

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	中野 亮介
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1, 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主査	教授 秀道広	印	
審査委員	教授 小林正夫		
審査委員	教授 永田靖		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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を受ける症例が増加している。肝臓に対する放射線照射は、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、肝臓に対する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。これは、肝臓に対する放射線照射により 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ことを示唆する。そこで本研究では、肝臓に対する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を目的とした。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臓全体に対する放射線照射モデルを作成した。肝臓に対する放射線照射線量を 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⁺-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⁺ TRAIL⁺) 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⁺ TRAIL⁻) 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。</p> <p>TRAIL 感受性の肝癌細胞株 (Hepa1-6) を用いて、⁵¹Cr 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。肝臓に対する放射線照射 (10Gy) 後 4 週, 8 週の肝臓内リンパ球は、非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抗腫瘍活性を検討した。肝臓に対する放射線照射 (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、非照射群と肝転移数を比較した。非照射群の肝臓には腫瘍生着は認めなかったが、肝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、同モデルに肝臓に対する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 (0.5x10⁶ 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、肝臓に対する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。</p> <p>次に肝臓に対する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⁻ 細胞) を抽出した。この前駆細胞をリン</p>			

パ球が存在しない Rag2^{-/-}γc^{-/-}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⁺ TRAIL⁺肝内在性 NK 細胞の出現を認めた。一方で肝臓に対する放射線照射 (10Gy) 1 週間後の Rag2^{-/-}γc^{-/-}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、肝臓に対する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、肝臓全体に対する放射線照射は、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、肝臓全体に対する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 細胞への分化を抑制することが誘因と示唆された。肝臓に対する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。以上の結果から、本論文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る点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が中野亮介に博士 (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	中野 亮介
学位授与の条件	学位規則第4条第1)2項該当		
論文題目 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)			
最終試験担当者			
主査	教授 秀道広	印	
審査委員	教授 小林正夫		
審査委員	教授 永田靖		
〔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11月1日の第76回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年11月7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"> 1 肝内在NK細胞と循環NK細胞の放射線感受性の違い 2 肝および骨髄におけるNK細胞分化の機序 3 肝放射線照射の微小環境への影響 4 肝実質細胞の放射線障害 5 組織内在NK細胞の分化機構と特徴 <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>			