

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	矢野 琢也
学位授与の条件	学位規則第4条第①2項該当		
論文題目 Hepatectomy leads to loss of TRAIL-expressing liver NK cells via downregulation of the CXCL9-CXCR3 axis in mice (肝切除後は CXCL9-CXCR3 経路を介して肝臓内の TRAIL 陽性 NK 細胞が消失する)			
論文審査担当者			
主査	教授	茶山 一彰	印
審査委員	教授	菅野 雅元	
審査委員	講師	今村 道雄	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>肝臓癌に対する肝切除後の再発部位として肝内再発は最多であり重要な課題である。著者等は、マウス肝臓内リンパ球の解析の結果、肝臓内 natural killer (NK)細胞が細胞傷害分子である TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を介して抗腫瘍効果を発揮しており、肝切除後には TRAIL 陽性 NK 細胞が消失し、肝臓癌再発の一因となることを報告してきた。しかし、TRAIL 陽性 NK 細胞が肝切除後に肝臓内から消失するメカニズムに関しては不明である。そこで、TRAIL 陽性 NK 細胞の解析と肝切除後に TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内から消失するメカニズムの解析を行った。</p> <p>マウス肝臓内 NK 細胞のケモカインレセプターの発現をフローサイトメトリーで解析した。マウスに 70%肝切除を行い、肝切除前後の肝臓内ケモカイン・サイトカインの RNA 発現と蛋白濃度測定を行った。CXCL9 に対する肝臓内 NK 細胞の遊走能を migration assay で評価した。さらに CXCL9 産生細胞の同定のため、肝臓内細胞を培養しフローサイトメトリーで解析した。肝切除後の CXCL9 濃度を維持するために、wild-type マウスに対して肝切除を行い、polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)を投与し、CXCL9 の蛋白濃度測定と肝臓内単核球をフローサイトメトリーで解析し、マウス肝癌細胞株 (Hepalclc7) を用いて細胞傷害性試験を行った。同様に CXCR3 KO マウスに対しても肝切除後 poly I:C を投与し CXCL9 の蛋白濃度測定と肝臓内単核球をフローサイトメトリーで解析した。</p> <p>肝臓内 NK 細胞のケモカインレセプターを網羅的に解析すると、TRAIL 陽性 NK 細胞がケモカインレセプター CXCR3 を強発現し、TRAIL 陰性 NK 細胞と比較し、有意に CXCR3 を発現していることを見出した。TRAIL 陽性 NK 細胞はその他のケモカインレセプターの発現は認めなかった。70%肝切除マウスの肝切除前後の肝臓組織で、real time PCR を用いてケモカイン発現の網羅的解析を行ったところ、CXCR3 に対する ligand である CXCL9 と interferon gamma (IFN-<math>\gamma</math>)の発現が肝切除後に有意に低下していた。そして</p>			

肝切除後の CXCL9 の推移は術後 3 日目まで低下し、術後 7 日目に回復していた。さらに、肝臓内 NK 細胞と CXCL9 の共培養による migration assay により、CXCL9 の添加によって肝臓内 NK 細胞の遊走能の促進が認められ、CXCL9 antagonist によって遊走能が抑制された。肝臓内細胞を IFN- $\gamma$  存在下で培養したところ、IFN- $\gamma$  存在下に肝臓内マクロファージにおいて CXCL9 産生の増加がみられた。肝切除後には肝臓内マクロファージは増加するが、その主体は CXCL9 産生能の低い F4/80<sup>low</sup> のマクロファージであった。wild-type マウスと CXCR3 ノックアウトマウスに 70%肝切除を行い、術後 1 日目に poly I:C を投与すると wild-type マウス、CXCR3 ノックアウトマウスともに肝切除後においても肝臓内の CXCL9 は保たれたが、wild-type マウスでのみ TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内に維持され、CXCR3 ノックアウトマウスでは TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内から消失した。また、wild-type マウスでは肝癌細胞株 Hepa1c1c7 に対する細胞傷害性が肝切除後に低下するが、肝切除後 poly I:C を投与することで細胞傷害性が回復した。

肝切除によりケモカイン CXCL9 の発現が肝臓内で低下し、その結果として、CXCR3 を持つ TRAIL 陽性 NK 細胞が肝臓内から消失すると考えられた。CXCL9 は IFN- $\gamma$  存在下に肝臓内マクロファージのうち F4/80<sup>high</sup> のマクロファージが主に産生をしており、肝切除後に肝臓内 IFN- $\gamma$  が低下することでマクロファージからの CXCL9 産生が低下すると考えられた。肝切除後の CXCL9 の低下を防ぐことで、TRAIL 陽性 NK 細胞を肝臓内に維持することができ、肝切除後の腫瘍再発予防の新たな治療戦略になると考える。

以上の結果から、本論文は肝臓内の TRAIL 陽性 NK 細胞が肝切除後に消失するメカニズムとして、CXCR9-CXCR3 経路が関与していることを示し、肝切除後の抗腫瘍免疫に重要な情報となる事を示した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が矢野琢也に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	矢野 琢也
学位授与の条件	学位規則第4条第①2項該当		
論文題目			
Hepatectomy leads to loss of TRAIL-expressing liver NK cells via downregulation of the CXCL9-CXCR3 axis in mice (肝切除後は CXCL9-CXCR3 経路を介して肝臓内の TRAIL 陽性 NK 細胞が消失する)			
最終試験担当者			
主 査	教授	茶 山 一 彰	印
審査委員	教授	菅 野 雅 元	
審査委員	講師	今 村 道 雄	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年1月4日の第72回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年1月5日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 NK細胞の分化における TRAIL 発現</li> <li>2 NK細胞のメモリー機能と TRAIL 発現との関連</li> <li>3 肝切除後 IFN-<math>\gamma</math> 産生低下の機序</li> <li>4 肝切除後におけるマクロファージ動態と肝臓内 NK細胞との関連</li> <li>5 肝切除後の NK細胞機能維持を目的とした臨床的方策</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			