oberneder, R., Noessner, E. (2012). High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+ T cells that is reversible by pharmacologic intervention. J. Immunol. *188*, 5990-6000.

Quail, DF., Joyce, JA. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat. Med. *19,* 1423-1437.

Rainero, E., Cianflone, C., Proporato, P.E., Chianale, F., Malacarne, V., Bettio, V., Ruffo, E., Ferrara, M., Benecchia, F., Capello, D., et al. (2014). The diacylglycerol kinase aipha/atypical PKC/beta1 integrin pathway in SDF-1 alpha mammary carcinoma invasiveness. Plos ONE *9*, e97144.

Riese, MJ., Wang, LC., Moon, EK., Joshi, RP., Ranganathan, A., June, CH., Koretzky, GA., Albelda, SM. (2013). Enhanced effector responses in activated CD8+ T cells deficient in diacylglycerol kinases. Cancer Res. *73*, 3566-3577.

Riese, MJ., Moon, EK., Johnson, BD., Albelda, SM. (2016). Diacylglycerol Kinases (DGKs): Novel Targets for Improving T Cell Activity in Cancer. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 108.

Sakane, F., Yamada, K., Kanoh, H., Yokoyama, C., Tanabe, T. (1990). Porcine diacylglycerol kinase sequence has zinc finger and E-F hand motifs. Nature *344*, 345-348.

Sakane, F., Mizuno, S., Komenoi, S. (2016). Diacylglycerol Kinases as Emerging Potential Drug Targets for a Variety of Diseases: An Update. Front. Cell Dev. Biol. *4*, 82.

Sakane, F., Hoshino, F., Ebina, M., Sakai, H., Takahashi, D. (2021). The Roles of Diacylglycerol Kinase α in Cancer Cell Proliferation and Apoptosis.

Sharma, P., Allison, JP. (2015). The future of immune checkpoint therapy. Science (New York, NY) *348*, 56-61.

Shulga, YV., Topham, MK., Epand, RM. (2011). Regulation and functions of diacylglycerol kinases. Chemical reviews *111*, 6186-6208.

Sun, C., Mezzadra, R., Schumacher, TN. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. Immunity *48*, 434-452.

Takao, S., Akiyama, R., Sakane, F. (2020). Combined inhibition/silencing of diacylglycerol kinase alpha and zeta simultaneously and synergistically enhances interleukin-2 production in T cells and induces cell death of melanoma cells. J. Cell Biochem. *122*, 494-506.

Takeishi, K., Taketomi, A., Shirabe, K., Toshima, T., Motomura, T., Ikegami, T., Yoshizumi, T., Sakane, F., Maehara, Y. (2012). Diacylglycerol kinase alpha enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of Ras-Raf-MEK-ERK pathway. J. Hepatol. *57*, 77-83.

Topalian, SL., Drake, CG., Pardoll, DM. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. Cancer Cell *27*, 450-461.

Topham, M.K., Epand, R.M., (2009). Mammalian diacylglycerol kinase: Molecular interactions and biological functions of selected isoforms. Biochim. Biophys. Acta. *1790*, 416-424.

Torres-Ayuso, P., Daza-Martin, M., Martin-Perez, J. Avila-Flores, A., Merida, I. (2014). Diacylglycerol kinase α promotes 3D cancer cell growth and limits drug sensitivity through functional interaction with Src. Oncotarget *5*, 9710-9726.

Tumeh, PC., Harview, CL., Yearley, JH., Shintaku, IP., Taylor, EJ., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, AN., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature *515*, 568-571.

Wu, K., Kryczek, I., Chen, L., Zou, W., Welling, TH. (2009). Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. Cancer. Res. *69*, 8067-8075.

Yamada, K., Sakane, F., Kanoh, H. (1989). Immunoquantitation of 80kDa diacylglycerol kinase in pig and human lymphocytes and several other cells. FEBS Lett. *244*, 402-406.

Yamaki, A., Akiyama, R., Murakami, C., Takao, S., Murakami, Y., Mizuno, S., Takahashi, D., Kado, S., Taketomi, A., Shirai, Y., et al. (2019). Diacylglycerol kinase α-selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines. J. Cell Biochem. *120*, 10043-10056.

Yanagisawa, K., Yasuda, S., Kai, M., Imai, S., Yamada, K., Yamashita, T., Jimbow, K., Kanoh, H., Sakane, F. (2007). Diacylglycerol kinase alpha suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of human melanoma cells through NF-kappaB activation. Biochim. Biophys. Acta. *1771*, 462-474.

Yao, W., He, JC., Yang, Y., Wang, JM., Qian, YW., Yang, T., Ji, L. (2017). The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis. Scientific reports *7*, 7525.

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. The Journal of experimental medicine *209*, 1201-1217.

Zha, Y., Marks, R., Ho, A.W., Peterson, A.C., Janardhan, S., Brown, I., Praveen, K., Stang, S., Stone, J.C., Gajewski, T.F. (2006). T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-α. Nat. Immunol. *7*, 1166-1173.

Zhao, Y., Sun H., Li, X., Liu, Y., Jin, W. (2022). DGKZ promotes TGFβ signaling pathway and metastasis in triple-negative breast cancer by suppressing lipid raft-dependent endocytosis of TGFβR2. Cell Death Dis. *13*, 105.

Zhou, P., Shaffer, D.R., Alvarez Arias, D.A., Nakazaki, Y., Pos, W., Torres, A.J., Cremasco, V., Dougan, S., Cowley, G.S., Elpek, K., et al. (2014). In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumor microenvironment. Nature 506, 52-57.

Zou, W., Wolchok, JD., Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. Science translational medicine *8*, 328rv324.