

## 論文内容要旨

Hepatic irradiation persistently eliminates liver resident NK cells

(肝放射線照射による肝内在性ナチュラルキラー細胞の持続的消失)

PLoS One, 13(6): e0198904, 2018.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：菅野 雅元教授

(医歯薬保健学研究科 免疫学)

副指導教員：田中 友加准教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

中野 亮介

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

肝臓癌治療の基本は肝切除であるが、放射線照射機器の進歩により肝悪性腫瘍に対する放射線治療が増加している。肝放射線照射は、サイトカインを産生し肝線維化等を引き起こす。肝内免疫に関しては、NKT細胞や制御性T細胞が比較的放射線に耐性と報告されているが、肝放射線照射が自然免疫系のNK細胞に与える影響は不明である。肝臓内には、全身を循環する従来のNK細胞と機能的に異なる肝内在性NK細胞が存在する。肝内在性NK細胞は、細胞傷害性分子であるTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を強く発現し、強力な抗腫瘍活性を持つ。近年、肝内在性NK細胞が骨髄由来ではなく肝臓内前駆細胞より分化している可能性が報告された。つまり、肝放射線照射によりTRAIL陽性肝内在性NK細胞の分化が抑制され、肝内の抗腫瘍免疫が低下すると仮説を立てた。本研究の目的は、肝放射線照射が肝内在性NK細胞の機能及び分化に与える影響を検討することである。

マウス(C57BL/6)を使用し、開腹下にタングステンで肝臓以外を遮蔽し肝放射線照射モデルを作成した。肝放射線照射を5Gy、10Gy、20Gyの照射群に分け、2、4、6、8週後に肝臓内及び脾臓内のリンパ球分画とNK細胞表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。各群において、肝臓内及び脾臓内リンパ球中のNK細胞、T細胞、NK1<sup>+</sup>-like T細胞の割合に有意な変化は認めなかった。一方で肝内在性NK細胞(DX5<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup>)の割合は、10Gy、20Gy照射群において、非放射線照射群と比較し、放射線照射2週後より有意な低下を認め、8週後にも回復しなかった。この間、より未熟なNK細胞(DX5<sup>-</sup>TRAIL<sup>-</sup>)の割合が肝内で増加していた。以上より、10Gy、20Gy照射群で肝内在性NK細胞の低下に伴う肝内免疫機能低下が予想された。

次に、TRAIL感受性の肝癌細胞株(Hepa1-6)を用いて、<sup>51</sup>Cr遊離試験による肝臓内リンパ球の細胞傷害性試験を行った。肝放射線照射(10Gy)後4週、8週の肝臓内リンパ球は、非放射線照射群に比べ有意に細胞傷害性が低下した。この結果は、磁気分離で抽出した肝臓内NK細胞でも同様であった。さらに、マウスを用いた肝内腫瘍生着モデルで肝内在性NK細胞の抗腫瘍活性を検討した。肝放射線照射(10Gy)後1週のマウス脾臓内にHepa1-6を注射し、その1週間後に肝臓を摘出して、非放射線照射群と肝転移数を比較した。非放射線照射群の肝臓には腫瘍生着

は認めなかったが、肝放射線照射後の肝臓には多発する微小転移を認めた。肝内抗腫瘍活性における NK 細胞の関与を検討するために、同モデルに肝放射線照射を行っていない野生型マウスから抽出した肝臓内 NK 細胞 ( $0.5 \times 10^6$  個) を尾静脈から投与した結果、腫瘍生着率は有意に低下した。以上より、肝放射線照射による肝内在性 NK 細胞の抗腫瘍活性低下が示された。

次に肝放射線照射が肝内在性 NK 細胞の分化に及ぼす影響を検討した。肝内在性 NK 細胞の前駆細胞を明らかにするため、抗 NK1.1 抗体を投与して成熟 NK 細胞を除去した野生型マウスから肝臓内リンパ球、脾臓内リンパ球、骨髄細胞を抽出した。それぞれの細胞を CD3 で標識して成熟 T、NK1+like T を磁気分離で除去した non-T、non-NK and non-NK1+like T 前駆細胞 (CD3-NK1.1<sup>-</sup> 細胞) を抽出した。この前駆細胞をリンパ球が存在しない Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>マウスに移入したところ、いずれの前駆細胞を投与したマウスの肝臓にも、1 か月後に DX5<sup>+</sup> TRAIL<sup>+</sup>肝内在性 NK 細胞の出現を認めた。一方で肝放射線照射(10Gy)1 週間後の Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>マウスに前駆細胞を投与したところ、いずれも肝臓内に肝内在性 NK 細胞の出現は認めなかった。つまり、肝放射線照射は肝臓内で前駆細胞が肝内在性 NK 細胞に分化する環境を変化させると考えられた。

本研究において、肝放射線照射は、肝臓内リンパ球分画を変化させないが、抗腫瘍活性を持つ肝内在性 NK 細胞の割合を持続的に減少させた。その結果、肝内の抗腫瘍免疫が低下した。この現象は、肝放射線照射による肝内微小環境の変化が、前駆細胞から肝内在性 NK への分化を抑制することが誘因と示唆された。肝放射線照射が肝内在性 NK 細胞に与える長期的な影響や、肝内在性 NK 細胞の分化を抑制する機序は、今後の検討課題である。本研究結果は肝臓癌の治療戦略を考える上で、新たな一助になると考えられた。