



Title	Tumor endothelial cell-induced CD8+ T-cell exhaustion via GPNMB in hepatocellular carcinoma
Author(s)	Sakano, Yoshihiro
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89548
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	阪野 佳弘
論文題名 Title	Tumor endothelial cell-induced CD8 ⁺ T-cell exhaustion via GPNMB in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌において腫瘍血管内皮細胞はGPNMBを介してCD8陽性T細胞の疲弊化を誘導する)
論文内容の要旨	
〔目 的 (Purpose)〕	
肝細胞癌は、外科的切除等の根治的治療を施行しえたとしても治療後の再発率は高率であり、予後不良である。肝細胞癌は、画像上血流豊富な多血性腫瘍であり、血管新生が癌の発育・進展に深く関与していると考えられている。腫瘍組織内の血管内皮細胞は、癌細胞からの各種サイトカインに曝露されているため、正常血管内皮細胞 (NEC: normal endothelial cell) と異なる機能を保持していると考えられており、腫瘍血管内皮細胞 (TEC: tumor endothelial cell) と呼ばれる。腫瘍組織内の血管構造は不規則に拡張・蛇行し、脆弱な血管壁を有しており、それらの異常構造が癌細胞の増殖および転移に関与していると考えられている。これら腫瘍血管の構造や機能を正常化することで、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞が増加したとの報告もみられることから、TECと免疫細胞の間には相互作用が存在することが示唆される。 本研究の目的は、肝細胞癌においてTECがCD8陽性T細胞に与える影響について検討し、新規治療標的を同定することとした。	
〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕	
マウス肝癌細胞株 (BNL) を用いて皮下腫瘍を作成し、CD31マイクロビーズを用いた磁気細胞分離法によりTECを、マウスの正常肝臓からNECを分離培養した。腫瘍生着率の低いBNLをマウスの生体内で継代し、生着率の高い細胞としてBNL-Tを樹立した。マウス皮下腫瘍モデルにおいて、BNL-T単独群、BNL-T+NEC混合群と、BNL-T+TEC混合群の腫瘍体積を比較検討したところ、BNL-T+TEC混合群は、他の2群と比較して腫瘍体積が増加した (BNL-T群: 476mm³、BNL-T+NEC群: 663mm³、BNL-T+TEC群: 921mm³、$p < 0.05$。以下$p < 0.05$を有意差ありとした)。また、皮下腫瘍における腫瘍血管数をCD31蛍光免疫染色で、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞数等をFACSで、比較検討した。腫瘍血管数はBNL-T+TEC混合群で1視野当り33.4個であり、他の2群と比較して有意に増加していた (BNL-T群: 25.2 個、BNL-T+NEC群: 26.8 個)。腫瘍浸潤CD8陽性T細胞数は、BNL-T+TEC混合群で1.3個/mgと有意に減少を認め、PD-1陽性Tim-3陽性CD8陽性T細胞の比率が31.2%と他の2群と比較して有意な増加を認めた (BNL-T群: 1.9個/mg、0.2%、BNL-T+NEC群: 1.9個/mg、2.7%)。各群において、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞を単離し、ELISPOT assayでIFN-γ産生能を評価した。BNL-T+TEC混合群において、他の2群と比較して腫瘍内浸潤CD8陽性T細胞のIFN-γ産生能は有意に低下していた。以上からTECによりCD8陽性T細胞の疲弊化を認めたと考えられた。 次に、次世代シーケンサーを用いてTECおよびNECの遺伝子発現解析を行い、NECと比較してTECにおいてfold changeが5倍以上の発現差を認めた42遺伝子を同定した。42遺伝子中、glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (GPNMB) に関して、以降の解析を行った。NECとTECにおけるGPNMBの発現をqRT-PCRおよびwestern blot法にて評価した結果、TECにおいてGPNMBの発現亢進を認めた。次に、TECにおいて2種類のsiRNAを作成してGPNMBの発現抑制を行い、細胞増殖能や遊走能の変化を検討した。GPNMBの発現抑制により細胞増殖能と遊走能の有意な低下を認めた。最後に<i>In vivo</i>において、GPNMB発現を抑制したTECを使用して皮下腫瘍を作成し、腫瘍体積や腫瘍内の腫瘍血管数、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞数、T細胞の機能活性を評価した。BNL-T+ TEC siGPNMB1混合群、およびsiGPNMB2混合群は、BNL-T+TEC Scramble siRNA混合群と比較して、腫瘍体積 (674mm³、715mm³) や腫瘍血管数 (1視野当り24.2個、24.8個) は有意に減少した (BNL-T+TEC Scramble siRNA混合群: 1050mm³、35.6個)。また腫瘍内浸潤CD8陽性T細胞数は1.5個/mg、2.6個/mgと有意に増加し、PD-1陽性Tim-3陽性CD8陽性T細胞の比率は16.1%、13.8%と有意に低下していた (BNL-T+TEC Scramble siRNA混合群: 1.2個/mg、22.7%)。BNL-T+ TEC siGPNMB1混合群、およびsiGPNMB2混合群から単離した腫瘍浸潤CD8陽性T細胞は、BNL-T+TEC Scramble siRNA混合群から単離した腫瘍浸潤CD8陽性T細胞と比較して、IFN-γ産生能は有意に増加しており、T細胞疲弊化の改善が認められた。	
〔総 括 (Conclusion)〕	
肝細胞癌における腫瘍血管内皮細胞 (TEC) は、GPNMBを介してCD8陽性T細胞の疲弊化を誘導していた。GPNMBは新規治療標的となりうる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 阪野 佳弘				
論文審査担当者	(職)	氏 名		
	主 査	大阪大学教授	江口 英利	署 名
	副 査	大阪大学教授	高倉 伸幸	署 名
	副 査	大阪大学教授	野々村 祝夫	署 名
論文審査の結果の要旨 癌微小環境の構成細胞である腫瘍血管内皮細胞と免疫細胞の間に相互作用が存在することが示唆されている。本研究の、肝細胞癌における新たな治療標的の同定を目的として、腫瘍血管内皮細胞の免疫抑制機序に関してCD8陽性T細胞の疲弊化に注目して検討されている。 本研究では、マウス肝癌細胞株と腫瘍血管内皮細胞を混合投与し作成した皮下腫瘍では、腫瘍形成が促進され、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞数が減少していた。さらに、腫瘍浸潤CD8陽性T細胞の疲弊化割合が有意に高く、腫瘍血管内皮細胞による影響と考えられた。腫瘍血管内皮細胞に対する次世代シーケンスにより、GPNMB (glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B) という遺伝子の発現が亢進していることを見いだした。GPNMBの発現抑制により、腫瘍の増殖抑制と腫瘍浸潤CD8陽性T細胞のIFN-γ産生能の回復を認めた。これらの結果から腫瘍血管内皮細胞は、GPNMBの発現を介して腫瘍浸潤性CD8陽性T細胞の疲弊化を誘導し、GPNMBは肝細胞癌における新規治療ターゲットとなりうる可能性があることを示した。今後は、肝細胞癌治療への臨床応用も期待される研究成果であり、本研究は日本癌学会の英文機関紙であるCancer Science誌に掲載され、学位の授与に値すると考える。				