

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(村主 遼) 印

(学位論文のタイトル)

High membrane expression of CMTM6 in hepatocellular carcinoma is associated with tumor recurrence

(肝細胞癌において細胞膜上のCMTM6の高発現は術後早期再発と相関する)

(学位論文の要旨) 2,000字程度、A4判

【背景】 CKLF-like MARVEL trans-membrane domain-containing protein 6 (CMTM6) は、リサイクリングエンドソームを介した細胞膜上でのPD-L1の安定した発現に寄与しており、複数の癌腫において腫瘍免疫における負の制御因子としての機能が報告されているが、肝細胞癌におけるCMTM6の発現意義は明らかにされていない。またPD-L1と共にB7 familyに属するリガンドであるPD-L2, B7-H3, B7-H4は、分子構造と発現パターンの類似性から、PD-L1と同様の発現制御メカニズムが存在することが想定されるが、肝細胞癌におけるCMTM6発現とB7 familyリガンドの発現の関連については報告がない。仮にCMTM6がこれら複数の免疫チェックポイントに共通する制御因子である場合、有効な治療標的になり得ると考えられる。本研究では肝細胞癌におけるCMTM6発現の意義と、B7 familyリガンドの発現制御へのCMTM6の関与について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】 ①臨床病理学的検討：肝細胞癌の切除84症例において、CMTM6, PD-L1, B7-H3, B7-H4, Ki-67の発現と、腫瘍内CD8T細胞の浸潤とリンパ球におけるグランザイムBとKi-67の発現を免疫染色法で評価し、それぞれの相関と臨床病理学的因子との関連について解析した。②ヒト肝細胞癌細胞株における検討：Crispr/Cas9 systemを用いて肝細胞癌CMTM6ノックアウト細胞株を樹立し、CMTM6およびB7 familyリガンドの発現をWestern blottingにより評価した。次にノックアウト細胞と野生型細胞の増殖能をWST法により比較解析した。またPD-L1以外のB7 family リガンドの制御メカニズムを明らかにするため、lysosomal degradationの抑制を介してAutophagyを制御するChloroquineを投与したときのCMTM6ノックアウト細胞株におけるB7 family リガンドの発現を解析した。

【結果】 ①CMTM6は84例中17例が高発現を示し、67例が低発現であった。CMTM6高発現群および低発現群ではPD-L1の発現率がそれぞれ47.0%:17.9%($P=0.0224$), PD-L2は82.4%:31.3%($P=0.00021$), B7-H3は58.8%:25.3%($P=0.018$), B7-H4は70.6%:14.9%($P=0.000018$)であり、いずれもCMTM6高発現群において発現率が有意に高かった。またCMTM6高発現群では腫瘍細胞のKi-67 indexが有意に高値であった。さらにCMTM6の発現は腫瘍内CD8T細胞の浸潤と正の相関を認めたが、高発現群ではリンパ球のグランザイムB発現とKi-67 indexが有意に低下しており、CD8T細胞の疲弊化との関連が示唆された。CMTM6高発現群の無再発生存期間中央値は178日、低発現群は742日で、CMTM6高発現群が有意に無再発生存期間が短かった($P=0.00833$)。多変量解析を用いて術後早期再発の予測因子を解析した結果、CMTM6の高発現は独立した予後不良因子となった。腫瘍内CD8T細胞の高浸潤群と低浸潤群の2群に層別化をし、それぞれでCMTM6発現と予後との相関について解析した結果、腫瘍内CD8T細胞の浸潤の程度に関わらず、CMTM6高発現群は無再発生存期間が有意に短かった。CMTM6は腫瘍の免疫環境に関わらず術後

早期再発に関与していることが示唆された。②肝細胞癌細胞株PLC/PRF/5を用いてCMTM6ノックアウト細胞株を樹立した。CMTM6ノックアウト細胞株では野生型細胞株と比較しPD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4の細胞膜上での発現が抑制されていた。またノックアウト細胞は野生型細胞と比較し増殖能の有意な低下を認めた。肝細胞癌細胞株Hep3Bを用いてCMTM6ノックアウト細胞株を樹立しvalidationを行い、同一の結果になることが確かめられた。またクロロキン投与下では、CMTM6ノックアウト細胞株におけるB7-H3とB7-H4の発現は野生型細胞と同等のレベルに回復しており、PD-L1と共通のメカニズムで制御されていることが示唆された。

【考察】肝細胞癌においてCMTM6は、術後早期再発を予測するための新規バイオマーカーになると考えられた。またCMTM6は肝細胞癌の増殖を直接促進すると共に、複数のB7 familyの発現制御を介して腫瘍免疫の疲弊化に関与していると考えられ、CMTM6は免疫治療における新たな治療標的になり得ると考えられた。