

博士論文

癌関連線維芽細胞(CAF)によるナチュラルキラー(NK)細胞
活性抑制メカニズムに関する研究

井上 知子

癌関連線維芽細胞(CAF)によるナチュラルキラー(NK)細胞
活性抑制メカニズムに関する研究

所属：医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻

指導教官 藤井 知行

井上 知子

目 次

1. 要旨	4
2. 序文	
2-1 子宮体癌	5
2-2 腫瘍微小環境	6
2-3 子宮体癌の腫瘍微小環境	8
2-4 癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF)	10
2-5 NK 細胞	11
2-6 NK レセプター	11
2-7 PVR	13
3. 材料と方法	
3-1 対象	15
3-2 CAF および NEF の抽出	15
3-3 NK 細胞の抽出	16
3-4 免疫細胞染色と蛍光共焦点顕微鏡	16
3-5 ウェスタンブロッティング	17
3-6 フローサイトメトリー	17
3-7 細胞共培養	18
3-8 NK 細胞傷害活性	18
3-9 IDO およびプロスタグランジン阻害	19
3-10 siRNA トランスフェクション	20
3-11 統計学的検討	20

4. 結果	
4-1 子宮体癌組織および子宮内膜組織からの CAF および NEF の抽出	22
4-2 NK 細胞の抽出	23
4-2 CAF は NK 細胞の細胞傷害活性を低下させる	24
4-3 CAF は NEF と比較して、NK 細胞傷害活性を低下させる	27
4-4 CAF との共培養による NK 細胞傷害活性の低下は IDO 阻害薬によりキャンセルされない	29
4-5 CAF による NK 細胞傷害活性抑制効果は、細胞間の直接的相互関係が不可欠である	32
4-6 細胞表面上の PVR の発現量は、NEF に比較し、CAF で低下している	33
4-7 PVR SiRNA トランスフェクトにより、NK 細胞傷害活性が低下する	36
5. 考察	39
6. 結論	44
7. 参考文献	45

1 要旨

癌関連線維芽細胞(CAF)は、腫瘍微小環境において癌細胞だけでなく、様々な免疫細胞や間質細胞と直接的および間接的な相互作用を有し、癌の拡大や増殖に重要な役割を担っている。我々は、CAF が NK 細胞活性に及ぼす作用とそれを制御する因子を検討した。子宮内膜癌組織と正常子宮内膜から CAF あるいは正常線維芽細胞(NEF)を抽出し、これらを NK 細胞と共培養し、CAF が NK 細胞傷害活性を低下させることを確認した。また CAF による NK 活性低下は、IDO などのパラクラインによるものではなく、細胞間の直接的な接触が不可欠であり、線維芽細胞の PVR(CD155)の発現量が関与していることが示唆された。

2 序文

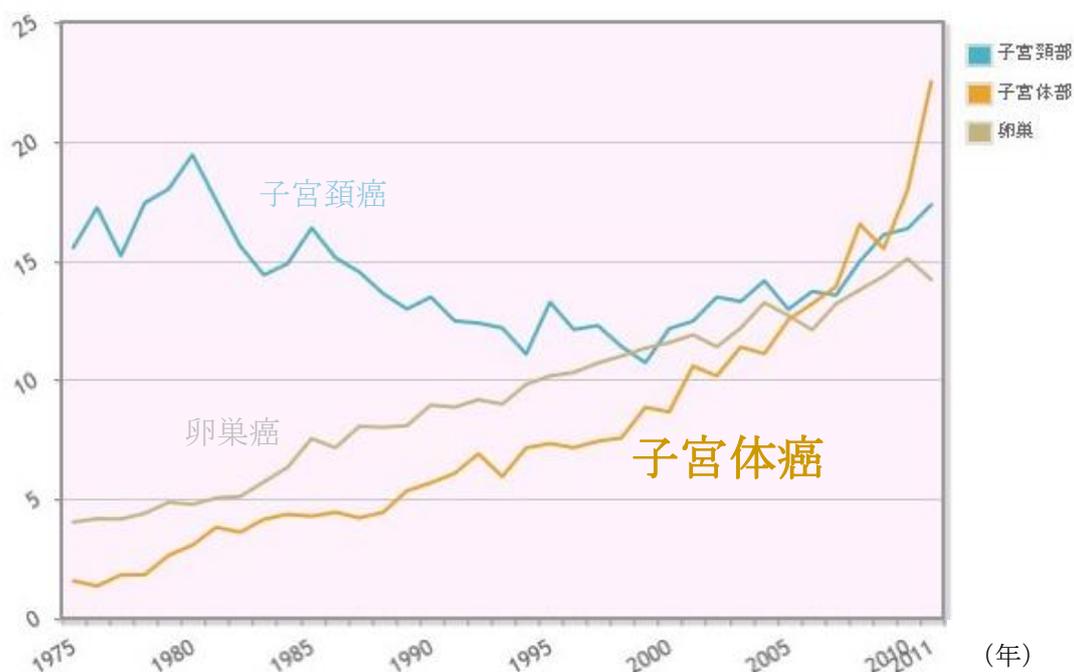
2-1. 子宮体癌

子宮体癌は、エストロゲン過剰刺激（エストロゲン単独治療、肥満、遅発閉経、未産など）がリスク因子となり発症する。

本邦での子宮体癌の罹患率は 1975 年で 1.8/10 万人であったのが、2009 年に 12.5/10 万人、2011 年には 22.5 人/10 万人と、急増しており、婦人科がんの中で最も頻度の高い疾患となった。好発年齢は 50～60 代の周閉経期であるが、ここ数十年の間に 30 代後半でも 1975 年 0.4/10 万人から 2011 年 8.9/10 万人へと急激に増加している。死亡率は全年齢で 3～4 倍に増加し、30～40 代では 10 倍程度と報告されている。

図 1. 本邦の婦人科悪性腫瘍：年齢調整罹患率の推移

(人/人口 10 万人)



国立がん研究センターがん対策情報センター [1]

子宮体癌は、手術可能例であれば、手術療法を主治療とする。手術不能例については化学療法または放射線治療が主治療となる。

予後は比較的良好で、日本産婦人科学会統計では、本邦での 2007 年治療例の 5 年生存率は全体で 86.5%である。しかし、Ⅲ期（全体の 20%）の 5 年生存率は 74.6%、Ⅳ期（全体の 6.9%）の 5 年生存率は 29.1%と、進行症例の治療成績は不良である。また、Ⅲ期とⅣ期との予後に大きく差がみられるが、これは、Ⅲ期は手術可能例が多いのに対し、Ⅳ期は手術不能例であり、手術以外の治療（化学療法、放射線治療）の成績は不良であることを示しているとも言える。

したがって、近年本邦で急増する子宮体癌の死亡例を減少させるために、さらなる病態の解明と治療の開発が求められる。

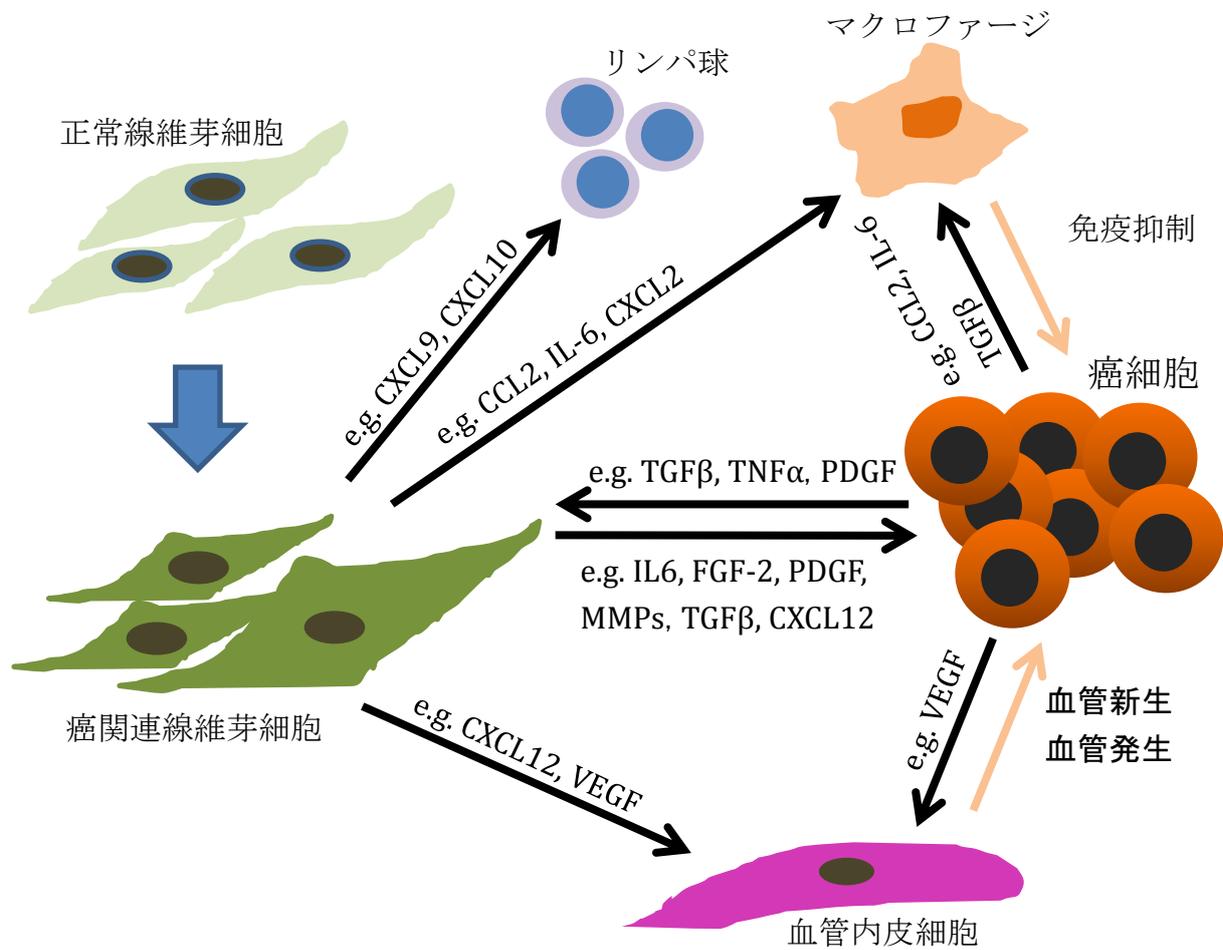
2-1. 腫瘍微小環境

腫瘍組織には、癌細胞のみならず、癌関連線維芽細胞や血管内皮細胞、リンパ球、マクロファージなど様々な細胞が認められる。これらの癌間質組織を構成する細胞は、正常組織の細胞とは性質を異にしており、腫瘍微小環境を構築している。

発がん現象やがんの進展・増殖などの悪性像は、がん細胞そのものが有する遺伝的もしくはゲノムの後成的変化等の内因性因子だけでなく、がん細胞をとりまく様々な細胞により構築された腫瘍微小環境（外因性因子）によっても規定されていることがわかってきた[2,3]。

これら腫瘍微小環境におけるそれぞれの構成細胞は、下図のように様々なサイトカイン、ケモカイン等を介し、互いに関与し合いながら、発がんおよび腫瘍の維持、増殖、転移などを促す。さらに細胞間のシグナル伝達や低酸素等によりもたらされる効果など、複雑な仕組みが成立している[4,5]。

図2 腫瘍微小環境



図：申請者作成

これまで、がん治療はがん細胞をターゲットとされていたが、このような腫瘍微小環境の解明とともに、近年は、がん細胞そのものでなく、免疫チェックポイント分子阻害薬などをはじめ、腫瘍微小環境を構築する癌細胞以外の細胞をターゲットとした免疫治療が成果をあげるようになり、免疫治療が、手術、放射線治療、抗がん剤治療に並ぶ、がんの新しい治療戦略として期待されるようになってきた[6-8]。

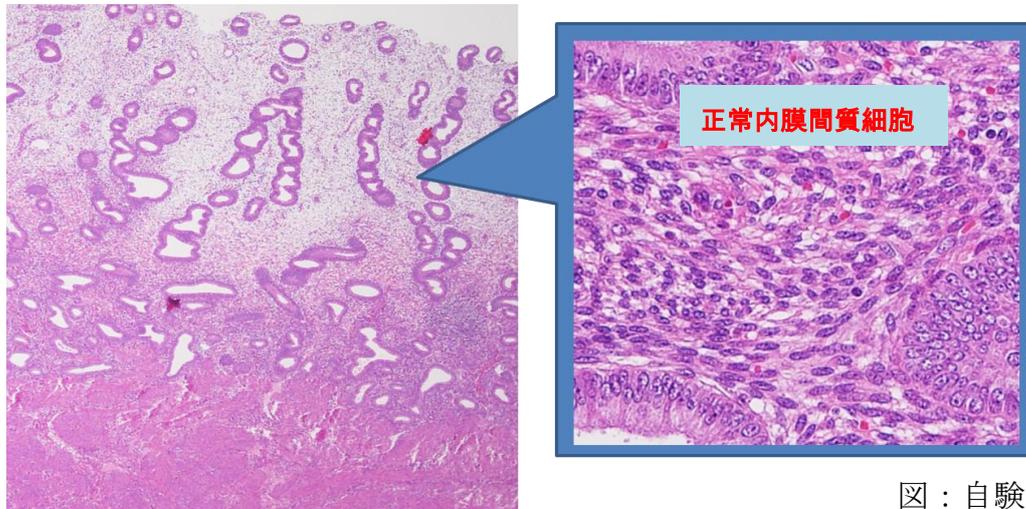
2-3. 子宮体癌組織の腫瘍微小環境

正常子宮内膜組織（図3）子宮体癌組織（図4）の病理組織像の一例を示す。子宮体癌組織においても、癌細胞とともに、線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ球やマクロファージなどの間質細胞が認められ、腫瘍微小環境を構築している。

子宮体癌組織に存在する線維芽細胞は、癌関連線維芽細胞であり、正常内膜間質細胞より変化したものと考えられているが、正常子宮内膜間質細胞に比べ、核クロマチン濃度も濃く、形態が異なっている。

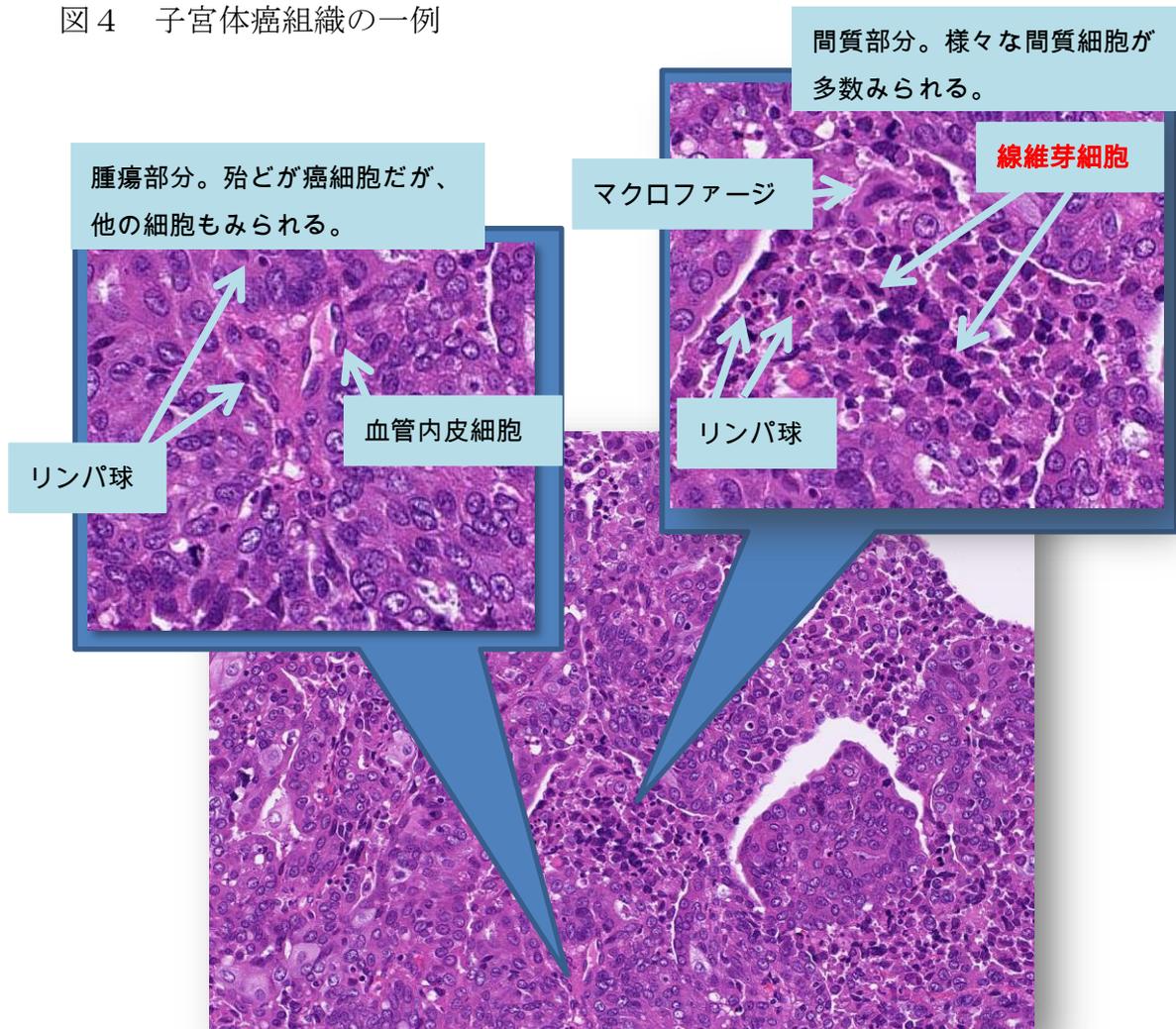
子宮体癌の癌関連線維芽細胞も、これまで報告されている様々な癌関連線維芽細胞[9-12]と同様に、正常内膜組織の間質細胞に比べ、がんの増殖・浸潤を促すような性質を有している可能性があると考えられる。

図3 正常子宮内膜組織の一例



図：自験例より

図4 子宮体癌組織の一例

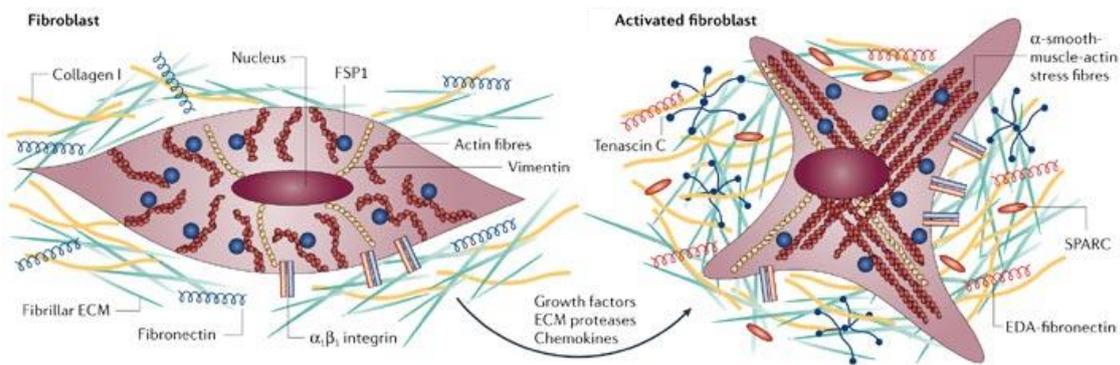


図：自験例より

2-4. 癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast : CAF)

癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblast : CAF)は、がん間質を構成する線維芽細胞で、活性化した Alpha smooth muscle actin 陽性 Myofibroblasts の状態である[13]。CAF の起源としては、近傍の平滑筋細胞や血管周皮細胞、骨髄由来線維芽細胞、あるいは EMT(epithelial mesenchymal transition)化した癌細胞などの可能性も報告されているが[13-15]、多くは、腫瘍の温床となる既存組織の線維芽細胞が、腫瘍微小環境の中で後天的に生物学的変化を獲得し成立していると考えられている[12, 13]。

図5 癌関連線維芽細胞 (CAF)



腫瘍組織内の線維芽細胞は、腫瘍微小環境の中で活性化され、癌関連線維芽細胞となり、Alpha smooth cell actin 陽性として判別されるようになる。

R Kalluri, et al. Fibroblasts in cancer. May 2006. Nature Reviews Cancer [13]

腫瘍微小環境において、CAFは癌細胞と直接的および間接的に、EGFやサイトカイン、ケモカイン、エクソソームなどを介した相互作用を有し、発がん現象、がんの維持や増殖進展、転移などに寄与している[9-11, 16]。CAFは、がんの増殖において様々なパラクラインやシグナルによりがん細胞の浸潤や増殖能を誘導するだけでなく、CAF自らが浸潤、転移現象を有し構造的かつ増殖力学的ながんの生存環境を促進する[9]。同時に腫瘍微小環境における免疫逃避機構を統制し、がんの増殖、拡大、転移を促進させる[17]。

2-5. NK細胞

NK細胞は、主要な抗腫瘍免疫の担当細胞であり、腫瘍免疫においても重要な役割を担っている。また、腫瘍微小環境において、NK細胞の細胞傷害活性が低下することが多く報告されており、重要な予後不良因子の一つになっている[18,19]。

NK細胞活性を低下させる要因として、TGF β やProstaglandin E2などの様々な抑制系のパラクラインが報告されており、indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO)も注目されている[20-22]。IDOは、悪性腫瘍細胞より産生され、トリプトファンを代謝し、その代謝産物であるL-キヌレニンを増加させることによってNK細胞増殖を抑え、腫瘍内環境における免疫を抑制するとされている。間葉系幹細胞やCAFにおいても、IDOやPGE2が産生され、NK細胞活性の低下に寄与しているという報告も見られる[23-25]。

2-6. NK レセプター

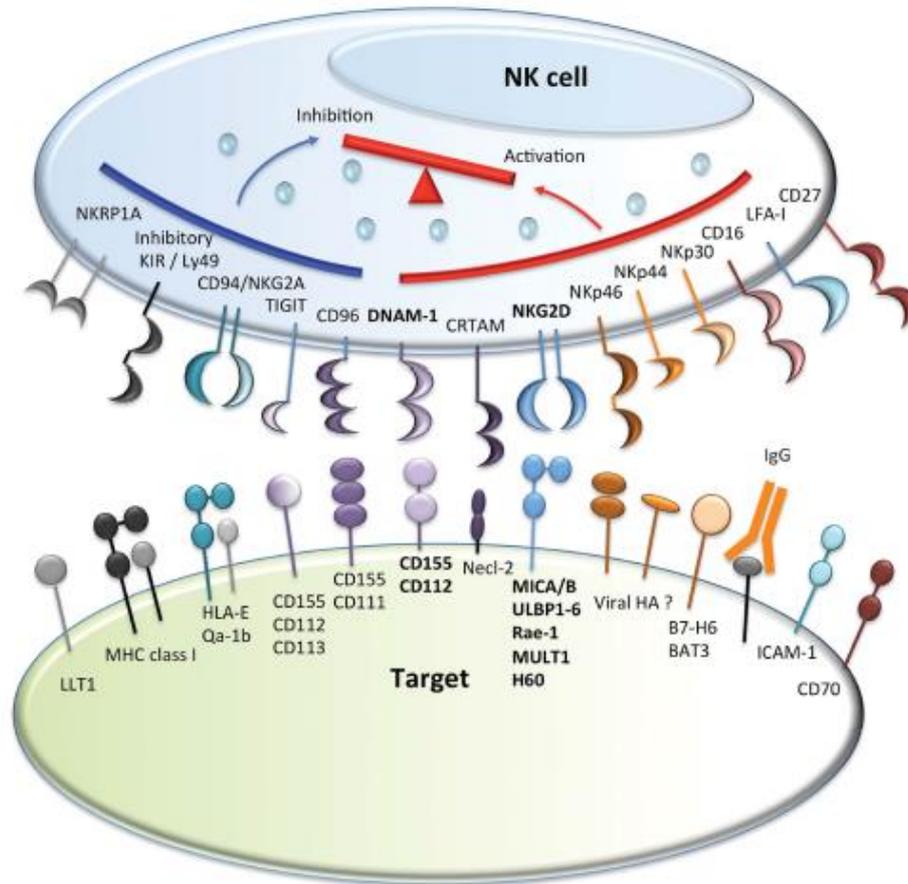
NK 細胞は、細胞表面上の、様々な活性化型レセプター、抑制レセプターによりその活性が制御されている[26-28]。これらの活性化レセプター、抑制レセプターは、相動性の高い細胞外ドメイン（リガンド認識部位）を持ちながら、細胞内に抑制系シグナルを伝達するモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif : ITIM）を持つ抑制型と細胞内に活性化シグナルを伝達するモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif : ITAM）を持つ活性化型とが対となって存在するペア型レセプターも存在する[29]。

NK 細胞の活性化レセプターには、NKG2D、NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1, LFA-1 などが存在し、これに対し KIR, CD94/NKG2A などの抑制レセプターがあり、これらのバランスにより NK 活性が制御される[26]。

これまで、癌細胞から産生される TGF β や IDO, PGE2 などの液性因子によって NKG2D, NKp30, NKp46 などの活性化レセプターの発現が低下し、NK 活性が低下することなどが報告されている[30, 31]。

しかし、CAF による NK 活性の低下において、細胞間の直接的な相互作用はこれまで報告されていない。

図6 NK レセプター



NK 細胞は、数々の活性化および抑制レセプターを有しており、これらの複雑なバランスにより活性化が規定される。

Chan CJ, et al. Review. Cell Death and differentiation 2014 [26]

2-6. PVR

PVR (CD155) は、ポリオウイルスを認識するレセプターとして、1990 年に発見されたが[32]、後に多くの体細胞に発現することが判明した。また癌細胞には PVR の過剰発現が認められることもあり、遊走、浸潤、増殖、転移に寄与することが数多く報告されている[33-35]。

PVR の NK レセプターは DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) がよく知られており、細胞内に ITAM を有する活性化レセプターである。近年、DNAM-1 と相同する細胞外ドメインを有し、細胞内に ITIM を有する抑制レセプターである TIGIT の存在が明らかになり、DNAM-1 と TIGIT が PVR を認識するペア型レセプターであることが判明した[36]。これらが NK 細胞の活性バランスに大きく寄与していることが明らかになってきた[37]。

私は、子宮体癌の腫瘍微小環境において、腫瘍細胞のみならず、CAF が、NK 細胞の活性化を抑制する役割があると仮定した。

そこで、子宮体癌組織から癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast : CAF)、正常内膜組織から正常線維芽細胞 (Normal endometrioid fibroblast : NEF) をそれぞれ抽出し、これらの NK 活性に対する影響を解析した。正常子宮内膜における内膜間質細胞は、線維芽細胞が豊富で内膜腺上皮に覆われており、子宮体癌組織ではこれらの正常線維芽細胞が、CAF に変化すると考えられる。したがって、子宮体癌は、CAF と NEF とを比較するうえでの的確な対象である。

本研究において、CAF による NK 細胞障害活性の抑制効果およびそのメカニズムを研究した。

3 材料と方法

3-1 対象

サンプルは、手術摘出検体のうち病理組織診断に使用しなかった箇所から抽出した。東京大学の研究倫理委員会の承認を得た手続きに則り、対象となるすべての患者に対しては、説明と同意を取得した（倫理委員会申請番号：0863）。

CAF は、子宮体癌患者の癌組織から、NEF は、正常子宮内膜を有し、他疾患のため子宮摘出を要した患者の正常子宮内膜組織から抽出した。

NK 細胞は、健康な成人女性より無償で提供された血液より NK 細胞抽出キットを用いて分離した。

3-2 CAF および NEF の抽出

癌組織あるいは正常子宮内膜組織は、採取後、ミンチ状に細かく刻み、DMEM/F12 (Gibco) に 100IU/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin (Gibco)、1mg/ml コラゲナーゼ type I (Wako) および 25ng/ml DNase (Roche) を添加した溶液で 37°C 60min 攪拌させた。攪拌溶液を 100 μ m ポア、および 70 μ m ポアのセルストレーナーに通した後、1500rpm5 分で遠心し、沈殿したものに線維芽細胞が含まれる。

これを 10%FBS (Gibco), 100IU/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin 含有 DMEM/F12 培地で 37°C 5%CO₂ 下に培養し、2-3 回以上継代したところ、純度の高い CAF あるいは NEF として抽出された。線維芽細胞は 3-8 継代したものを実験に使用した。CAF、NEF が純度 95%以上の線維芽細胞であることを確認

するため、Vimentin 陽性、CD90 陽性であることをフローサイトメトリーにて確認した。CAF の性質を確認するため、 α SMA の発現を細胞免疫染色、ウェスタンブロッティングにて確認した。抗体は anti-Vimentin antibody [RV202] (abcam)、FITC anti-human CD90 [Thy1] (BioLegend)、anti-alpha smooth muscle Actin antibody [1A4] (abcam)を使用した。Vimentin、 α SMA の細胞免疫染色は、抗体を Zenon Mouse IgG Labeling Kits Alexa Flour 488 を用いて蛍光標識した。

3-3 NK 細胞の抽出

健康な成人女性より無償提供された血液より、Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare, Japan)を用い密度勾配遠心で末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cell : PBMC) を抽出し、NK 細胞抽出キット (NK cell isolation kit Miltenmyi Biotec) を用いネガティブセレクションでNK 細胞を単離抽出した。

抽出したNK 細胞は、CD3 陰性、CD56 陽性であることをフローサイトメトリーにて確認し、純度 90%以上あることを確認した。抗体は PE anti CD3 antibody [UCHT1] (eBioscience)、PerCP-Cy5.5 conjugated CD56 [B159] (BD Pharmigen)を用いた。

3-4 免疫細胞染色と蛍光共焦点顕微鏡

CAF は、カバースライド上に培養し、培地を取り除き PBS 洗浄した後、4%ホルムアルデヒドで固定し、0.1%Triton X-100 で透過処理を行い、PBS で洗浄、 α SMA 抗体を Alexa Flour 488 で蛍光標識してスライド上に添加し、室温で遮光下に 60 分静置した。抗体を除去し PBS で洗浄した後、4%ホルムアルデヒドで

固定し、DAPI (6-diamidino-2-phenylindole dehydrochloride) を滴下、PBS 洗浄し、フルオロマウントで封入した。画像は、LSM 700, flexible confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察し、フィルターセットは Alexa 488 と DAPI に合わせて適合化させた。Z-axis plane capture, deconvolution, analyses を ZEN 2009 Software (Carl Zeiss) で行った。

3-5 ウェスタンブロッティング

培養した CAF と NEF をそれぞれ回収し、Lysis Buffer (Protease inhibitor 含有 Cell Lysis Buffer) 500 μ l に懸濁し、冷却水中で超音波破碎を 10 分 (10 秒間隔) 行い、4°C 下で 14000rpm 10 分遠心し、得られた全溶解物を蛋白定量し、20 μ g を使用した。BIO RAD ミニプロティアン TGX ゲルに SDS-PAGE を混和したプロテインサンプルと分子量マーカーをアプライし 200V 定電圧で 30 分泳動した。MeOH で活性化した PVDF 膜に BIO RAD セミドライ転写装置を使用し 15V 30 分で転写した。転写後の PVDF 膜を 10% ミルクでブロッキングし、TBS-T で洗浄し、10% ミルクに希釈した一次抗体希釈液中で反応。TBS-T で洗浄後、10% ミルクに希釈した二次抗体希釈液を反応させ、TBS-T で洗浄し、暗室中で ECL 検出液を反応させ ECL film への感光を行った。検出には Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare Buckinghamshire, UK) を使用した。

3-6 フローサイトメトリー

付着細胞は、培養した細胞を trypsin/EDTA を使って回収し 1500rpm で遠心、また、浮遊細胞は細胞浮遊液を回収し 1500rpm で遠心し、PBS-B(1% ウシ血清入

りの PBS)で洗浄した後、 10^6 /ml に再懸濁し、抗体もしくは対応する同色標識の IgG アイソタイプコントロールを加えて遮光下 4°C で 30 分インキュベートし、PBS-B で 3 回洗浄後 1%パラホルムアルデヒドに懸濁し、FACS caliber flow cytometry system (BD Bioscience)を使って測定した。結果の解析は Kaluza ソフトを使用した。

3-7 共培養実験

抽出した NK 細胞は、PBS で洗浄し、10%FBS、100IU/ml penicillin 100μ g/ml streptomycin を含有した RPMI (Gibco)に 1ng/ml IL15 (R&D)を添加し、37°C 5%CO₂ 下で 48 時間培養し、回収、共培養実験に使用した。

CAF と NEF は、24 ウェルディッシュに 5×10^4 個を撒き、500 μ l の DMEM/F12 培地 (10%FBS, 100IU/ml penicillin 100μ g/ml streptomycin を含有する) で 48 時間培養したところ、およそ 1×10^5 /well となることを確認した。またこの条件が本実験系において最も効果が高いことを確認した。

IL15 1ng/ml で刺激した NK 細胞を PBS で洗浄し、各ウェルに、CAF または NEF を、NK 細胞:線維芽細胞比率 1:1[]で、直接、もしくは 1μ m ポアの BD Falcon セルカルチャーインサートを介して添加し、24 時間 RPMI 培地 (10%FBS, 100IU/ml penicillin 100μ g/ml streptomycin を含有する) で共培養した。コントロールとして、NK 細胞を単独培養した。

3-8 NK 細胞傷害活性

NK 細胞の細胞傷害活性は、K562 細胞をターゲットとし、PI 陽性細胞数の比率をフローサイトメトリーにて解析した。

K562 細胞 (ATCC, Virginia) は、10%FBS, 100IU/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin RPMI1640 培地で培養した。K562 細胞を $1\sim 2\times 10^7$ cell/ml を 0.1%FBS/PBS に溶解し、CFSE Cell Division Assay Kit (Cay man chemical) で最終濃度 2.5 μ M となるよう CFSE staining solution を作成し、37°C で 30min 反応させた。300G で 10 分遠心後、上清を破棄し、RPMI 培地で再混濁し 37°C で 30 分反応させた。細胞は 2%FBS/PBS で 3 回洗浄し、 2×10^4 個の CFSE 染色した K562 細胞を 200 μ l/ml でそれぞれのチューブに加え、様々な条件下で培養 (共培養) した NK 細胞を 1×10^6 /ml で 200 μ l 添加した。これを 37°C 5%CO₂ 下で 4 時間培養し、5 μ l の PI (Propidium Iodide Solution, Biolegend, San Diego, USA) を加えた。PI 陽性の死滅 K562 細胞の数をフローサイトメトリーにてカウントした。また CFSE 染色した K562 細胞を単独で同環境下で自然死滅した数を差し引いた。

3-9 IDO およびプロスタグランジン阻害

NK 細胞傷害活性の低下に、IDO あるいはプロスタグランジンが関与しているという報告がある[23-25]。これらを確認するため、IDO の阻害薬である 1-Methyl tryptophan (1-MT) (Sigma Aldrich) を、COX-1 および COX-2 の選択的阻害薬である NS-398 (Sigma Aldrich) を使用し、NK 細胞傷害活性に及ぼす影響を調べた。1-MT は、NaOH に溶解させ、HCl により中和させた後 50mM に希釈した。NS-398 は DMSO で溶解し、5mM に希釈した。IDO またはプロスタグランジン

阻害目的に、CAF と NK 細胞の共培養と同時に、最終濃度 0.5mM 1-MT、または 5 μ M NS-398 となるよう添加した。

3-10 siRNA トランスフェクション

100pmol の PVR siRNA、Lipofectamine RNAiMAX を用いて NEF をトランスフェクトした。あらかじめ NEF は、24 時間前より 4×10^4 /well で 24 ウェルディッシュに培養しておく。まず、100pmol の PVR SiRNA と、1.5 μ l の Lipofectamine RNAiMAX、無血清の 140 μ l Opti-MEM I Medium を混和し、室温に 20 分静置して安定させた。この間に NEF の DMEM/F12 培養液 (10%FBS, 100IU/ml penicillin 100 μ g/ml streptomycin を含有する) を除去し、かわりに抗生剤の含まれていない DMEM/F12 培養液 (10%FBS 含有する) を 500 μ l 添加し、先ほどの SiRNA 混和物を静かに滴下した。これを 37°C 5%CO₂ 下で 12 時間インキュベートし、SiRNA をトランスフェクトした。12 時間後に混和液を除去し、抗生剤の含まれていない DMEM/F12 培養液 (10%FBS を含有する) に交換し、48 時間インキュベートし、PVR の発現量の抑えられた NEF として実験に使用した。Human PVR SiRNA は、R&D より購入した。シーケンスは下記：

sense, 5'-rCrArGrCUrAUUrCrGrGrArCUrCrCrArArATT, antisense,
5'-UUArGrGrArCUrCrCrGrArAUrArGrCUrGTT. SiRNA のネガティブコントロールは、Life Technology より購入した。

3-11 統計学的検討

実験は少なくともそれぞれ 3 検体を用い、 $n \geq 3$ で行い、分散分析により解析した。P 値は 0.05 未満で有意差ありとみなした。

4 結果

4-1 子宮癌組織および子宮内膜組織からの CAF および NEF の抽出

子宮体癌組織および正常子宮内膜組織から CAF と NEF をそれぞれ抽出した。

CAF および NEF を抽出した検体の患者背景は表 1 の通りである。

CAF は、2-3 回以上継代すると、CAF もしくは NEF は、純度の高い細胞集団になった。フローサイトメトリーにて、CD90 および Vimentin 陽性であることが判明し、陽性細胞は 95%以上であった。(図 6 A)

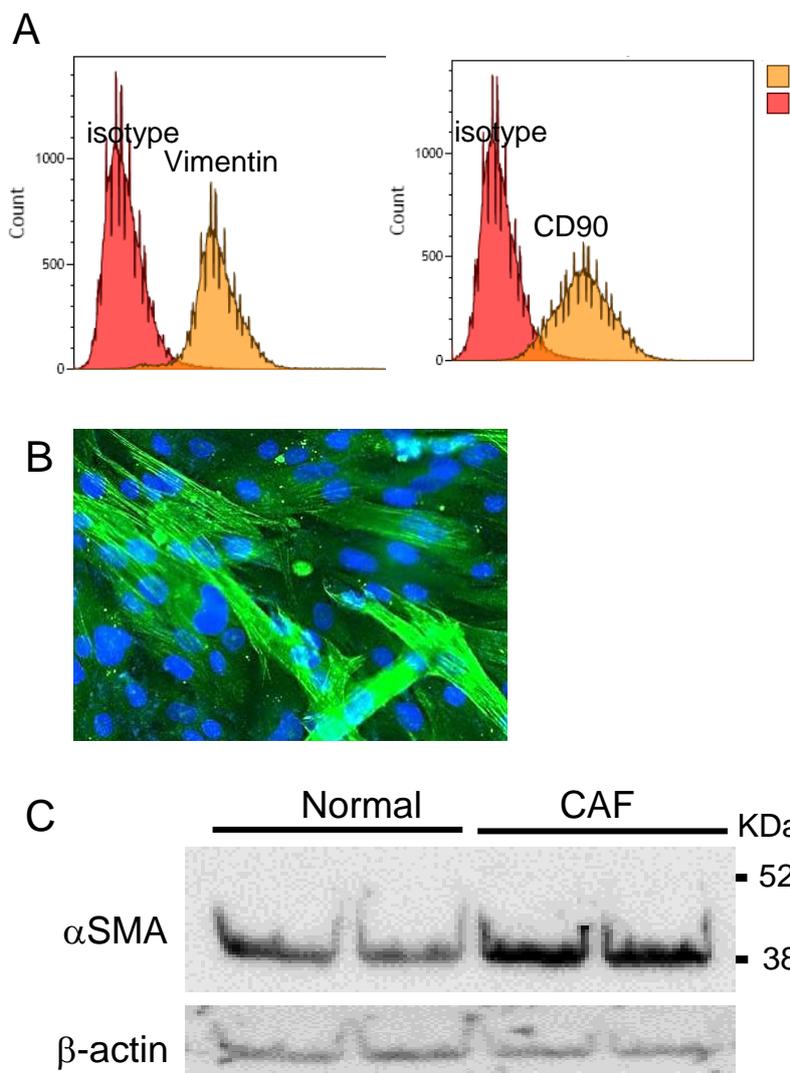
Alpha-smooth muscle actin (α SMA)は、活性型の myofibroblast のマーカーであり、CAF の特徴として最も重要である。 α -SMA の発現についてそれぞれ検索した。免疫細胞染色では、CAF は α -SMA 陽性細胞として確認できた。(図 6 B) また、CAF と NEF の α -SMA をウェスタンブロッティングにて確認したところ、CAF が優位に発現率が高いことが判明した。(図 6 C) これらにより、抽出した細胞が、線維芽細胞であること、CAF としての性質を持っていることが判明し、これらを実験に使用した。

表 1 CAF および NEF 検体の患者背景

	CAF	NEF
性別	女性	女性
年齢	42 歳～57 歳 (平均 48.2 歳)	37 歳～45 歳 (平均 42.6 歳)
疾患	類内膜腺癌 Grade1(6), Grade2(3) F I 期(4), II 期(1), III 期(4)	子宮筋腫(2), 卵巣腫瘍(5), 子宮頸癌(3)

CAF および NEF は、培養継代し、実験に使用した。

図6 CAF および NEF の抽出



抽出した線維芽細胞は、95%以上の純度をもって、Vimentin 陽性、CD90 陽性であることをフローサイトメトリーにて確認した。(A) は CAF の一例である。また、CAF は、CAF のマーカーである α SMA を免疫細胞化学的に確認した (B)。 α SMA を Alexa 488 で蛍光標識して染色し、Green signal で、核を DAPI で染色し、Blue signal で検出した (B)。 α SMA の蛋白発現レベルをウェスタンブロッティングにて確認、CAF が、NEF に比較し、 α SMA 発現が高いことを示した (C)

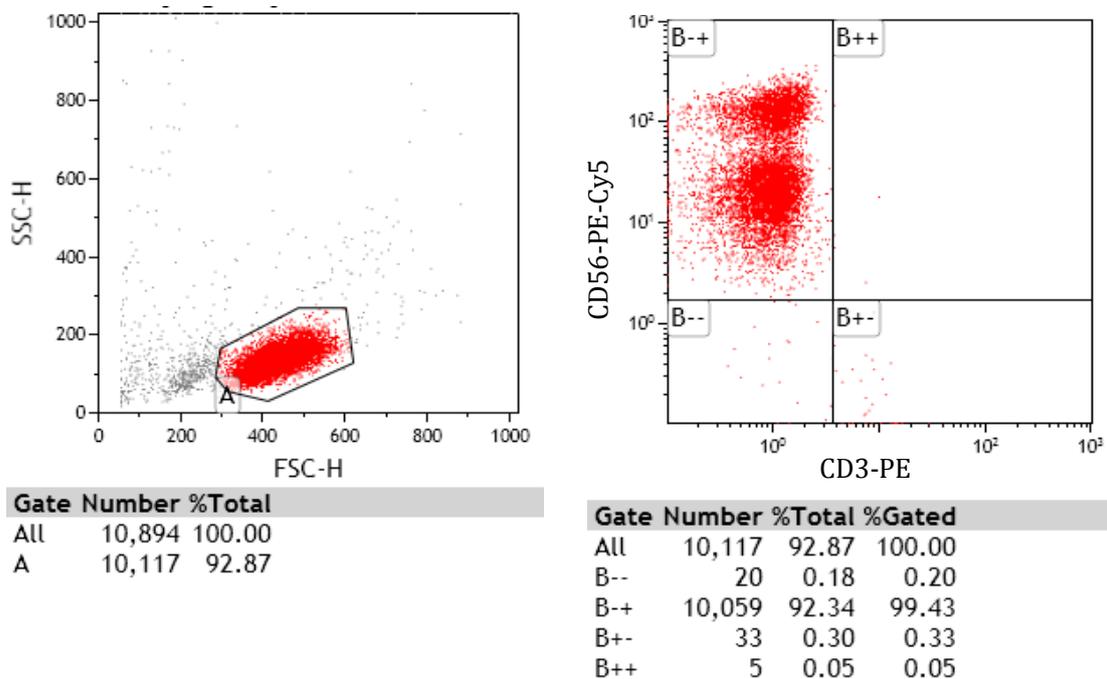
4-2 NK 細胞の抽出

健康な成人女性より無償提供された血液より、密度勾配遠心で末梢血単核球を抽出し、NK 細胞抽出キットを用いネガティブセレクションでNK 細胞を単離抽出した。

NK 細胞の提供者背景は、年齢 28 歳～38 歳、平均 36.2 歳である。

抽出した NK 細胞は、CD3 陰性、CD56 陽性であることをフローサイトメトリーにて確認し、純度 90%以上あることを確認した (図 7)。

図 7 NK 細胞の抽出



抽出した NK 細胞は、CD3 陰性、CD56 陽性細胞として 90%以上の純度であることを確認した。図は、代表的な NK 細胞の一例である

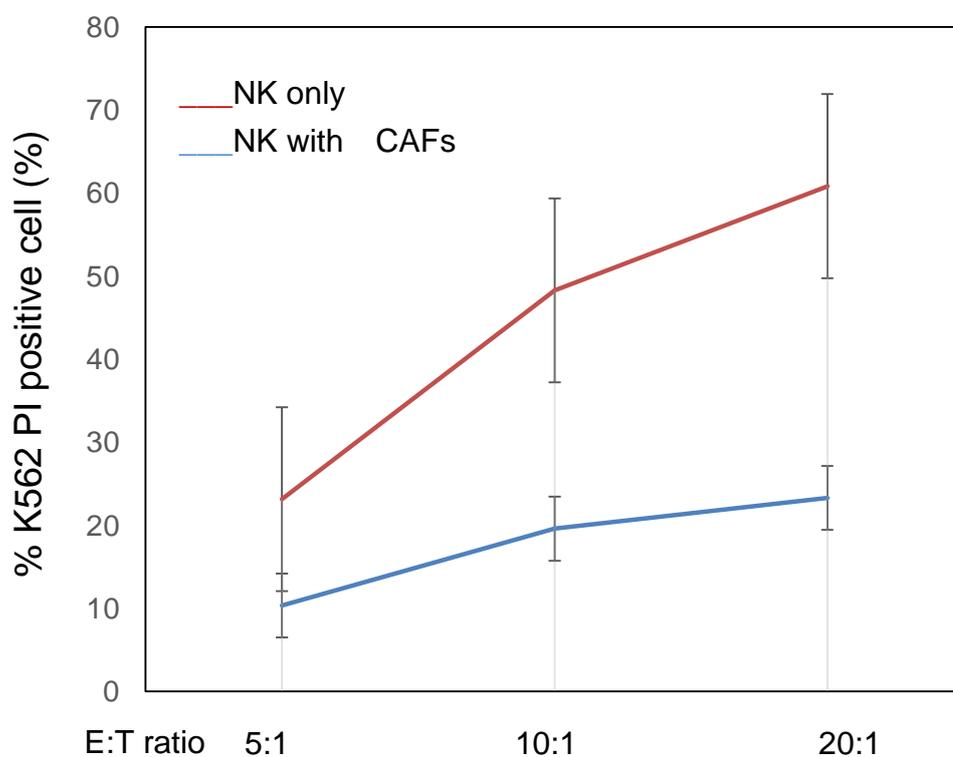
4-3 CAF は、NK細胞の細胞傷害活性を低下させる

CAF の NK 細胞傷害活性に対する影響を確認するために、CAF と NK 細胞の共培養を行った。NK 細胞は自然免疫であり、その攻撃性について HLA 型に依存しない。したがって、同種異型の細胞における実験系が成立し、NK 活性の評価には、これまでも多くの論文で同種異型の NK 細胞で評価している。本実験においても、健常人より提供された血液より抽出した同種異型 NK 細胞を用い、ヒト骨髄性白血病細胞由来の K562 細胞株を細胞傷害対象とする実験を行った。

NK 細胞傷害活性は、K562 細胞を同時間培養したときの K562 細胞に対し、NK 細胞と共培養したときの死滅細胞の割合で示した。K562 細胞は、MHC Class I 分子を持たないヒト慢性骨髄性白血病細胞から株化されており、同種異型の NK 細胞により殺傷された。しかし、無刺激では培養が困難であるため、わずかな IL15 刺激を NK 細胞に加えた。NK 細胞の細胞傷害活性は、IL15 1ng/ml で 48 時間刺激後が最も高く、実験に使用する NK 細胞は、IL15 1ng/ml 48 時間培養後としてその後の実験を進めた。なお、IL15 による CAF への影響をなくすため、共培養実験前に、NK 細胞を PBS で 2 回洗浄した後に使用した。

次に、NK 細胞と CAF の共培養実験を行った。同種異型細胞の NK 細胞により CAF が傷害され死滅しないことを確認した。共培養後の NK 細胞を回収し、細胞傷害活性を調べた。CAF と共培養したときの NK 細胞の細胞傷害活性が、NK 単独培養の時と比較し、抑制されることを確認した。Effector : NK 細胞、Target : K562 として、ET ratio を 1 : 1~10 : 1 に設定し実験すると、CAF と共培養させた NK 細胞も、単独培養の NK 細胞も、いずれも ET ratio 依存的に NK 細胞傷害活性が低下した。(図 8)

図 8. CAF と共培養により、NK 細胞の細胞傷害活性が低下する。

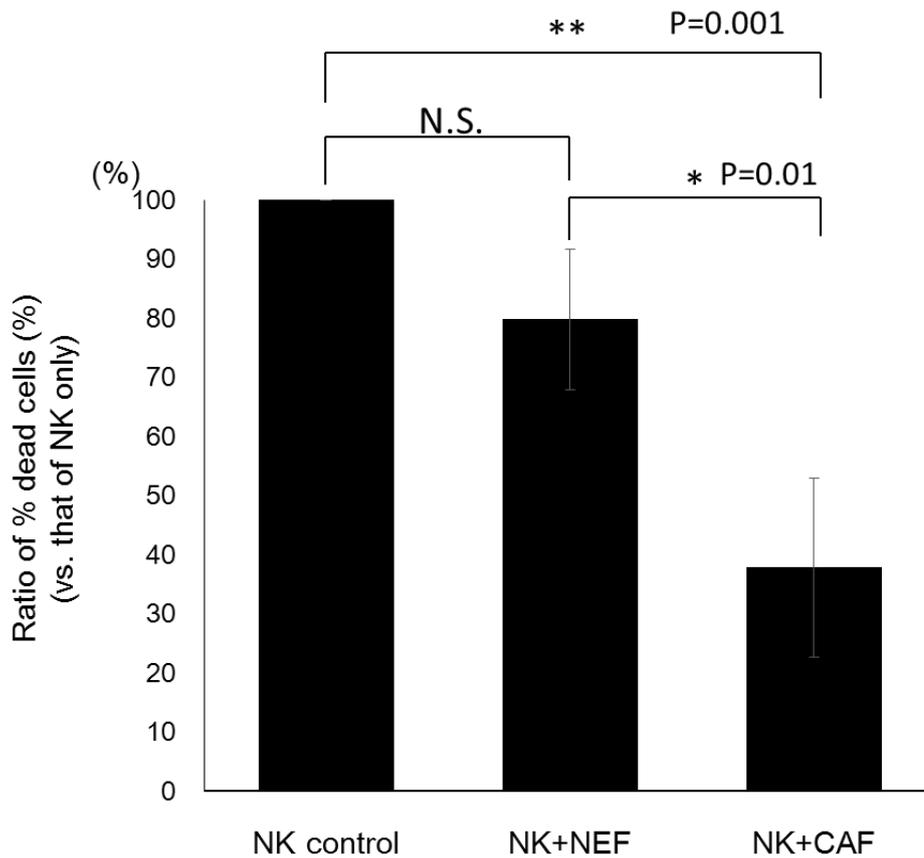


CAF と共培養した NK 細胞と、単独で培養した NK 細胞とで、K562 細胞に対する細胞傷害活性を比較した。細胞傷害活性は Effector(E) : NK 細胞、Target(T) : K562 細胞とし、E:T=5:1~20:1 で比較したが、いずれも CAF と共培養した (n=4)。NK 細胞の細胞傷害活性は抑制されていた。

4-4 CAF は、NEF と比較して、NK 細胞傷害活性を低下させる

CAF と共培養した NK 細胞の細胞傷害活性は、30%程度にまで著明に低下した。そこで、正常内膜組織から抽出した NEF と共培養したときの NK 細胞傷害活性を比較した。CAF と同様に NEF を培養し、NK 細胞と 24 時間共培養した。IL15 1ng/ml で 48 時間刺激した NK 細胞を PBS で洗浄し、NK 細胞単独培養、CAF と共培養、NEF と共培養の 3 群で 24 時間培養し、回収した NK 細胞を K562 細胞に暴露した。NK 細胞の細胞傷害活性は、NK 細胞に暴露後の PI 陽性 K562 細胞の割合で算出し、さらに NK 細胞単独で培養した NK 細胞の K562 細胞傷害活性 (PI 陽性 K562 細胞率) を 100% として比較検討した。すると、CAF と共培養したときの NK 細胞傷害活性は有意に低下したが、NEF との共培養では、有意な変化は見られなかった。(図 9)

図.9 共培養したときの NK 細胞傷害活性の変化



24 ウェルディッシュに NEF, CAF をそれぞれ培養し、NK 細胞と共培養させた。同時に NK 細胞を単独で培養した。(n = 6)

これらの NK 細胞を 48 時間後に回収し、K562 細胞に対する細胞傷害活性を、NK 細胞を単独で培養したものをコントロールとし、これを 100%として比較した。CAF と共培養させた NK 細胞は、有意に低下した。NEF との共培養では有意な差はみられなかった。

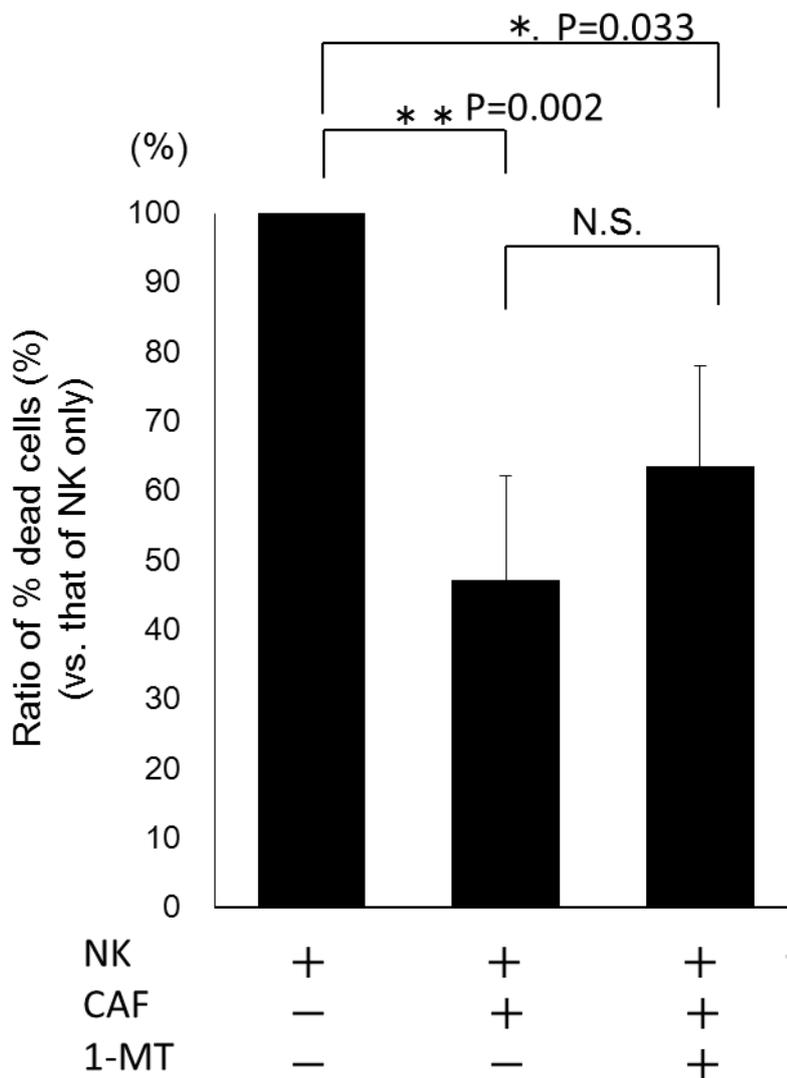
4-5. CAF との共培養による NK 細胞傷害活性の低下は、IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) 阻害剤によりキャンセルされない

これまで、がん細胞が、IDO の産生によって NK 細胞活性を低下させることが報告されている。IDO は刺激のない CAF ではほとんど検出されないが、NK 細胞と共培養すると、顕著に認められるようになる。これは、NK 細胞により産生される IFN- γ によって、CAF が刺激されたためであると考えられる。そこで、次に IDO の阻害剤である 1-MT を用いて IDO 活性を低下させ、IDO が NK 細胞の活性低下に関与するかどうかを調べた。CAF と NK 細胞を 1-MT の存在あり、なしで培養し、NK 細胞の細胞傷害活性を確認した。

CAF と共培養すると、やはり NK 細胞傷害活性は低下するが、1-MT を添加しても、NK の活性は改善しなかった (図 9)。なお、NK 細胞に 1-MT のみを添加したものを同時に調べ、1-MT が単独に NK 細胞傷害活性を変化させていないことを確かめた (結果示さず)。

IDO とともに、プロスタグランジンが寄与する可能性が報告されており、COX-1, COX-2 の選択的阻害剤である NS-398 を添加した CAF、1-MT と NS-398 を添加した CAF と NK 細胞を共培養した。1-MT、NS-398 が直接 NK 細胞傷害活性に影響しないことも確認した。この実験においても、NK 活性の低下の回復は認めなかった。(図 10) なお、NK 細胞に 1-MT あるいは NS398 を添加したものを同時に調べ、1-MT、NS398 が単独に NK 細胞傷害活性を変化させていないことを確かめた (結果示さず)。

図9 CAF から分泌される IDO を阻害したときの NK 細胞傷害活性の変化

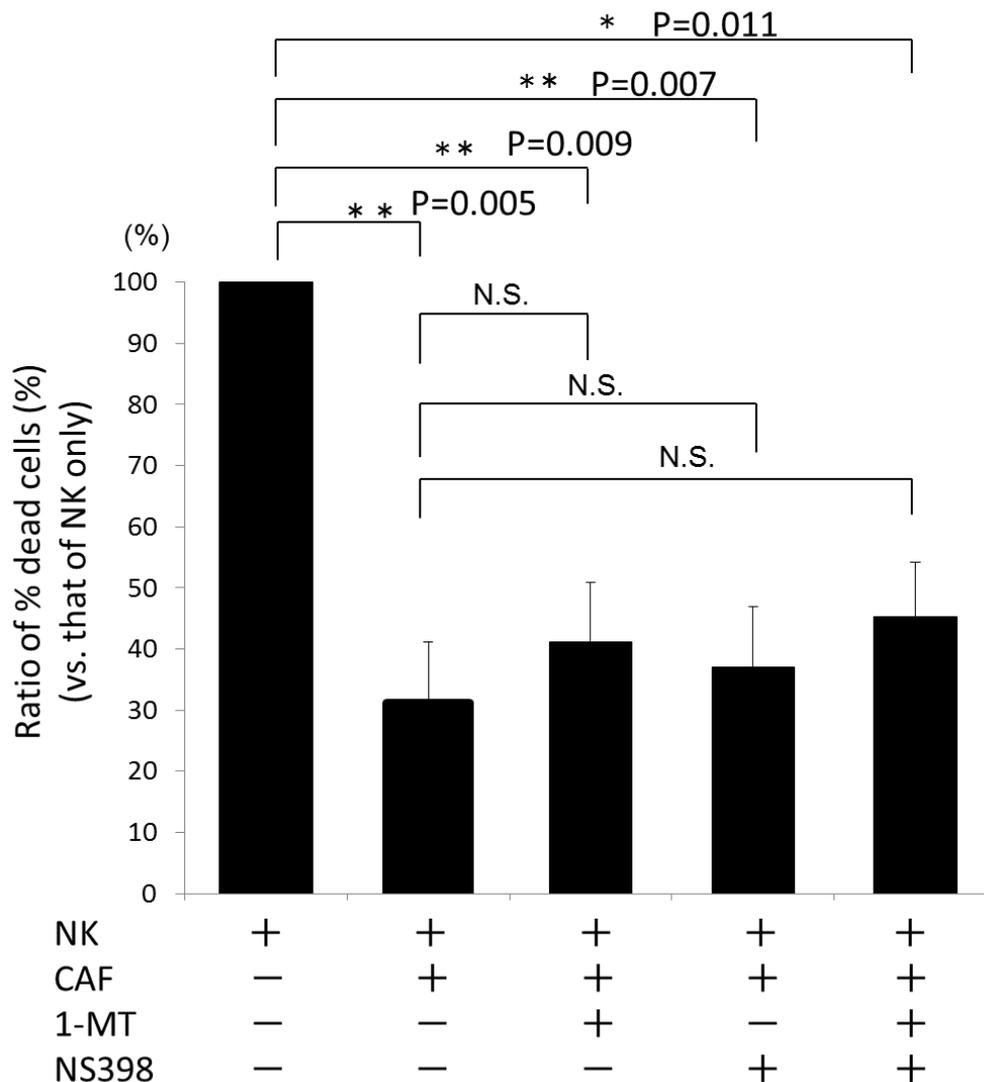


24 ウェルディッシュに CAF を培養し、NK 細胞と共培養させるときに、IDO の阻害薬である 1-MT を加えたもの、1-MT と加えないもの（1-MT の溶媒と同濃度に希釈した HCL:NaOH 溶液のみを加えたもの）とで、NK 細胞の細胞傷害活性の変化を K562 に対する細胞傷害活性で比較した（n = 7）。

コントロールとして同時に NK 細胞を単独（1-MT の溶媒のみ）で培養したものの細胞傷害活性を 100% とした。

CAF は、NK 細胞の細胞傷害活性を有意に低下させるが、1-MT を添加しても、NK 細胞傷害活性は有意な改善を認めなかった。

図 1 0 IDO および PGE2 を阻害したときの NK 細胞傷害活性の変化

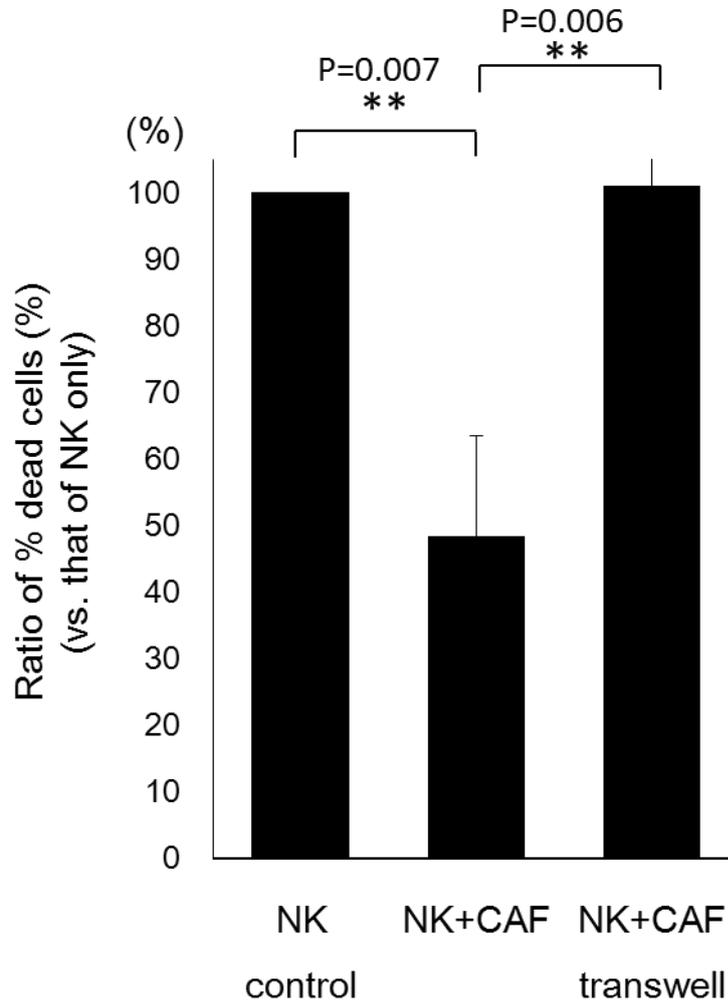


24 ウェルディッシュに CAF を培養し、NK 細胞と共培養させるときに、IDO の阻害薬である 1-MT、Prostaglandin E2 の阻害薬である NS398 を加えたものとそれらの溶媒のみを加えたものとの比較した。コントロールとして同時に NK 細胞単独（溶媒のみ）培養し、この細胞傷害活性を 100%とした (n=3)。CAF は、NK 細胞の細胞傷害活性を有意に低下させるが、1-MT あるいは NS398 を添加しても、NK 細胞傷害活性は有意な改善を認めなかった。

4-6 CAFによるNK細胞傷害活性抑制効果は、細胞間の直接的コンタクトが不可欠である。

CAFによるNK細胞傷害活性抑制効果が液性因子によるものか、直接的なコンタクトによるものかを明らかにするために、NK細胞とCAFの間に1 μ mポアを有するチャンバーを挿入し、チャンバーを挿入しない場合とで比較した。CAFによるNK細胞活性低下は、チャンバーを入れると完全にキャンセルされた。この結果は、CAFによるNK細胞傷害活性の抑制は、IDOや他のサイトカインのような液性因子によるものではなく、細胞間の直接的なコンタクトによるものであることを強く示唆する。

図 1 1 CAF と NK 細胞の直接コンタクトを回避したときの NK 細胞傷害活性



24 ウェルディッシュに CAF を培養し、NK 細胞を直接共培養させたものを NK+CAF、 $1\mu\text{m}$ ポアを有するチャンバーを挿入して NK 細胞を共培養したものを、NK+CAF transwell とし、これらの NK 細胞の細胞傷害活性を比較した。コントロールとして同時に NK 細胞を単独で培養し、この細胞傷害活性を 100%とした ($n=6$)。

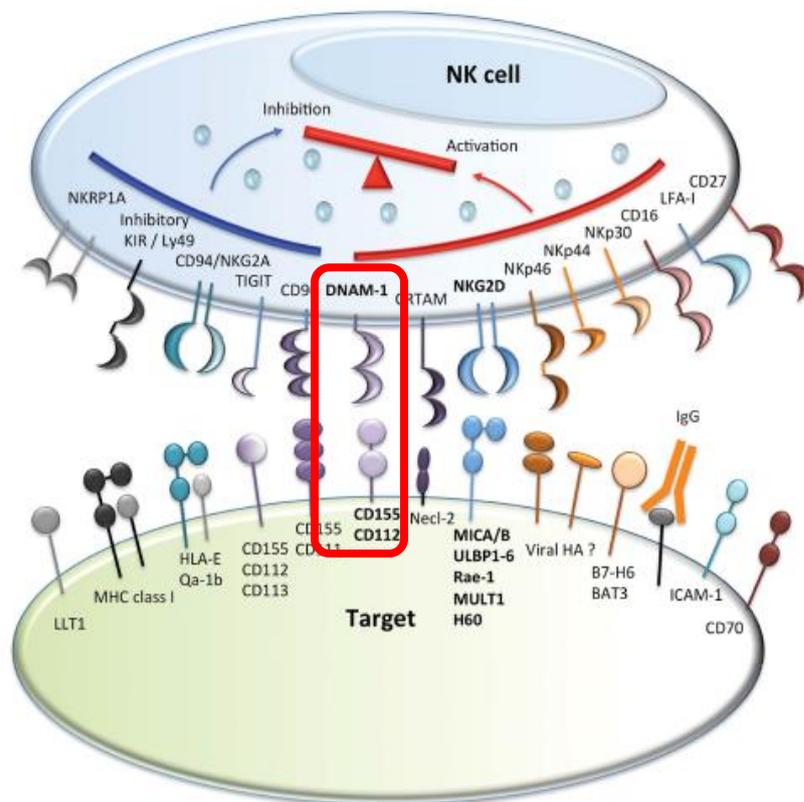
4-7 細胞表面上の PVR の発現量は、NEF に比較し、CAF で低下している。

次に、CAF の細胞表面にある NK 細胞の活性化系および抑制系のリガンドに注目した。

私は、CAF の細胞表面上に発現する NK 細胞の活性化レセプターに着目した。これまで、様々な NK 細胞レセプターがあることがわかっており、ターゲット細胞であるがん細胞については多く報告されている。

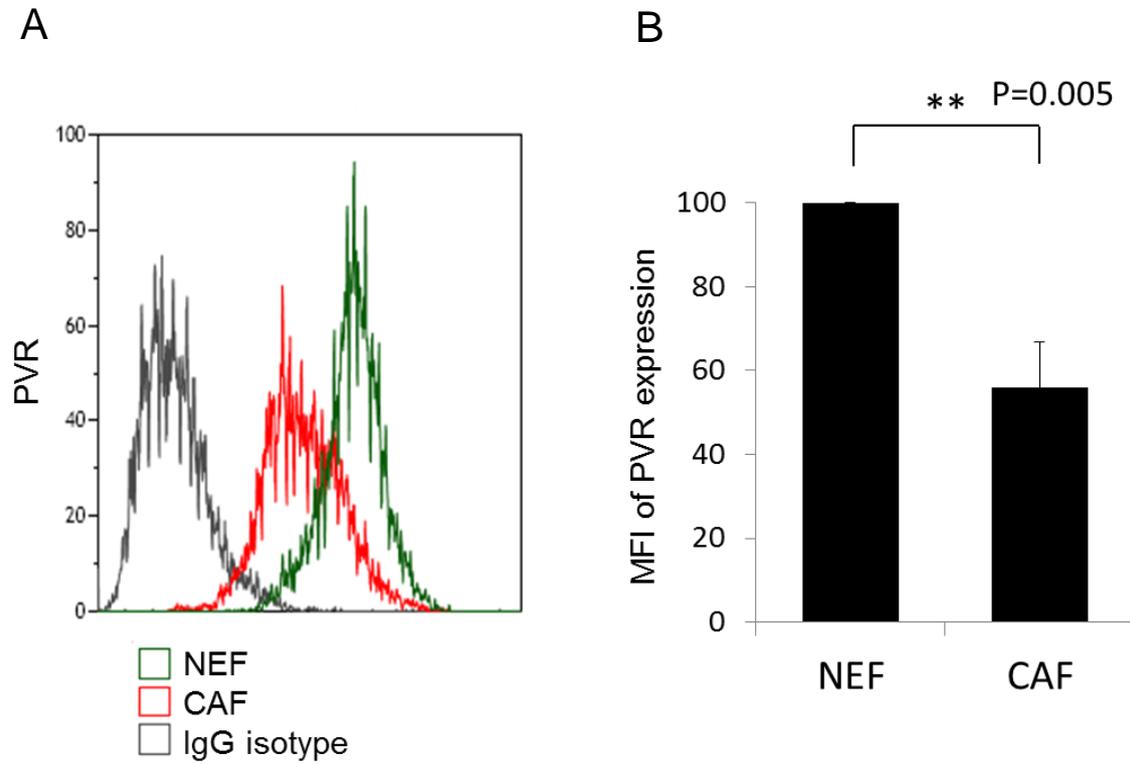
私は、様々な NK 細胞レセプターのリガンドについて、CAF と NEF で発現量が異なるものがあると仮定し、比較検討した。そこで、DNAM-1、CD96 と TIGIT のペアレセプターである PVR(CD155)の発現が CAF において低下していることを確認した。このことが NK 細胞活性の低下に寄与している可能性があると考えられた。

図 1 2



Chan CJ, et al. Review. Cell Death and differentiation 2014 より

図 1 3

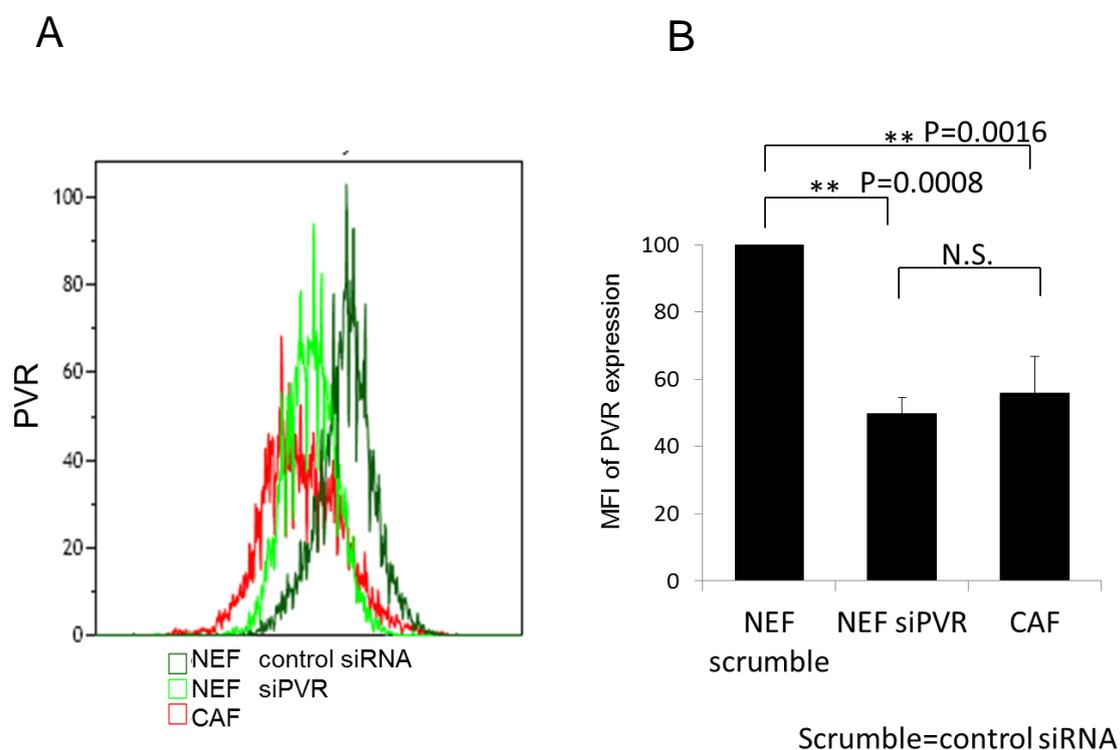


NEF と CAF において、NK 細胞の活性化レセプターDNAM-1 のリガンドである PVR(CD155)の発現量をフローサイトメトリーで比較した。A は、代表的なヒストグラムを示した。B は、MFI (Mean fluorescent intensity) を NEF を 100 として比較した (n=4)。NEF に比較して、CAF の PVR の発現が低下していることが判明した。

4-8 PVR をノックダウンすると、NK 細胞傷害活性が低下する。

PVR の発現の低下により NK 細胞傷害活性が下がることを確かめるために、NEF の PVR 発現量を、PVR に対する siRNA (PVRsi) でノックダウンした (図 1 4 A)。PVRsi をトランスフェクトした NEF は、PVR 発現量がフローサイトメトリーで確認すると MFI (The median flow cytometry index) にして CAF 相当に低下した (図 1 4 B)。PVRsi をトランスフェクトした NEF と NK 細胞を共培養すると、NK 細胞傷害活性は、1/3 程度まで低下し、CAF と共培養したときと概ね同程度にまで低下した。(図 1 5) これらの結果は、PVR の発現量が NK 細胞障害活性に非常に重要であることがわかった。

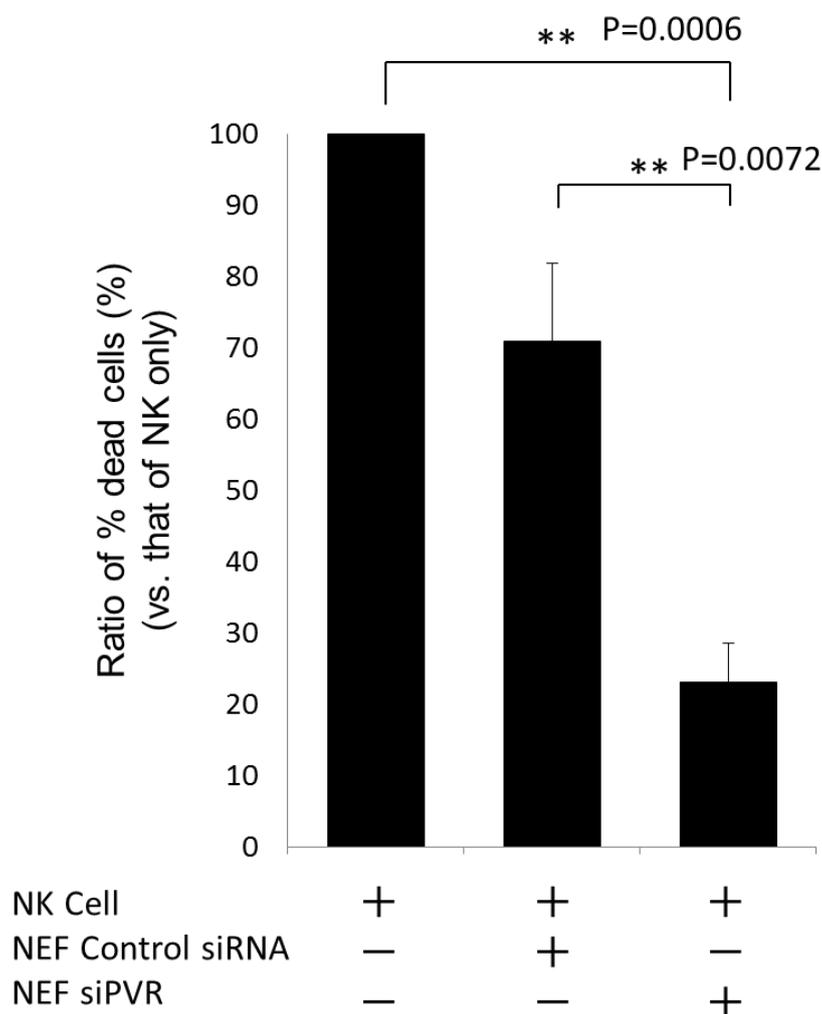
図 1 4 NEF の PVR 発現を siRNA でノックダウンした



NEFにPVRのsiRNAをトランスフェクションした（siPVR）ところ、NEFのPVR発現量が低下したことをフローサイトメトリーにて確認した。NEFのPVRをノックダウンすると、PVRの発現量はCAFの発現量と同程度にまで低下した（n=3）。

Aは、NEFにcontrol siRNAをトランスフェクションしたもの、NEFにPVR siRNA（siPVR）をトランスフェクションしたもの、CAFのPVR発現のヒストグラムの代表的な一例。Bは、それぞれのMFI（Mean fluorescent intensity）を、NEFのMFIを100として比較した。

図 1 5 NEF の PVR をノックダウンすると NK 細胞傷害活性の抑制が低下した



PVR を siRNA でノックダウンした NEF、control siRNA とトランスフェクションしただけの NEF と NK 細胞を共培養させたとき、K562 細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性の変化を比較した。PVR の発現をノックダウンすると、NK 細胞の細胞傷害活性抑制能が低下した。(n = 3)

5 考察

我々は、CAF が、共培養により NK 細胞傷害活性を低下させることを示した。

またそれは NEF と比較しても活性低下が認められ、それが CAF の細胞表面上の NK 活性化レセプターのリガンドである PVR の発現の低下によってもたらされることを示した。

本実験において、ヒトの CAF および NEF を、内膜細胞癌の組織および、正常内膜組織よりそれぞれ抽出し、NK 細胞との相互作用について比較した。

子宮内膜は、多くの腺と間質により構成されており、子宮内膜間質には、線維芽細胞が多く認められる。子宮内膜癌においてこれらの正常線維芽細胞が CAF に変換されると考えられる。腫瘍微小環境内で、CAF は線維芽細胞としての特徴を持ちながら、腫瘍内特異的な特徴を獲得する。つまり、CAF の特徴を比較検討するうえで、内膜癌の CAF と、正常内膜間質の線維芽細胞とを比較することは、適した方法であると考ええる。

我々は、培養下において、CAF の α SMA 発現量が NEF に比較し増加していることを確認した。また、活性化線維芽細胞としてのマーカーである Vimentin が陽性であり、ヒト線維芽細胞のマーカーとして肺組織や膀胱組織、乳房組織等で確認に用いられる CD90 が陽性であることを確認した[42,43]。抽出した CAF は、ほぼ全てが α SMA、Vimentin、CD90 陽性細胞であり、高い純度での CAF の抽出を確認した。

本実験における CAF は、CAF としての特徴を有したものである。

NK 細胞は MHC の拘束性を有さないため、ヒト NK 細胞傷害活性は、同種異型ヒト白血病細胞株である K562 細胞の傷害により示すことができる。K562 細胞は、MHC Class I を有さず、NKG2D Ligand である MICA/B, ULBP1 を高発現しており、NK 細胞の優れた標的細胞である。

これまで、癌細胞による NK 細胞の活性低下において、IDO の産生を介した NK 細胞活性低下がいくつか報告されている。本研究においては、NK 細胞の傷害活性は、IDO の阻害剤である 1-MT の添加ではレスキューされないことが確認され、CAF による NK 細胞傷害活性低下には、CAF の IDO 産生の関与は少ない可能性が示唆された。次に、NK 細胞と CAF との細胞間相互作用を回避すると、NK 細胞傷害活性が完全にキャンセルされた。つまり、CAF がもたらす NK 細胞傷害活性低下には、NK 細胞と CAF の直接的な接触が不可欠であることが示された。これまで、CAF からエクソソームが放出され、NK 細胞障害活性を低下させているという報告もあるが、エクソソームもトランスウエルメンブレンを通過するはずであり、この実験系においてはこの仮説にもそぐわない。

ここで、CAF が、NEF に比較し、PVR という細胞表面分子の発現量が低下していることを確認した。NK の活性化レセプターは、NKp30、NKp44、NKp46、NKG2D、DNAM-1、LFA-1 などがある。PVR は DNAM-1 のレセプターであることがよく知られている。しかし、同時に、抑制レセプターである TIGIT も PVR を認識するレセプターであることがわかっている。ペア型レセプターのリガンドの発現量が弱い場合には、親和性の高いレセプターが優先的に結合する。Yu らは、TIGIT が DNAM-1 に比較し、非常に高い親和性を持つことを明らかにしている[36]。したがって、PVR の発現量が低い場合、強い親和性を持つ TIGIT

との結合により、PVR-TIGIT 結合により、抑制系のシグナルが入る。同時に PVR-DNAM-1 との結合は抑えられ、NK 細胞活性が低下する。

PVR 発現量の低い CAF が NK 活性を低下させる作用を持っており、さらに NEF の PVR をノックダウンすると、この NEF も、NK 細胞障害活性を下げるのがわかった。つまり、PVR の発現が低いと、その細胞と接触した NK 細胞障害活性を低下させることが示唆される。PVR 発現量が低下していると、PVR-DNAM-1 結合が極めて低く、この活性化シグナルが入らないことによる活性低下がまず考えられる。また、PVR-TIGIT 結合による抑制シグナルが強くなるために、NK 活性が抑制された可能性も推測される。

これまで、PVR と NK 細胞に関する報告は数多くあり、がん細胞の PVR 発現量が低いほど予後不良であるということも報告されている [45]。これは、通常のがん細胞の場合、過剰発現されている PVR により PVR-DNAM-1 結合が生まれ、NK 細胞が活性化される機序を妨げていること示唆している。しかし、CAF の細胞表面の PVR 発現量の低下により NK 細胞傷害活性が下がることを示したことはこれまでにない。

本研究において、PVR の関与をさらに裏付ける実験が望まれる。

CAF への PVR 発現が、PVR 機能を見るうえで有効な実験方法と考えられた。しかし、本研究では初代培養系の線維芽細胞を実験に用いるために、siRNA の一過性発現のためのトランスフェクションは NEF では可能であったが、CAF へのトランスフェクションによる遺伝子導入は細胞傷害性のためか困難であった。

また、安定的発現を目指した遺伝子導入・PVR 安定発現細胞株樹立は難しいと考えられた。CAF は、NEF に比べて細胞として菲弱であった可能性がある。

NK 細胞については、DNAM-1 が作用しているのか、TIGIT が作用していないかどうかについて確認することが望まれる。NK 細胞の活性化レセプターは刺激をうけると細胞内ドメインの ITAM が活性化し、SLP76 のリン酸化などから ERK のリン酸化、脱顆粒に至り、細胞傷害活性を発揮する[37]。この反応は、DNAM-1 特異的でなく、NKG2D など他の活性化レセプターの細胞内のシグナルに共通する。抑制レセプターの場合は、細胞内ドメインである ITIM が活性化し、SHIP1 のリン酸化、PI3K 経路の抑制、ERK リン酸化の抑制などにより脱顆粒が抑制される。つまり、細胞内の反応について、DNAM-1 もしくは TIGIT の特有な経路ではないため、リン酸化蛋白の検出や脱顆粒などによって、どのレセプターが作用したかを判断することは不可能である。

NK 細胞の活性化レセプターのノックダウンなども考えられるが、初代培養系の NK 細胞は、siRNA のトランスフェクションは困難である。NK 細胞の細胞株を利用する方法も考えられた。そこでまずヒト NK 細胞の細胞株である NK92 細胞を用いて同様の実験を行った。しかし、NK92 細胞の K562 細胞に対する細胞傷害能が不良であり、同等の実験に持ち込むことができなかった。

本研究では、CAFによるNK細胞傷害活性低下がCAFの細胞表のPVR発現低下からもたらされることを報告したが、PVRの発現低下メカニズムについては不明である。近年Gongらは、肝細胞腫細胞において、ERストレスがATF6, IRE1a経路を通じてPVR発現の低下を生み出していることを報告した[46]。ERストレスは、腫瘍微小環境では低酸素などによっておこり、CAFにおけるPVR発現量を低下させているかもしれない。したがって、線維芽細胞におけるPVR発現量の低下は、CAFの特徴といえるだろう。今後、腫瘍微小環境におけるCAFのPVR低下のメカニズムについてさらなる研究が必要である。

6 結論

CAFによるNK細胞傷害活性が表面抗原のPVR発現量により低下することを初めて示した。CAFが、NK細胞との細胞間接触に関連してNK細胞の機能を低下させる。このことが癌の増殖・維持に繋がっている可能性がある。腫瘍微小環境における新しい免疫逃避機構を示した。

7 参考文献

1. がん情報サービス ganjoho.jp.独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター. <http://ganjoho.jp/professional/statistics/index.html>
2. Lorusso G, Ruegg C: The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008, 130(6):1091-103.
3. Joyce JA, Pollard JW: Microenvionmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(4):239-52.
4. Robert D Schreiber, Lloyd J Old, Mark J Smyth: Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011, 331(6024):1565-1570.
5. Kawakami Y, Tomonori Yaguchi, et al: Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of immunosuppressive tumor-associated microenvironments, in "Tumor immunoenvironment". Shurin M, et al (eds). Springer 2013:307-323.
6. James Larkin, Vanna Chiarion-Sileni, et al: Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015, 373:23-34.
7. Mark E Dudley, John R. Wunderlich, et al: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002, 298(5594):850-854.
8. Steven A Rosenberg: Development of effective immunotherapy for the treatment of patients with cancer, *J Am Coll Surg.* 2004; 198(5)685-696.

9. Kim De Verman, Luigia Ralo, Elke De Bruyne, Eline Menu, Les Van Valckenborgh, Ivan Van Riet, Maria Antonia Frassanito, Lucia Di Marzo, Angelo Vacca, Karin Vanderkerken. Cancer Associated Fibroblast and Tumor Growth: Focus on Multiple Myeloma. *Cancers* 2014, 6(3):1363-1381.
10. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3):335-48.
11. Karagiannis GS, Pouthahidis T: Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res* 2012, 10(11):1403-18.
12. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW: Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21(1):33-9.
13. Kalluri R, Zeisberg M: Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(5):392-401. Review.
14. Ishi G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T. In vivo characterization of Bone Marrow Derived Fibroblasts Recruited into fibrotic Lesions. *Stem Cells*. 2005, 23(5):699-706.
15. Anderberg C, Peitras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2009, 8:1461-1462.
16. Luga V, Feffrey L, Wrana. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-Planar Cell Polarity Signaling in Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 2013, 73:6843-6847.

17. Yael R, Neta E. An inflammatory vicious cycle: Fibroblasts and immune cell recruitment in cancer. *Exp Cell Res*. 2013.
18. Anahid Jewett, Han-Ching Tseng. Tumor induced inactivation of Natural Killer cell cytotoxic function; *J Cancer* 2011, 2:443-457.
19. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014, 44(6):1582-92.
20. Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer by inducing an immunosuppressive environment. *Cancer Sci* 2014, 105(8):966-73.
21. Yoshida N, Ino K, Ishida Y, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Terauchi M, Nawa A, Akimoto H, Takikawa O, Isobe K, Kikkawa F. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res* 2008, 14(22):7251-9.
22. Pietra G, Manzini C, Rivars S, Vitael M, Cantoni C, Petretto A, Balsamo M. Melanoma cells inhibit natural killer cell function by modulating the expression of activativ receptors and cytolytic activity. *Cancer Res*. 2012; 72: 1407-1415.-
23. Grazia Maria Spaggiari, Andrea Capobiancho, Heba Abdelrazik, Flavio Becchitti, Meria Cristina, Mingari and Lorenzo Moretta. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2, *blood*. 2008 111:1327-1333
24. Tuanjie Li, Shunhong Yi, Wei Liu, Changchang Jia, Guoying Wang, Xuefeng Hua, Yan Tai, Qi Zhang, Guihua Chen, Colorectal carcinoma-derived fibroblasts

- modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Mod Oncol* 2013, 30:663
25. Amandine Pradier, Fakob Passweg, Jean Villard, Vincent Kindler. Human Bone Marrow Stromal Cells and Skin Fibroblasts Inhibit Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxic Activity. *Cell Transplantation*, *Cell Transplantation* 2011, 20:681-91.
 26. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L: Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 2014, 21(1):5-14.
 27. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9:503-10.
 28. Parham P. MHC class I molecule and KIRs in human history, health and survival. *Nat.Rev.Immunol.*5.201-214.
 29. Noa S, Ofer M. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Letters* 2010. 584; 4895-4900.
 30. Castriconi, Cantoni. Lella Chiesa, Vitale, Marcenaro, Cone. Biassoni. Transforming growth factor beta1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK mediated killing of dendritic cells. *Troc.Natl Acad Sci.U.S.A.* 2003.100:4210-4215.
 31. Della Chiesa, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46 and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006. 108:4118-4125.
 32. Satoshi Koike, Hitoshi Horia, Iku Ise, Akira Okitsu, Michihiro Yoshida, Narushi Iizukaa, Kenji Takeuchi, Tsutomu Takegami and Akio Nomoto, The poliovirus

- receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. The EMBO Journal vol 9, no10 3217-3224, 1990.
33. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Sudo A. Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. *Oncol Lett* 2013, 5(6):1771-1776
 34. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol* 2004, 16(4):533-8.
 35. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Camemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003, 198(4):557-67.
 36. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009, 10:48-57.
 37. Ludovic M, Mark J Smythl Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature rev immunol.* 2015 (15) 243-254.
 38. Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Sudo A. Prognostic significance of CD155 mRNA expression in soft tissue sarcomas. *Oncol Lett* 2013, 5(6):1771-1776.
 39. Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 2014, 4:62.

40. Löb S, Königsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P, Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(6): 445-452
41. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011; 89: 216–224
42. Yan X, Luo H, Zhou X, Zhu B, Wang Y, Bian X. Identification of CD90 as a marker for lung cancer stem cells in A549 and H446 cell lines. *Oncol Rep*. 2013; 30(6): 2733-40
43. True LD, Zhang H., Ye M, Huang CY, Nelson PS, von Haller PD, Tjoelker LW, Kim JS, Qian WJ, Smith RD, Ellis WJ, Liebeskind ES, Liu AY. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol*. 2010; 23: 1346–1356
44. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods*. 2004; 294(1-2): 15–22
45. Qu P, Huang X, Zhou X, Lu Z, Liu F, Shi Z, Wu Y, Chen Y. Loss of CD155 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2015, 66(5):706-14.
46. Gong J, Fang L, Liu R, Wang Y, Xing J, Chen Y, Zhuang R, Zhang C, Yang A, Zhang X, Jin B, Chen L. UPR decreased CD226 ligand CD155 expression and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity in hepatoma cells. *Eur J Immunol*. 2014; 44(12): 3758-67

8 謝辞

本研究にあたり、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医学部産科婦人科学教室の藤井知行先生、大須賀穰先生に甚大なる感謝の意を表します。また、終始直接研究ご指導を賜りました東京大学医学部産科婦人科学教室の川名敬先生、ならびに実験計画や実験手法について御指導、御協力頂きました東京大学医学部産科婦人科学教室の永松健先生、足立克之先生、田口歩先生、藤本麻葉先生、長阪一憲先生、松本陽子先生、西田晴香先生、中村寛江先生、佐藤雅和先生、吉田光代先生、富尾賢介先生、江口聡子先生、山下亜紀先生に心より深謝いたします。