



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16406
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95937
Type	doctoral thesis
File Information	SAKATA_Toshihiro.pdf



学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

阪田 敏聖

学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

阪田 敏聖

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	7 頁
方法	10 頁
結果	20 頁
考察	46 頁
結論	49 頁
謝辞	50 頁
利益相反	51 頁
引用文献	52 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. Toshihiro Sakata, Sachiyo Yoshio, Taiji Yamazoe, Taizo Mori, Eiji Kakazu, Yoshihiko Aoki, Nobuyoshi Aoyanagi, Toru Okamoto, Takanori Ito, Hidenori Toyoda, Takumi Kawaguchi, Yoshihiro Ono, Yu Takahashi, Akinobu Taketomi and Tatsuya Kanto.

Immunoglobulin-like transcript 2 as an impaired anti-tumor cytotoxicity marker of natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma.

Front. Immunol. 15:1389411. doi: 10.3389/fimmu.2024.1389411

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Toshihiro Sakata, Sachiyo Yoshio, Masaaki Mino, Shiori Yoshikawa, Taiji Yamazoe, Taizo Mori, Eiji Kakazu, Taketomi Akinobu, Tatsuya Kanto.

ILT2 as a biomarker of impaired natural killer cells expressing excess lipid peroxidation in patients with hepatocellular carcinoma.

EASL CONGRESS 2023, 2023.6.21-24, Vienna, Austria

2. 阪田敏聖、由雄祥代、美野正彰、山添太士、松田道隆、森泰三、嘉数英二、青木孝彦、武富紹信、考藤達哉

肝がん患者における NK 細胞機能抑制分子 ILT2 の同定

JDDW 2023, 2023. 11. 2-5, 神戸

3. 阪田敏聖、由雄祥代、考藤達哉

肝がん患者における NK 細胞機能性分子 ILT2 の同定ーマスサイトメトリーと機能解析の統合

第 59 回 日本肝臓学会総会, 2023. 6.15-16, 奈良

要旨

【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キング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とした。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。

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

ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity;
Ca, cancer;
CCL, C-C motif chemokine ligand;
CD, cluster differentiation;
CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester;
CyTOF, cytometry by time-of-flight;
CXCL, C-X-C motif chemokine ligand;
CXCR, C-X-C motif chemokine receptor;
CX3CL1, C-X3-C motif chemokine ligand 1;
CX3CR1, C-X3-C motif chemokine receptor 1;
DC, dendritic cell;
DNAM-1, DNAX accessory molecule-1;
FBS, fetal bovine serum;
FCS, fetal calf serum;
F stage, fibrosis stage;
FcγRIIIa, Fc-gamma receptor IIIa;
GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor;
HLA, human leukocyte antigen;
HV, healthy volunteer;
ICI, immune-checkpoint inhibitor;
IFN-γ, interferon-gamma;
IHL, intrahepatic lymphocyte;
ILT2, immunoglobulin-like transcript 2;
LAG-3, lymphocyte-activation gene 3;
MIF, macrophage migration inhibitory factor;
MSI, mean signal intensity;
NCa, non-cancer; NK, natural killer;
NKG2A, natural killer group 2 member A;
NKG2D, natural killer group 2 member D;
NKp30, natural killer cell p30;
NKp44, natural killer cell p44;

NKp46, natural killer cell p46;
PBMC, peripheral blood mononuclear cell;
PD-1, programmed cell death-1;
PD-L1, programmed cell death-ligand 1;
pNK, peripheral NK;
RFS, recurrence-free survival;
Siglec, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin;
TIGIT, T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains;
Tim-3, T-cell immunoglobulin and mucin domain 3;
TME, tumor microenvironment;
viSNE, visual stochastic network embedding.

緒言

肝細胞癌(HCC)は原発性肝癌の90%を占める最も一般的な肝癌であり(Llovet et al., 2021)、2020年の全世界における部位別癌罹患率第6位であり、癌による死亡原因の第3位であった(Sung et al., 2021)。進行HCCに対する治療は外科的切除が基本であるが、5年以内の再発率は60-70%と高いことが課題であり(Chew et al., 2012)、肝切除後のソラフェニブによる術後補助化学療法ではRecurrence-free survival (RFS)を改善することが出来なかった(Bruix et al., 2015)。切除不能HCCに対しては全身化学療法が適応となり、ソラフェニブなどのマルチキナーゼ阻害薬である分子標的治療薬が標準治療とされてきたが、近年免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の登場により免疫チェックポイント阻害薬(ICI)を含む併用療法は、治療成績が向上し、アテゾリズマブとベバシズマブ併用療法は標準治療となっている。また、術後補助化学療法についてもアテゾリズマブとベバシズマブ併用療法を用いたIMbrave050が報告され、17.4ヶ月の中央観察期間においてRFSの延長が確認された(Qin et al., 2023)。しかしながら、切除不能HCCに対するアテゾリズマブとベバシズマブ併用療法は約20%において治療無効例も存在している(Finn et al., 2020)。また、アテゾリズマブとベバシズマブ併用療法を用いた術後補助化学療法についても長期予後が課題となっている(Qin et al., 2023)。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)細胞は悪性腫瘍に対する免疫応答の制御に重要な役割を果たしており(Sakamoto et al., 2021)(Yoshida et al., 2021)(Yu, 2023)(図1)、ICI療法に対する患者の反応性に関与している(Hazeldine and Lord, 2013)。

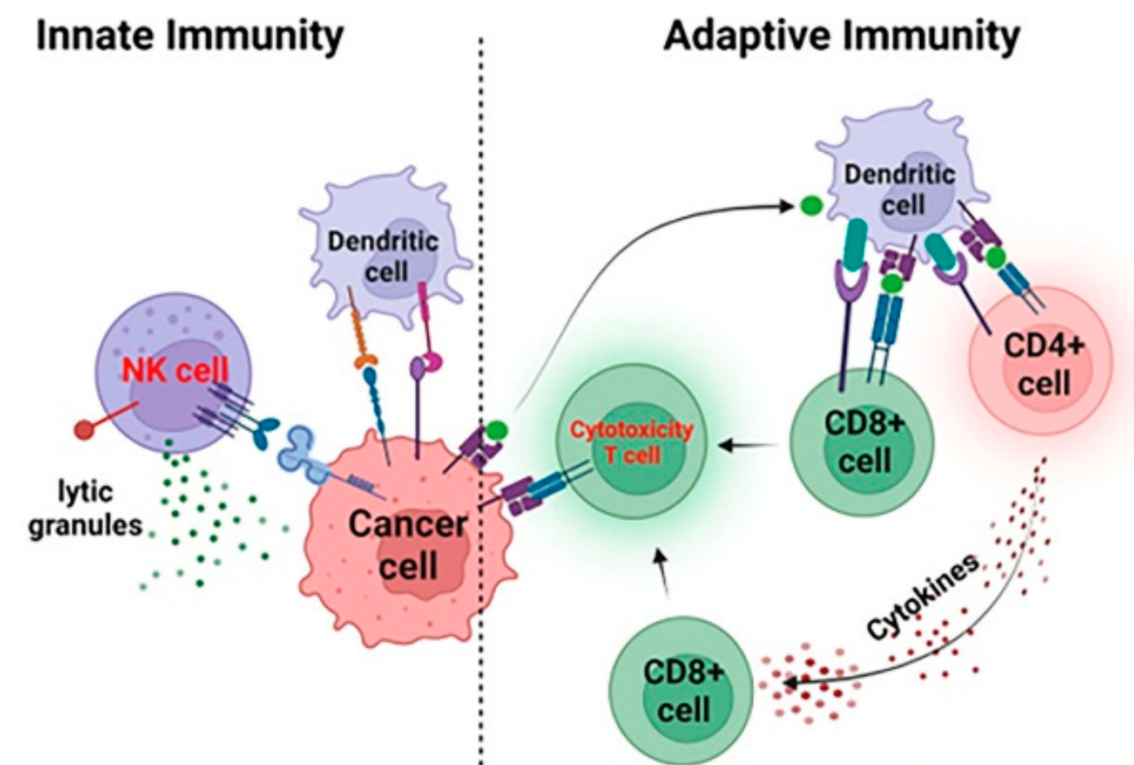


図 1 悪性腫瘍に対する免疫応答

(Yu Yanlin. 2023 より引用)

また、腫瘍内 CD56⁺ NK 細胞の減少は HCC 患者の予後不良と相関する (Chew et al., 2012)。したがって、HCC 患者における NK 細胞の表現型と機能を詳細に解析することは、抗腫瘍免疫において有用な知見を与える可能性がある。

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、肝臓内の免疫に NK 細胞が重要役割を担っていることがわかる (Sakamoto et al., 2021) (Yoshida et al., 2021)。健常人では、CD56^{dim}CD16⁺ NK 細胞が末梢 NK 細胞集団の 90% 以上を占める。HCC 患者において CD56^{dim} NK 細胞は肝内 NK 細胞の半数以上を占めており、癌部 CD56^{dim} NK 細胞の頻度は非癌部 CD56^{dim} NK 細胞に比べて減少していた (Yoshida et al., 2021)。したがって、HCC 患者における肝内 (癌部・非癌部) NK 細胞の解析は HCC における腫瘍免疫の解析において重要である。

NK 細胞の機能は、活性型受容体や抑制型受容体などの発現状態によって調節されているが (Rosen and Golden-Mason, 2020) (図 2)、その発現状態は腫

瘍微小環境（TME）による影響を受ける。

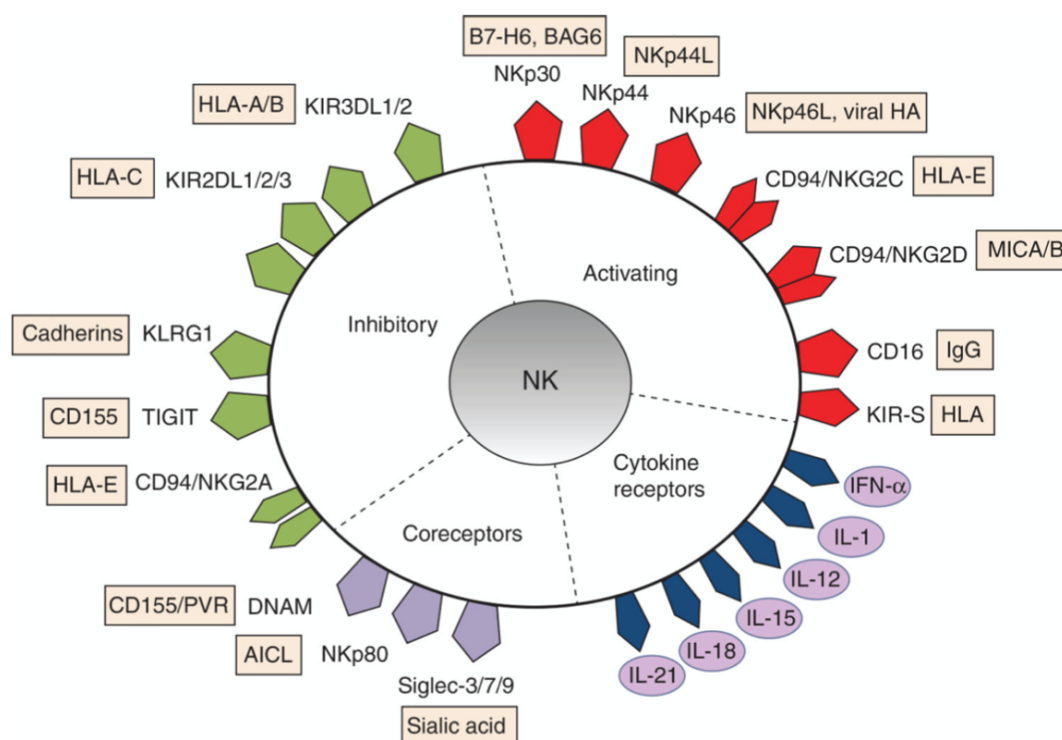


図 2 NK 細胞の表面受容体とリガンド
(Rosen and Golden-Mason, 2020 より引用)

加齢は免疫機能に影響を与える生物学的過程であり、加齢によりしばしば悪性腫瘍に対する免疫監視機能は低下する (Hazeldine and Lord, 2013)。HCC や加齢が NK 細胞の機能低下を導いている可能性があるが (Sakamoto et al., 2021) (Yoshida et al., 2021) (Hazeldine and Lord, 2013) (Sun et al., 2019)、加齢や HCC の存在が NK 細胞の機能関連分子の発現にどのような影響を及ぼしているかは、依然として不明である。これまでの研究では対照群は比較的若年であり、HCC 患者群が高齢であることが多かった。そのため、加齢による NK 細胞への影響を明らかにした上で年齢による影響を最小限にした条件での対照群と HCC 患者群を比較検討することが必要である。

本研究では、NK 細胞を介した抗腫瘍免疫の潜在的標的を同定することを目的とした。この目的のため、加齢による NK 細胞への影響を検討し、HCC 患者における NK 細胞の表面受容体と機能を、患者の年齢とマッチさせた HV で比較検討し、さらに HCC 患者における末梢血と肝内での NK 細胞の表面受容体について網羅的に検討した。その結果、HCC 患者では細胞傷害活性と抗体依存性細胞傷害能 (ADCC) が低下している $ILT2^{+}NKp46^{-}CD56^{dim}$ NK 細胞が癌部

において特に増加しており、抗 ILT2 抗体治療によりこれらの機能低下が回復することを見出した。さらに、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）が NK 細胞における ILT2 の誘導に部分的に関与していることを見出した。

方法

1. 対象

本研究は、2018 年 5 月から 2020 年 12 月までに国立国際医療研究センター国府台病院またはがん研有明病院で HCC に対する肝切除術を受けた線維化なしまたは軽度線維化（線維化 [F] ステージ 0、1、2 ; n=6）または進行線維化（F ステージ 3、4 ; n=11）の患者 17 名を対象とした（表 1）。また、年齢が 21~82 歳で、明らかな肝疾患や悪性腫瘍の既往がなく、HBs 抗原、HIV 抗原、抗 HIV 抗体、抗 HCV 抗体が陰性であった 42 名の健常成人（HV）を対照とした。登録時にすべての被験者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。

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」（NCGM-A-000275-01）に基づき行われ、日本がん研究振興財団がん研有明病院（2017-GA-1118）の倫理委員会にも承認された。また、本研究は、1975 年のヘルシンキ宣言の倫理指針および厚生労働省が定めたヒト臨床研究に関する倫理指針に準拠し、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. 細胞株

K562 細胞株（#JCRB0019 ; JCRB）は、10%非働化ウシ胎児血清（FBS）（GE Healthcare, Chicago, IL）を添加した RPMI-1640 培地（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）で培養した。Daudi 細胞株（#JCRB9071 ; JCRB）は、20%非働化ウシ胎児血清（FBS）添加した RPMI-1640 培地で培養した。Huh7 および PLC-PRF5 は、順天堂大学大学院医学研究科微生物学 岡本 徹教授のご好意により、HLE は、久留米大学医学部内科学講座 川口 巧教授のご好意によりご提供いただいた。これらの細胞株は、10%FBS、1% penicillin- streptomycin (P4333; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、1% MEM (M7145 ; Sigma-Aldrich)、および 10mM HEPES (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した DMEM (043-30085; Wako, Osaka, Japan) で培養した。すべての細胞は、加湿した 5% CO₂ インキュベーター内で 37℃で培養した。すべての実験は、マイコプラズマを含まない細胞で行った。

3. 末梢単核球 (PBMC) の抽出方法

PBMC の抽出は、HCC 患者と HV より採取した全血を 1×phosphate buffered

saline(PBS)(Nacalai Tesque)で1:1で希釈し、Ficoll-Paque (d=1.077 ; Nacalai Tesque) の上に積層し、20℃、500xg で 20 分間遠心分離を行う密度勾配遠心分離によって単離した。分離された PBMC の薄い層を採取し、PBS を加え混和した後 20℃、500xg、5 分間で遠心分離し洗浄した。洗浄は 2 回繰り返した。Cell Banker 溶液(ZENOAQ RESOURCE CO Ltd、Fukushima、Japan)にて-150℃で保存した。

4. 肝浸潤リンパ球(IHL)と肝細胞の抽出方法

IHL と肝細胞を分離するために、HCC に対する肝切除術の際に肝細胞癌組織と隣接する正常肝組織の一部を採取し、2mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific)、25mM HEPES(Nacalai Tesque)、10%ウシ胎児血清(FCS) (HyClone, Cytiva, Tokyo, Japan)、および 100U/mL penicillin- streptomycin (Nacalai Tesque) を含む RPMI-1640 培地 (Buffer 1) 中で冷蔵保存し、病院 (国立国際医療研究センター国府台病院またはがん研有明病院) から研究室 (国立国際医療研究センター肝炎免疫研究センター) まで速やかに輸送した。IHL 抽出方法は、下記のように施行した。

- ① 肝組織は、2%FCS と 0.6%ウシ血清アルブミンを含む HBSS (Gibco) (Buffer 2) で 2 回洗浄する。
- ② 10cm dish 上で、肝組織を 1mm 程度に細断する。
- ③ 50 μ g/L DNase I (Promega, Madison, WI) と 500mg/L collagenase IV (Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG, Uetersen, Germany) を添加し、5% CO₂ インキュベーター 37℃ 60 分間 40rpm で振盪混和して酵素反応させる。
- ④ 得られた細胞懸濁液を 40 μ m のセルストレーナー (Greiner) で濾過した後、Ficoll-Paque (d=1.077; Nacalai Tesque) での密度勾配遠心により IHL を分離する。
- ⑤ MACS システム (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD45⁺ IHL を回収する。
- ⑥ 抽出した IHL を Cell Banker 溶液(ZENOAQ RESOURCE CO Ltd、Fukushima、Japan)にて-150℃で保存した。
- ⑦ ④で密度勾配遠心後、肝細胞と赤血球を含む残存細胞塊を ACK 溶解 buffer (1.5M NH₄Cl, 100mM KHCO₃, PH7.2 に調整した 0.5M EDTA) で再懸濁し、赤血球を溶解する。
- ⑧ 洗浄後、肝細胞を Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) (1.129 g/mL) で遠心分離して単離し、Cell Banker 溶液(ZENOAQ

RESOURCE CO Ltd、Fukushima、Japan)にて-150℃で保存した。

5. NK 細胞の単離方法

PBMC から NK 細胞単離のために、NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いた MACS システムを用いたネガティブ磁気選択により NK 細胞を単離した。ILT2+CD56^{dim}NK 細胞を得るため、単離した NK 細胞を LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966 ; Invitrogen)、抗 CD3/CD14/CD19-APC-Cy7 抗体 (Biolegend, San Diego, CA)、抗 CD56-V450 抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA)、抗 CD16-PE 抗体 (BD Biosciences)、抗 NKp46-APC 抗体 (BD Biosciences)、抗 ILT2-PE-Cy7 抗体 (Biolegend) を用いて 4℃で 30 分間染色した。染色された細胞は、FACS Aria III セルソーター (BD Biosciences) でソーティングを行い、ILT2+CD56^{dim}NK 細胞を単離した。

6. マスサイトメトリー (CyTOF) を用いた解析方法

CyTOF 法は、飛行時間型質量分析計で質量により識別可能な金属同位体標識抗体を用いることにより、蛍光色素ベースのフローサイトメトリー特有のスペクトル重複の制限なしに、多数のマーカーの同時検出を可能にする。解析のために、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, San Francisco, CA) で処理して生細胞/死細胞を同定し、細胞表面膜タンパク質に対する金属標識抗体 (表 2) と 30 分間インキュベートした。細胞は 1.6% パラホルムアルデヒドで固定し、Cell-ID™ Intercalator-Ir (Fluidigm) で標識してシングレットとダブレットの識別を可能にし、CyTOF マスサイトメーター (Helios, Fluidigm) を用いて分析した。CyTOF シグナルは、EQ Four Element Calibration Beads (201078; Fluidigm) を用いて、製造元の指示に従って正規化した。データファイルは Cytobank ソフトウェア (Cytobank Premium, Mountain View, CA) を用いて解析した。サンプルあたり合計 40,000 個の CD45+白血球を分析した。NK 細胞 (CD45+CD3-CD14-CD56+)、T 細胞 (CD45+CD3+)、および単球 (CD45+CD3-CD14+) を同定するために用いたゲーティング戦略を図 3 に示す。CyTOF 解析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処理にかけられ、多次元データ構造を保持したまま、多次元サイトメトリーデータを 2 次元で表示することができる (Kimball et al., 2018)。visNE 解析では、各ドナーから合計 14,000 個の NK 細胞が含まれ、データは平均シグナル強度 (MSI) に基づいてクラスタ化した。

表 2. マスサイトメトリーで使用した金属抗体

Channel	Isotope	Marker	Function of Markers	Clone	Staining Method	Catalog number
89	Y	CD45	lymphocytes identification	HI30	surface	3089003B
106	Cd	CD3	T cell identification	UCHT1	surface	Custom
111	Cd	CD38	NK activation	HIT2	surface	Custom
112	Cd	ILT2 (CD85j)	NK inhibitory	292305	surface	Custom
113	Cd	NKG2D (CD314)	NK activation	149810	surface	Custom
114	Cd	CD56 (NCAM)	NK identification	HCD56	surface	Custom
116	Cd	TIGIT	NK inhibitory	741182	surface	Custom
141	Pr	CD27	NK differentiation	O323	surface	Custom
143	Nd	HLA-DR	APC identification	L243	surface	3143013B
144	Nd	CD69	NK activation	FN50	surface	3144018B
145	Nd	KIR2DL1	NK inhibitory	MAB1844	surface	Custom
146	Nd	CXCR6	NK differentiation	56811	surface	Custom
147	Sm	NKG2C (CD159c)	NK activation	MAB1381	surface	Custom
148	Nd	Siglec-10	Siglec family	AF2130	surface	Custom
149	Sm	Siglec-9	Siglec family	K8	surface	Custom
150	Nd	CXCR1	NK activation	42705	surface	Custom
151	Eu	CD96	NK inhibitory	MAB6199	surface	Custom
152	Sm	Siglec-7 (CD328)	Siglec family	194211	surface	3152013B
153	Eu	TIM-3	Inhibitory checkpoint	immune F38-2E2	surface	3153008B
154	Sm	CD49a	NK differentiation	AF5676	surface	3154016B
155	Gd	CX3CR1	NK differentiation	AF5825	surface	Custom
156	Gd	CD94	NK inhibitory	131412	surface	Custom
158	Gd	CD200R	NK inhibitory	380525	surface	Custom
159	Tb	NKp30 (CD337)	NK activation	Z25	surface	3159017B
160	Gd	CD14	Monocytes identification	M5E2	surface	3160001B
162	Dy	NKp46 (CD335)	NK activation	BAB281	surface	Custom
164	Dy	TRAIL	NK activation	RIK-2	surface	Custom
165	Ho	LAG-3 (CD223)	Inhibitory checkpoint	immune 11C3C65	surface	3165037B

166	Er	CD47	NK inhibitory	472603	surface	3166016B
167	Er	KIR3DL1 (CD158e1)	NK inhibitory	DX9	surface	3167013B
168	Er	CD160	NK activation	688327	surface	Custom
169	Tm	NKG2A (159a)	NK inhibitory	Z199	surface	3169013B
170	Er	2B4 (CD244)	NK activation	MAB10393	surface	Custom
171	Yb	DNAM-1 (CD226)	NK activation	DX11	surface	3171013B
172	Yb	FasL	NK activation	NOK-1	surface	Custom
173	Yb	KIR2DL2/L3 (CD158b)	NK inhibitory	DX27	surface	3173010B
174	Yb	PD-1 (CD279)	Inhibitory checkpoint	immune EH12.2H7	surface	3174020B
175	Lu	NKp44 (CD336)	NK activation	MAB22491	surface	Custom
176	Yb	CD57	NK differentiation	HCD57	surface	3176019B
209	Bi	CD16	NK identification	3G8	surface	3209002B

CXCR6, C-X-C motif chemokine receptor 6; CX3CR1, C-X3-C motif chemokine receptor 1; DNAM-1, DNAX accessory molecule-1; HLA-DR, human leukocyte antigen-DR; ILT2, immunoglobulin-like transcript 2; KIR2DL1, killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL1; KIR2DL2/L3, killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL2/L3; KIR3DL1, killer cell immunoglobulin-like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1; LAG-3, lymphocyte-activation gene 3; NKG2A, CD94/NK group 2 member A; NKG2D, CD94/NK group 2 family of C-type lectin-like receptors; NKp30, natural killer cell p30; NKp44, natural killer cell p44; NKp46, natural killer cell p46; PD-1, programmed cell death-1; Siglec, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin; TIGIT, T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains; Tim-3, T-cell immunoglobulin and mucin domain 3.

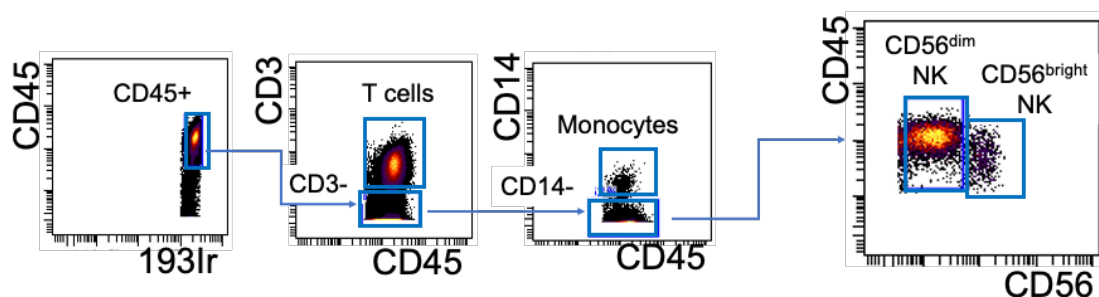


図 3 NK 細胞 (CD45+CD3-CD14-CD56+)、T 細胞 (CD45+CD3+)、および単球

(CD45+CD3-CD14+) を同定するゲーティング戦略

7. フローサイトメトリーを用いた解析方法

PBMC や IHL の細胞表面染色の前に、すべての細胞を FcR ブロッキング試薬 (130-059-901 ; Miltenyi Biotec) と共に 4°C で 10 分間インキュベートした。NK 細胞の表現型を解析するために、PBMC と IHL を LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (L34966 ; Invitrogen)、抗 CD3/CD14/CD19-APC-Cy7 抗体 (Biolegend)、抗 CD56-BUV737 抗体 (BD Biosciences)、抗 CD16-BUV395 抗体 (BD Biosciences)、抗 NKp46-BV421 抗体 (BD Biosciences)、抗 ILT2-PE-Cy7 抗体 (Biolegend) を用いて 4°C で 30 分間染色した。また、ILT2 のリガンド解析のために、HCC 組織 (Ca) および隣接する非癌肝組織 (Nca) の肝細胞を PE-HLA-G およびアイソタイプコントロールとインキュベートした。全てのサンプルは LSRFortessa (BD Biosciences) を用いて FACSDiva ソフトウェアで取得し、FlowJo 10.8.1 ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。フローサイトメトリー解析に用いた抗体を表 3 に示す。

表 3. フローサイトメトリーで使用した抗体

Antibody	Fluorophore	Clone	Vendor	Catalog number
CD3	APC-Cy7	SK7	Biolegend	344818
CD14	APC-Cy7	HCD14	Biolegend	325620
CD16	PE	3G8	BD Biosciences	555407
CD19	APC-Cy7	HIB19	Biolegend	302218
CD56	V450	B159	BD Biosciences	560360
HLA-G	PE	87G	Abnova	MAB11223
ILT2	PE-Cy7	GHI/75	Biolegend	333712
NKp46	APC	9E2	BD Biosciences	558051

HLA-G, human leukocyte antigen-G; ILT2, immunoglobulin-like transcript 2; NKp46, natural killer cell p46.

8. 細胞傷害活性と ADCC 活性の測定

NK 細胞の細胞傷害性と ADCC は、既報と同様にフローサイトメトリーで解析した (Yamashita et al., 2016)。Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)

(C34554; Invitrogen)で標識した K562 細胞および Daudi 細胞を、10%FBS 添加 RPMI-1640 培地に再懸濁し、96well V 型底プレートに 4×10^3 細胞/ $200 \mu\text{L}$ /well で入れた。単離した NK 細胞（エフェクター細胞）を、CFSE 標識 K562 細胞および Daudi 細胞（ターゲット細胞）と、それぞれ 5 : 1 および 10 : 1 のエフェクター／ターゲット比で、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。また、K562 細胞および Daudi 細胞が HLA-G を発現していることをフローサイトメトリーを用いて確認した（図 4）。細胞傷害活性の測定前に sIL-2 (50ng/mL) (200-02 ; Thermo Fisher Scientific) を添加し、ADCC 活性の測定前に Rituximab (10 $\mu\text{g/mL}$) (HY-P9913; MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ) を添加した。また、機能回復実験（図 5）の前に、単離した ILT2+NK 細胞を ILT2 中和抗体 (10 $\mu\text{g/mL}$) (333721 ; Biolegend) またはアイソタイプ抗体 (10 $\mu\text{g/mL}$) (401216 ; Biolegend) と 1 時間インキュベートした。前処理した NK 細胞（エフェクター細胞）を CFSE 標識した K562 細胞および Daudi 細胞（ターゲット細胞）と 2.5:1 のエフェクター／ターゲット比で 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 4 時間インキュベートした。4 時間培養後、標的細胞を 7-AAD (559925; BD Biosciences) で 10 分間染色することで細胞傷害活性または ADCC 活性で傷害された標的細胞を識別できるようになり、LSRFortessa を用いて測定を行い、FACSDiva ソフトウェアと FlowJo 10.8.1 ソフトウェアを用いて解析した。細胞傷害活性または ADCC 活性による細胞傷害(lysis)の程度は、全 CFSE 陽性標的細胞中の 7-AAD 陽性細胞の割合を計算することにより定量した。特異的細胞傷害は以下の式で計算した： $\% \text{ specific lysis} = (\% \text{ lysis of sample cells} - \% \text{ lysis of control target cells}) / (100\% - \% \text{ lysis of control target cells})$ 。

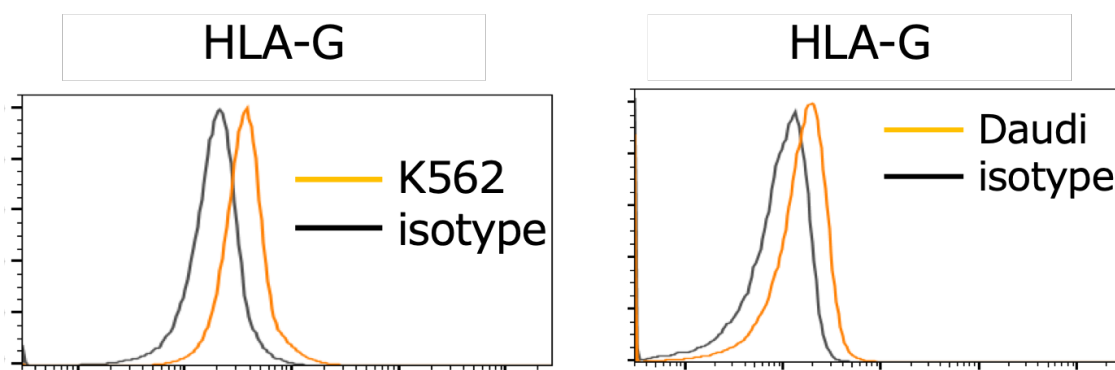


図 4 K562 細胞および Daudi 細胞における HLA-G の発現

Histograms showing the expression of HLA-G on K562 and Daudi cells as target

cells for cytotoxicity and ADCC assays, respectively. The yellow and black lines indicate target cells or isotype cells, respectively.

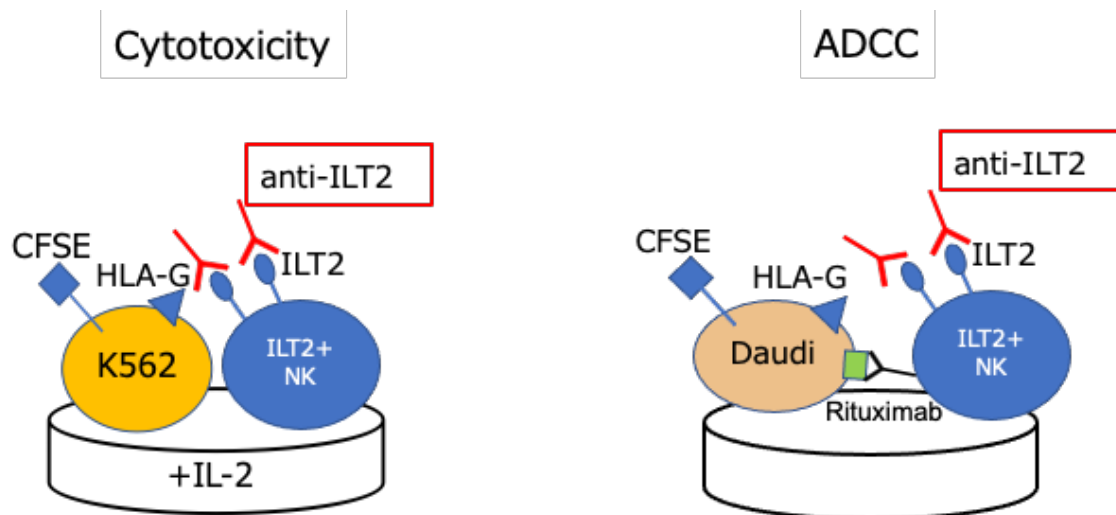


図 5 細胞傷害活性と ADCC 活性の機能回復実験におけるシェーマ

9. 血清液性因子の測定

血清検体は、採血した全血を $300 \times g$ で 15 分間遠心分離して回収後に -80°C で保存した。血清液性因子の測定には、Bio-Plex Pro™ Human Chemokine Panel (40 plex) (Bio-Rad, Hercules, CA) を使用した。このパネルでは、以下のケモカインの発現をスクリーニングした： CCL1、CCL2、CCL3、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL15、CCL17、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL6、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL16、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-16、MIF、および TNF- α 。

10. 細胞培養

5×10^4 個の Huh7、PLC-PRF5、または HLE 細胞と 5×10^4 個の HV から MACS システムを使用して単離した NK 細胞の共培養は、24 ウェルプレートで recombinant IL-15 1ng/mL (247-ILB-005; R&D Systems, Minneapolis, MN) と 72 時間行った。トランスウェルインサートを用いた共培養では、 5×10^4 個の NK 細胞を、 $0.4 \mu\text{m}$ 孔のポリエチレンテレフタレート (#353495; Corning, Glendale, AZ) を用いた上部チャンバーで培養した。その他の培養では、HV から 5×10^4 個の単離した NK 細胞を、10% 非働化 FBS と recombinant human MIF (289-MF-

01M/CF; R&D Systems) または HCC 細胞株の 50%細胞培養上清を添加した RPMI-1640 培地で 48 時間培養し、アイソタイプコントロール抗体、DMSO、抗 MIF 抗体(MAB289;R&D Systems)、抗 CD74 抗体(555612;BD Biosciences)、CXCR2 アンタゴニスト (SB225002 ; MedChemExpress)、または CXCR4 アンタゴニスト (WZ811 ; Selleckchem.com) を用いた。

11. 統計解析

2 群間の差は、Mann-Whitney U-test(対応のないもの)または Wilcoxon signed-rank test (対応のあるもの) により評価した。2 群間以上の差は、Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test で評価した。相関は Spearman's analysis で評価した。統計解析とデータの可視化は、Prism software version 8 (Graph Pad, San Diego, CA)を用いて行い、p 値は 0.05 未満を優位とした。

結果

本研究における対象症例の臨床データを表 1 ～ 2 に示す。

表 1. HCC 17 症例の臨床データ

		HCC (n=17)	
Age (years)	70.0	±	12.8
Sex (male:female)		14 : 3	
BMI (kg/m ²)	22.8	±	3.2
AST (IU/L)	45.6	±	32.0
ALT (IU/L)	40.9	±	40.9
T-bil (mg/dL)	0.8	±	0.3
Alb (g/dL)	4.1	±	0.3
Plt (x10 ⁴ /μL)	16.0	±	6.1
PT (%)	103.6	±	18.3
Hb (g/dL)	13.3	±	1.2
TG (mg/dL)	130.0	±	69.8
T-Cho (g/dL)	187.4	±	52.1
γGTP (IU/L)	111.5	±	134.8
ALP (IU/L)	372.1	±	219.4
HbA1c (%)	6.1	±	0.7
Creatinine (mg/dL)	0.80	±	0.1
Serum iron (μg/dL)	92.3	±	45.0
Ferritin (ng/mL)	285.2	±	216.7
Transferrin (mg/dL)	255.9	±	49.9
TIBC (μg/dL)	326.1	±	59.3
AFP (ng/mL)	251.4	±	860.9
PIVKA-II (mAU/mL)	5314	±	13147
ALBI score	-2.7	±	0.3
Etiology (HCV/ HBV/ NBNC/ Alc)		6/ 3/ 6/ 2	
F stage (0/ 1/ 2/ 3/ 4)		2/ 0/ 4/ 5/ 6	
Maximal tumor size (cm)	5.0	±	3.0
Histological differentiation grade (Well/ Moderately/ Poor)		1/ 14/ 2	

Data are presented as patient number, mean $\pm$ SD, or score (range) as appropriate. AFP, alpha-fetoprotein; Alb, serum albumin; ALBI, albumin-bilirubin grade; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; F stage, fibrosis stage; Hb, hemoglobin; HbA1c, hemoglobin A1c; PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II; Plt, platelet count; PT, prothrombin time; T-bil, total bilirubin; T-cho, total cholesterol; TG, triglycerides; TIBC, total iron-binding capacity; TP, total protein; γ GTP, gamma-glutamyl transpeptidase.

表 2. HV 42 名と年齢/性別をマッチさせた HCC 患者と HV の臨床データ

	HV		HCC		P value
	All (n=42)	Matched (n=12)	(n=12)		
Age (years)	52.0 ± 20.6	72.9 ± 9.4	73.1 ± 9.6		NS
Sex (male:female)	21 : 21	9 : 3	9 : 3		NS
BMI (kg/m ²)		23.1 ± 2.3	21.9 ± 2.3		NS
AST (IU/L)		22.1 ± 4.6	50.3 ± 35.4		< 0.05
ALT (IU/L)		19.3 ± 6.8	41.1 ± 47.8		< 0.05
T-bil (mg/dL)		-	0.8 ± 0.2		
Alb (g/dL)		-	4.0 ± 0.4		
Plt (x10 ⁴ /μL)		22.9 ± 3.7	15.2 ± 5.1		< 0.001
PT (%)		-	105.3 ± 20.8		
Hb (g/dL)		-	13.0 ± 1.1		
TG (mg/dL)		-	119.8 ± 58.4		
T-Chol (g/dL)		-	181.8 ± 55.2		
γGTP (IU/L)		-	127.2 ± 158.6		
ALP (IU/L)		-	412.4 ± 242.2		
HbA1c (%)		-	6.0 ± 0.5		
Serum creatinine (mg/dL)		-	0.80 ± 0.2		
Serum iron (μg/dL)		-	88.5 ± 51.0		
Serum ferritin (ng/mL)		-	245.6 ± 128.3		(n=11)
Serum transferrin (mg/dL)		-	259.1 ± 57.8		(n=11)
TIBC (μg/dL)		-	328.5 ± 67.8		(n=11)
AFP (ng/mL)		-	333.7 ± 1026		
PIVKA-II (mAU/mL)		-	7308 ± 15382		
ALBI score		-	-2.7 ± 0.3		
Etiology (HCV/ NBNC/ Alc)		-	6/ 5/ 1		
F stage (0/ 1/ 2/ 3/ 4)		-	1/ 0/ 3/ 5/ 3		
Maximal tumor size (cm)		-	5.2 ± 2.3		

Histological

differentiation grade

(Well/ Moderately/

Poor)

-

1/ 9/ 2

Data are presented as patient number, mean $\pm$ SD, or score (range) as appropriate.

The *p*-values were determined by the Mann–Whitney U-test.

AFP, alpha-fetoprotein; Alb, serum albumin; ALBI, albumin-bilirubin grade; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; F stage, fibrosis stage; Hb, hemoglobin; HbA1c, hemoglobin A1c; HV, healthy volunteer; NS, not significant; PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II; Plt, platelet count; PT, prothrombin time; T-bil, total bilirubin; T-cho, total cholesterol; TG, triglycerides; TIBC, total iron-binding capacity; TP, total protein; γ GTP, gamma-glutamyl transpeptidase.

1. 健常人の NK 細胞に対する加齢の影響

1. 1. CD56^{dim} 末梢 NK (pNK) 細胞の頻度は加齢とともに増加した

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。まず、42 人の健常人の末梢 NK 細胞の頻度と 35 種類の表面受容体の発現レベルをマスサイトメトリーで評価した。図 3 に示したように、CD56^{dim} および CD56^{bright} NK 細胞を定義した。CD56^{dim} 末梢 NK (pNK) 細胞の頻度は加齢とともに増加し、CD56^{bright} NK 細胞の頻度は減少した (図 6)。これらの傾向は性別による差はなかった。

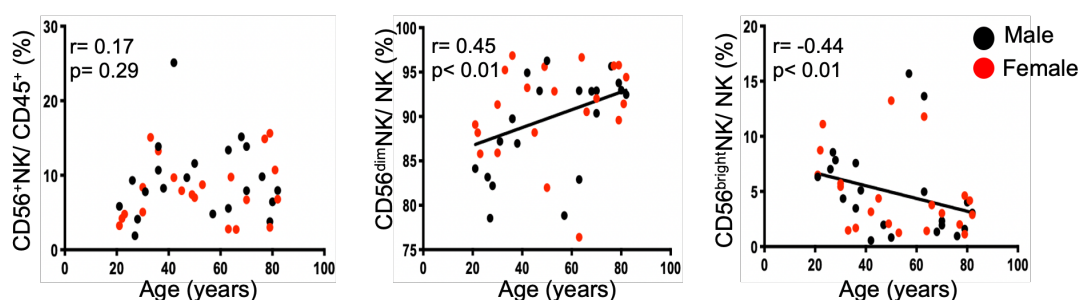


図 6 加齢に伴う末梢 NK 細胞の変化

Spearman's correlations for peripheral CD56⁺ NK cells, CD56^{dim} NK cells, and CD56^{bright} NK cells in HVs with age. Black and red plots indicate data for men and women, respectively. The values of the Spearman's correlation coefficients are indicated.

1. 2. CD56^{dim} 末梢 NK (pNK) 細胞の表面受容体の加齢による変化

成熟化マーカーである CD57 と 4 つの抑制型受容体 (ILT2、Siglec-9、Siglec-10、CD200R) の発現レベルは年齢と正の相関があった (図 7、表 3)。対照的に、5 つの活性化マーカー (Siglec-7、CD160、Nkp46、NKG2D、CXCR1) は年齢と負の相関があった (図 7、表 3)。CD56^{dim} の NK 細胞は細胞傷害活性を持つエフェクター細胞の主要なタイプの一つであるため、以下の実験では CD56^{dim}NK 細胞に注目した。

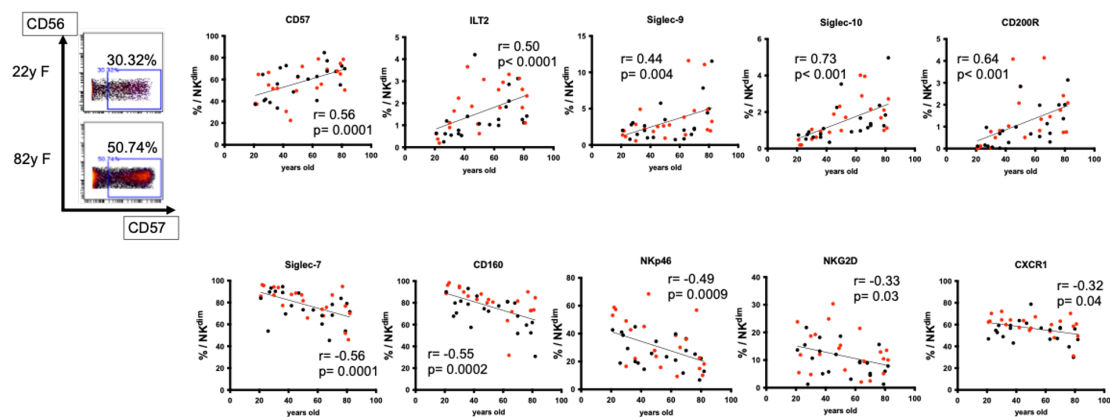


図 7 末梢 CD56^{dim} NK 細胞の表面受容体発現程度(%)と年齢の相関

Representative mass cytometry plots for CD56 and CD57 on peripheral CD56^{dim} NK cells from a younger HV and an older HV. The remaining panels show the Spearman's correlations between age and the percentages of CD57, Siglec-7, CD160, Nkp46, NKG2D, CXCR1, ILT2, Siglec-9, Siglec-10 and CD200R expression on peripheral CD56^{dim} NK cells in HVs. Black and red plots indicate data for men and women, respectively. The values of the Spearman's correlation coefficients are indicated.

表 3. 末梢 CD56^{dim} NK 細胞の表面受容体 35 種類の発現(%)と年齢の相関

		Correlation of %			
Function of Markers	Marker	r	(95% CI)	p	
NK differentiation	CD57	0.56	(0.31 to 0.75)	0.0001	***
	CD27	-0.42	(-0.65 to -0.12)	0.0058	**
	CXCR6	-0.24	(-0.51 to 0.083)	0.1336	
	CX3CR1	0.15	(-0.17 to 0.44)	0.3330	
	CD49a	0.16	(-0.16 to 0.45)	0.3155	
NK activation	Siglec-7 (CD328)	-0.56	(-0.74 to -0.30)	0.0001	***
	CD160	-0.55	(-0.73 to -0.28)	0.0002	***
	Nkp46 (CD335)	-0.49	(-0.70 to -0.22)	0.0009	***
	Nkp30 (CD337)	-0.29	(-0.55 to 0.024)	0.0618	
	NKG2D (CD314)	-0.33	(-0.59 to -0.024)	0.0307	*
	NKG2C (CD159c)	0.12	(-0.20 to 0.42)	0.4530	

	2B4 (CD244)	-0.019	(-0.33 to 0.29)	0.9034	
	DNAM-1 (CD226)	0.038	(-.28 to 0.35)	0.8114	
	CD69	0.51	(0.23 to 0.71)	0.0006	***
	CD38	-0.16	(-0.45 to 0.16)	0.3258	
	CXCR1	-0.32	(-0.57 to -0.0035)	0.0418	*
	HLA-DR	0.78	(0.62 to 0.88)	<0.0001	****
	NKp44 (CD336)	0.19	(-0.13 to 0.48)	0.2221	
	FasL	0.38	(0.078 to 0.62)	0.0128	*
	TRAIL	0.51	(0.23 to 0.71)	0.0006	***
NK inhibitory	ILT2 (CD85j)	0.50	(0.34 to 0.76)	<0.0001	****
	PD-1 (CD279)	0.26	(-0.055 to 0.53)	0.0934	
	TIM-3	0.27	(-0.045 to 0.54)	0.0829	
	LAG-3 (CD223)	0.28	(-0.037 to 0.54)	0.0744	
	TIGIT	0.25	(-0.063 to 0.53)	0.1041	
	CD96	-0.22	(-0.50 to 0.10)	0.1635	
	NKG2A (159a)	-0.37	(-0.69 to -0.19)	0.0015	**
	CD94	-0.23	(-0.50 to 0.093)	0.1508	
	Siglec-9	0.44	(0.14 to 0.66)	0.0040	**
	Siglec-10	0.73	(0.55 to 0.85)	<0.0001	****
	KIR2DL1	0.13	(-0.19 to 0.43)	0.4078	
	KIR2DL2/L3	0.22	(-0.097 to 0.50)	0.1579	
	KIR3DL1	-0.31	(-0.57 to 0.0012)	0.0448	*
	CD200R	0.64	(0.41 to 0.79)	<0.0001	****
	CD47	-0.39	(-0.62 to -0.085)	0.0114	*

Spearman's correlation rho (r) values and p -values are indicated.

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

1. 3. 高齢者では CD57^{high}Siglec-7^{low}CD160^{low}NKp46^{low}CD56^{dim} NK 細胞が増加した

若年者 (22 歳) と高齢者 (82 歳) の pNK 細胞のマスサイトメトリデータを
を使用して viSNE プロットにて比較した。高齢者では CD57^{high}Siglec-

$7^{\text{low}}\text{CD}160^{\text{low}}\text{NKp}46^{\text{low}}\text{CD}56^{\text{dim}}$ 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（図 8）。これらの結果は、加齢に伴い、健常人の 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減少する傾向があることを示唆している。これらの表現型の変化は、高齢者における潜在的な NK 細胞の機能障害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。

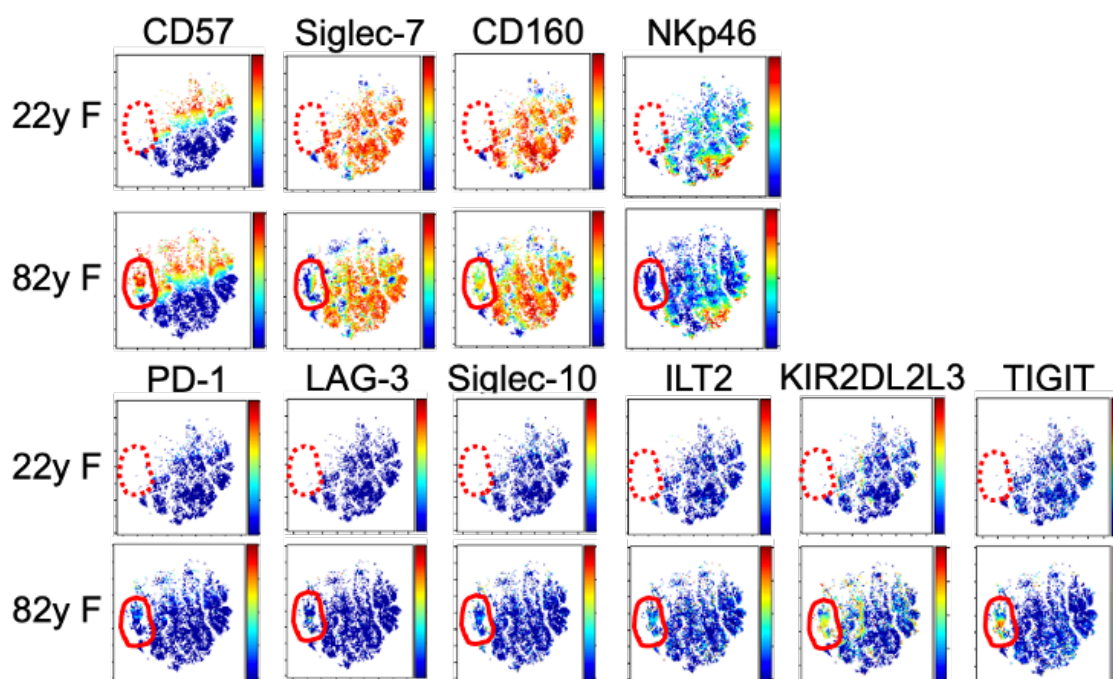


図 8 若年者（22 歳）と高齢者（82 歳）の pNK^{dim} 細胞の visNE プロット
The panels show the expression of the indicated surface proteins: CD57, Siglec-7, CD160, NKp46, PD-1, LAG-3, Siglec-10, ILT2, KIR2DL2/L3, and TIGIT. The color scale indicates a gradient from high (red) to low (blue) expression of the relevant protein. The red circles with dashed and solid lines indicate the $\text{CD}56^{\text{dim}}$ NK subpopulation that was specifically detected in the older individual and not in the younger individual.

2. HCC 患者における NK 細胞の変化

2.1. HCC 患者では $\text{CD}56^{\text{dim}}$ NK 細胞の頻度が低下していた

HCC 患者と健常人の NK 細胞を比較するために、年齢と性別をマッチさせた HCC 患者と HV を比較した（表 2）。HCC 患者では $\text{CD}56^{\text{dim}}$ NK 細胞の頻度が HV

に比べて減少していたが、CD56^{bright} NK 細胞の頻度は同等であった（図 9）。

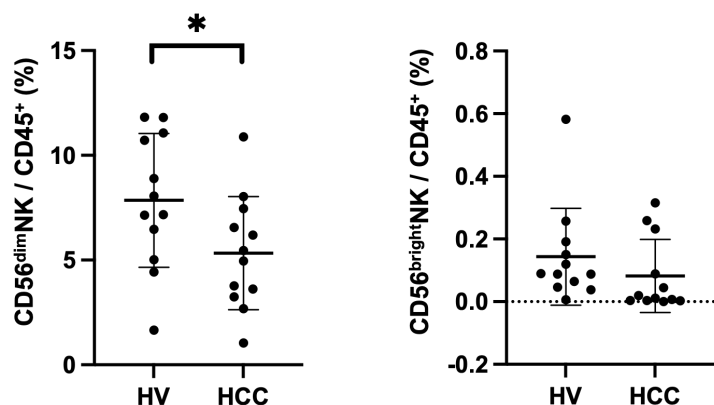


図 9 HCC 患者における末梢 NK 細胞頻度の変化

Percentages of CD56^{dim} NK cells and CD56^{bright} NK cells among total PBMCs from HVs ($n=12$) and HCC patients ($n=12$). Data are presented as mean $\pm$ SD.

* $p < 0.05$, by the Mann-Whitney U-test.

2. 2. HCC 患者の 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た

HCC 患者と HV の CD56^{dim} NK 細胞の 35 種類の表面受容体の発現レベル (MSI) と頻度 (%) を調べ、発現レベルの結果をヒートマップで表した（図 10）。CD56^{dim}NK 細胞上の抑制型受容体である ILT2、NKG2A、CD47 の発現レベルは HV よりも HCC 患者で有意に高く、活性型受容体である Siglec-7、DNAM-1 (CD226)、2B4 (CD244) の発現レベルは有意に低かった（図 11）。また、NKp46 と CD16 は NK 細胞の主要な活性型受容体であると報告されているが (Hadad et al., 2015)、NKp46 と CD16 の発現レベルは HCC 患者と HV の間で同等であった（図 11）。CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現頻度も 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た（図 12）。末梢血 NK 細胞のマスサイトメトリーデータを使用した viSNE プロット解析では、赤で示す ILT2 陽性 NK^{dim}細胞は、活性型受容体 NKp46、NKG2D、CD160、2B4 が低下しており、抑制型受容体 Tim-3、CD200R、Siglec-10 の発現を認めた（図 13）。これらの結果から、HCC 患者の 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。

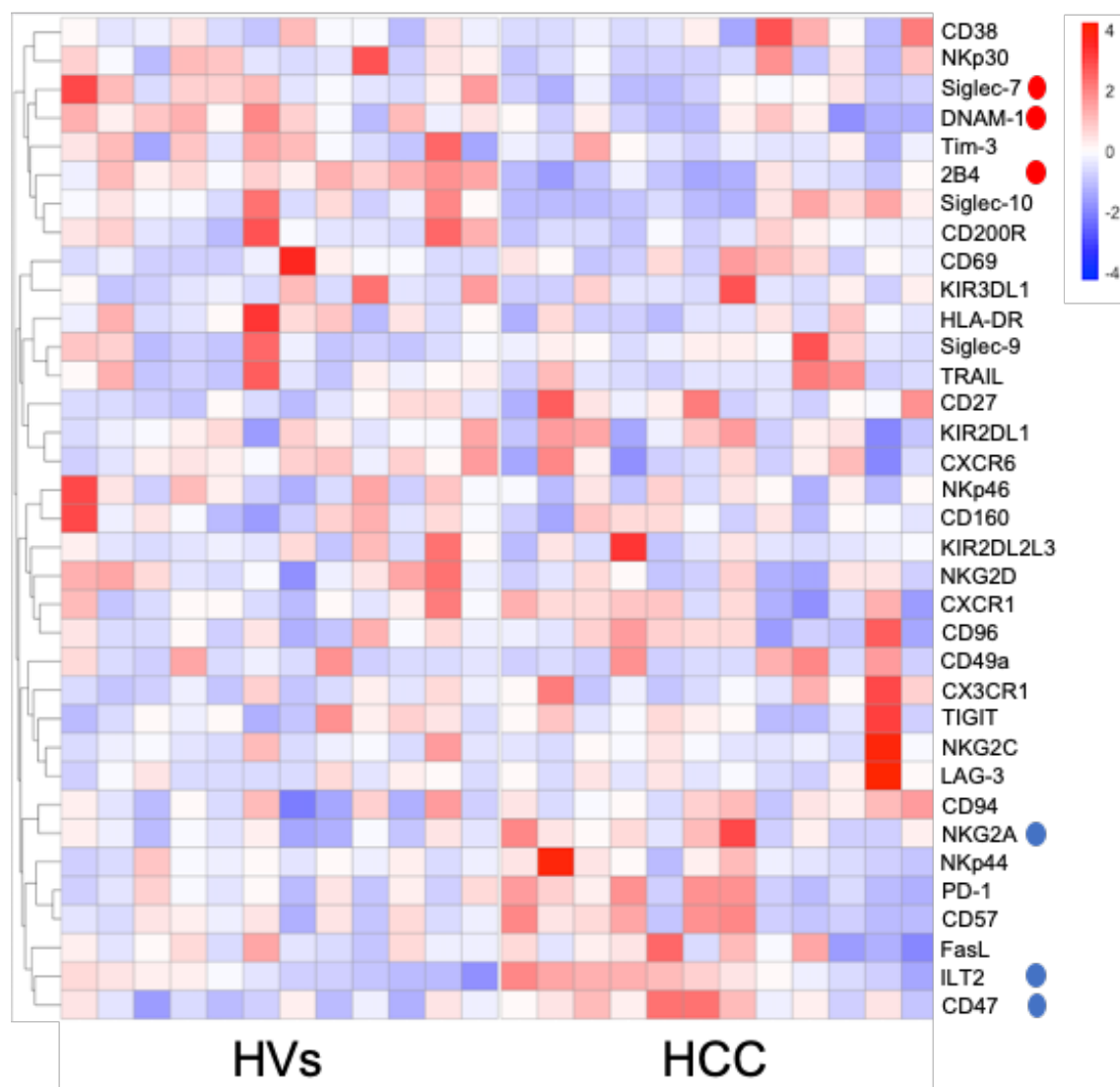


図 10 HCC 患者と HV の CD56^{dim} NK 細胞の表面受容体の発現レベル (MSI) のヒートマップ

The horizontal axis represents 35 surface markers on CD56^{dim} NK cells. The vertical axis represents the samples from HCC patients and HVs. The red region represents upregulated markers and the blue region represents downregulated markers. The red circles indicate surface markers that were highly expressed on CD56^{dim} NK cells from HVs compared with HCC patients (Siglec-7, DNAM-1, 2B4). The blue circles indicate surface markers that were highly expressed on CD56^{dim} NK cells from HCC patients compared with HVs (NKG2A, ILT2, CD47).

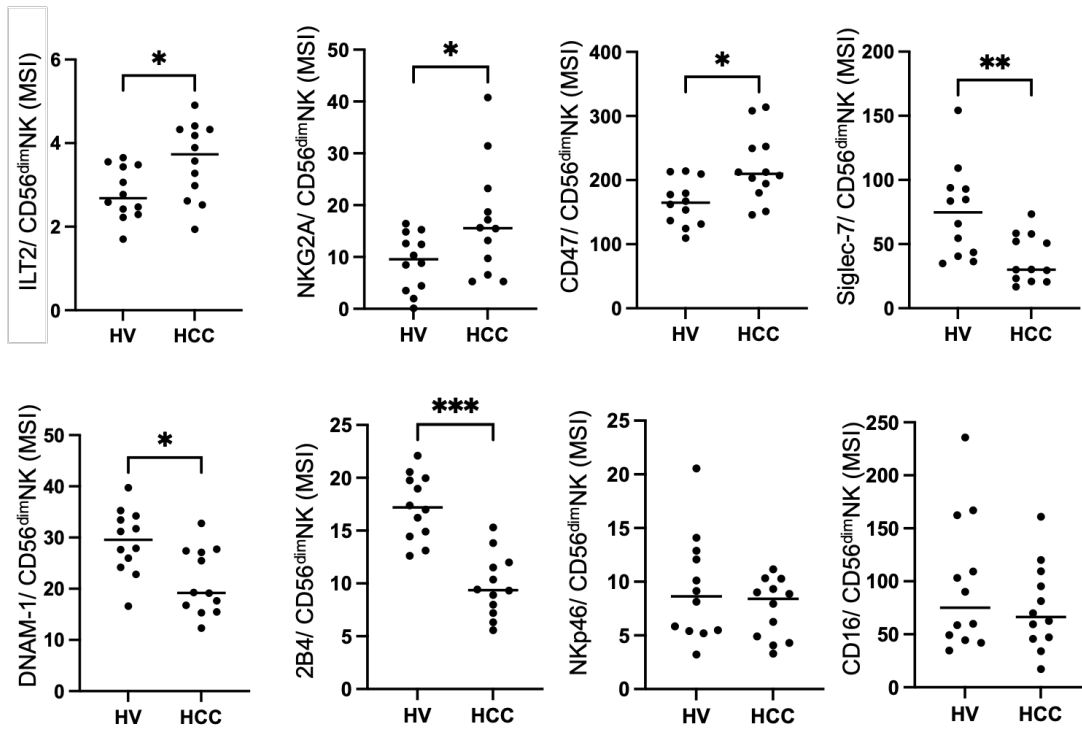


図 11 HCC 患者と HV の末梢 NK^{dim} 細胞の表面受容体の発現レベルの比較
MSI values for ILT2, NKG2A, CD47, Siglec-7, DNAM-1, 2B4, NKp46 and CD16
expression on CD56^{dim} NK cells from HCC patients ($n=12$) and HVs ($n=12$).
* $p<0.05$, *** $p<0.001$, by the Mann–Whitney U-test.

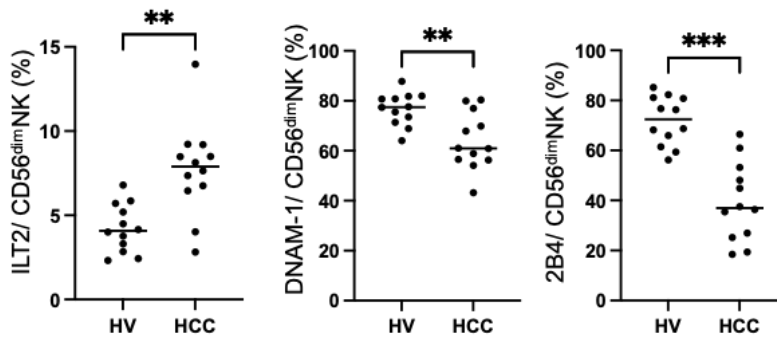


図 12 HCC 患者と HV の末梢 NK^{dim} 細胞の表面受容体の発現頻度の比較
Frequencies (%) of ILT2, DNAM-1, and 2B4 expression on CD56^{dim} NK cells from
HCC patients ($n=12$) and HVs ($n=12$). Data are presented as individual values with
a mean line. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, by the Mann–Whitney U-test.

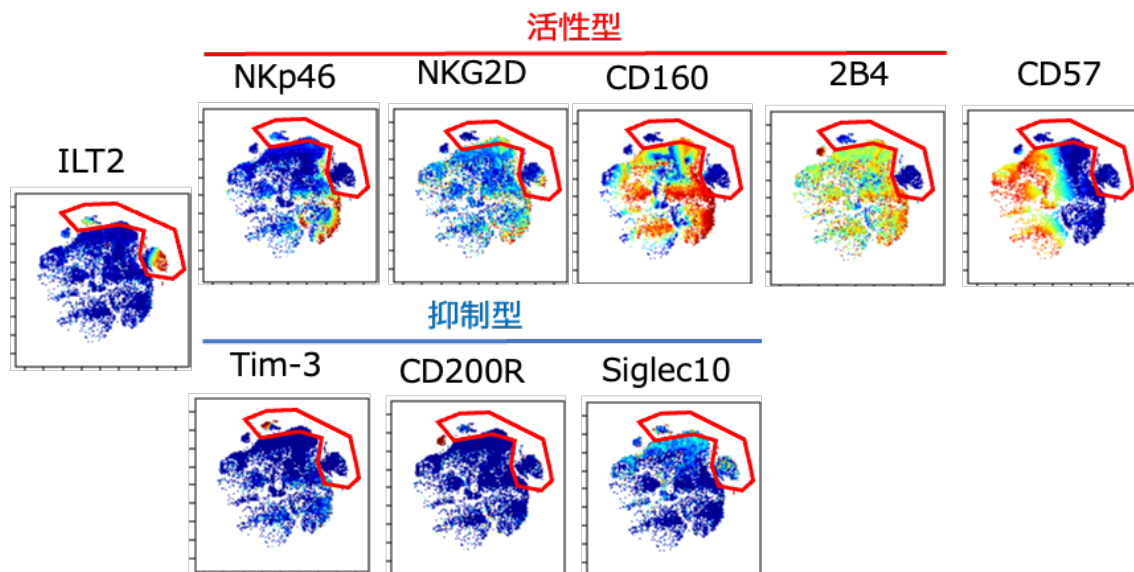


図 13 末梢血 ILT2+NK^{dim}細胞の viSNE プロット

The panels show the expression of the indicated surface proteins: ILT2, NKp46, NKG2D, CD160, 2B4, CD57, Tim-3, CD200R and Siglec-10. The color scale indicates a gradient from high (red) to low (blue) expression of the relevant protein. The red circles indicate the peripheral ILT2+CD56^{dim} NK subpopulation.

3. HCC 患者の癌組織と非癌組織における肝内 NK 細胞の変化

3. 1. 癌部 CD56^{dim} NK 細胞の頻度は低下していた

次に、HCC 患者 17 名の肝内 NK 細胞の頻度と表面受容体について癌組織 (Ca) と非癌組織 (NCa) で比較した (表 1)。既報と同じように Ca-CD56^{dim}NK 細胞の頻度は NCa-CD56^{dim}NK 細胞の頻度より低かったが (Yoshida et al., 2021)、CD56^{bright}NK 細胞の頻度は同等であった (図 14)。

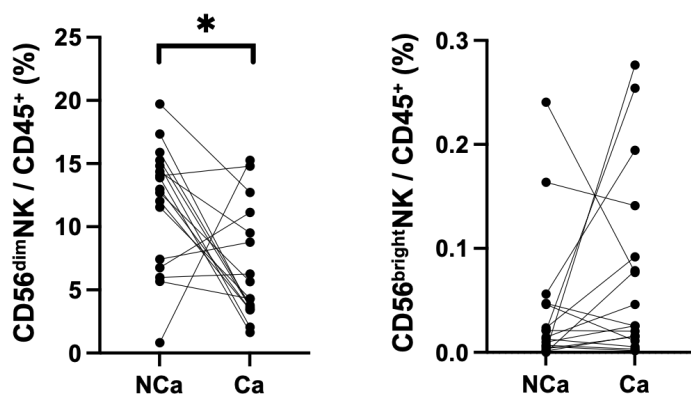


図 14 HCC 患者の癌部と非癌部における末梢 NK 細胞頻度の変化

Percentages of intrahepatic CD56^{dim} NK cells (CD45⁺CD3⁻CD14⁻CD56^{dim}) and CD56^{bright} NK cells (CD45⁺CD3⁻CD14⁻CD56^{bright}) from HCC tissue. * $p<0.05$, by the Mann–Whitney U-test.

3. 2. 癌部 CD56^{dim} NK 細胞において ILT2 の発現と頻度が上昇していた

癌組織 (Ca) と非癌組織 (NCa) の CD56^{dim} NK 細胞上の表面受容体の発現レベル (MSI) と頻度 (%) を比較した。癌組織では、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現と頻度は、非癌部組織と比較して有意に高く、2B4 の発現と頻度は低かった (図 15、図 16)。

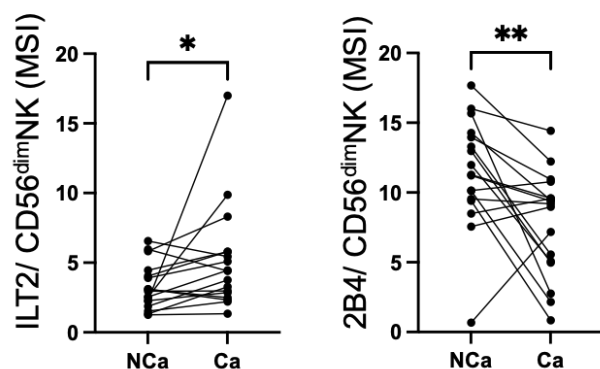


図 15 HCC 患者の癌部と非癌部末梢 NK 細胞表面受容体の発現レベルの比較

MSI values for ILT2 and 2B4 expression on Ca-CD56^{dim} NK cells and NCa-CD56^{dim} NK cells.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, by the Wilcoxon signed-rank test.

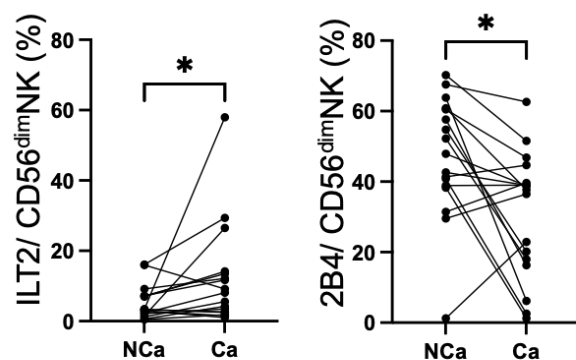


図 16 HCC 患者の癌部と非癌部末梢 NK 細胞表面受容体の発現頻度の比較
Frequencies (%) of ILT2 and 2B4 expression on Ca-CD56^{dim} NK cells and NCa-CD56^{dim} NK cells. * $p<0.05$, by the Wilcoxon signed-rank test.

3. 3. HCC 患者の NK^{dim} 細胞の ILT2 は末梢血より肝内で高く、癌部で高発現であった

さらに、同一 HCC 患者における CD56^{dim} NK 細胞の ILT2 の発現を末梢と肝内とで比較した。肝内 NK^{dim} 細胞は末梢 NK^{dim} 細胞よりも高い ILT2 レベルを示し、非癌部よりも癌部で高い発現を示した (図 17)。対照的に、CD56^{dim} NK 細胞上の 2B4 の発現レベルは、2 つの部位間で差がなかった (図 17)。これらの結果から、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 は患者の年齢によって変化している可能性があり、その発現は末梢血よりも肝内組織、特に肝細胞癌組織で高いことが示された。肝内 NK 細胞のマスサイトメトリーデータを使用した viSNE プロット解析では、赤で示す ILT2 陽性 NK^{dim} 細胞は、末梢血と同様で活性型受容体 NKp46、NKG2D、CD160、2B4 が低下しており、抑制型受容体 Tim-3、CD200R、Siglec-10 の発現を認めた (図 18)。これらの結果に基づき、本研究では抑制型受容体である ILT2 を HCC 患者における NK 細胞の機能分子として注目した。

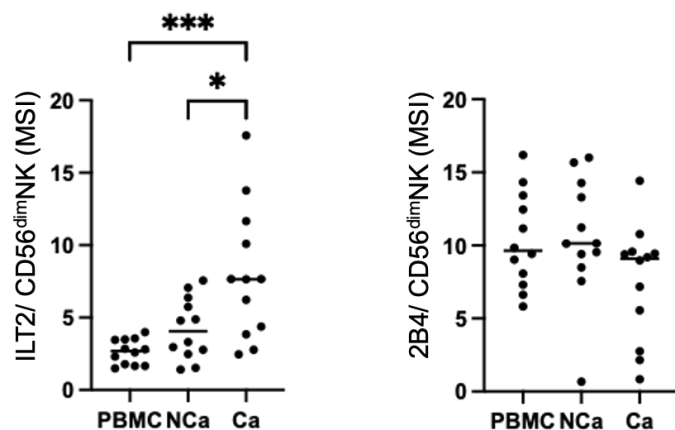


図 17 同一 HCC 患者の末梢血と肝内における CD56^{dim} NK 細胞表面受容体発現の比較

MSI values of ILT2 and 2B4 expression on peripheral, intrahepatic NCa, and Ca CD56^{dim} NK cells. * $p<0.05$, *** $p<0.001$, by the Friedman test with Dunn's multiple comparison test.

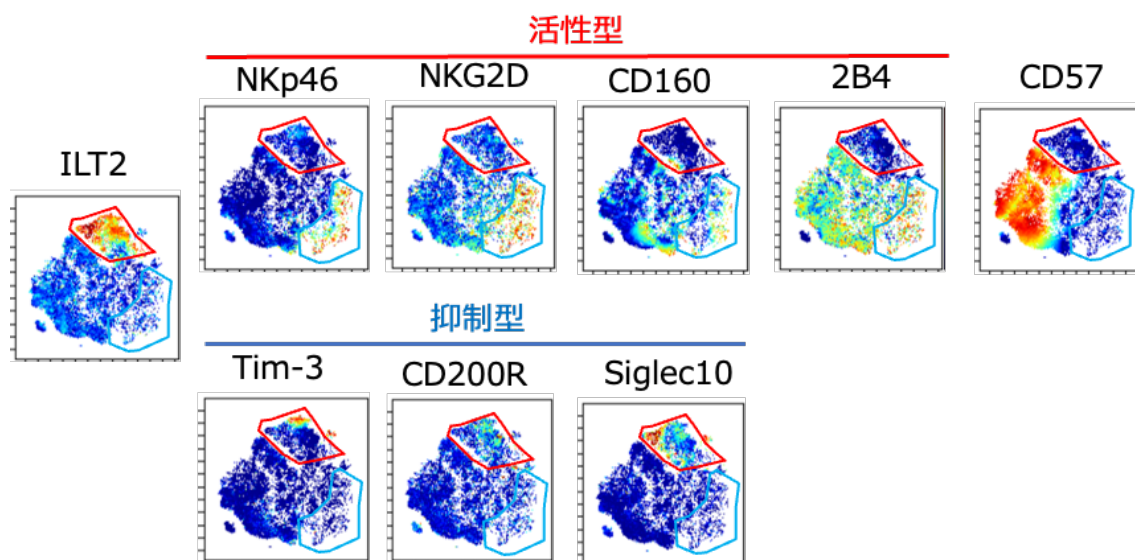


図 18 肝内 ILT2+NK^{dim}細胞の viSNE プロット

The panels show the expression of the indicated surface proteins: ILT2, NKp46, NKG2D, CD160, 2B4, CD57, Tim-3, CD200R and Siglec-10. The color scale indicates a gradient from high (red) to low (blue) expression of the relevant protein. The red circles indicate the intrahepatic ILT2+CD56^{dim} NK subpopulation.

4. CD56^{dim}NK 細胞における ILT2 発現誘導

4.1. HCC の存在により CD56^{dim}NK 細胞に ILT2 発現誘導させた

HCC 患者における CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 誘導のメカニズムを調べるため、HV から回収した NK 細胞と HCC 細胞株 (Huh7/PLC-PRF5/HLE) の in vitro 共培養を行った。CD56^{dim}NK 細胞上の ILT2 の発現は、Huh7 細胞の存在下で増加した (図 19)。この結果は、PLC-PRF5 細胞と HLE 細胞との共培養でもそれぞれ確認できた (図 20)。また、CD56^{dim}NK 細胞上の ILT2 の発現亢進は、トランスウェル挿入した Huh7 細胞との非接触型共培養でも減少しなかった (図 21)。この結果は、PLC-PRF5 細胞と HLE 細胞でもそれぞれ確認できた (図 22)。これらの結果から、HCC 細胞由来の可溶性因子が ILT2 の誘導に関与していることが示唆された。

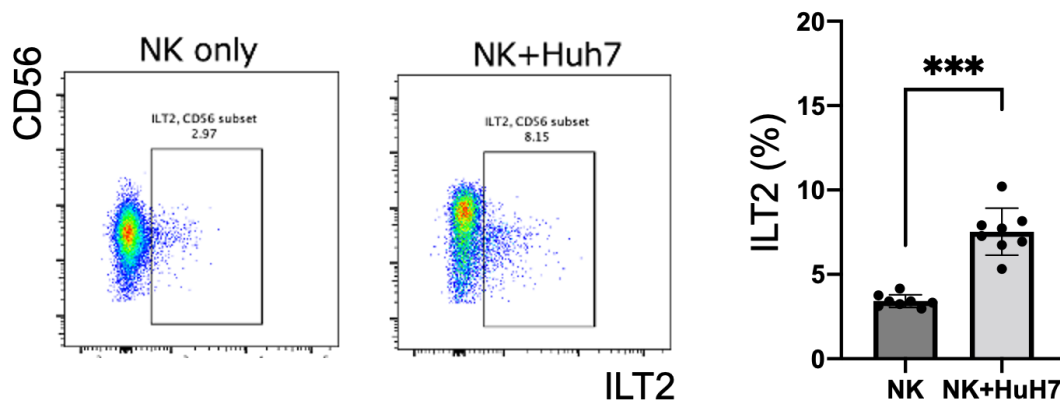


図 19 Huh7 細胞による CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 発現誘導

Representative flow cytometry plots showing the expression levels (%) of ILT2 on CD56^{dim} NK cells from NK cells only or NK cells co-cultured with Huh7 cells for 72 h with 1 ng/mL IL-15. *** $p<0.001$, by the Mann–Whitney U-test.

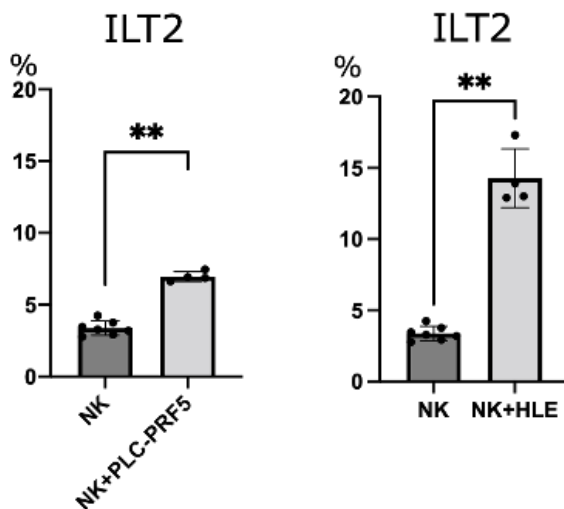


図 20 PLC-PRF5 細胞と HLE 細胞による CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 発現誘導
Expression levels (%) of ILT2 on CD56^{dim} NK cells from NK cells only or NK cells cocultured with PLC-PRF5 or HLE cells for 72 h with 1 ng/mL IL-15. ** $p<0.01$, by the Mann–Whitney U-test.

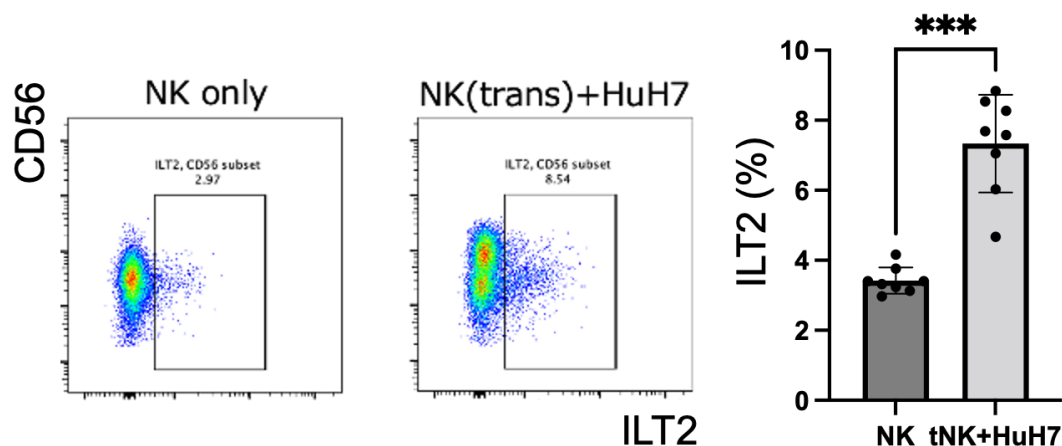


図 21 Huh7 細胞との非接触型共培養による $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞上の ILT2 発現誘導

Representative flow cytometry plots showing the expression levels (%) of ILT2 on $CD56^{\text{dim}}$ NK cells from NK cells only or NK cells co-cultured indirectly with Huh7 cells using transwell inserts for 72 h with 1 ng/mL IL-15. *** $p < 0.001$, by the Mann–Whitney U-test.

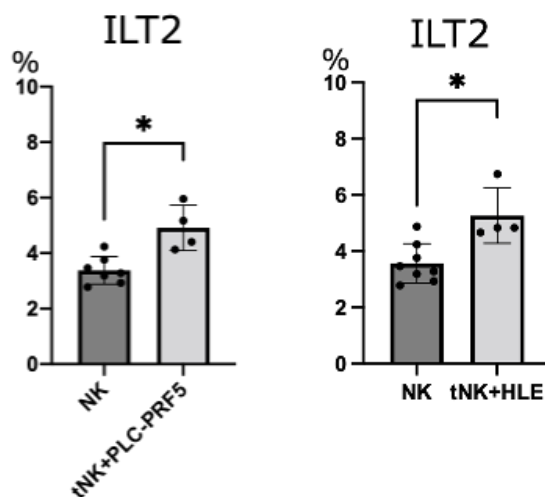


図 22 PLC-PRF5 細胞と HLE 細胞との非接触型共培養による $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞上の ILT2 発現誘導

Expression levels (%) of ILT2 on $CD56^{\text{dim}}$ NK cells from NK cells only or NK cells cocultured indirectly with PLC-PRF5 or HLE cells using transwell inserts for 72 h with 1 ng/mL IL-15. * $p < 0.05$, by the Mann–Whitney U-test.

4. 2. MIF が CD56^{dim}NK 細胞に ILT2 発現誘導した

液性因子による誘導を確認するために Huh7 細胞からの培養上清単独と培養したところ、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 発現が増加した (図 23)。続いて、Huh7 細胞の培養上清について 40 種類のケモカインとサイトカインを調べた。その結果、CCL21、CXCL5、CX3CL1、CXCL1、CXCL8、MIF、CCL20、CXCL12、CCL25 の濃度が Huh7 細胞上清中で高かった (図 24)。これらの因子の中で、MIF は他の PLC-PRF5 細胞 (図 25) と HLE 細胞 (図 26) の上清でも上昇した唯一の因子であった。次に、HV の NK 細胞を様々な濃度の recombinant MIF で培養し、ILT2 の発現を調べた。recombinant MIF は用量依存的に CD56^{dim} NK 細胞に ILT2 の発現を誘導した (図 27)。recombinant MIF により誘導された ILT2 陽性 NK^{dim} 細胞は、末梢血や肝内 ILT2 陽性 NK^{dim} 細胞の phenotype と同様、活性型受容体 NKp46、NKG2D、CD160 が低下しており、抑制型受容体 Siglec-10 の発現を認めました (図 28)。

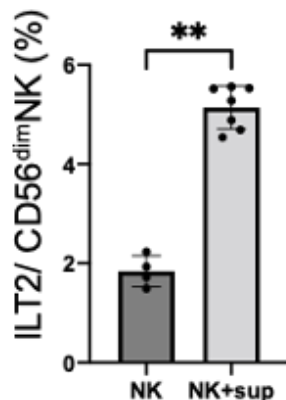


図 23 Huh7 培養上清による CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 発現誘導
Induction of ILT2 expression by culture supernatants of Huh7 cells. ** $p < 0.01$, by the Mann–Whitney U-test.

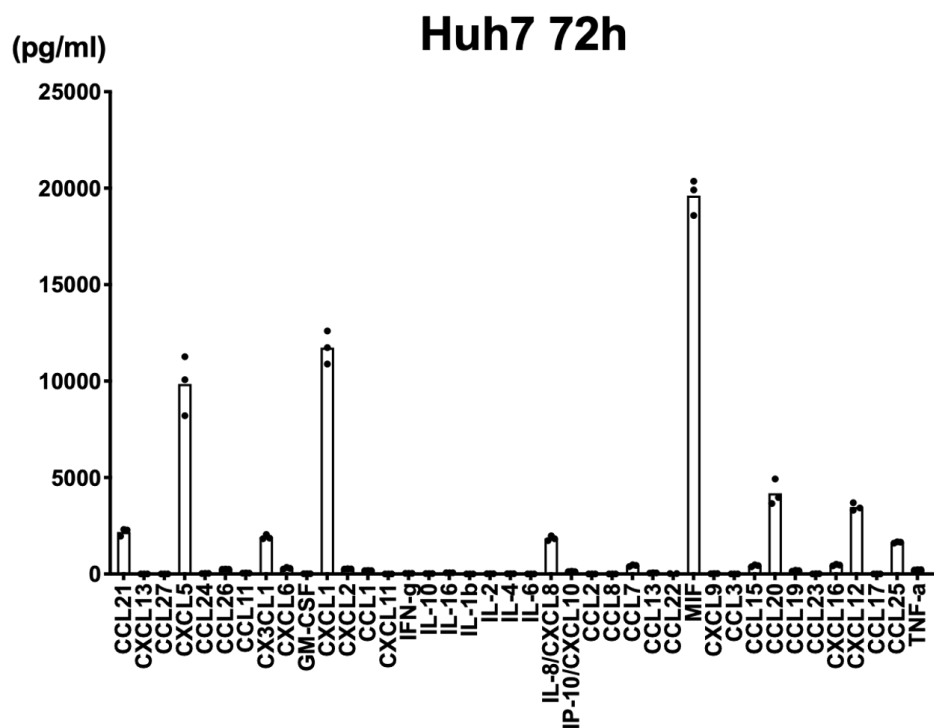


図 24 Huh7 細胞の培養上清中の 40 種類のケモカインとサイトカイン
Analysis of 40 chemokines and cytokines in culture supernatants of an HCC cell line (Huh7).

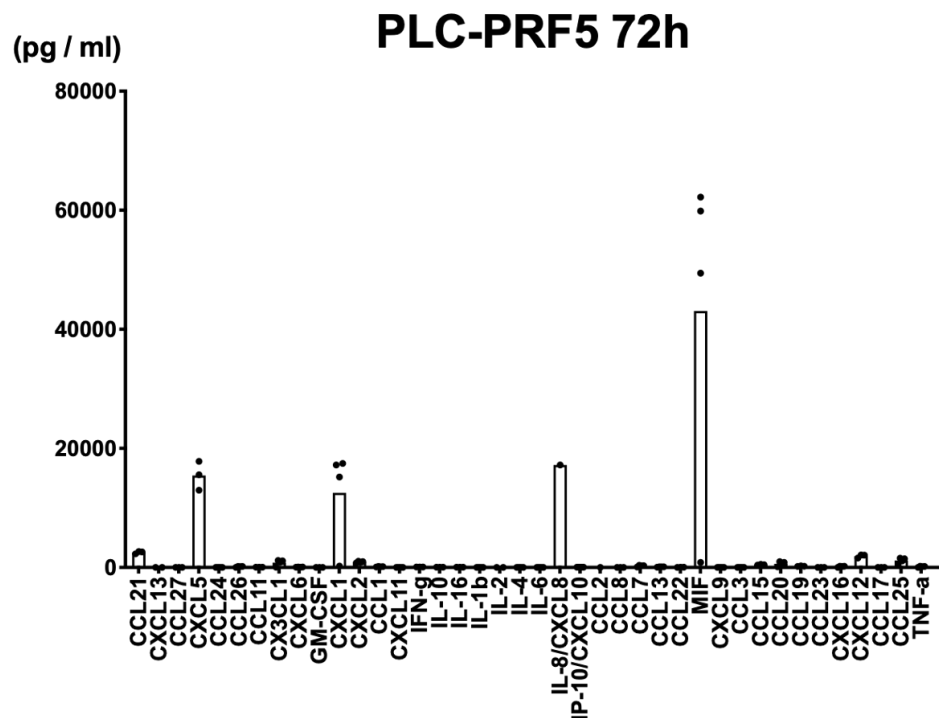


図 25 PLC-PRF5 細胞の培養上清中の 40 種類のケモカインとサイトカイン

Analysis of 40 chemokines and cytokines in culture supernatants of an HCC cell line (PLC-PRF5).

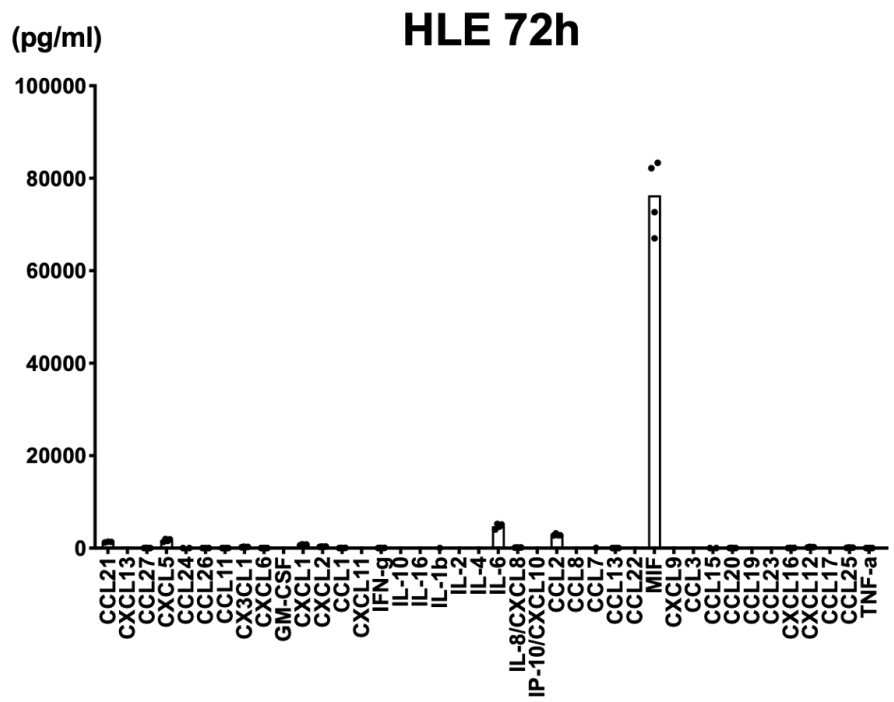


図 26 HLE 細胞の培養上清中の 40 種類のケモカインとサイトカイン
Analysis of 40 chemokines and cytokines in culture supernatants of an HCC cell line (HLE).

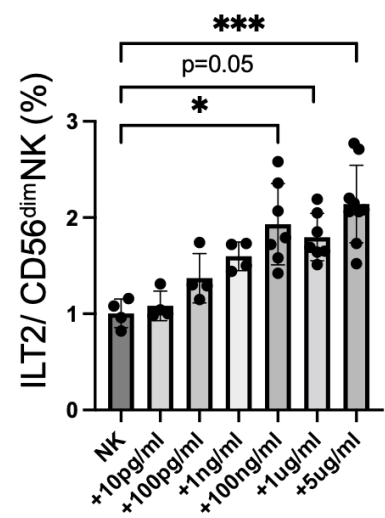


図 27 recombinant MIF による ILT2 発現誘導

Induction of ILT2 expression by recombinant MIF. $*p<0.05$, $***p<0.001$, by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

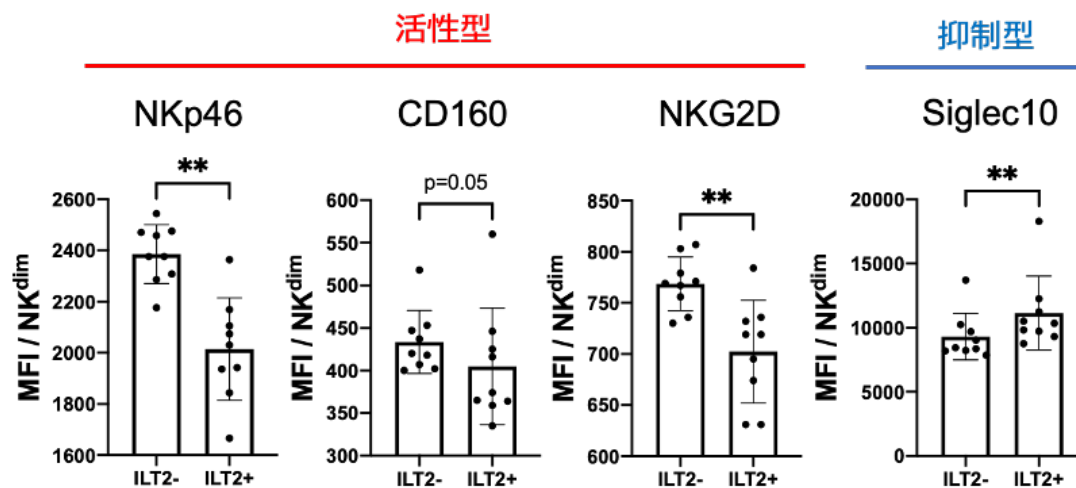


図 28 rMIF により誘導された ILT2+NK^{dim} 細胞の Phenotype
Expression levels of NKp46, CD160, NKG2D and Siglec-10 on ILT2-CD56^{dim} NK cells and ILT2+CD56^{dim} NK cells determined by flow cytometry. $**p<0.01$, by the Mann–Whitney U-test.

4. 3. CD56^{dim} NK 細胞への ILT2 発現誘導には MIF と CXCR4 が関与していた
MIF の受容体ファミリーには CXCR4、CXCR2 および CD74 が報告されている (Bernhagen et al., 2007)。フローサイトメトリーにて CD56^{dim} NK 細胞上のこれらの受容体の発現を調べたところ、CD74 および CXCR4 が発現していた (図 29)。続いて、CXCR4 および CD74 に対するマスキング抗体を用いてブロッキング実験を行った。MIF 存在下での CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現亢進は、抗 CXCR4 抗体処理後に減少した (図 30)。一方で、CXCR2 および CD74 に対する抗体では、ILT2 の発現亢進が抑制されなかった (図 30)。

さらに、NK 細胞と Huh7 細胞上清との共培養において抗 MIF 抗体および抗 CXCR4 抗体で処理することで NK 細胞上の ILT2 の発現亢進が抑制された (図 31)。したがって、HCC 由来の MIF とその受容体 CXCR4 は、CD56^{dim} NK 細胞における ILT2 の誘導に関与している可能性がある。

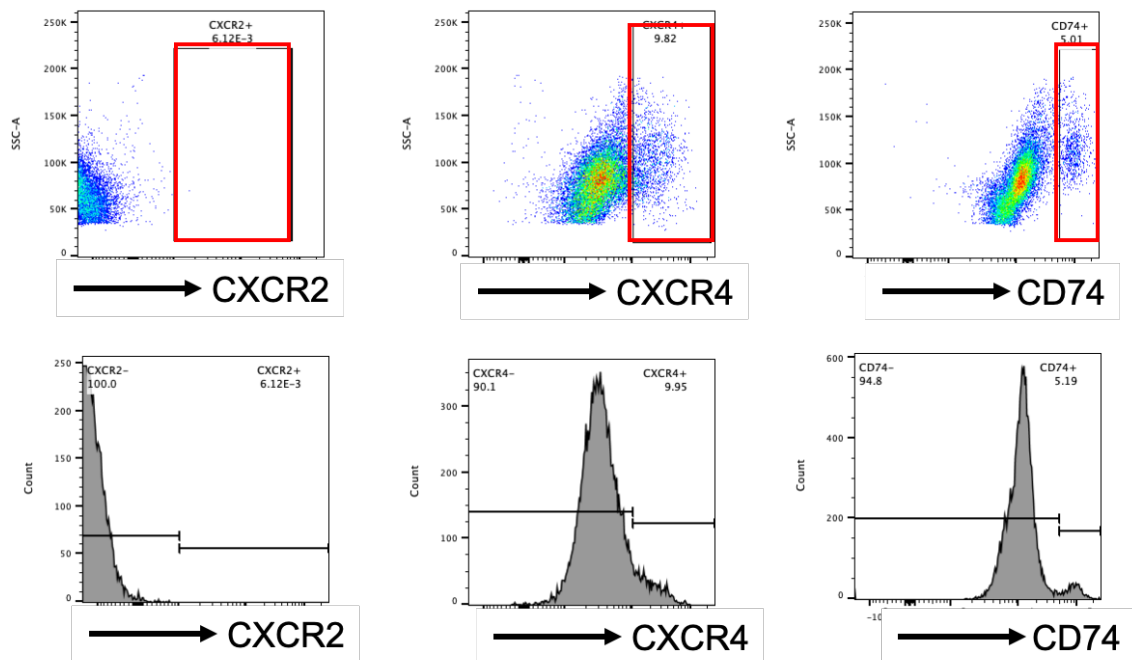


図 29 CD56^{dim} NK 細胞上の CXCR2、CXCR4 および CD74 の発現

Expression levels of CD74, CXCR4, and CXCR2 as receptors of MIF on CD56^{dim} NK cells determined by flow cytometry. Representative dot plots and histograms showing CXCR2⁺, CXCR4⁺, and CD74⁺ cells among CD56^{dim} NK cells are presented.

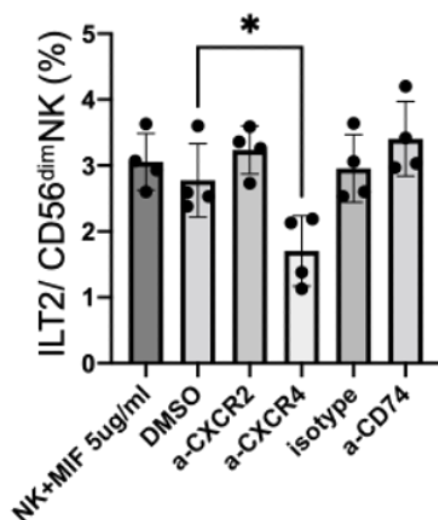


図 30 MIF による NK 細胞上への ILT2 発現誘導の抑制

Inhibition of induction of ILT2 expression by recombinant MIF (5 μ g/mL) for 48 h in the presence of CXCR2 antagonist, CXCR4 antagonist, anti-CD74 blocking

antibody, DMSO, or isotype antibody. $*p<0.05$, by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

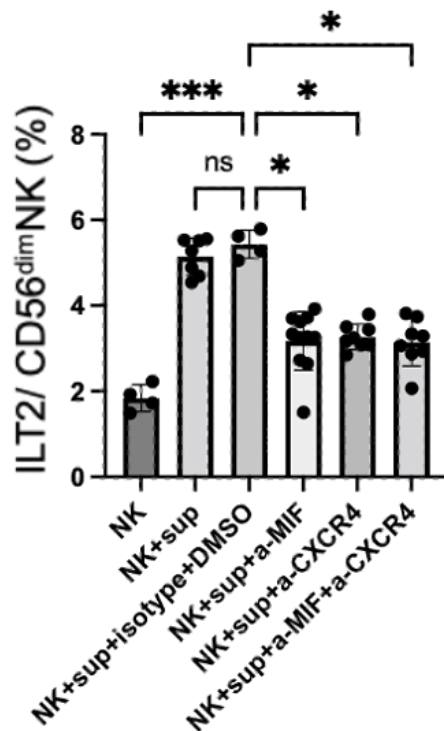


図 31 Huh7 細胞の培養上清による NK 細胞上への ILT2 発現誘導の抑制
Inhibition of induction of ILT2 expression by Huh7 cell culture supernatants for 48 h in the presence of CXCR4 antagonist, anti-MIF blocking antibody, CXCR4 antagonist, anti-MIF blocking antibody, DMSO, and isotype antibody. $*p<0.05$, $***p<0.001$, by the Kruskal–Wallis test with Dunn’s multiple comparison test.

5. ILT2 は CD56^{dim} NK 細胞の機能低下寄与分子である

5. 1. ILT2+CD56^{dim} NK 細胞は機能低下していた

HCC 患者と HV から回収した NK 細胞の機能を比較した。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 (図 32)。

次に、CD56^{dim} NK 細胞機能を ILT2 と NKp46 の発現の程度で ILT2+NKp46⁺細胞、ILT2-NKp46⁺細胞、ILT2-NKp46⁻細胞の 3 つの細胞サブセットに分けて細胞傷害活性と ADCC 活性を比較した。その結果、ILT2+CD56^{dim} NK 細胞は、NKp46 の発現にかかわらず、ILT2-NK 細胞と比較して機能低下していた (図 33)。

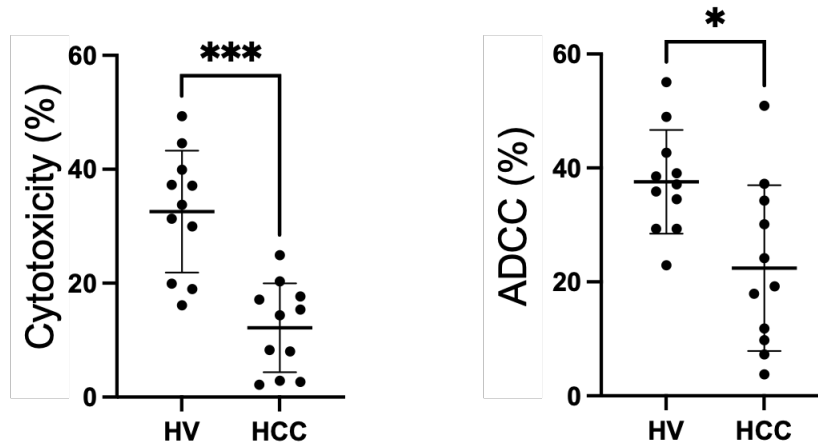


図 32 HCC 患者と HV の細胞傷害活性と ADCC 活性

Cytotoxicity and ADCC assays of peripheral NK cells from HVs and HCC patients against K562 cells treated with 200 U/mL IL-2 or Daudi cells treated with 10 μ g/mL rituximab were performed at 5:1 or 10:1 effector/target (E:T) ratios, respectively. * p <0.05, *** p <0.001, by the Mann–Whitney U-test.

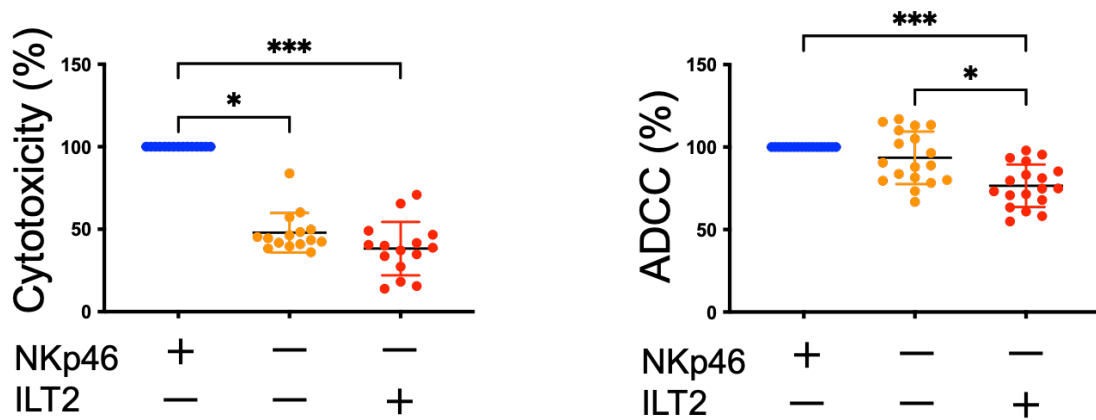


図 33 ILT2+CD56^{dim} NK 細胞の機能低下

NKp46⁺ILT2⁺, NKp46⁺ILT2⁻, or NKp46⁻ILT2⁻ subpopulations of CD56^{dim} NK cells were sorted by flow cytometry. Cytotoxicity and ADCC assays of these subpopulations against K562 cells treated with 200 U/mL IL-2 or Daudi cells treated with 10 μ g/mL rituximab were performed at 2.5:1 E:T ratio. The red plots represent NKp46⁻ILT2⁺ cells, the blue plots represent NKp46⁺ILT2⁻ cells, and the yellow plots represent NKp46⁻ILT2⁻ cells. * p <0.05, *** p <0.001, by the Friedman test with Dunn's multiple comparison test.

5. 2. 機能低下している ILT2+CD56^{dim}NK 細胞は抗 ILT2 抗体処理により機能回復した

NK 細胞の機能制御の標的としての ILT2 の可能性を評価するために、ILT2 に対するマスキング抗体存在下で NK 細胞の細胞傷害活性および ADCC 活性を評価した。抗 ILT2 抗体処理後、NK 細胞の機能改善を認めた (図 34)。

さらに、ILT2 のリガンドである HLA-G は、非癌組織よりも HCC 癌組織で高発現していた (図 35)。

これらの結果は、ILT2 が CD56^{dim} NK 細胞の機能的分子であり、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。

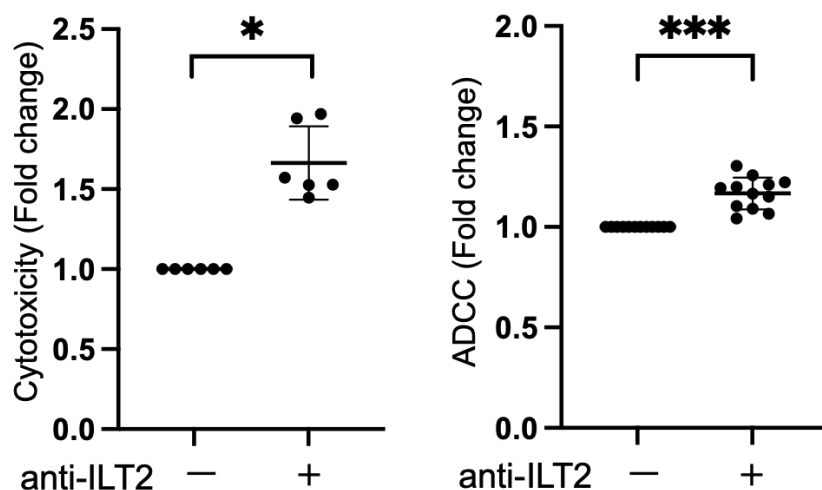


図 34 抗 ILT2 抗体処理による ILT2+CD56^{dim} NK 細胞の機能回復

Functional recovery of ILT2⁺CD56^{dim} NK cells by anti-ILT2 blocking antibody treatment. The cytotoxicity and ADCC assays of ILT2⁺CD56^{dim} NK cells treated with anti-ILT2 blocking antibody. The cytotoxicity and ADCC capacities of ILT2⁺CD56^{dim} NK cells with anti-ILT2 blocking antibody treatment were evaluated by the fold changes in the presence or absence of the anti-ILT2 blocking antibody. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, by the Mann–Whitney U-test.

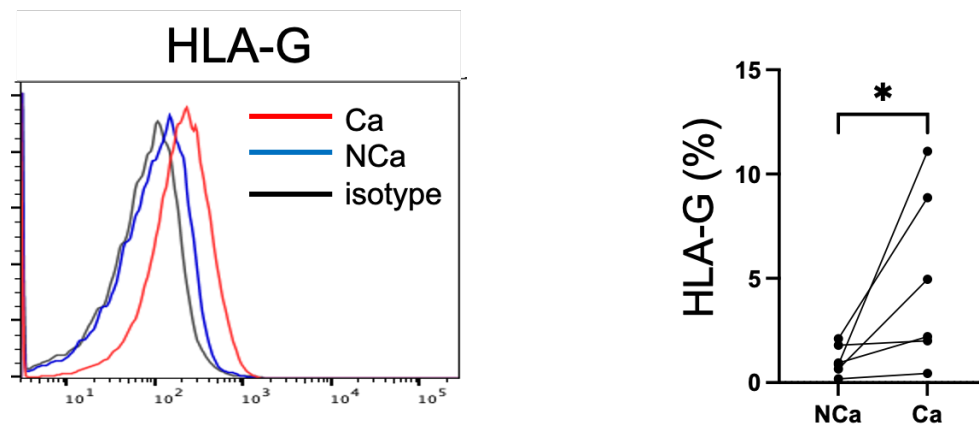


図 35 非癌組織 (NCa) および HCC 癌組織 (Ca) における HLA-G の発現
 Histograms showing the expression levels (%) of HLA-G on NCa and Ca liver tissue evaluated by flow cytometry. The red, blue, and black lines indicate Ca liver tissue, NCa liver tissue, or isotype, respectively. * $p < 0.05$, by the Mann–Whitney U-test.

考察

NK 細胞は腫瘍免疫における重要な役割を担っているが、HCC の腫瘍微小環境 (TME) において機能低下している (Sung and Jang, 2018)。本研究では、NK 細胞に対する加齢の影響を明らかにし、HCC 患者における CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現上昇を同定した。ILT2 は MIF によって発現誘導され、NK 細胞の機能を低下させた。

加齢は免疫系に影響を及ぼし、免疫細胞の機能に影響を与える生物学的プロセスである。加齢に関連した T 細胞の機能不全は多く報告されているが (Carrasco et al., 2022)、NK 細胞の加齢との関係についてはまだ議論の余地がある。我々は、CD56^{dim} NK 細胞の頻度が加齢とともに増加すること (図 6)、ILT2 を含むいくつかの抑制型受容体の発現が加齢と正の相関を示す一方、活性型受容体の発現は逆の相関を示すことを見出した (図 7)。我々のデータは、疾患群における NK 細胞の表面受容体は、年齢を一致させた上で健常ボランティアのものと比較すべきであることを示した。

年齢と性別をマッチさせた HCC 患者と HV の比較において HCC 患者では CD56^{dim} NK 細胞の頻度が HV に比べて減少しており (図 9)、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現上昇していることを見出した (図 11、12)。さらに、HCC 癌部組織では非癌部組織と比較して CD56^{dim} NK 細胞の頻度は低下しており (図 14)、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 が発現上昇していることを明らかにした (図 15、16、17)。

ILT2 は 1997 年に NK 細胞で初めて発見され、その他に T 細胞、B 細胞、樹状細胞 (DC) など免疫細胞に広く発現しており、**Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)** を持つ抑制型受容体である (Samaridis and Colonna, 1997)。ILT2 は HLA-A/B/C に加え、非古典的な MHC クラス I 分子である HLA-G とも相互作用することが報告されている (Colonna et al., 1997)。HLA-G はヒトの胎盤の栄養膜細胞に発現しており (Kovats et al., 1990)、ILT2 との相互作用により子宮内の脱落膜 NK 細胞の抑制を介して、胎児-母体の免疫寛容に寄与している (Xu et al., 2020)。

ILT2-HLA-G 相互作用は、NK 細胞の機能不全を引き起こす免疫チェックポイントと考えられている。NK 細胞における ILT2 の発現亢進は、がん、自己免疫疾患、慢性感染症など様々な病態で報告されている (Wang et al., 2014b)。トリプルネガティブ乳がん (TNBC) や膠芽腫患者では、末梢 NK 細胞上の ILT2 発現が上昇し、ILT2 が上昇した末梢 NK 細胞は機能低下を起こしている (Roberti et al., 2015) (Lorenzo-Herrero et al., 2023)。HCC

患者では、HLA-G の発現は進行した病期と強く関連しているが、HCC 患者における NK 細胞上の ILT2 のような HLA-G 受容体の発現については、未だ研究されていなかった (Amiot et al., 2015)。

本研究では HCC 癌部組織で CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現上昇していることを明らかにし (図 15、16、17)、HLA-G が非癌組織よりも癌組織で高発現していることを見出した (図 35)。

NK 細胞における ILT2 発現上昇のメカニズムは、腫瘍を有する状態との関連において、まだ明らかにされていない。以前の研究では、TGF- β が CD56^{dim}CD16⁺ NK 細胞上の ILT2 発現亢進に関与している可能性が示唆され、NK 細胞の機能低下やアポトーシス感受性と関連していた (Zhang et al., 2022)。本研究では、CD56^{dim} NK 細胞上の ILT2 の発現が HCC 癌組織に局在するほど増加しており、肝癌細胞の存在により誘導されたことから (図 19-23)、肝臓の TME で増減する因子が NK 細胞の表現型変化に関与している可能性が示唆された。

肝細胞由来の液性因子を探索したところ、TGF- β ではなく MIF が NK 細胞の ILT2 発現を増加させる要因の一つであることを見出した (図 24-27)。MIF は、TNF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生を促進し、敗血症、炎症反応、自己免疫疾患の発症に関与している自然免疫応答の重要な制御因子である (Calandra and Roger, 2003)。

腫瘍由来 MIF の免疫調節的役割は以前にも報告されており、MIF の過剰発現は HCC、卵巣癌、悪性黒色腫の腫瘍進行と免疫逃避機構に寄与していた (Ren et al., 2003, Krockenberger et al., 2008, Repp et al., 2000)。具体的には、MIF の mRNA の発現は、正常肝組織と比較して HCC 組織で上昇し (Ren et al., 2003)、HCC 組織における MIF の発現レベルは、隣接する非腫瘍肝組織よりも高く (Wang et al., 2014a)、ヒトの HCC では、がん関連線維芽細胞 (CAF) が MIF を分泌し、これが骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) をリクルートして免疫抑制的な微小環境を作っていることが報告されている (Zhu et al., 2023)。また、MIF が悪性黒色腫によって誘導され、NK 細胞を介した細胞傷害活性を阻害すると報告されている (Repp et al., 2000)。

MIF は、CD74/CD44、ケモカイン受容体 CXCR2、CXCR4 シグナル伝達経路を介して、CAF と B 細胞、DC、MDSC、単球、NK 細胞、T 細胞などの免疫細胞との相互作用することで免疫系を制御する (Krockenberger et al., 2008, Calandra and Roger, 2003, Zhu et al., 2023)。本研究では、MIF と相互作用する NK 細胞上の受容体は CXCR2 や CD74 ではなく、CXCR4 が関与していることがわかった (図 29-31)。

HCC に対する免疫エフェクターとしての NK 細胞の役割は、臨床の間ではまだ十分に確立されていない。現在、免疫疲弊した CD8+T 細胞の再活性化は、ICI を用いた進行肝細胞癌治療の主要なアプローチの一つである。しかしながら、アテゾリズマブとベバシズマブの一次治療で HCC 患者の 20% が進行性病変を示すことを考慮すると (Finn et al., 2020)、NK 細胞を介した細胞傷害活性を加えることは、ICI に対する一次抵抗性を克服するために有効である可能性がある。

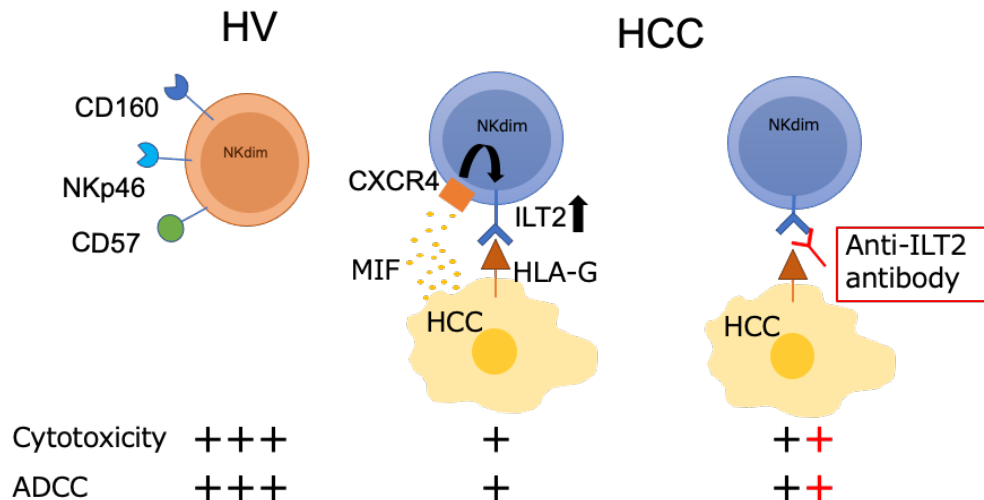
本研究で HCC 患者において NK 細胞の細胞傷害活性と ADCC 活性が低下しており、HCC 癌部において発現上昇していた ILT2+NK 細胞の細胞傷害活性と ADCC 活性が低下していたことを明らかにした (図 32、33)。また、HLA-G が非癌組織よりも癌組織で高発現していたことから (図 35)、癌組織局所での免疫逃避において ILT2-HLA-G 相互作用が関与している可能性を初めて報告した。

HCC に対する NK 細胞治療では、HCC の 70% に発現しているが正常肝細胞には発現していないグリピカン-3 (GPC-3) を標的とする抗体を用いた NK 細胞の ADCC 活性による HCC 細胞を直接標的とした検討では、全生存期間の改善を認めなかった (Ishiguro et al., 2008)。この結果には、ILT2-HLA-G 相互作用による NK 細胞の機能低下が影響していた可能性がある。本研究では、抗 ILT2 抗体の添加が *in vitro* での ADCC 活性を改善したことから、ILT2 またはそのリガンドである HLA-G を標的とすることが、今後の研究の選択肢となりうることが示唆された。

結論

1. 加齢に伴い、健常人の NK 細胞は ILT2 を含む抑制型受容体の発現が亢進し、活性型受容体の発現が減少した。
2. 年齢と性別をマッチさせた HCC 患者と HV の比較では、HCC 患者において $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞の頻度が HV に比べて減少し、ILT2 を含む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た。
3. 癌部 $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞の頻度は低下し、癌部 $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞において ILT2 の発現と頻度が上昇していた。
4. HCC の存在により $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞に ILT2 が発現誘導され、 $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞への ILT2 発現誘導には MIF と CXCR4 が関与していた。
5. ILT2+ $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞は細胞傷害活性と ADCC 活性が低下していたが、機能低下している ILT2+ $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞は抗 ILT2 抗体処理により機能回復した。

Graphic abstract



今後は同一 HCC 患者における血清 MIF 濃度や肝組織での MIF 発現と PBMC 及び IHL における ILT2+ $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞の発現について検討する必要がある。

また、ICI 治療患者の治療効果と血清 MIF 濃度と末梢血 ILT2+ $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞の発現について検討が必要と考える。

さらに、HLA-G 発現 HCC 細胞を用いた動物実験モデルにおいて ILT2+ $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞、ILT2- $CD56^{\text{dim}}$ NK 細胞と抗 ILT2 抗体の治療効果について検討するべきだと考える。

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、由雄祥代肝疾患研究部室長（現 免疫病態研究部テニユアトラック部長）、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I 武冨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 22fk0210110、22fk0210094) と、科学研究費補助金 (grant number 21K08020) より、研究助成を得たものである。

利益相反

Sachiyo Yoshio has received a lecture fee from Gilead Sciences.

Takanori Ito has received lecture fees from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. and AstraZeneca, and a research grant from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.

Hidenori Toyoda has received lecture fees from Gilead Sciences, AbbVie, Eisai, Fujifilm WAKO, Terumo, Kowa, Takeda and AstraZeneca.

Takumi Kawaguchi has received lecture fees from Janssen Pharmaceutical, Taisho Pharmaceutical, Kowa Company, Otsuka Pharmaceutical, Eisai, ASKA Pharmaceutical, AbbVie, and EA Pharma.

Akinobu Taketomi has received a research grant from Ono Pharmaceutical Co.

Tatsuya Kanto has received lecture fees from Gilead Sciences and AbbVie.

All other authors declare no competing interests.

引用文献

- AMIOT, L., VU, N. & SAMSON, M. 2015. Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. *J Hepatol*, 62, 1430-7.
- BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J. L., ZERNECKE, A., KOENEN, R., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S. R., BUCALA, R., HICKEY, M. J. & WEBER, C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13, 587-96.
- BRUIX, J., TAKAYAMA, T., MAZZAFERRO, V., CHAU, G. Y., YANG, J., KUDO, M., CAI, J., POON, R. T., HAN, K. H., TAK, W. Y., LEE, H. C., SONG, T., ROAYAIE, S., BOLONDI, L., LEE, K. S., MAKUUCHI, M., SOUZA, F., BERRE, M. A., MEINHARDT, G., LLOVET, J. M. & INVESTIGATORS, S. 2015. Adjuvant sorafenib for hepatocellular carcinoma after resection or ablation (STORM): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*, 16, 1344-54.
- CALANDRA, T. & ROGER, T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 791-800.
- CARRASCO, E., GOMEZ DE LAS HERAS, M. M., GABANDE-RODRIGUEZ, E., DESDIN-MICO, G., ARANDA, J. F. & MITTELBRUNN, M. 2022. The role of T cells in age-related diseases. *Nat Rev Immunol*, 22, 97-111.
- CHEW, V., CHEN, J., LEE, D., LOH, E., LEE, J., LIM, K. H., WEBER, A., SLANKAMENAC, K., POON, R. T., YANG, H., OOI, L. L., TOH, H. C., HEIKENWALDER, M., NG, I. O., NARDIN, A. & ABASTADO, J. P. 2012. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut*, 61, 427-38.
- COLONNA, M., NAVARRO, F., BELLON, T., LLANO, M., GARCIA, P., SAMARIDIS, J., ANGMAN, L., CELLA, M. & LOPEZ-BOTET, M. 1997. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med*, 186, 1809-18.
- FINN, R. S., QIN, S., IKEDA, M., GALLE, P. R., DUCREUX, M., KIM, T. Y., KUDO, M., BREDER, V., MERLE, P., KASEB, A. O., LI, D., VERRET, W., XU, D. Z., HERNANDEZ, S., LIU, J., HUANG, C., MULLA, S., WANG, Y., LIM, H. Y., ZHU, A. X., CHENG, A. L. & INVESTIGATORS, I. M. 2020. Atezolizumab plus

- Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 382, 1894-1905.
- HADAD, U., THAULAND, T. J., MARTINEZ, O. M., BUTTE, M. J., PORGADOR, A. & KRAMS, S. M. 2015. NKp46 Clusters at the Immune Synapse and Regulates NK Cell Polarization. *Front Immunol*, 6, 495.
- HAZELDINE, J. & LORD, J. M. 2013. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*, 12, 1069-78.
- ISHIGURO, T., SUGIMOTO, M., KINOSHITA, Y., MIYAZAKI, Y., NAKANO, K., TSUNODA, H., SUGO, I., OHIZUMI, I., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T., KODAMA, T., TSUCHIYA, M. & YAMADA-OKABE, H. 2008. Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer. *Cancer Res*, 68, 9832-8.
- KIMBALL, A. K., OKO, L. M., BULLOCK, B. L., NEMENOFF, R. A., VAN DYK, L. F. & CLAMBEY, E. T. 2018. A Beginner's Guide to Analyzing and Visualizing Mass Cytometry Data. *J Immunol*, 200, 3-22.
- KOVATS, S., MAIN, E. K., LIBRACH, C., STUBBLEBINE, M., FISHER, S. J. & DEMARS, R. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science*, 248, 220-3.
- KROCKENBERGER, M., DOMBROWSKI, Y., WEIDLER, C., OSSADNIK, M., HONIG, A., HAUSLER, S., VOIGT, H., BECKER, J. C., LENG, L., STEINLE, A., WELLER, M., BUCALA, R., DIETL, J. & WISCHHUSEN, J. 2008. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D. *J Immunol*, 180, 7338-48.
- LLOVET, J. M., KELLEY, R. K., VILLANUEVA, A., SINGAL, A. G., PIKARSKY, E., ROAYAIE, S., LENCIONI, R., KOIKE, K., ZUCMAN-ROSSI, J. & FINN, R. S. 2021. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 7, 6.
- LORENZO-HERRERO, S., SORDO-BAHAMONDE, C., MARTINEZ-PEREZ, A., CORTE-TORRES, M. D., FERNANDEZ-VEGA, I., SOLIS-HERNANDEZ, M. P. & GONZALEZ, S. 2023. Immunoglobulin-like transcript 2 blockade restores antitumor immune responses in glioblastoma. *Cancer Sci*, 114, 48-62.
- QIN, S., CHEN, M., CHENG, A. L., KASEB, A. O., KUDO, M., LEE, H. C., YOPP, A. C., ZHOU, J., WANG, L., WEN, X., HEO, J., TAK, W. Y., NAKAMURA, S., NUMATA, K., UGUEN, T., HSIEHCHEN, D., CHA, E., HACK, S. P., LIAN, Q., MA, N., SPAHN, J. H., WANG, Y., WU, C., CHOW, P. K. H. & INVESTIGATORS, I. M. 2023. Atezolizumab plus bevacizumab versus active surveillance in patients with

- resected or ablated high-risk hepatocellular carcinoma (IMbrave050): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*, 402, 1835-1847.
- REN, Y., TSUI, H. T., POON, R. T., NG, I. O., LI, Z., CHEN, Y., JIANG, G., LAU, C., YU, W. C., BACHER, M. & FAN, S. T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 107, 22-9.
- REPP, A. C., MAYHEW, E. S., APTE, S. & NIEDERKORN, J. Y. 2000. Human uveal melanoma cells produce macrophage migration-inhibitory factor to prevent lysis by NK cells. *J Immunol*, 165, 710-5.
- ROBERTI, M. P., JULIA, E. P., ROCCA, Y. S., AMAT, M., BRAVO, A. I., LOZA, J., COLO, F., LOZA, C. M., FABIANO, V., MAINO, M., PODHORZER, A., FAINBOIM, L., BARRIO, M. M., MORDOH, J. & LEVY, E. M. 2015. Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. *Eur J Immunol*, 45, 1560-9.
- ROSEN, H. R. & GOLDEN-MASON, L. 2020. Control of HCV Infection by Natural Killer Cells and Macrophages. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10.
- SAKAMOTO, Y., YOSHIO, S., DOI, H., MORI, T., MATSUDA, M., KAWAI, H., SHIMAGAKI, T., YOSHIKAWA, S., AOKI, Y., OSAWA, Y., YOSHIDA, Y., ARAI, T., ITOKAWA, N., ATSUKAWA, M., ITO, T., HONDA, T., MISE, Y., ONO, Y., TAKAHASHI, Y., SAIURA, A., TAKETOMI, A. & KANTO, T. 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.
- SAMARIDIS, J. & COLONNA, M. 1997. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol*, 27, 660-5.
- SUN, H., LIU, L., HUANG, Q., LIU, H., HUANG, M., WANG, J., WEN, H., LIN, R., QU, K., LI, K., WEI, H., XIAO, W., SUN, R., TIAN, Z. & SUN, C. 2019. Accumulation of Tumor-Infiltrating CD49a(+) NK Cells Correlates with Poor Prognosis for Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Immunol Res*, 7, 1535-1546.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SUNG, P. S. & JANG, J. W. 2018. Natural Killer Cell Dysfunction in Hepatocellular Carcinoma: Pathogenesis and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*, 19.

- WANG, D., LUO, L., CHEN, W., CHEN, L. Z., ZENG, W. T., LI, W. & HUANG, X. H. 2014a. Significance of the vascular endothelial growth factor and the macrophage migration inhibitory factor in the progression of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 31, 1199-204.
- WANG, X., MENG, X., ZHENG, Y., JIANG, J., YANG, B., LIU, Y., ZHAI, F. & CHENG, X. 2014b. Increased frequency of ILT2-expressing CD56(dim)CD16(+) NK cells correlates with disease severity of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 94, 469-74.
- XU, X., ZHOU, Y. & WEI, H. 2020. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. *Front Immunol*, 11, 592010.
- YAMASHITA, M., KITANO, S., AIKAWA, H., KUCHIBA, A., HAYASHI, M., YAMAMOTO, N., TAMURA, K. & HAMADA, A. 2016. A novel method for evaluating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by flowcytometry using cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*, 6, 19772.
- YOSHIDA, Y., YOSHIO, S., YAMAZOE, T., MORI, T., TSUSTUI, Y., KAWAI, H., YOSHIKAWA, S., FUKUHARA, T., OKAMOTO, T., ONO, Y., TAKAHASHI, Y., HASHIDA, R., KAWAGUCHI, T., TAKETOMI, A. & KANTO, T. 2021. Phenotypic Characterization by Single-Cell Mass Cytometry of Human Intrahepatic and Peripheral NK Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cells*, 10.
- YU, Y. 2023. The Function of NK Cells in Tumor Metastasis and NK Cell-Based Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 15.
- ZHANG, Y., TONG, S., LI, S., WANG, X., REN, H. & YIN, W. 2022. Increased ILT2 expression contributes to dysfunction of CD56(dim)CD16(+)NK cells in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res*, 205, 105385.
- ZHU, G. Q., TANG, Z., HUANG, R., QU, W. F., FANG, Y., YANG, R., TAO, C. Y., GAO, J., WU, X. L., SUN, H. X., ZHOU, Y. F., SONG, S. S., DING, Z. B., DAI, Z., ZHOU, J., YE, D., WU, D. J., LIU, W. R., FAN, J. & SHI, Y. H. 2023. CD36(+) cancer-associated fibroblasts provide immunosuppressive microenvironment for hepatocellular carcinoma via secretion of macrophage migration inhibitory factor. *Cell Discov*, 9, 25.