

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19893

研究課題名(和文)ケモカインCXCL9/CXCR3経路に基づく肝臓内NK細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of liver NK cell activation mechanisms through CXCL9/CXCR3 chemokine axis

研究代表者

大平 真裕(Ohira, Masahiro)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：30397947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓内NK細胞は抗腫瘍分子(TRAIL)を発現しているが、肝切除後には減弱する。TRAIL陽性NK細胞は、ケモカインレセプターCXCR3を発現し、CXCL9に対する遊走能を有した。肝臓内マクロファージは、IFN-gamma依存性にCXCL9を産生し、肝切除後には産生が減弱していた。IFN-gammaを誘導するためにPoly I:Cを投与すると、野生型マウスでは肝切除後にTRAIL陽性NK細胞が増加したが、CXCR3不全マウスではTRAIL陽性NK細胞の増加を認めなかった。これらの結果から、肝臓内TRAIL陽性NK細胞はCXCL9/CXCR3依存性に存在していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Liver resident natural killer (NK) cells express tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), a critical molecule for NK cell-mediated tumor cell killing. TRAIL+ NK cells strongly and exclusively expressed CXCR3. CXCL9, a ligand of CXCR3, was significantly decreased in the liver after hepatectomy. The kinetics of hepatic CXCL9 expression resembled those of hepatic TRAIL+ NK cell proportions after hepatectomy. Among liver-resident mononuclear cells, macrophages predominantly secreted CXCL9 in response to interferon (IFN)-gamma stimulation. Although the administration of poly I:C, an inducer of IFN-gamma, increased hepatic CXCL9 levels in both CXCR3-/- and WT mice, even after hepatectomy, only WT mice recovered TRAIL expression on NK cells. Major hepatectomy remarkably reduced the proportion of TRAIL-expressing NK cells in the liver through downregulation of the CXCL9-CXCR3 axis in mice.

研究分野：肝胆膵移植外科

キーワード：NK細胞 TRAIL ケモカイン 肝切除 肝癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床上肝切除を行う肝臓癌は、原発性肝癌のみならず大腸癌や胃癌の肝転移症例(肝臓癌は2013年統計で4番目に多い癌)が含まれる。昨今の化学療法の進歩により肝臓癌の治療成績は向上しているが、まだ満足できるものではなく、転移メカニズムに則した新規治療法の開発が必要である。

(2) 肝臓は門脈を介して外来抗原や腸内細菌に常にさらされており免疫学的に特殊な環境である。そのため肝臓内の自然免疫系を司るNK細胞は、他部位のNK細胞と異なり、強力な抗腫瘍効果を持つことが知られている。肝臓内NK細胞の抗腫瘍活性は、TRAILが重要な働きをしている。

(3) 我々は、マウス及びヒトの肝臓内にTRAIL陽性NK細胞が豊富に存在し、抗腫瘍活性を有することを明らかにしてきた。これらの基礎研究の結果に基づき、肝臓由来NK細胞を用いた肝癌肝移植術後補助免疫療法の臨床試験を開始した。特に進行肝癌において有効性を認めており、C型肝炎ウイルスや術後感染症への効果も確認できた。さらに、2009年より広島大学と米国マイアミ大学移植外科との共同研究として私自身が留学し、指導的立場で本治療法を開始した。臨床前試験を経て米国FDAの承認を受けた後、Phase I studyを終え、現在論文投稿準備中である(ClinicalTrial.gov # NCT01147380)。

(4) 一方で、肝臓を切除すると肝臓内のTRAIL陽性NK細胞が減少し、肝臓内の腫瘍増大を来すことを明らかにした。つまり、TRAIL陽性NK細胞減弱が、肝切除後の抗腫瘍効果に影響を与えていると考えられる。しかし、肝臓切除によってTRAIL陽性NK細胞が肝臓内から減少するメカニズムは不明である。

(5) ケモカインは、白血球やリンパ球を組織へ遊走させるのに必要な物質である。ウイルス感染や担癌状態では、ケモカインによってNK細胞が肝臓内に誘導される。つまり、ケモカインは肝臓内に特殊な細胞を維持する役割を果たしていると考えられる。そこで、「肝切除によりケモカイン分布が変化し、その結果としてTRAIL陽性NK細胞が肝臓内から消失する」と仮説を立てた。本研究では、肝臓内ケモカイン分布の変化を解析し、肝臓切除後の肝臓内NK細胞活性低下との関連を検討する。その結果、ケモカイン操作による肝臓内NK細胞活性維持が新規治療法となりうる。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、「肝臓切除後に低下する肝臓内Natural Killer(NK)細胞の活性を維持し、腫瘍増大を制御すること」である。

肝臓内NK細胞は強力な抗腫瘍活性を持つが、肝切除後にその活性は低下し腫瘍再発の一因となっている。網羅解析の結果、肝切除後に白血球遊走物質ケモカインCXCL9が有意に減弱していた。この新知見をもとに、本研究の目的は、「ケモカインCXCL9が、抗腫瘍活性の強いTRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)発現NK(Natural killer)細胞を肝臓内に維持させるメカニズムを解析する」ことである。この結果は、肝切除後に腫瘍再発を抑制しうる新規治療法となる可能性があり、臨床応用を展開するための研究基盤を確立することを将来の目的とする。

3. 研究の方法

この研究計画では、ケモカインCXCL9が肝臓内TRAIL陽性NK細胞の活性維持及び抗腫瘍活性に作用する効果を解明することを目的とする。研究計画の進め方として、

(1) 肝臓切除による肝臓内CXCL9局在の解析

肝組織の免疫染色及び蛋白解析を行い、CXCL9の肝臓内局在と責任細胞を同定する
(2) CXCL9による肝臓内TRAIL陽性NK細胞機能解析

外来性にマウス肝臓内CXCL9濃度を高め、TRAIL陽性NK細胞の表現型、抗腫瘍活性を解析する。

(3) CXCL9-CXCR3経路を介した肝臓NK細胞の抗腫瘍活性

ノックアウトマウスを用いて、ケモカインがNK細胞の抗腫瘍活性に作用するメカニズムを検討する。

4. 研究成果

(1) TRAIL陽性NK細胞はCXCR3を強発現していた

肝切除後に肝臓内NK細胞のTRAIL発現は有意に減少した。TRAIL陽性NK細胞のケモカインレセプターを解析すると、CXCR3を強発現していた。

ケモカイン遊走試験の結果、TRAIL陽性NK細胞はCXCL9に対して遊走し、CXCL9ブロッキング抗体でその遊走は阻害された。

(2) CXCL9は肝切除後に肝臓内で減少した

肝切除前後の肝臓組織中のCXCL9のmRNA及び蛋白濃度を測定した。いずれも肝切除後に有意な低下を認めた。肝切除後のCXCL9動態解析を行うと、肝臓内NK細胞が表出するTRAILの動態と同様であった。

(3) 肝臓内マクロファージがIFN- γ 依存性にCXCL9を産生した

様々な濃度のIFN- γ と肝臓内マクロファージを共培養すると、肝臓内マクロファージはCXCL9を産生した。肝切除後は、肝臓内のIFN- γ が低下し、その結果、肝臓内マクロファージのCXCL9産生も減少した。

(4) Poly I:CによるCXCL9増加及び肝切除後TRAIL発現維持

Poly I:C 注射により、IFN- γ を介して肝臓内の CXCL9 が増加する。野生型マウスでは、肝切除後に Poly I:C を投与すると、有意に TRAIL 陽性細胞が増加した。しかし、CXCR3 ノックアウトマウスではこの現象は見られず、CXCL9-CXCR3 経路を介した肝臓内 NK 細胞維持のメカニズムが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文・全て査読あり](計19件)

- (1) Ohira M, et al. Novel Immunotherapy Using Liver-Derived Natural Killer Cells for Preventing Hepatocellular Carcinoma Recurrence in Liver Transplantation. Gene Therapy and Cell Therapy Through the Liver: Springer, 2016: 35-45.
- (2) Hotta R, Ohira M, et al. CD52-Negative NK Cells Are Abundant in the Liver and Less Susceptible to Alemtuzumab Treatment. PLoS One, 2016; 11(8): e0161618.
- (3) Shimizu S, Ohira M, et al. Fc-Gamma Receptor Polymorphisms Predispose Patients to Infectious Complications After Liver Transplantation. Am J Transplant, 2016; 16(2): 625-633.
- (4) Sada H, Ohira M, et al. An Analysis of Surgical Treatment for the Spontaneous Rupture of Hepatocellular Carcinoma. Dig Surg, 2016; 33(1): 43-50.
- (5) Morimoto H, Ohira M, et al. Different sensitivity of rituximab-treatment to B-cells between ABO-incompatible kidney and liver transplantation. Hum Immunol, 2016; 77(6): 456-463.
- (6) Imaoka Y, Ohira M, et al. Elective laparoscopic deroofing to treat the spontaneous rupture of a large simple liver cyst: a case report. Surg Case Rep, 2016; 2(1): 148.
- (7) Honmyo N, Ohira M, et al. Stepwise approach to curative surgery using percutaneous transhepatic cholangiodrainage and portal vein embolization for severe bile duct injury during laparoscopic cholecystectomy: a case report. Surg Case Rep, 2016; 2(1): 27.
- (8) Honmyo N, Ohira M, et al. Inflammatory pseudotumor of the liver occurring during the course of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma treatment: A case report. International journal of surgery case reports, 2016; 20: 96-100.
- (9) Hashimoto M, Ohira M, et al. Inflammatory pseudotumor of the liver occurring during the course of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma treatment: A case report. International journal of surgery case reports, 2016; 20: 96-100.
- (10) Akabane S, Ohira M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma coinciding with a liver metastasis from a rectal carcinoma: a case report. Surg Case Rep, 2016; 2(1): 94.
- (11) Akabane S, Ohira M, et al. Intraoperative assessment of tissue oxygen saturation of the remnant stomach by near-infrared spectroscopy in two cases of pancreatotomy following gastrectomy. International journal of surgery case reports, 2016; 22: 75-78.
- (12) Abe T, Ohira M, et al. Prediction of long-term survival by using the Glasgow Prognostic Score in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Hepatol Res, 2016; 46(7): 622-633.
- (13) 大平真裕、他、【真菌感染症】肝臓移植と真菌症. 日本外科感染症学会雑誌, 13: 53-59, 2016.
- (14) Nakano R, Ohira M, et al. Treatment of hepatic amyloid light-chain amyloidosis with bortezomib and dexamethasone in a liver transplant patient. Hepatol Res, 2015; 45(10): E150-155.
- (15) Abe T, Ohira M, et al. Efficacy and Feasibility of Salvage Living Donor Liver Transplantation after Initial Liver Resection in Patients with Hepatocellular Carcinoma. Dig Surg, 2015; 33(1): 8-14.
- (16) Taguchi K, Ohira M, et al. Pseudolymphoma of the liver: a case report and literature review. Surg Case Rep, 2015; 1(1): 107.
- (17) Takahashi G, Ohira M, et al. A case of biliary cystic tumor with repeated hemobilia. Surg Case Rep, 2015; 1(1): 34.
- (18) 大平真裕、他、イトラコナゾールを用いた肝臓移植 術前真菌予防投与

- の取り組み. 今日の移植, 2015; 28(4): 455-459.
- (19) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 生体肝移植後 de novo 悪性腫瘍の検討と対策. 移植, 2015; 50(4-5): 417-422.
- 〔学会発表〕(計25件)
- (1) 大平真裕, 他, ドナー肝臓由来活性化ナチュラルキラー細胞移入療法による肝臓移植後重症感染症予防(第I/II相試験) 第16回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター(宮城県, 仙台市) 2017/3/7-9
- (2) 佐藤幸毅, 大平真裕, 他, 肝臓に発生した aggressive angioomyxoma の1例, 第78回日本臨床外科学会総会, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都, 港区) 2016/11/24-26
- (3) Ohira M, et al. Corticosteroids dampen Natural Killer cell function including cytotoxicity and anti-HCV effect. Asian Transplantation Week 2016, Seoul, Korea, 2016/10/27-29
- (4) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝移植後肝臓再発におけるNK細胞機能脆弱化のメカニズムの解明, 第52回日本移植学会総会, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都, 港区), 2016/9/29-10/1
- (5) 中野亮介, 大平真裕, 他, 広島大学における急性肝不全症例に対する肝移植の検討, 第52回日本移植学会総会, グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都, 港区) 2016/9/29-10/1
- (6) Yano T, Ohira M, et al. Reduction in CXCL9-CXCR3 signals diminishes TRAIL-expressing liver NK cells in partially hepatectomized mice under depressed immune status. 26th International Congress of the Transplantation Society. Hong Kong, China, 2016/8/18-23
- (7) Nakano R, Ohira M, et al. Negative influence of liver irradiation on liver resident NK cells. 26th International Congress of the Transplantation Society. Hong Kong, China, 2016/8/18-23
- (8) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝切除後肝臓癌再発における肝臓内NK細胞機能低下メカニズムの解明, 第71回日本消化器外科学会総会, あわぎんホール(徳島県, 徳島市) 2016/7/13-15
- (9) 中野亮介, 大平真裕, 他, 肝臓への放射線照射による肝臓内在NK細胞の抗腫瘍活性へ与える影響, 第71回日本消化器外科学会総会, あわぎんホール(徳島県, 徳島市) 2016/7/13-15
- (10) Ohira M, et al. Immunotherapy using donor liver NK cells for preventing severe infection after liver transplantation. 第71回日本消化器外科学会総会, あわぎんホール(徳島県, 徳島市) 2016/7/13-15
- (11) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝臓切除後におけるNK細胞機能の脆弱化のメカニズム, 第12回広島肝臓プロジェクト研究センター シンポジウム, ホテルグランヴィア広島(広島県, 広島市) 2016/6/25
- (12) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝移植後患者のアルコール使用障害の予測にAUDIT-Cが有用である, 第28回日本肝胆膵外科学会, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市) 2016/6/2-4
- (13) 大平真裕, 他, ドナー肝臓由来活性化ナチュラルキラー細胞移入療法による肝臓移植後重症感染症予防(第I/II相試験) 第52回日本肝臓学会総会, 東京ベイ幕張ホール(千葉県, 千葉市) 2016/5/19-20
- (14) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝臓再発予防のための肝切除後ケモカイン低下による肝臓内NK細胞機能低下の解析, 第116回日本外科学会定期学術集会, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市), 2016/4/14-16
- (15) Yano T, Ohira M, et al. The Alcohol Use Disorder Identification Test-Consumption (AUDIT-C) predicts the risk of excessive alcohol consumption in patients after liver transplantation. Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting, KFCホール(東京都, 両国) 2016. 2016/4/8-9
- (16) 大平真裕, 他, インターフェロン治療を契機にDe novo DSAを伴う急性拒絶反応を来した脳死肝移植の1例, 第5回ASAN Friendship Meeting, 虎ノ門ヒルズ森タワー(東京都, 港区), 2016/2/13
- (17) 今岡祐輝, 大平真裕, 他, 上腸間膜静脈-腎静脈シャントによる猪瀬型肝性脳症に対しハイブリッド手術室でIVR, CTAP併用による脾臓摘出術及び外科的シャント結紮術を行った1例, 第77回日本臨床外科学会総会, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市) 2015/11/26-28
- (18) 大平真裕, 他, ドナー肝由来NK細胞を用いた肝臓癌肝移植に対する補助免疫療法, 第74回日本癌学会学術集会, 名古屋国際会議場(愛知県, 名古屋市) 2015/10/8-11
- (19) 矢野琢也, 大平真裕, 他, 肝切除による肝臓内免疫機能低下メカニズムの解明と制御, 第51回日本移植学会総会, ホテル日航熊本(熊本県, 熊本市) 2015/10/1-3
- (20) Hotta R, Ohira M, et al. A Novel

Approach for Preventing HCC Recurrence after LT: Adoptive Immunotherapy Using Donor Liver Natural Killer Cells to Prevent Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Liver Transplantation. ILTS 2015, Chicago, USA, 2015/7/8-11

- (21) 大平真裕、他、教室における肝移植適応の再評価、第33回日本肝移植研究会、ホテルオークラ神戸(兵庫県、神戸市)、2015/5/28-29
- (22) 大平真裕、他、肝移植後疾患別問題点と治療戦略、第51回日本肝臓学会総会、ホテル日航熊本(熊本県、熊本市)、2015/5/21-22
- (23) Yano T, Ohira M, et al. Significant reduction in TRAIL-expressing NK cells in remnant liver after partial hepatectomy is strongly associated with the impaired intrahepatic CXCL9-CXCR3 pathway. American Transplant Congress 2015, Philadelphia, USA, 2015/5/2-6
- (24) 堀田龍一、大平真裕、他、HCC合併肝移植症例に対する脳死ドナー由来活性化肝NK細胞療法の有用性 -マイアミ大学におけるPhase I studyの報告-、第115回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)、2015/4/16-18
- (25) 矢野琢也、大平真裕、他、肝切除による肝臓内免疫機能低下メカニズムの解明と制御、第115回日本外科学会定期学術集会、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)、2015/4/16-18

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 真裕 (OHIRA MASAHIRO)
広島大学病院 消化器・移植外科 病院助教

研究者番号：30397947