

Title	CD1D-MEDIATED STIMULATION OF NATURAL KILLER T CELLS SELECTIVELY ACTIVATES HEPATIC NATURAL KILLER CELLS TO ELIMINATE EXPERIMENTALLY DISSEMINATED HEPATOMA CELLS IN MURINE LIVER.
Author(s)	宮城, 琢也
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45289
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	宮 城 琢 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 0 1 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 4 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学 位 論 文 名	CD1D-MEDIATED STIMULATION OF NATURAL KILLER T CELLS SELECTIVELY ACTIVATES HEPATIC NATURAL KILLER CELLS TO ELIMINATE EXPERIMENTALLY DISSEMINATED HEPATOMA CELLS IN MURINE LIVER. (CD1d 分子を介した NKT 細胞活性化により肝臓に選択的に誘導される活 性化 NK 細胞を用いた微小肝細胞癌に対する治療)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 林 紀 夫 (副査) 教 授 門 田 守 人 教 授 青 笹 克 之

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

近年、肝細胞癌の発生率は上昇の一途をたどり、今後罹患患者数の増加が予想される。肝細胞癌に対する治療としては、手術、肝動脈塞栓術、経皮エタノール注入療法、ラジオ波焼灼療法といったものが、局所療法としてある程度良好な成績をおさめている。一方で、特に再発症例で頻繁に認める肝臓内微小播種性病変に対しては対処が困難であり、免疫療法を含めた新たな治療法の開発が求められている。

NKT 細胞は、NK 細胞の表面マーカーと単一の T 細胞受容体を有し、樹状細胞などの抗原提示細胞が CD1d 分子とともに提示する糖脂質をリガンドとして認識する。糖脂質の一種である α -galactosylceramide (α -GalCer) により CD1d 分子を介して NKT 細胞は活性化され IFN- γ や IL-4 などのサイトカインを分泌し、抗腫瘍免疫に関与するとの報告がある。NKT 細胞は臓器により偏った分布を示し、特に肝臓で豊富に存在すると言われる。そこで、NKT 細胞を活性化させることにより、肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫が誘導されるか、およびそのメカニズムについて動物モデルを用いて検討した。

〔方法ならびに成績〕

6～8 週齢・雌の BALB/c マウスに対して、同マウス由来肝細胞癌株 BNL1MEA.7R.1 (BNL) を用いて、経脾的注入による肝臓内散布モデルを作成した。腫瘍細胞注入後 1、5、9 日に α -GalCer あるいはコントロールとして Vehicle を腹腔内投与し、3 週目に腫瘍形成評価を行った。

1. 肝臓での腫瘍形成評価の結果、Vehicle 投与群は、肝臓に明らかな腫瘍形成を認めたものの、 α -GalCer 投与群は腫瘍形成を認めなかった。統計学的評価のため、肝重量を測定したところ、 α -GalCer 投与群は Vehicle 投与群に比し有意に軽量であった。以上の結果より、 α -GalCer を投与することにより肝細胞癌に対する抗腫瘍効果が肝臓内で認められることが示された。

2. 腫瘍細胞を皮下に接種したところ、 α -GalCer 投与群、Vehicle 投与群ともに腫瘍形成を認め、腫瘍径においても両群間で有意差を認めなかった。以上の結果より、肝臓では認めた α -GalCer 投与による抗腫瘍効果が末梢の皮下組

織においては認められないことが示された。

3. 腫瘍細胞を経脾的に肝内に注入した後4日目の肝組織を検討したところ、腫瘍細胞からなる病巣が α -GalCer 投与群、Vehicle 投与群ともに肝臓内に散在して認められた。免疫組織染色にて、リンパ球が病巣部に浸潤している像が α -GalCer 投与群において認められ、Vehicle 投与群ではほとんど認められなかった。この結果より、 α -GalCer 投与による肝臓内での抗腫瘍効果には、肝臓内リンパ球が関与していることが示唆された。

4. α -GalCer 投与後の単核球分画の変化について肝臓と肝臓外組織（脾臓、血液、リンパ節）とで比較検討した。肝臓において、 α -GalCer 投与により NK 細胞分画が選択的に著明に増加した。脾臓、血液、リンパ節においては、NK 細胞分画の増加は認められなかった。

5. α -GalCer 投与による単核球の細胞傷害活性の変化について比較検討した。 α -GalCer 投与によって肝臓内単核球の BNL をターゲットとする細胞傷害活性は著明に増大した。対照的に、この変化は肝外組織である脾臓、血液、リンパ節では認められなかった。 α -GalCer 投与マウスの肝臓内単核球を、NK 細胞マーカーである DX5 によって、その陽性分画と陰性分画に単離した上でそれぞれの細胞傷害活性を調べたところ、DX5 陽性分画は単離前の単核球よりも効果的な細胞傷害活性を示し、対照的に DX5 陰性分画はまったく細胞傷害活性を示さなかった。さらに、 α -GalCer 投与マウスと Vehicle 投与マウスとから、肝臓および肝外組織の DX5 陽性細胞を単離し細胞傷害活性を比較した。肝臓においては、 α -GalCer 投与マウスから単離した DX5 陽性細胞は、先と同様効果的な傷害活性を示したが、Vehicle 投与マウスから単離した DX5 陽性細胞はほとんど傷害活性を示さなかった。一方、肝外組織では、いずれもほとんど傷害活性を示さなかった。この結果から、DX5 陽性細胞すなわち NK 細胞は、肝臓において選択的に、 α -GalCer 投与により細胞傷害活性を増強させることが示された。

6. *In vivo* にて抗アシアロ GM1 抗体を投与することにより NK 細胞を欠失させると、 α -GalCer 投与による抗腫瘍効果が消失した。この結果より、 α -GalCer 投与による抗腫瘍効果には NK 細胞の存在が必須であることが示された。

〔総括〕

肝細胞癌は、癌化肝細胞の集団から成る微小な病巣から増大していくことから考えると、肝臓内に出現するそれら微小病変部を排除することで、肝細胞癌の発育進展を防御できる可能性がある。

今回我々は α -GalCer 投与によって CD1d を介して NKT 細胞を活性化することにより、肝臓内に選択的に NK 細胞の活性化が起こり、そのことで癌化肝細胞の効果的な殺傷排除の可能性のあることを *in vivo* および *in vitro* で示した。

肝臓に豊富に含まれるこれら先天免疫細胞を連鎖的に活性化させることが、肝細胞癌の進展を制御できる新たな治療法となることを期待する。

論文審査の結果の要旨

本論文は、マウスモデルを用いて α -galactosylceramide (α -GalCer) による CD1d 分子を介した NKT 細胞活性化により肝細胞癌に対する抗腫瘍免疫が誘導されるか、およびそのメカニズムについて肝臓と肝外組織とで比較検討したものである。 α -GalCer 投与により、肝内に播種させた肝癌細胞の発育は完全に抑制された。この効果は肝外組織である皮下では認められなかった。肝臓においては肝外組織に比し、NK 細胞、NKT 細胞が豊富に存在し、また NKT 細胞は活性化しやすい状態となっていた。 α -GalCer 投与により肝臓に選択的に NK 細胞の数の増加と細胞傷害活性の増強を認めたが、肝外組織では認めなかった。*In vivo* にて NK 細胞を欠失させると肝臓における抗腫瘍効果が消失することから、NK 細胞が必須であることが示された。

本論文により、 α -GalCer 投与による NKT 細胞活性化により導かれる NK 細胞の活性化と抗腫瘍効果に関して、肝臓と肝外組織とでは明瞭な違いがあることが示された。本論文は、肝臓における先天免疫細胞の連鎖的な活性化により肝細胞癌の発育進展を制御できる可能性を初めて示したものであり、学位の授与に値すると考えられる。