



Title	肝がんにおけるNK細胞の抗腫瘍免疫を負に制御する因子の同定と新規治療標的の探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	阪田, 敏聖
Description	配架番号 : 2898
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16406号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95398
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAKATA_Toshihiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 阪田 敏聖

学 位 論 文 題 名

肝がんにおける NK 細胞の抗腫瘍免疫を負に制御する因子の同定と新規治療標的の探索

(Study on potential targets for immune intervention by revealing NK cell function-related phenotypes in HCC patients)

【背景と目的】

肝細胞癌(HCC)は原発性肝癌の大多数を占め、2020 年では癌による死亡原因の第 3 位である。HCC に対する治療は、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 併用療法が登場したことで治療成績が改善され、ICI 併用療法が切除不能 HCC 患者の標準治療となっている。しかしながら、全身療法による奏効率は依然として満足できるものではない。従って、進行 HCC 患者の予後を改善するためには、免疫学的介入による新たな治療標的の同定が必要である。

ナチュラルキラー (NK) 細胞は肝臓の免疫応答において極めて重要な役割を果たしている。ヒト NK 細胞は CD56 と CD16 の発現によって 2 つのサブセットに分類される。CD56^{dim}CD16⁺NK 細胞は高い細胞傷害活性を示すが、CD56^{bright}CD16⁻NK 細胞は強力なサイトカイン産生能を有する。NK 細胞とそのサブセットの比率は、末梢血単核球 (PBMC) では約 10%、肝内リンパ球 (IHL) では 30%~50%であり、健常人では、CD56^{dim}CD16⁺ NK 細胞が末梢 NK 細胞集団の 90%を占める。NK 細胞の機能は、腫瘍微小環境 (TME) における活性型受容体と抑制型受容体のバランスによって調節されている。本研究では、HCC 患者における NK 細胞の機能分子を明らかにすることにより、NK 細胞を介した免疫療法の新規治療標的を同定することを目的とした。

【対象と方法】

まず、42 人の健常人(HV)の末梢血 NK 細胞における表面受容体の頻度と発現レベルをマスサイトメトリーを用いて評価した。続いて、HCC 患者 17 名と健常人の末梢血 NK 細胞を比較するために、年齢と性別をマッチさせ末梢血 NK 細胞の頻度と表面受容体の発現レベルを調べた。次に、HCC 患者の肝内 NK 細胞の頻度と表面受容体を、癌組織 (Ca) と非癌組織 (Nca) で比較した。HCC 患者における CD56^{dim} NK 細胞上に誘導される機能低下寄与分子の誘導メカニズムを調べるため、HV から回収した末梢血 NK 細胞と HCC 細胞株の in vitro 共培養を行い、細胞培養上清中の 40 種類のケモカインとサイトカインを調べた。共培養実験により同定した機能低下寄与分子とそのブロック抗体による誘導抑制についても検討した。HCC 患者と HV から回収した末梢血 NK 細胞の細胞傷害活性と ADCC 活性を比較検討し、さらに機能低下分子の発現有無で NK 細胞をそれぞれ単離して細胞傷害活性と ADCC 活性を比較し、機能低下分子に対する中和抗体を用いて細胞傷害活性と ADCC 活性の機能回復について検討した。

【結果】

HV の末梢血 NK 細胞における表面受容体の検討では、成熟化マーカーである CD57 と抑制型受容体 (ILT2、Siglec-9、Siglec-10、CD200R) の発現レベルは年齢と正の相関があった。対照的に、活性型受容体 (Siglec-7、CD160、NKp46、NKG2D、CXCR1) は年齢と負の相関があった。高齢者では CD57^{high}Siglec-7^{low}CD160^{low}NKp46^{low}CD56^{dim} NK 細胞が増加し、同じ細胞集団が PD-1、LAG-3、TIGIT などの免疫チェックポイント分子を発現していることが明らかになった。

年齢をマッチさせた HCC 患者と HV の末梢血 NK 細胞における表面受容体の比較において、HCC 患者では CD56^{dim} NK 細胞の頻度が HV に比べて減少していた。CD56^{dim} NK 細胞上の抑制型受容体 ILT2、NKG2A、CD47

の発現レベルは、HV よりも HCC 患者で有意に高く、活性型受容体 Siglec-7、DNAM-1 (CD226)、2B4 (CD244) の発現レベルは有意に低かった。

HCC 患者の末梢血 NK 細胞および癌組織と非癌組織の肝内 NK 細胞における検討では、Ca-CD56^{dim} の NK 細胞の頻度は NCa-CD56^{dim} の NK 細胞の頻度より低かった。癌組織で CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現と頻度は非癌組織と比較して有意に高く、2B4 の発現と頻度は低かった。肝内 NK 細胞は末梢血 NK 細胞よりも ILT2 を高発現しており、非癌組織よりも癌組織で高発現であった。

CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現は、肝細胞癌株との共培養で増加し、非接触型共培養でも発現上昇した。また、肝細胞癌株の培養上清単独でも CD56^{dim} NK 細胞上に ILT2 が発現上昇した。肝細胞癌株の培養上清では、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の濃度が高いことを明らかにした。リコンビナント MIF は用量依存的に CD56^{dim} NK 細胞に ILT2 の発現を誘導した。リコンビナント MIF 存在下での CD56^{dim} NK 細胞上への ILT2 誘導は、MIF の受容体である CXCR4 に対する抗 CXCR4 抗体処理後に減少した。

NK 細胞の細胞傷害活性と ADCC 活性は、HCC 患者では HV と比較して低下していた。ILT2 陽性 CD56^{dim} NK 細胞は、ILT2 陰性細胞よりも低い細胞傷害活性と ADCC 活性を示したが、抗 ILT2 抗体によって部分的に回復した。

【考察】

加齢は免疫細胞の頻度や機能に影響を与える重要な因子の一つであるが、健常人の NK 細胞は加齢に伴い抑制型受容体が発現亢進し、活性型受容体が発現低下傾向があることを明らかにした。これらの表現型の変化は、高齢者における潜在的な NK 細胞の機能低下に関与している可能性がある。したがって、HCC 患者と HV の NK 細胞比較解析を行う際には、NK 細胞に対する加齢の影響を考慮する必要がある。

年齢をマッチさせた HCC 患者と HV の末梢血 NK 細胞における表面受容体の比較において、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現頻度は HV と比較して HCC 患者で上昇し、DNAM-1 と 2B4 の発現頻度は低下しており、これらの結果から、CD56^{dim} NK 細胞は抑制型受容体の発現が亢進し、活性型受容体の発現が低下していることが示唆された。

肝内 NK 細胞は末梢 NK 細胞よりも ILT2 を高発現しており、非癌組織よりも癌組織で高発現を示した。CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 は加齢により発現上昇するが、HCC 患者において末梢血よりも肝内組織、特に肝細胞癌組織で高発現しており、肝細胞癌組織での NK 細胞機能低下に関与している可能性が示唆された。

CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 は、HCC 由来の MIF 存在下で CXCR4-MIF 経路により発現誘導されている可能性がある。肝細胞癌組織で発現亢進している ILT2 陽性 NK 細胞の細胞傷害活性と ADCC 活性は低下していたが、抗 ILT2 抗体処理後 NK 細胞の機能回復したことから ILT2 が CD56^{dim} NK 細胞の機能低下寄与分子であり、HCC 患者における機能低下した CD56^{dim} NK 細胞の再活性化の標的として可能性があることを示している。

【結論】

HCC 患者において、ILT2 は CD56^{dim} NK 細胞の機能低下寄与分子である。MIF-CXCR4 相互作用は CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 誘導と関連しており、ILT2 は NK 細胞の機能回復の標的として機能する。これらの発見は、ILT2 が新しい治療標的である可能性を示唆している。