

氏名 やまもと ゆたか
山本 優

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 277 号

学位授与年月日 平成 30 年 7 月 27 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学位論文題目

**Lung-resident natural killer cells control pulmonary
tumor growth in mice**

(肺組織常在性ナチュラルキラー細胞の肺がん増殖制御に
おける重要性)

論文審査委員

(主査)	教授	藤井 努
(副査)	教授	井村 穰二
(副査)	教授	関根 道和
(副査)	教授	清水 忠道
(指導教員)	教授	芳村 直樹

論文内容の要旨

〔目的〕

医療技術の著しい発展にも関わらず肺癌は未だに制御困難な疾患である。肺癌の治療方法には手術や化学療法、放射線療法があり、近年では抗 PD-1 抗体（ニボルマブ）といった免疫療法が注目を浴びている。免疫療法の奏功率は 20%前後といわれているが、従来の治療方法では改善を得られなかった肺癌患者にとっては新しい希望となっている。自然免疫系リンパ球である Natural Killer 細胞（以下 NK 細胞）は、がん細胞に対して前感作なく応答できる抗腫瘍エフェクター細胞であることから免疫療法への応用が探られている。NK 細胞は Mac-1 (CD11b) と CD27 の発現パターンによって機能的に分類される。マウス CD11b^{hi} mature NK 細胞は CD27 の発現レベルによって CD27^{hi} NK 細胞または CD27^{lo} NK 細胞に分けることができる。これらの CD27^{hi} NK 細胞および CD27^{lo} NK 細胞は異なる細胞表面レセプター群の発現パターンを示し、それに伴い免疫応答において異なる反応性を示す。また非常に興味深いことにそれぞれ CD27^{hi} サブセットは骨髄や 2 次リンパ組織（リンパ節など）に、CD27^{lo} サブセットは非リンパ組織（末梢組織、末梢血中など）への選択的な分布が見られることから、それぞれのサブセットが異なる組織分布によって役割分担をしている可能性が示唆される。がん組織において、皮下移植モデルではケモカイン受容体である CXCR3 を発現する循環型の CD27^{hi} NK 細胞が主に腫瘍浸潤リンパ球中の NK 細胞として存在することが知られている。一方、組織常在型の CD27^{lo} NK 細胞、特に肺における lung-resident NK 細胞のがん細胞に対する免疫応答における重要性は明らかでない。本研究の目的は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス 3LL 細胞株である 3LL-Luc2 細胞を同所移植し作成した原発性肺癌モデルマウス、および同細胞を尾静脈接種して作成した転移性肺癌モデルマウスを用いて、lung-resident NK 細胞の肺組織における抗腫瘍免疫応答における重要性を明らかにすることである。

〔方法並びに成績〕

原発性肺癌モデルマウスは C57BL/6J マウスの左肺へ同所性に 3LL-Luc2 細胞を移植し作成した。腫瘍増殖の経時的変化は in vivo imaging system を用いたルシフェラーゼ発光イメージングで観察した。また腫瘍移植後 10 日目に肺を摘出し、腫瘍を移植した左肺組織及び対照群として右肺組織から単核球を分離し、NK 細胞ならびにそのサブセッ

トについてフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍移植した左肺組織とコントロールである右肺組織におけるリンパ球に占める NK 細胞の割合に差は認めなかったものの、NK 細胞サブセットについて腫瘍を移植した左肺組織では CD27^{hi} (Mac1^{lo}CD27^{hi} 及び Mac1^{hi}CD27^{hi}) NK 細胞の有意な増加を認めた。NK 細胞はケモカイン受容体である CXCR3 や S1P 経路を介してその組織移行や再循環が制御されていることが報告されている。そこで次に、抗 CXCR3 抗体及び S1P 受容体拮抗薬 (FTY720) を用いて、これらが肺がん組織における CD27^{hi} NK 細胞の増加と関係するか検討した。その結果、CXCR3 抗体投与群では CD27^{hi} NK 細胞の腫瘍移植肺組織内での増加を有意に抑制されたが、FTY720 投与群では腫瘍移植肺組織内での NK 細胞サブセットに変化は認められなかった。このことから肺がん細胞同所移植モデルにおける腫瘍移植肺組織内で見られる CD27^{hi} NK 細胞の増加には S1P 経路ではなく CXCR3 が重要であることが示された。

次に NK 細胞の原発性肺癌に対する抗腫瘍免疫応答における重要性を明らかにするために、抗アジアロ GM1 抗体投与により NK 細胞を除去したマウス (NK 細胞除去マウス) に 3LL-Luc2 細胞を同所移植し腫瘍増殖についてコントロール群と比較検討した。NK 細胞除去マウスではコントロール群と比較して有意に腫瘍増殖の促進が認められたことから、原発性肺癌モデルにおいて NK 細胞が腫瘍増殖を抑制していることが示された。次に腫瘍移植した肺組織で見られた CD27^{hi} NK 細胞の増加が、NK 細胞による原発性肺癌の増殖抑制に重要であるかについて検討した。NK 細胞除去マウスとは異なり、抗 CXCR3 抗体投与マウスではコントロール群と比較して、原発性肺癌モデルにおける腫瘍増殖に差を認めなかった。このことは原発性肺癌の NK 細胞による腫瘍増殖抑制には CXCR3 を介した循環型 NK 細胞ではなく、組織常在型の lung-resident NK 細胞が重要であることを示唆すると考えられる。また原発性肺癌モデルに加え、3LL-Luc2 細胞を尾静脈接種して作成した転移性肺癌モデルにおいて同様の検討を行った結果、NK 細胞除去マウスでは移植した転移性腫瘍の増殖が促進されたのに対して、抗 CXCR3 抗体投与マウスではコントロール群と同程度であった。これらの結果は、原発性肺癌モデルと同様に転移性肺癌モデルにおいても組織常在型の lung-resident NK 細胞が肺組織における腫瘍の免疫監視に重要であることを示していると考えられる。

〔総括〕

本研究により、肺組織における腫瘍の免疫監視では組織常在型の lung-resident NK 細胞が重要な役割を担っていることを明らかとした。今後肺癌に対する免疫治療の新たなターゲットとして組織常在型の NK 細胞の活用が期待出来る。

学位論文審査の要旨

【目的】

医療技術の著しい発展にも関わらず肺癌は未だに制御困難な疾患である。肺癌の治療方法には手術や化学療法、放射線療法があり、近年では抗PD-1抗体（ニボルマブ）といった免疫療法が注目を浴びている。免疫療法の奏成功率は20%前後といわれているが、従来の治療方法では改善を得られなかった肺癌患者にとっては新しい希望となっている。自然免疫系リンパ球であるNatural Killer細胞（以下NK細胞）は、がん細胞に対して前感作なく応答できる抗腫瘍エフェクター細胞であることから免疫療法への応用が探られている。NK細胞はMac-1（CD11b）とCD27の発現パターンによって機能的に分類される。マウスCD11b^{hi} mature NK細胞はCD27の発現レベルによってCD27^{hi} NK細胞またはCD27^{lo} NK細胞に分けることができる。これらのCD27^{hi} NK細胞およびCD27^{lo} NK細胞は異なる細胞表面レセプター群の発現パターンを示し、それに伴い免疫応答において異なる反応性を示す。また非常に興味深いことにそれぞれCD27^{hi}サブセットは骨髄や2次リンパ組織（リンパ節など）に、CD27^{lo}サブセットは非リンパ組織（末梢組織、末梢血中など）への選択的な分布が見られることから、それぞれのサブセットが異なる組織分布によって役割分担をしている可能性が示唆される。がん組織において、皮下移植モデルではケモカイン受容体であるCXCR3を発現する循環型のCD27^{hi} NK細胞が主に腫瘍浸潤リンパ球中のNK細胞として存在することが知られている。一方、組織常在型のCD27^{lo}NK細胞、特に肺におけるlung-resident NK細胞のがん細胞に対する免疫応答における重要性は明らかでない。

本研究の目的は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス3LL細胞株である3LL-Luc2細胞を同所移植し作成した原発性肺癌モデルマウス、および同細胞を尾静脈接種して作成した転移性肺癌モデルマウスを用いて、lung-resident NK細胞の肺組織における抗腫瘍免疫応答における重要性を明らかにすることである。

【方法並びに成績】

原発性肺癌モデルマウスはC57BL/6Jマウスの左肺へ同所性に3LL-Luc2細胞を移植し作成した。腫瘍増殖の経時的変化はin vivo imaging systemを用いたルシフェラーゼ発光イメージングで観察した。また腫瘍移植後10日目に肺を摘出し、腫瘍を移植した左肺組織及び対照群として右肺組織から単核球を分離し、NK細胞ならびにそのサブセットについてフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍移植した左肺組織とコントロールである右肺組織におけるリンパ球に占めるNK細胞の割合に差は認めなかったものの、NK細胞サブセットについて腫瘍を移植した左肺組織ではCD27^{hi}（Mac1^{lo}CD27^{hi}及びMac1^{hi}CD27^{hi}）NK細胞の有意な増加を認めた。NK細胞はケモカイン受容体であるCXCR3やS1P経路を介してその組織移行や再循環が制御されていることが報告されている。そこで次に、抗CXCR3抗体及びS1P受容体拮抗薬（FTY720）を用いて、これらが肺がん組織におけるCD27^{hi} NK細胞の増加と関係するか検討した。その結果、CXCR3抗体投与群ではCD27^{hi} NK細胞の腫瘍移植肺組織内での増加を有意に抑制されたが、FTY720投与群では腫瘍移植肺組織内

でのNK細胞サブセットに変化は認められなかった。このことから肺がん細胞同所移植モデルにおける腫瘍移植肺組織内で見られるCD27^{hi} NK細胞の増加にはS1P経路ではなくCXCR3が重要であることが示された。

次にNK細胞の原発性肺癌に対する抗腫瘍免疫応答における重要性を明らかにするために、抗アシアロGM1抗体投与によりNK細胞を除去したマウス（NK細胞除去マウス）に3LL-Luc2細胞を同所移植し腫瘍増殖についてコントロール群と比較検討した。NK細胞除去マウスではコントロール群と比較して有意に腫瘍増殖の促進が認められたことから、原発性肺癌モデルにおいてNK細胞が腫瘍増殖を抑制していることが示された。次に腫瘍移植した肺組織で見られたCD27^{hi} NK細胞の増加が、NK細胞による原発性肺癌の増殖抑制に重要であるかについて検討した。NK細胞除去マウスとは異なり、抗CXCR3抗体投与マウスではコントロール群と比較して、原発性肺癌モデルにおける腫瘍増殖に差を認めなかった。このことは原発性肺癌のNK細胞による腫瘍増殖抑制にはCXCR3を介した循環型NK細胞ではなく、組織常在型のlung-resident NK細胞が重要であることを示唆すると考えられる。また原発性肺癌モデルに加え、3LL-Luc2細胞を尾静脈接種して作成した転移性肺癌モデルにおいて同様の検討を行った結果、NK細胞除去マウスでは移植した転移性腫瘍の増殖が促進されたのに対して、抗CXCR3抗体投与マウスではコントロール群と同程度であった。これらの結果は、原発性肺癌モデルと同様に転移性肺癌モデルにおいても組織常在型のlung-resident NK細胞が肺組織における腫瘍の免疫監視に重要であることを示していると考えられる。

【総括】

本研究により、肺組織における腫瘍の免疫監視では組織常在型のlung-resident NK細胞が重要な役割を担っていることを明らかとした。今後肺癌に対する免疫治療の新たなターゲットとして組織常在型のNK細胞の活用が期待出来る。以上のことから、肺組織常在性ナチュラルキラー細胞の肺がん増殖制御における関与を初めて明らかにした点は新規性があり、未だ制御困難な疾患である肺がんに対する新たな治療の礎となる可能性があるという理由により医学における学術的重要性も高く、本研究を元に肺がんのみならず難治性の感染症への応用や、肺以外の臓器における組織常在型ナチュラルキラー細胞への応用といった理由により臨床的発展性が期待できる。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。