

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10669

研究課題名（和文）EZ2エピジェネティック制御による肝内在性NK細胞活性化機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of liver resident NK cell activation through the EZ2 epigenetic regulations

研究代表者

大平 真裕（Ohira, Masahiro）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：30397947

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、強力な抗腫瘍活性を持つ肝臓内在性ナチュラルキラー（NK）細胞の活性化メカニズムを明らかにすることが目的です。肝内在性NK細胞を脆弱化させるマウスモデルを作成し、放射線照射モデルによる肝内在性NK細胞の機能・分化機構を明らかにしました。また、抗腫瘍分子の遺伝子多型が肝癌再発に関連することを明らかにしました。遺伝子制御により肝内在性NK細胞の活性を維持することが肝癌の新規治療につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓癌は悪性腫瘍死因の第5位であり、根治的な治療を行っても再発することが多い。抗癌剤治療や放射線治療の効果は限定的であり、新規治療法の開発が急務である。肝臓内に存在する抗腫瘍活性の高いNK細胞は、肝癌や肝臓治療により弱体化する。本研究結果は、遺伝子制御を含めた免疫療法につながる礎となる。肝内在性NK細胞の活性を維持できる治療法は、既存の治療法に上乗せ効果が期待でき肝臓癌治療成績のさらなる向上が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the activation mechanism of the liver resident natural killer (NK) cells with vigorous antitumor activity. We have created a mouse model that weakens the liver resident NK cells, and clarified the function and differentiation mechanism of the liver resident NK cells by the whole liver irradiation model. Moreover, it was revealed that genetic polymorphisms of antitumor molecules are associated with recurrence of liver cancer. Maintaining the activity of NK cells in the liver by gene regulation would lead to a novel treatment for liver cancer.

研究分野：肝・胆・膵外科

キーワード：肝細胞癌 ナチュラルキラー細胞 肝臓内免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓癌は悪性腫瘍死因の第 5 位である。昨今の手術・化学療法の進歩により肝臓癌治療成績は向上している。しかし多くの症例が再発するためその成績は不十分であり、再発メカニズムに則した新規治療法の開発が必要である。

肝臓は門脈を介して外来抗原にさらされる免疫学的に特殊な環境である。そのため他部位とは異なり、肝臓内 NK 細胞は、TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)を介した強力な抗腫瘍効果を持つ。我々は、マウス及びヒトの肝臓内 TRAIL 陽性 NK 細胞の特殊性と有用性を証明し(Ishiyama et al., Hepatology, 43,p.362, 2006; Ohira et al., Transplantation, 82,p.1712, 2006)、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行っている。一方で、肝切除後には肝臓内 TRAIL 陽性 NK 細胞が減少する(Ohira et al., Transplantation, 82,p.1712, 2006)。つまり、肝内在性 NK 細胞の脆弱性が肝切除後の抗腫瘍効果に影響を与えている。同様の現象は、門脈結紮や肝臓放射線照射モデルでも確認できた。NK 細胞の分化や活性化に必要な遺伝子が近年同定されている。定常状態と活性化 NK 細胞の遺伝子網羅解析によると、マイクロ RNA-223 が変化してグランザイム B の発現を制御していた(Fehniger et al., Genome research, 20,p.1590, 2010)。つまり、肝切除後の脆弱化回避には、遺伝子発現の制御(エピジェネティック)が必要であると考えられる。

そこで、「EZH2 制御により肝内在性 NK 細胞の脆弱性が回避できる」と仮説を立てた。これまでの研究結果から肝内在性 NK 細胞の脆弱性にケモカイン CXCL9 の低下が関与している可能性が示唆される。EZH2 制御が肝内のケモカイン濃度や肝内在性 NK 細胞分化に与えている報告から、EZH2 によるエピジェネティック制御が肝内在性 NK 細胞活性の脆弱性に与える影響を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子抑制たんぱく質 EZH2 による遺伝子発現の制御(エピジェネティック制御)が肝内在性ナチュラルキラー(NK)細胞の脆弱性に与える影響を明らかにすることである。肝内在性 NK 細胞は強力な抗腫瘍活性を持っているが、肝切除、門脈結紮、放射線治療によりその活性は著明に低下(脆弱化)する。その詳細なメカニズムと活性維持の方法は不明である。本研究では、EZH2 の過剰発現、ノックダウン及びヒストンメチル化阻害剤によるエピジェネティック制御を行う。また肝内在性 NK 細胞活性低下モデルを用いた検討を行う。その結果、エピジェネティック制御が肝内在性 NK 細胞活性脆弱化に及ぼす変化とその原因が明らかになる。つまり、抗がん剤としてのエピジェネティック薬と免疫細胞療法を併用する新規治療法への礎となる。

本研究は、エピジェネティック薬が肝内在性 NK 細胞の活性に与える影響を詳細に解析し、肝臓切除後に肝臓内 NK 細胞活性が低下するメカニズムを明らかにするものである。最終的な目標は、エピジェネティック制御を通じて自然免疫系を賦活することにより肝臓癌増殖を制御することである。これは、新規治療法及び細胞免疫療法の前臨床試験と位置づけられる。

現在、世界的にも NK 細胞を用いた制癌治療及び NK 細胞と癌再発を検討する研究が数多く発表されているが、そのほとんどが末梢血 NK 細胞を用いたものである。我々は、自然免疫応答を司る NK 細胞を肝臓移植時にグラフト肝の灌流排液から大量に採取する技術を開発し、ヒトの末梢血のみならず肝臓由来 NK 細胞とエピジェネティック変化を詳細に検討可能である。肝癌転移及び癌の初期発生前に重要な役割を果たしている NK 細胞の活性を維持する研究は、世界的にも類を見ない新しい試みと言える。本治療法が確立し得れば、医学的貢献のみならず、医療経済的にも大きく貢献できる期待が持たれる

3. 研究の方法

この研究計画では、遺伝子抑制たんぱく質 EZH2 によるエピジェネティック制御が肝内在性 NK 細胞活性の脆弱性に与える影響を明らかにすることを目的とする。研究計画は以下の通り。

(1) エピジェネティックが肝内在性 NK 細胞活性に与える影響及び基礎解析：

肝内在性 NK 細胞を用いて EZH2 発現変化及び EZH2 阻害剤との共培養を行い、NK 細胞の機能を解析する。具体的には、NK 細胞の表現型・サイトカイン産生能をフローサイトメトリーで評価する。また、肝内在性 NK 細胞のエピジェネティック変化が抗腫瘍活性や腫瘍増殖や転移に関わるメカニズムを解明する。

(2) 肝内在性 NK 細胞脆弱化モデルを用いた EZH2 の機能解析：

肝内在性 NK 細胞の脆弱性モデル(肝切除・門脈結紮・放射線照射)を用いて、肝内在性 NK 細胞のエピジェネティック変化に伴う表現型変化及び機能を解析する。具体的には、肝内在性 NK 細胞の脆弱性モデルに EZH2 阻害剤を投与し、NK 細胞の TRAIL 発現を含めた表面マーカーの解析をフローサイトメトリーで行う。また、EZH2 ノックアウトマウスに肝切除、門脈結紮、放射線照射し、肝内在性 NK 細胞の脆弱化を検討する(表面マーカー、細胞障害性試験)。

(3) EZH2 阻害剤及び NK 細胞免疫治療の抗腫瘍効果とその免疫学的検討：

我々の開発したマウス肝内在性 NK 細胞脆弱化後の肝転移モデルを用いる。EZH2 阻害剤投与及びエピジェネティック処理を行った NK 細胞療法の抗腫瘍効果を免疫学的に検討する。単独投与と

比較して、相乗効果をマウス血液中のNK細胞マーカー、サイトカイン、ケモカイン濃度を検討する。マウス肝転移モデルを用いて、エピジェネティック変化によるNK細胞療法の抗腫瘍効果を免疫学的に検討する。

4. 研究成果

(1) エピジェネティックが肝内在性NK細胞活性に与える影響

B6マウスにエピジェネティック制御薬剤を投与すると、肝内在性NK細胞の抗腫瘍分子であるTRAILの発現は26.0%から46.1%に増加した。我々は以前に、肝内在性NK細胞のTRAIL発現にはCXCL9-CXCR3経路が関わっていることを報告した(Yano T, Ohira M, Nakano R, et al. PLoS One 2017; 12(10):e0186997.)。本実験系においては、エピジェネティック制御薬剤による肝臓内ケモカイン変化は認められず、別の経路が関与することが示唆された。

続いて、肝内在性NK細胞の脆弱化モデルとして70%肝切除マウスモデルを用いた。エピジェネティック制御薬剤であるEZH2投与により、肝内在性NK細胞の活性化マーカー(CD69, NKG2D, NKp46)は増強したが、抗腫瘍分子TRAILの上昇及び細胞障害活性の増強は認めなかった。

一方でNK細胞上のTRAIL分子には一塩基多型が存在し、様々な疾患と関連があることが報告されている。1595番目のシトシンがチミンに変わるTRAILの一塩基多型と、肝細胞癌肝切除後の予後について検討を行った。TRAILの一塩基多型による背景に差はなく、生存率に差を認めなかったが、TTジェノタイプ群が術後の肝外再発と有意に相関することが明らかとなった(Imaoka Y, Ohira M, et al. Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences, 2018; 25(8): 370.)

(2) 肝内在性NK細胞脆弱化モデルを用いたEZH2の機能解析

エピジェネティック制御と肝内在性NK細胞の分化について検討するために肝内在性NK細胞脆弱化モデルとしてマウス肝臓へ放射線照射を行った。マウス肝臓に特異的に放射線照射を行うと、肝臓内のリンパ球の割合はNK細胞を含めて変化しなかった。しかし、肝臓内NK細胞のうち肝内在性NK細胞(DX5-TRAIL+)細胞の割合は、26%から11%に減少して2ヶ月以上にわたり肝内在性NK細胞の割合は回復しなかった。肝内在性NK細胞の細胞障害活性は、放射線照射群で有意に低下し、マウス肝転移モデルにおいて腫瘍の増殖が促進された。放射線照射マウスに造血幹細胞(骨髄・肝臓・脾臓)を移入したが、いずれにおいても肝内在性NK細胞は回復しなかった。この結果は、肝放射線照射により肝内在性NK細胞への分化を抑制する環境変化が示唆された(Nakano R, Ohira M, et al. PLoS One, 2018; 13(6): e0198904.)。肝内在性NK細胞のエピジェネティック制御には、一塩基多型や肝臓内環境も重要であると考えられた。

(3) EZH2阻害剤及びNK細胞免疫治療の抗腫瘍効果とその免疫学的検討

マウス肝転移モデル(マウス肝切除後・門脈結紮後・放射線照射)を用いて、肝内在性NK細胞を用いた細胞療法による抗腫瘍活性を検討した。肝内在性NK細胞脆弱化目的でマウス肝臓へ放射線照射を行った後に、経脾臓的に肝癌腫瘍株Hepa1-6と投与すると肝臓内に腫瘍を形成する。このマウスに肝内在性NK細胞を外来的に投与すると腫瘍は縮小した(Nakano R, Ohira M, et al. PLoS One, 2018; 13(6): e0198904.)。しかし、EZH2阻害剤投与による抗腫瘍効果の増強は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Ryosuke, Ohira Masahiro, Yano Takuya, Imaoka Yuki, Tanaka Yuka, Ohdan Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 Hepatic irradiation persistently eliminates liver resident NK cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0198904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaoka Yuki, Ohira Masahiro, Yano Takuya, Nakano Ryosuke, Tanimine Naoki, Shimizu Seiichi, Kuroda Shintaro, Tahara Hiroyuki, Kobayashi Tsuyoshi, Ohdan Hideki	4. 巻 25
2. 論文標題 Polymorphisms in TRAIL predict long-term survival and extrahepatic recurrence following initial hepatectomy for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 370 ~ 376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imaoka Yuki, Ohira Masahiro, Nakano Ryosuke, Shimizu Seiichi, Kuroda Shintaro, Tahara Hiroyuki, Ide Kentaro, Kobayashi Tsuyoshi, Ohdan Hideki	4. 巻 25
2. 論文標題 Impact of Abdominal Aortic Calcification Among Liver Transplantation Recipients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Liver Transplantation	6. 最初と最後の頁 79 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lt.25311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Ryosuke, Ohira Masahiro, Kobayashi Tsuyoshi, Ide Kentaro, Tahara Hiroyuki, Kuroda Shintaro, Shimizu Seiichi, Kimura Tomoki, Nagata Yasushi, Aikata Hiroshi, Chayama Kazuaki, Ohdan Hideki	4. 巻 164
2. 論文標題 Hepatectomy versus stereotactic body radiotherapy for primary early hepatocellular carcinoma: A propensity-matched analysis in a single institution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 219 ~ 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 今岡祐輝 大平真裕、中野亮介、清水誠一、谷峰直樹、黒田慎太郎、田原裕之、小林剛、井手健太郎、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 肝細胞癌再発予後因子としてのTRAIL遺伝子一塩基多型の役割
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水誠一 大平真裕、中野亮介、谷峰直樹、黒田慎太郎、田原裕之、小林剛、井手健太郎、田中友加、大段秀樹
2. 発表標題 ドナー肝臓由来活性化ナチュラルキラー細胞を用いた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）
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Ohira Ryosuke Nakano, Yuki Imaoka, Yuka Tanaka, Seiichi Shimizu, Hiroyuki Tahara, Kentaro Ide, Tsuyoshi Kobayashi, Andreas G Tzakis, Seigo Nishida, Hideki Ohdan
2. 発表標題 Novel immunotherapy using liver natural killer cells for preventing recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation
3. 学会等名 The 17th meeting of the Society for Natural Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Imaoka, Masahiro Ohira, Takuya Yano, Ryosuke Nakano, Naoki Tanimine, Seiichi Shimizu, Shintaro Kuroda, Hiroyuki Tahara, Tsuyoshi Kobayashi, Hideki Ohdan
2. 発表標題 Polymorphisms in TRAIL predict long-term survival and extrahepatic recurrence following liver resection for primary hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 第30回肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Imaoka, Masahiro Ohira, Takuya Yano, Ryosuke Nakano, Naoki Tanimine, Seiichi Shimizu, Shintaro Kuroda, Hiroyuki Tahara, Tsuyoshi Kobayashi, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan
2. 発表標題 Impact of Aortic Abdominal Calcification among Living Donor Liver Transplant Recipients; A retrospective study
3. 学会等名 2018 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平真裕 中野亮介 今岡祐輝 清水誠一 田原裕之 井手健太郎 小林剛 田中友加 大段秀樹
2. 発表標題 肝臓癌治療における肝内在性NK細胞の可能性
3. 学会等名 第73回消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Ohira
2. 発表標題 The role of Liver resident natural killer cells in treatment of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 2017 Bridging Gaps in Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohira M, Imaoka Y, Sato K, Tahara H, Ide K, Kobayashi T, Tanaka Y, and Ohdan H
2. 発表標題 Adjuvant Immunotherapeutic Approach For Liver Transplant Recipients With Hepatocellular Carcinoma Using Donor Liver Derived Natural Killer Cells
3. 学会等名 2019 American Transplant Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平真裕, 清水誠一, 今岡祐輝, 佐藤幸毅, 山根宏昭, 秋本修志, 田口和浩, 田中飛鳥, 黒田慎太郎, 田原裕之, 井手健太郎, 小林剛, 田中友加, 大段秀樹
2. 発表標題 臓器移植における免疫機能分子一塩基多型の役割
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平真裕, 橋本慎二, 尾上隆司, 今岡祐輝, 佐藤幸毅, 田口和浩, 黒田慎太郎, 田原裕之, 井手健太郎, 小林剛, 田中友加, 大段秀樹
2. 発表標題 生体肝移植周術期の門脈圧がア口免疫応答に与える影響.
3. 学会等名 第26回日本門脈圧亢進症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大平真裕, 清水誠一, 今岡祐輝, 佐藤幸毅, 山根宏明, 秋本修志, 田口和浩, 田中飛鳥, 黒田慎太郎, 田原裕之, 井手健太郎, 小林剛, 田中友加, 大段秀樹
2. 発表標題 Adjuvant immunotherapy using liver natural killer cells for preventing recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----