

学位論文（博士）

Immune Evasion of Hepatoma Cancer Stem-Like
Cells from Natural Killer Cells

（肝癌幹細胞様細胞におけるナチュラルキラー細胞
からの免疫逃避）

氏名 木村 祐太

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和4年12月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	8
6. 謝辞	10
7. 参考文献	10
8. 図表	15

1. 要旨

背景：肝癌は肝内転移を生じやすく、その予後は不良である。がん幹細胞様細胞（CSLCs）とは、幹細胞性、腫瘍形成能、治療抵抗性に加え、転移能亢進といった特徴を有している。近年では、がんの転移形成や制御において、宿主の免疫機構が重要な働きを担っていると考えられており、今回、肝癌細胞株から誘導した CSLCs の免疫逃避能について検討を行った。

方法：Sphere 誘導培地を用いて、Sphere 細胞の形態で肝癌細胞株から CSLCs を誘導した。免疫逃避に関わる遺伝子およびタンパク発現を、RNA シーケンス、フローサイトメトリー、ELISA 法を用いて解析し、親株と Sphere 細胞とで比較した。親株と Sphere 細胞それぞれの、NK 細胞に対する感受性について、クロム放出試験を用いて比較検討した。BALB/c ヌードマウスを用いた異種移植実験にて、親株と Sphere の腫瘍形成能を比較した。

結果：肝癌細胞株 SK-HEP-1 から誘導した Sphere 細胞（SK-sphere）では、親株と比較し、細胞膜上の PD-L1、PD-L2、CEACAM1 の発現が亢進し、ULBP1、MICA/MICB の発現は低下していた。また、SK-sphere の培地中では、可溶性 MICA の濃度が上昇していた。SK-sphere における HLA class I 発現低下は見られなかった。肝癌細胞株 SK-HEP-1 および HLE から誘導した Sphere 細胞を用いて、NK 細胞に対する感受性をそれぞれの親株と比較したところ、どちらの Sphere 細胞においても NK 細胞による細胞障害性がより低下していた。NK 細胞を保持するヌードマウスにおいて、親株の移植と比較して SK-sphere を移植した際により大きな腫瘍を形成した。

結論：肝癌細胞株から誘導した CSLCs は NK 細胞を介した免疫系からの逃避能が亢進している事が示唆された。

2. 背景

肝細胞癌（Hepatocellular carcinoma; HCC）や肝内胆管癌（Intrahepatic cholangiocarcinoma; ICC）などの原発性肝癌は、世界的に患者数も多く、3 番目にがん関連死亡が多いがん種である(1)。HCC は原発性肝癌の 85-90%を占めており(2)、門脈をはじめとした脈管侵襲を来しやすく、結果として肝内転移や根治切除後の早期再発が多い疾患である(3, 4)。HCC の最も効果的な治療は外科的切除であるが(5)、術後 2 年以内の再発が多く(6)、新規発癌も含めたその頻度は、術後 5 年で 70%に達する(6, 7)。原発性肝癌として 2 番目に多い ICC もまた、リンパ節転移や肝内転移が多く(8)、根治術後の再発率が高い(9)。リンパ節転移を伴っていた場合、根治術後の 5 年生存率は 20%未満である(9)。これらのことから、肝癌患者の予後改善のためには、転移の制御が重要である。

近年、がん細胞が免疫逃避能を獲得することが、がんの進行や転移形成に関わっていると考えられており、実臨床においても、T 細胞の免疫チェックポイント分子である Programmed death-1 (PD-1) や Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) を標的とした阻害剤が、固形がんに対して有効であることが明らかとなっている(10)。免疫細胞の中で

も、自然免疫を担う NK 細胞は、がん細胞を含めた外敵に対して HLA 非拘束性に即応できるため、最近では腫瘍形成や転移形成の制御に関与していると考えられている(11)。

がん幹細胞 (Cancer stem cells; CSCs) とは腫瘍組織中に少数存在するとされる細胞集団であり、自己複製能、多分化能、腫瘍形成能といった幹細胞としての性質を持つとされる(12)。さらに、抗がん剤や放射線といった既存治療への抵抗性を有し、転移や切除後の再発にも寄与していると考えられている(12)。上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) は、癌が浸潤・転移を起こす際に鍵となる現象であり、これによって一旦分化した癌細胞が再び幹細胞性を獲得していると考えられる(13)。我々はこの癌細胞の可塑性に注目し、Neural survival factor-1を含む独自の培地を用いることで、ヒト肝癌細胞株および膀胱癌細胞株から浮遊細胞塊として、がん幹細胞様細胞 (Cancer stem-like cells; CSLCs) を誘導し、解析に用いてきた(14-16)。これまでに、我々が誘導した CSLCs は抗がん剤耐性や転移能が亢進していること、がん幹細胞マーカーである CD44 variant や EMT 関連遺伝子の発現が亢進していることを報告してきた(14, 15, 17)。CSC マーカーの発現に関しては、CD133 陽性である典型的な肝癌幹細胞(18)と異なり、我々が誘導した CSLCs は CD133 陰性、CD44^{high}、CD24^{low}であった(14)。

悪性黒色腫 CSCs が免疫逃避能を有していることが報告されて以来(19)、現在では乳癌、肺癌、皮膚癌などその他の固形癌 CSCs においても、特に T 細胞に対する免疫逃避能が亢進していることが明らかとなっている(20-22)。一方で、CSCs の NK 細胞に対する感受性については、未だ議論の余地がある(23-25)。

本研究では、網羅的 RNA 解析による免疫逃避関連遺伝子の発現解析と、共培養による NK 細胞感受性評価を行い、肝癌 CSLCs の免疫逃避能について検討した。

3. 方法

【細胞株】

ヒト肝癌細胞株 SK-HEP-1 と HLE をそれぞれ the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) と JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) から購入し、使用した。細胞は 10% 熱不活化ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan)、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、1.5 g/l 炭酸水素ナトリウムを含んだ Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; 日水製薬, Tokyo, Japan) を用い、37°C、5% CO₂ の加湿環境で培養した。

【Sphere の誘導】

浮遊細胞塊である Sphere 細胞を誘導するため、既報の Sphere 誘導培地に親株を播種した(14, 18)。親株は播種前に洗浄して血清を除去し、37°C、5% CO₂ の加湿環境で Sphere 誘導培地にて培養した。培養 6 日目に培地を半量交換し、7 日目に Sphere 細胞を回収した。

Sphere 細胞は細胞塊として誘導されるため、Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) を用いて単細胞懸濁液としたうえで、細胞数カウントや実験に使用した。

【RNA シーケンス】

細胞からの RNA の抽出は miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を使用した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina, Tokyo, Japan) を用いてライブラリー調整を行った。NextSeq 500 (Illumina) を用いてペアエンドシーケンスを実施した。

クオリティチェック (18) の後、STAR (version 2.5.1b) (26) にてショートリードをリファレンスゲノム (hg38) にマッピングした。鎖特異的なカウントは RSEM (version 1.3.3.) (27) を用いて取得し、TCC package (29, 30) を用いて Trimmed mean of M-values 法で正規化した。Differentially expressed genes (DEGs) は edgeR (version 3.28.1) (31, 32) で同定した。Gene set enrichment 解析は GSEA2 (version 2.2.1) と Molecular Signatures Database v7.4. (33) を使用して行った。

【フローサイトメトリー】

細胞は Fixable Viability Dye eFluor 450 (Thermo Fisher Scientific) で染色し、死細胞を区別した。フローサイトメトリー解析に用いた蛍光抗体を補足表 S1 に示す。フローサイトメーターは MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec, Tokyo, Japan) を使用した。

【ELISA】

培地交換から 24 時間後の細胞培養上清を回収し、ELISA による解析に使用した。Human MICA ELISA Kit (ab59569; Abcam, Tokyo, Japan) を用いて可溶性 MICA (sMICA) 濃度を測定した。また、標的細胞と NK 細胞との共培養後に上清を回収し、Human Perforin ELISA Kit (ab46068; Abcam) を用いて上清中のパーフォリン濃度を測定した。吸光度測定には EnVision plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA) を使用した。

【細胞障害性試験】

非胆がん患者の全血から、Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いた密度勾配遠心法で末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分離した。さらに NK Cell Isolation Kit, Human (Miltenyi) を用いて PBMC から NK 細胞を分離した。分離した NK 細胞は X-VIVO 15 培地 (Lonza, Tokyo, Japan) にて培養し、フローサイトメトリーで CD3 陰性/ CD56 陽性の NK 細胞にあたる集団が 70-85%であることを確認した。非胆がん患者から分離した PBMC の使用は、山口大学 治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会の承認を得て行った (2021-089)。

NK 細胞による親株および Sphere 細胞への細胞障害性はクロム放出試験を用いて評価し

た。0.5×10⁵ cells/ml の標的細胞を 1.85 MBq の Na₂⁵¹CrO₄ (PerkinElmer) で 1 時間、37°C で標識し、NK 細胞と共培養した。37°C、4 時間の共培養後、培養上清中の放射線を 2480 Wizard gamma counter (PerkinElmer) で測定した。細胞障害性は% specific lysis を用いて評価した {% specific lysis = [(試験放出値-自然放出値) / (最大放出値-自然放出値)] × 100}。標的細胞に終濃度 5% のドデシル硫酸ナトリウムを加えたサンプルおよび NK 細胞を加えないサンプルからの測定値を ⁵¹Cr の最大放出値および自然放出値として取得した。

【異種移植モデルによる腫瘍形成】

メス BALB/cAJcl-*nu/nu* マウス (ヌードマウス) を CLEA Japan (Tokyo, Japan) から購入し、適切に管理された動物実験施設内で飼育した。すべての動物実験は山口大学動物使用委員会の規定に従い、United States National Institute of Health (Bethesda, MD, USA) の発行する the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を遵守して行った。8-12 週齢のヌードマウス皮下に、27 ゲージ針を用いて 1.0×10⁶ 個の癌細胞を移植した。計 5 匹のマウスを使用し、親株である SK-HEP-1 を左側腹部に、誘導した Sphere 細胞を右側腹部にそれぞれ移植した。形成された腫瘍体積を次式 {腫瘍体積 = [(長径) × (短径)²] / 2} により計算した。実験に用いたマウスは 8 週間後に安楽死に供した。

【免疫組織染色】

ヌードマウスに形成された皮下腫瘍を 10% ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。3 μm 厚で切り出した切片を、200:1 に希釈した goat anti-mouse NKp46/NCR1 polyclonal antibody (AF2225; R&D systems) で 4°C、一晩反応させた。その後、切片を二次抗体 [Histofine Simple Stain MAX PO (G); ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan] と 30 分反応させた。反応は 3,3'-ジアミノベンジジンクロモゲンで可視化し、ヘマトキシリンで対比染色した。顕微鏡画像は BZ-X710 (Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。

【統計解析】

各実験はそれぞれ最低 2 回施行した。数値は平均値±標準偏差で表記した。検定は R version 3.6.3 ソフトウェア (the R project website, <http://www.r-project.org/>) にて Turkey-Kramer の多重検定および Welch の *t* 検定を行った。*P* 値 < 0.05 を統計学的有意とした。

4. 結果

【T 細胞免疫に関連した遺伝子発現】

RNA シーケンスにて親株である SK-HEP-1 と、そこから誘導した Sphere 細胞との網羅的 RNA 発現解析を行った。T 細胞免疫に関連した DEGs を表 1 に示す。T 細胞に抑制的に働く、PD-L2、CEACAM1、PD-L1 をコードする mRNA は、親株と比較して、Sphere 細胞で発現が亢進

していた ($q < 0.05$)。また、HLA class II をコードする mRNA は Sphere 細胞において発現が低下していた ($q < 0.05$)。一方、HLE の場合、親株、Sphere 細胞ともにこれらの遺伝子発現は低値であった (補足表 S2)。

次に細胞膜表面のタンパクレベルでの発現を、フローサイトメトリーを用いて検証した。SK-HEP-1 から誘導した Sphere 細胞においては、親株と比較して PD-L1 (59.0% vs 16.2%)、PD-L2 (79.7% vs 17.0%)、CEACAM1 (6.9% vs 1.7%) の陽性細胞の割合が上昇していた (図 1)。

【NK 細胞免疫に関連した遺伝子発現】

NK 細胞免疫に関連した DEGs を表 1 および補足表 S2 に示す。NK 細胞を活性化させる ULBP1 の発現は、親株の SK-HEP-1 と比較し、Sphere 細胞で低下していた ($q < 0.05$)。一方、同じく NK 細胞の活性化に関与する ULBP2、MICA、MICB の発現は、Sphere 細胞において亢進していた ($q < 0.05$)。興味深いことに、細胞膜上のタンパクレベルでみると、Sphere 細胞においては ULBP1 だけでなく、MICA/MICB 陽性細胞の割合も大きく低下しており (図 2a、2b)、MICA/MICB の発現は mRNA レベルと細胞膜タンパクレベルで逆の関係となっていた。細胞膜から遊離し、周囲に分泌された sMICA は NK 細胞に対して抑制的に作用すると報告されていることから (34)、培養上清中の sMICA 濃度を測定した。結果、親株の SK-HEP-1 と比較し、Sphere 細胞の培養上清中の sMICA 濃度は 2 倍に上昇していることが明らかとなった ($P < 0.05$; 図 2c)。

NK 細胞に抑制的に働く HLA 分子をコードする mRNA 発現は、親株と比較し、Sphere 細胞で発現が亢進していた (表 1、補足表 S2)。細胞膜上のタンパクレベルでみると、親株、Sphere 細胞ともに HLA-ABC 分子の発現は維持されていた (図 2d、2e)。

Gene set enrichment 解析では、親株の SK-HEP-1 と比較し、Sphere 細胞においてリンパ球免疫に抑制的に働く遺伝子群の発現が有意に亢進していた (図 3)。この遺伝子群の中でも、*SERPINB4*、*HLA-E*、*HLA-B*、*CEACAM1*、*MICA*、*CLEC12B*、*IL7R*、*HLA-G*、*HLA-F*、*HLA-A*、*SERPINB9* が core enrichment gene として同定された。

【NK 細胞に対する感受性】

クロム放出試験にて、親株と Sphere 細胞それぞれに対する NK 細胞の細胞障害性を評価した (図 4a)。親株である SK-HEP-1、HLE、それらから誘導した Sphere 細胞を標的細胞として ^{51}Cr で標識し、NK 細胞と Effector/Target 比 (E:T 比) 2:1、5:1、10:1 で共培養した。親株である SK-HEP-1 および HLE を標的細胞とした場合、E:T 比の上昇に従って NK 細胞による細胞障害性も有意に上昇したが、Sphere 細胞の場合は E:T 比を上げてても細胞障害性の増加はわずかであった。また、すべての E:T 比において、親株と比較し、Sphere 細胞では NK 細胞による細胞障害性が低く抑えられていた。さらに別の非担がん患者から分離した NK 細胞も使用し、同様の結果が得られることを確認した (補足図 S1)。また、NK 細胞と標的細胞

を 24 時間共培養した後、培養上清中のパーフォリン濃度を測定したところ、親株と比較して、Sphere 細胞の上清中ではパーフォリン濃度が低く抑えられていた (図 4b)。

【NK 細胞機能が維持された免疫不全マウスにおける腫瘍形成能】

成熟 T 細胞を欠くが、NK 細胞機能は保持するヌードマウスを用いて腫瘍形成能を評価した (図 5a、補足図 S2)。親株である SK-HEP-1 と、そこから誘導した Sphere 細胞とをそれぞれヌードマウスの左右側腹部に皮下移植した。8 週間後に皮下腫瘍を摘出し、腫瘍体積を比較したところ、Sphere 細胞に由来する腫瘍は、親株由来のそれと比較し、有意に腫瘍体積が大きかった ($P < 0.05$)。興味深いことに、摘出した腫瘍を用いて RNA シーケンスを行ったところ、PD-L2、HLA-A-C、HLA-E、MICA、MICB に関しては細胞株の解析時と同様に有意な発現変化が観察された (表 2)。免疫染色では、腫瘍辺縁にマウス NK 細胞マーカーである NKp46/NCR1 陽性細胞が少数観察された (図 5b)。摘出した腫瘍の RNA シーケンスでは、親株と Sphere 細胞由来の腫瘍とで、マウス NK 細胞マーカーの発現に差はなかった (補足表 S3)。

5. 考察

本研究では、ヒト肝癌細胞株から誘導した CSLCs の免疫逃避能について検討を行った。RNA シーケンスの結果、親株と比較し、CSLCs では免疫逃避に関連した mRNA の発現変化がみられた (表 1、図 3)。さらに共培養実験において、CSLCs では NK 細胞からのパーフォリン分泌および NK 細胞による細胞障害性が低く抑えられていることが明らかとなった (図 4)。

CSCs を含め、がん細胞は様々な方法で宿主の免疫機構から逃避していると考えられており、免疫抑制分子の利用、抗原提示能の欠如、腫瘍微小環境への免疫抑制細胞の誘導などが報告されている (25)。我々が誘導した SK-HEP-1 由来 CSLCs では、免疫抑制性分子である PD-L1、PD-L2、CEACAM1 の発現亢進が mRNA およびタンパクレベルで観察された。PD-L1 および PD-L2 は T 細胞の抑制に関わる免疫チェックポイント分子 PD-1 のリガンドであり (35)、CSC では EMT を介して PD-L1 発現の亢進と安定化が促進されていると報告されている (36)。CEACAM1 は T 細胞の抑制に関わる TIM-3 のリガンドとして同定された分子である (37)。興味深いことに、PD-1 や TIM-3 は T 細胞だけでなく、NK 細胞にも発現していることが明らかとなっている (38, 39)。

細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T cells; CTLs) への抗原提示に不可欠な MHC 分子 (ヒトにおける HLA 分子) の欠如は、しばしば CSCs で認められる (25)。ヒトおよびマウス固形癌由来の複数の CSCs では、MHC class I 分子の発現が低下していると報告されている (21, 40, 41)。しかしながら本研究において、SK-HEP-1 由来 CSLCs では、細胞表面の HLA-ABC 分子の欠如はわずかであり、mRNA レベルでは、その発現が亢進していた。MHC class I 分子の欠如は“非自己”の証であり、このような細胞は NK 細胞によって排除される (11)。また、MHC-class I 分子に加え、非古典的 MHC 分子の 1 つである HLA-E は NK 細胞に抑制シグナルを伝達すると報告されている (25)。HLA-E 分子は神経膠腫 CSCs で発現が報告されており、神経

膠腫 CSCs で HLA-E 遺伝子をノックダウンすると、NK 細胞への感受性が増加することが報告されている (42)。これらのことから、SK-HEP-1 由来 CSLCs における HLA 分子の発現維持は、NK 細胞からの逃避に有利に働いていると示唆された。

NK 細胞の活性化は、複数のレセプターを介した活性化シグナルと抑制シグナルのバランスで制御されている (11)。本研究において、NKG2D のリガンドである、ULBP1、MICA/MICB の細胞膜上の発現は、SK-sphere において大幅に低下していた (表 1、図 2)。NKG2D は最もよく知られた活性化レセプターの 1 つであり、すべての NK 細胞と一部の T 細胞に発現している (17)。それゆえ、いくつかのがん細胞では細胞膜上のリガンド発現を低下させることによって NKG2D を介した免疫機構から逃避していると考えられている (11)。Shedding は細胞膜上の MICA 分子発現を低下させるメカニズムとして知られている (34)。これは細胞膜上の MICA 分子の細胞外ドメインがメタロプロテアーゼによって切断され、周囲に分泌される現象である。細胞膜上の MICA 分子は NK 細胞の活性化に関与するが、Shedding によって分泌された sMICA は逆に、NK 細胞の抑制に作用するとされている (43)。SK-HEP-1 由来 CSLCs では、親株と比較して mRNA レベルで MICA/MICB の発現が亢進していたが、細胞膜上のタンパク発現は逆に低下し、sMICA 濃度が上昇していた (表 1、図 2)。このことから、Shedding による NK 細胞逃避を利用していることが示唆された。

SK-HEP-1 由来 CSLCs では、リンパ球免疫に抑制的に働く遺伝子群の発現が上昇しており、HLA class I や MICA、CLEC12B といった、特に NK 細胞逃避に関係する遺伝子が Core enrichment genes として同定された (図 3)。グランザイム M および B の阻害物質である SERPINB4 と SERPINB9 (44, 45) もまた、Sphere 細胞で発現が亢進していた。これらの結果から、我々は NK 細胞逃避能に着目し、研究を行った。今回の研究で、SK-HEP-1 および HLE 由来の CSLCs は親株と比較し、NK 細胞による細胞障害性が低く抑えられていることが明らかとなった (図 4a)。過去の報告では、乳癌や卵巣癌由来 CSC では、NKG2D リガンドの発現低下や、MHC 分子の発現亢進といったメカニズムを介して、NK 細胞からの逃避能が亢進しているとされている (23, 46)。また、ヒト MICA 分子はマウス NKG2D と結合することが可能であり、MICA を強制発現させたマウス悪性黒色腫およびマウス大腸癌細胞株と、免疫機能が維持されたマウスを用いた動物実験において、MICA shedding の阻害が肺転移の形成を抑制したと報告されている (47)。このことは、ヒト細胞株とマウスを用いて行った我々の実験結果に矛盾しないものである (図 5a)。我々の動物実験において、MICA を含めた免疫逃避関連遺伝子の発現変化は、皮下に形成された腫瘍の RNA 解析でも観察されており (表 2)、形成された腫瘍体積の差は、CSLCs の腫瘍形成能亢進と免疫逃避能亢進の両方に由来していると考えられた。

CSCs の NK 細胞に対する感受性についてはまだ議論の余地があり、がん種や細胞株によって結果は様々である。卵巣癌や大腸癌由来のいくつかの CSCs では、MHC 分子の発現が低下しており、これらは NK 細胞によって“非自己”と認識され、排除されると報告されている (40, 41)。別の研究では、複数の固形癌由来 CSCs において、NKG2D リガンドの発現や、Fas

や DR5 といった Death receptor の発現が亢進しており、これらは NK 細胞によって効率的に排除されると報告されている (24)。本研究において、SK-HEP-1 および HLE 由来 CSLCs は NK 細胞に対する感受性が低下していたが、SK-sphere でみられた sMICA 濃度の上昇は HLE では観測されず (補足図 S3)、その逃避メカニズムは細胞株ごとに異なっていると考えられた。一方で、条件培地を用いた共培養では、SK-HEP-1 および HLE 由来 CSLCs の両方で、NK 細胞感受性のさらなる低下がみられたことから (補足図 S4)、HLE 由来 CSLCs では sMICA 以外の、何らかの免疫抑制性液性因子が関与していることが示唆された。我々は最近、SK-HEP-1 が *RAB3B* 遺伝子によって調節されるエクソソーム分泌を介し、CSLCs としての性質を獲得している可能性を報告した (48)。このエクソソーム分泌の亢進は HLE 由来 Sphere 細胞においても観測され (補足図 S5a)、エクソソーム阻害剤存在下では NK 細胞への感受性が増すことも示された (補足図 4b)。*RAB3B* 以外の RAB ファミリーの発現について検討したところ、エクソソーム分泌に関与すると考えられている *RAB27B* (49) が、SK-HEP-1 および HLE 由来 Sphere 細胞の両方で発現亢進していることが示された (補足図 5b)。以上のことから、エクソソームは HLE 由来 CSLCs が分泌する免疫抑制性液性因子の候補の 1 つと考えられるが、今後さらなる研究が必要である。

転移の制御において、循環腫瘍細胞の迅速な排除が NK 細胞に与えられた重要な役割であるとされている (11, 50)。HCC を含めた固形癌患者において、腫瘍浸潤リンパ球の程度と予後が相関することが知られているが (51)、腫瘍浸潤リンパ球中における NK 細胞の割合は少数である (50)。一方で循環 NK 細胞の量や質は、転移の頻度と逆相関することが報告されている (50)。我々はマウスを用いた動物実験の結果から、SK-HEP-1 由来 CSLCs の転移能が亢進していることを報告した (17)。これらのことから、NK 細胞からの逃避能亢進は CSLCs の転移能亢進に寄与していると考えられ、その逃避メカニズムを詳細に解明することで、将来的には転移の制御につながる可能性が示された。

結語として、我々が誘導した肝癌幹細胞様細胞は、HLA class I 分子の発現維持、免疫関連リガンドの発現調整、さらに免疫抑制性の液性因子の利用により、特に NK 細胞から逃避している可能性が示唆された。

6. 謝辞

本研究にあたり、ご指導頂いた永野浩昭教授に深甚なる謝意を表します。また、直接ご指導を賜りました恒富亮一先生に心より拝謝申し上げます。また、RI 実験に関して技術のご指導をしていただいた坂口修一先生に深謝いたします。

7. 参考文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-49.

2. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16018.
3. Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, et al. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Ann Surg*. 2011;253:453-69.
4. Sakamoto K, Nagano H. Surgical treatment for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus. *Hepatol Res*. 2017;47:957-62.
5. Ban D, Ogura T, Akahoshi K, Tanabe M. Current topics in the surgical treatments for hepatocellular carcinoma. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018;2:137-46.
6. Tabrizian P, Jibara G, Shrager B, Schwartz M, Roayaie S. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Ann Surg*. 2015;261:947-55.
7. Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, et al. Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: the Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC guidelines) 2019 update. *Hepatol Res*. 2019;49:1109-13.
8. Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2014;60:1268-89.
9. Yamashita YI, Shirabe K, Beppu T, et al. Surgical management of recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma: predictors, adjuvant chemotherapy, and surgical therapy for recurrence: a multiinstitutional study by the Kyushu study group of liver surgery. *Ann Gastroenterol Surg*. 2017;1:136-42.
10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2443-54.
11. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:7-19.
12. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10:717-28.
13. Fang X, Cai Y, Liu J, et al. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene*. 2011;30:4707-20.
14. Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, Watanabe Y, Hazama S, Oka M. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. *BMC Cancer*. 2014;14:722.
15. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, et al. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem-like cell-enriched population. *Int J Oncol*. 2014;45:1857-66.

16. Fujiwara Y, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Pancreatic cancer stem-like cells with high calreticulin expression associated with immune surveillance. *Pancreas*. 2021;50:405-13.
17. Nishiyama M, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Metastatic ability and the epithelial-mesenchymal transition in induced cancer stem-like hepatoma cells. *Cancer Sci*. 2018;109:1101-9.
18. Nio K, Yamashita T, Kaneko S. The evolving concept of liver cancer stem cells. *Mol Cancer*. 2017;16:4.
19. Schatton T, Frank MH. Antitumor immunity and cancer stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:154-69.
20. Hsu JM, Xia W, Hsu YH, et al. STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nat Commun*. 2018;9:1908.
21. Morrison BJ, Steel JC, Morris JC. Reduction of MHC-I expression limits T-lymphocyte-mediated killing of cancer-initiating cells. *BMC Cancer*. 2018;18:469.
22. Miao Y, Yang H, Levorse J, et al. Adaptive immune resistance emerges from tumor-initiating stem cells. *Cell*. 2019;177:1172-86. e14.
23. Wang B, Wang Q, Wang Z, et al. Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells. *Cancer Res*. 2014;74:5746-57.
24. Ames E, Canter RJ, Grossenbacher SK, et al. NK cells preferentially target tumor cells with a cancer stem cell phenotype. *J Immunol*. 2015;195:4010-9.
25. Tsuchiya H, Shiota G. Immune evasion by cancer stem cells. *Regen Ther*. 2021;17:20-33.
26. Wang T, Liu J, Shen L, et al. STAR: an integrated solution to management and visualization of sequencing data. *Bioinformatics*. 2013;29:3204-10.
27. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinform*. 2011;12:323.
28. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11:R25.
29. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinform*. 2013;14:219.
30. Tang M, Sun J, Shimizu K, Kadota K. Evaluation of methods for differential expression analysis on multi-group RNA-seq count data. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:361.

31. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26:139-40.
32. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:4288-97.
33. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15545-50.
34. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, et al. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*. 2008;68:6368-76.
35. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:12293-7.
36. Lee Y, Shin JH, Longmire M, et al. CD44⁺ cells in head and neck squamous cell carcinoma suppress T-cell-mediated immunity by selective constitutive and inducible expression of PD-L1. *Clin Cancer Res*. 2016;22:3571-81.
37. Huang YH, Zhu C, Kondo Y, et al. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*. 2015;517:386-90.
38. Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J Clin Invest*. 2018;128:4654-68.
39. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*. 2016;44:989-1004.
40. Koh J, Lee SB, Park H, Lee HJ, Cho NH, Kim J. Susceptibility of CD24(+) ovarian cancer cells to anti-cancer drugs and natural killer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427:373-8.
41. Tallerico R, Todaro M, Di Franco S, et al. Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules. *J Immunol*. 2013;190:2381-90.
42. Wolpert F, Roth P, Lamszus K, Tabatabai G, Weller M, Eisele G. HLA-E contributes to an immune-inhibitory phenotype of glioblastoma stem-like cells. *J Neuroimmunol*. 2012;250:27-34.
43. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional

- implications. *Scand J Immunol.* 2013;78:120-9.
44. de Koning PJ, Kummer JA, de Poot SA, et al. Intracellular serine protease inhibitor SERPINB4 inhibits granzyme M-induced cell death. *PLoS One.* 2011;6:e22645.
 45. Bird CH, Sutton VR, Sun J, et al. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol.* 1998;18:6387-98.
 46. Akhter MZ, Sharawat SK, Kumar V, et al. Aggressive serous epithelial ovarian cancer is potentially propagated by EpCAM(+)CD45(+) phenotype. *Oncogene.* 2018;37:2089-103.
 47. Ferrari de Andrade L, Tay RE, Pan D, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science.* 2018;359:1537-42.
 48. Tsunedomi R, Yoshimura K, Kimura Y, et al. Elevated expression of RAB3B plays important roles in chemoresistance and metastatic potential of hepatoma cells. *BMC Cancer.* 2022;22:260.
 49. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. RAB27A and RAB27B control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010;12:19-30.
 50. López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell.* 2017;32:135-54.
 51. Wada Y, Nakashima O, Kutami R, Yamamoto O, Kojiro M. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology.* 1998;27:407-14.

8. 図表

表 1 RNA レベルにおける T 細胞および NK 細胞のリガンド発現

Ligand	Receptor	TPM*			<i>q</i> value**
		Parental cells	Sphere cells	(ratio)	
Inhibitory for T cells					
PDCD1LG2 (PD-L2)	PD-1	1.31±0.46	4.60±0.36	(3.51)	<0.01
CEACAM1	TIM-3	0.07±0.02	0.18±0.05	(2.62)	<0.01
CD274 (PD-L1)	PD-1	0.34±0.16	0.64±0.07	(1.88)	<0.01
HLA-DRA	LAG3	7.82±0.90	2.89±1.03	(0.37)	0.01
HLA-DMB	LAG3	0.30±0.05	0.10±0.02	(0.34)	<0.01
HLA-DRB5	LAG3	1.23±0.11	0.42±0.06	(0.34)	<0.01
HLA-DRB1	LAG3	7.41±0.65	2.52±0.79	(0.34)	<0.01
Inhibitory for NK cells					
HLA-E	CD94/NKG2A	37.58±4.90	82.47±16.50	(2.19)	<0.01
HLA-B	CD158A	68.24±12.66	134.3±27.66	(1.97)	<0.01
HLA-C	CD158A	39.97±9.76	76.75±22.94	(1.92)	<0.01
HLA-A	CD158B1	99.93±15.50	144.3±35.32	(1.44)	0.03
Activating for NK cells					
TNFSF9 (4-1BB-L)	4-1BB	0.93±0.10	3.85±0.46	(4.14)	<0.01
ULBP2 (NKG2DL2)	NKG2D	1.07±0.11	2.00±0.16	(1.87)	<0.01
MICA	NKG2D	14.34±0.72	25.77±2.53	(1.80)	<0.01
NCR3LG1 (B7-H6)	NKp30	0.80±0.34	1.33±0.31	(1.65)	<0.01
MICB	NKG2D	7.94±0.56	12.3 ±1.22	(1.56)	0.03
PCNA	NKp44	58.53±10.54	32.63±6.08	(0.55)	0.01
CADM1 (TSLC1)	CRTAM	0.50±0.27	0.25±0.05	(0.50)	0.01
ULBP1 (NKG2DL1)	NKG2D	1.45±0.80	0.54±0.15	(0.37)	<0.01

*RNA 発現量は Transcripts per million (TPM, 平均 ± 標準偏差) で表す。

**False discovery rate で補正した *p* 値 (*q* values) は Trimmed mean of M-values 法で正規化したデータを用いて計算した。

表 2 異種移植実験における T 細胞および NK 細胞のリガンド発現

Ligand	Receptor	TPM*			q value**
		Parental cells	Sphere cells	(ratio)	
Inhibitory for T cells					
PDCD1LG2 (PD-L2)	PD-1	3.56±0.16	6.36±0.72	(1.79)	<0.01
CEACAM1	TIM-3	0.27±0.07	0.46±0.14	(1.75)	0.445
CD274 (PD-L1)	PD-1	0.99±0.17	1.47±0.24	(1.49)	0.887
HLA-DRA	LAG3	0.08±0.03	0.19±0.07	(2.50)	n.d.
HLA-DMB	LAG3	0.02±0.02	0.03±0.05	(1.25)	n.d.
HLA-DRB5	LAG3	0.14±0.07	0.06±0.07	(0.42)	n.d.
HLA-DRB1	LAG3	0.44±0.08	0.57±0.06	(1.31)	0.687
Inhibitory for NK cells					
HLA-E	CD94/NKG2A	55.50±0.68	88.84±1.46	(1.60)	<0.01
HLA-B	CD158A	156.28±1.58	254.42±3.78	(1.63)	<0.01
HLA-C	CD158A	115.41±4.58	181.50±9.52	(1.57)	0.036
HLA-A	CD158B1	140.68±2.07	235.39±6.91	(1.67)	<0.01
Activating for NK cells					
TNFSF9 (4-1BB-L)	4-1BB	2.62±0.26	3.36±0.53	(1.28)	0.121
ULBP2 (NKG2DL2)	NKG2D	0.54±0.19	0.90±0.27	(1.66)	0.647
MICA	NKG2D	7.22±0.54	12.72±0.90	(1.76)	<0.01
NCR3LG1 (B7-H6)	NKp30	0.36±0.05	0.63±0.05	(1.78)	0.101
MICB	NKG2D	4.34±0.31	7.37 ±0.67	(1.70)	0.010
PCNA	NKp44	15.37±0.64	23.12±0.98	(1.50)	0.849
CADM1 (TSLC1)	CRTAM	0.77±0.08	0.92±0.24	(1.20)	0.056
ULBP1 (NKG2DL1)	NKG2D	0.57±0.06	1.21±0.13	(2.13)	<0.01

*RNA 発現量は Transcripts per million (TPM, 平均 ± 標準偏差) で表す。

**False discovery rate で補正した p 値 (q values) は Trimmed mean of M-values 法で正規化したデータを用いて計算した。

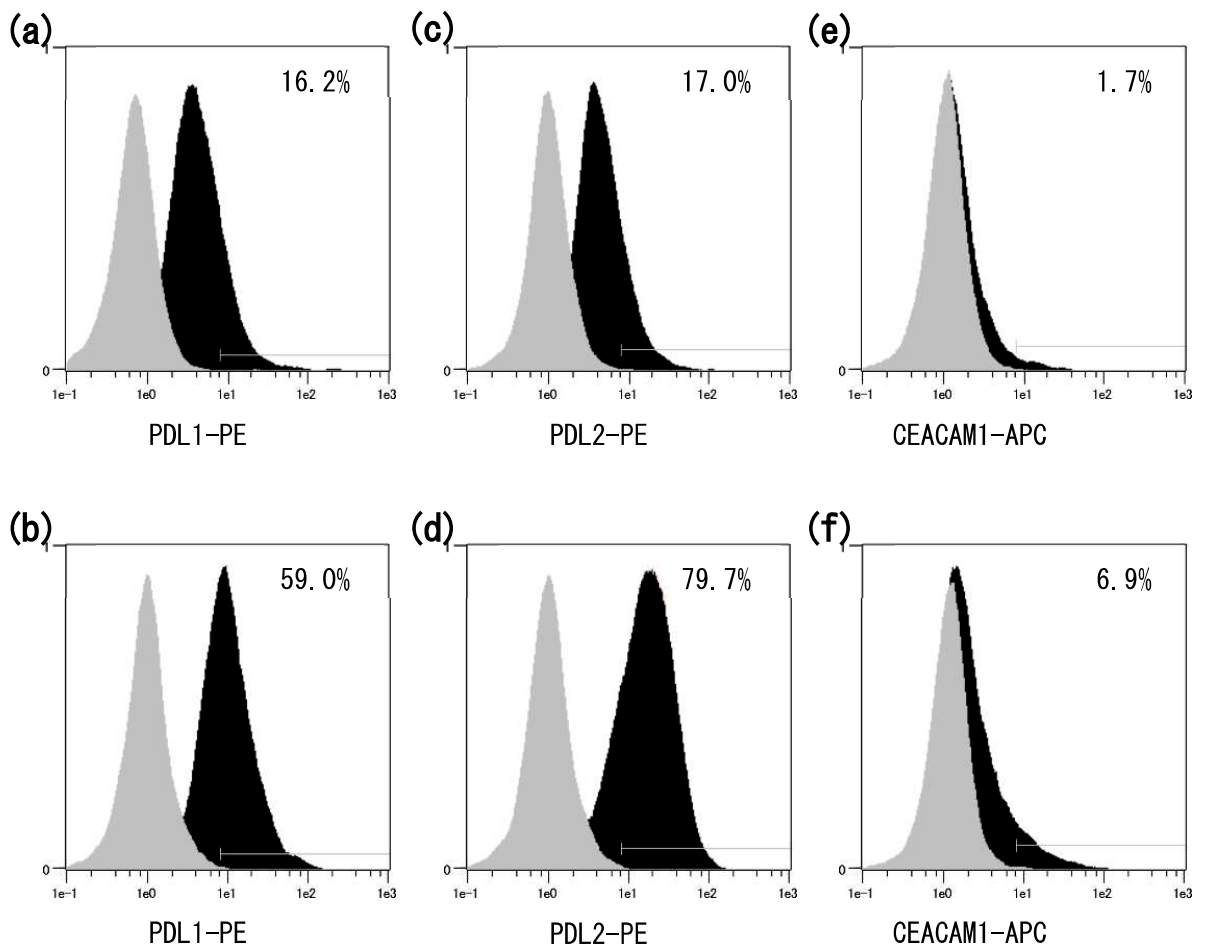


図1 細胞膜表面における PD-L1、PD-L2、CEACAM1 の発現。

親株 SK-HEP-1 (a, c, e)および Sphere (b, d, f)をそれぞれ抗 PD-L1 抗体 (a, b)、抗 PD-L2 抗体 (c, d)、抗 CEACAM1 抗体 (e, f)で染色後、フローサイトメトリーで評価した。黒色のヒストグラムは標的抗原陽性の細胞を、灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール陽性の細胞をそれぞれ表す。親株と比較し、PD-L1、PD-L2、CEACAM1 陽性細胞の割合は、Sphere において上昇していた。

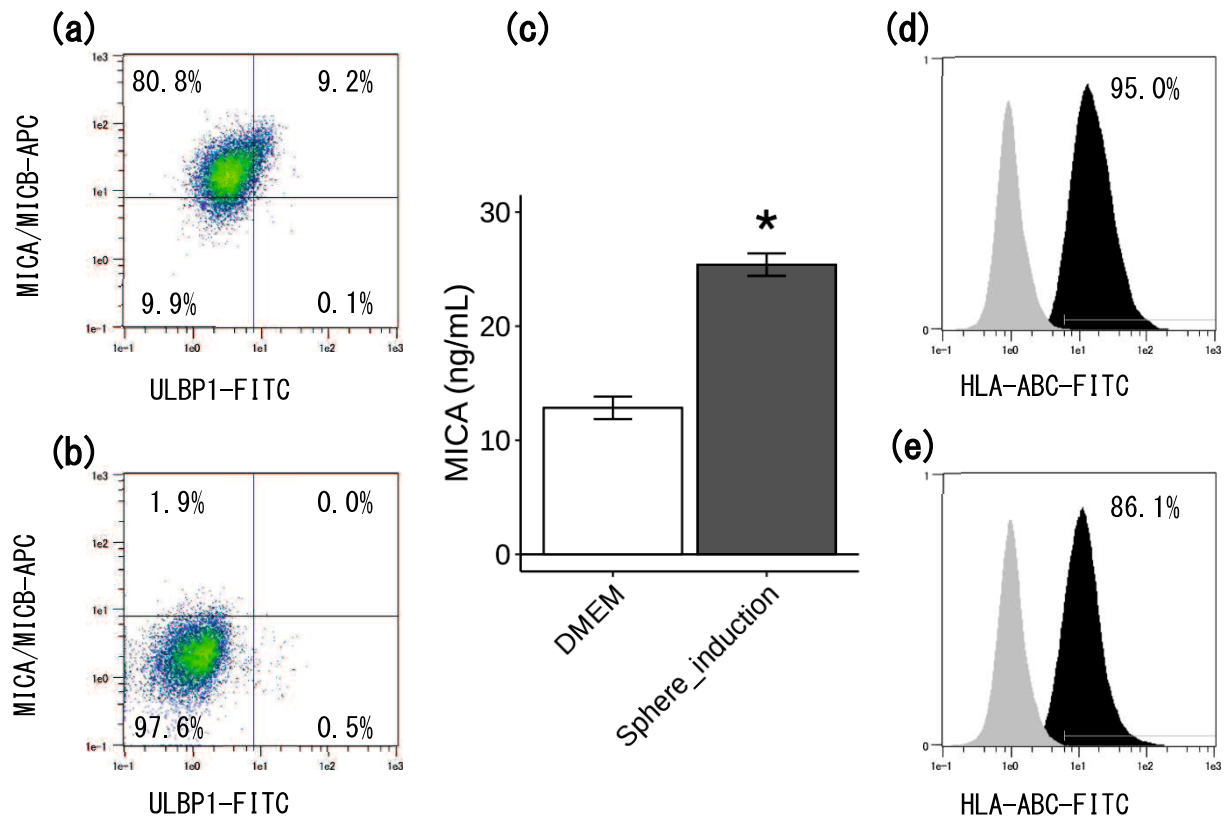


図2 SK-HEP-1 および Sphere における NKG2D リガンド、可溶性 MICA、HLA-class I 発現。

a, b; 細胞を抗 MICA/MICB 抗体および抗 ULBP1 抗体で染色した後、フローサイトメーターで解析した。親株 (a) と比較し、Sphere (b) では MICA/MICB および ULBP1 陰性細胞の割合が上昇していた。c; 培地上清中の可溶性 MICA 濃度。培地交換から 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて測定した。親株と比較し、Sphere の培地中の可溶性 MICA 濃度は有意に上昇していた。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*, $P < 0.05$ 。d, e; 細胞を抗 HLA-ABC 抗体で染色後、フローサイトメーターで解析した。黒色のヒストグラムは標的抗原陽性の細胞を、灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール陽性の細胞をそれぞれ表す。親株 (d) および Sphere (e) の両方において、HLA-ABC の発現は高いレベルで保たれていた。

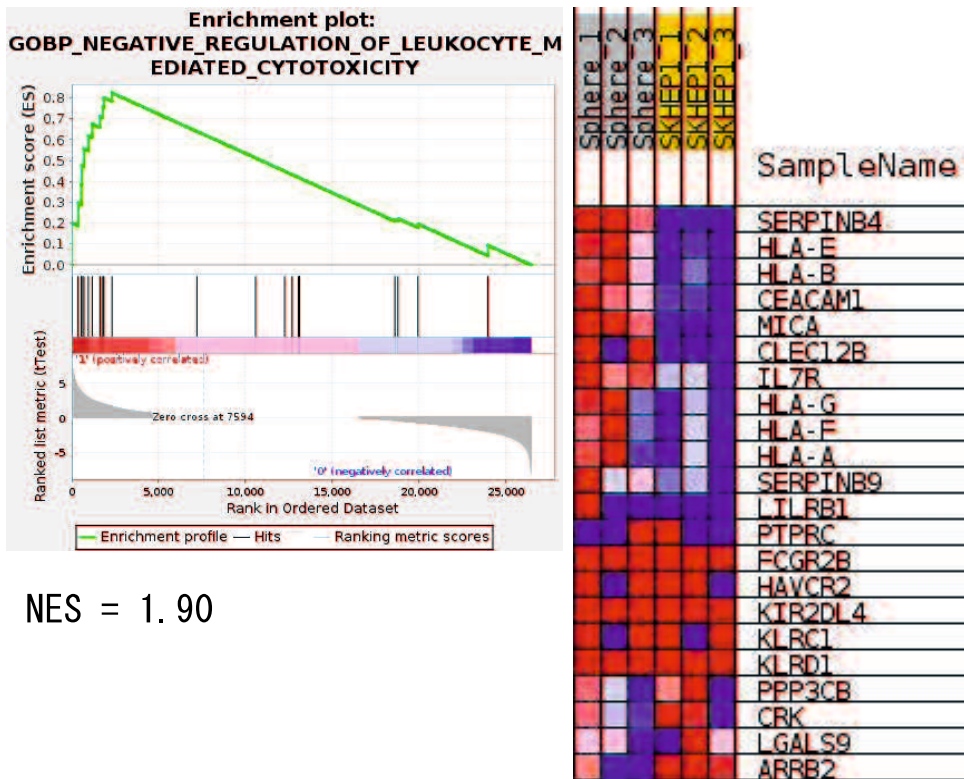
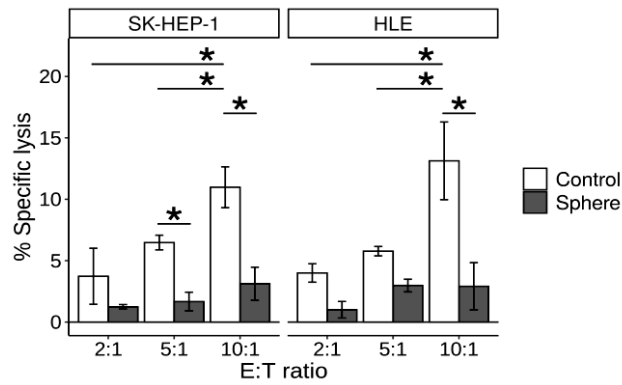


図3 がん幹細胞様細胞において発現が増強していた遺伝子セット。

SK-HEP-1 および Sphere の RNA シーケンスデータを用いて Gene set enrichment 解析を行った。親株と比較し、Sphere では“リンパ球免疫に対して抑制的に働く遺伝子群”が Enrich されていた。

(a)



(b)

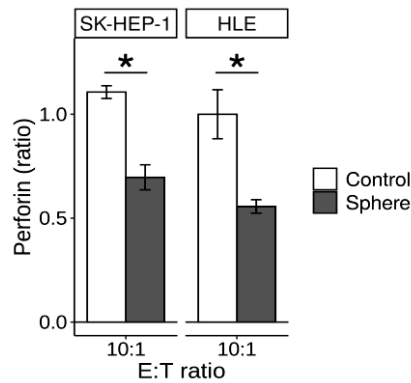


図 4 NK 細胞による細胞障害性およびパーフォリン分泌。

a; 標的細胞である SK-HEP-1、HLE およびそれぞれから誘導した Sphere を ^{51}Cr で標識し、Effector/Target 比 (E:T 比) 10:1、5:1、2:1 で共培養した。実験は同じ NK 細胞を使用し、37°C で 4 時間共培養した。親株と比較し、Sphere では NK 細胞による特異的溶解がより低かった。b; 標的細胞と NK 細胞を E:T 比 10:1 で 24 時間共培養した後、上清を回収して ELISA 法にてパーフォリン濃度を測定した。親株と比較し、Sphere との共培養時ではパーフォリン分泌がより低く抑えられていた。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*, $P < 0.05$ 。

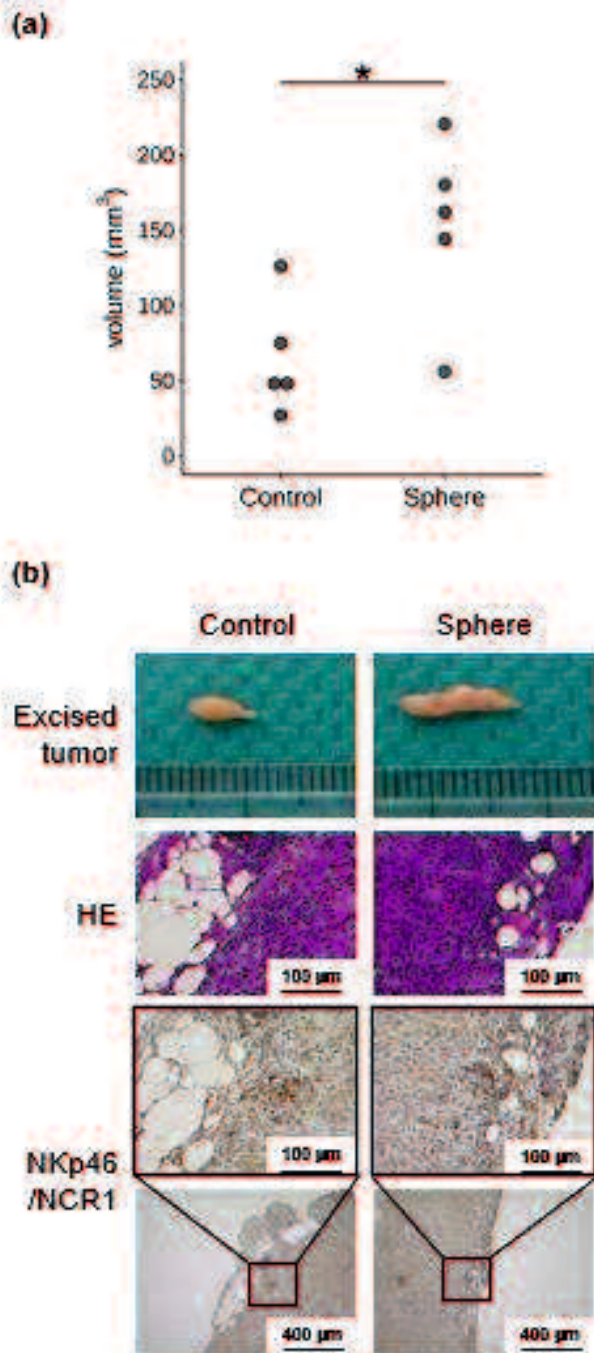


図5 NK細胞が維持されたヌードマウスにおける腫瘍形成。

a; BALB/c *nu/nu* マウスに対するがん細胞の皮下移植により、腫瘍の形成能および増生能を評価した。1.0×10⁶ 個の親株 SK-HEP-1 と Sphere を。それぞれマウスの左右側腹部に皮下注射し、8週間後に腫瘍体積を評価した。Sphere の注射で形成された腫瘍は、親株のそれと比較し、有意に大きかった。*, $P < 0.05$ 。b; ヌードマウスから摘出した皮下腫瘍の免疫組織染色。切片を抗 NKp46/NCR1 抗体およびヘマトキシリン、エオジンで染色した。

補足表 S1 使用した抗体

Antibodies	Code no	Company
<i>Primary antibodies</i>		
anti-PD-L1 PE	329706	BioLegend (Tokyo, Japan)
anti-PD-L2 PE	130-098-651	Miltenyi Biotec (Tokyo, Japan)
anti-MICA/MICB APC	320908	Biolegend
anti-ULBP1	ab176566	Abcam (Tokyo, Japan)
anti-HLA-ABC FITC	555552	BD Biosciences (Tokyo, Japan)
anti-CD66a APC	17-0668-42	Thermo Fisher Scientific (Kanagawa, Japan)
<i>Secondary antibody for ULBP1</i>		
F(ab') ₂ -Goat anti-Rabbit IgG (H+L) FITC	11-4839-81	Thermo Fisher Scientific
<i>Isotype control antibodies</i>		
mouse IgG2b-PE	IC0041P	R&D Systems (Tokyo, Japan)
mouse IgG1-PE	IC002P	R&D Systems
mouse IgG2 α isotype control-APC	17-4724-42	Thermo Fisher Scientific
rabbit IgG monoclonal isotype control	ab172730	Abcam
mouse IgG1 κ isotype control-FITC	555748	BD Biosciences
mouse IgG2 α isotype control-APC	17-4724-42	Thermo Fisher Scientific

PE, phycoerythrin. APC, allophycocyanin. FITC, fluorescein isothiocyanate.

補足表 S2 HLE における T 細胞および NK 細胞のリガンド発現

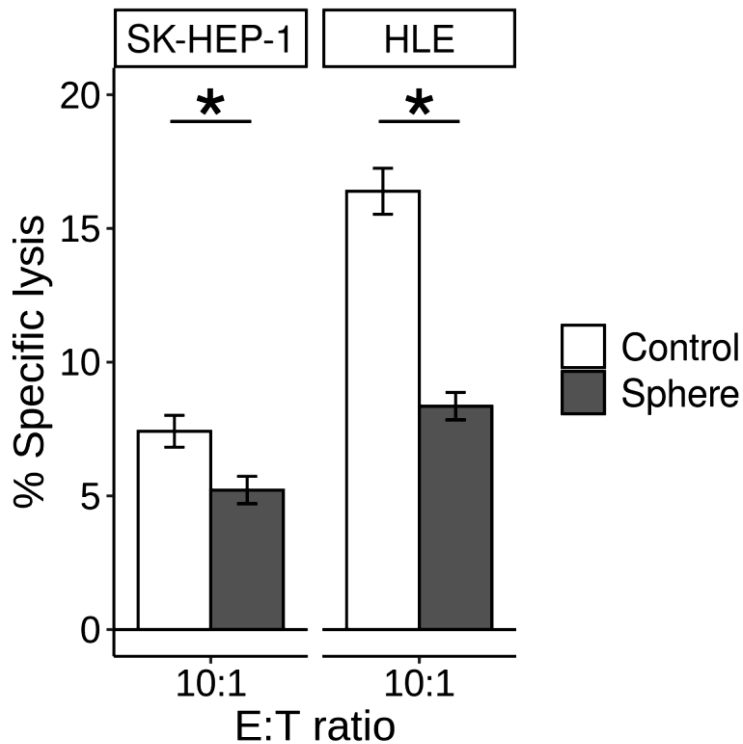
Ligand	Receptor	TPM*			<i>q</i> value**
		Parental cells	Sphere cells	(ratio)	
Inhibitory for T cells					
PDCD1LG2 (PD-L2)	PD-1	0.05±0.01	0.06±0.02	(1.20)	n.d.
CEACAM1	TIM-3	0.00±0.00	0.02±0.01	(inf.)	n.d.
CD274 (PD-L1)	PD-1	0.05±0.02	0.04±0.02	(0.73)	n.d.
HLA-DRA	LAG3	0.00±0.00	0.00±0.00	(n.a.)	n.d.
HLA-DMB	LAG3	0.01±0.01	0.09±0.06	(13.5)	n.d.
HLA-DRB5	LAG3	0.00±0.00	0.00±0.00	(n.a.)	n.d.
HLA-DRB1	LAG3	0.00±0.00	0.00±0.00	(n.a.)	n.d.
Inhibitory for NK cells					
HLA-E	CD94/NKG2A	19.47±0.52	25.40±0.99	(1.30)	<0.01
HLA-B	CD158A	4.87±0.33	9.67±0.37	(1.99)	<0.01
HLA-C	CD158A	12.51±0.39	20.06±0.99	(1.60)	<0.01
HLA-A	CD158B1	39.35±3.06	67.45±2.99	(1.71)	<0.01
Activating for NK cells					
TNFSF9 (4-1BB-L)	4-1BB	0.01±0.01	0.02±0.00	(3.00)	n.d.
ULBP2 (NKG2DL2)	NKG2D	0.33±0.06	0.63±0.06	(1.94)	0.001
MICA	NKG2D	33.81±1.62	51.68±0.44	(1.53)	<0.01
NCR3LG1 (B7-H6)	NKp30	0.06±0.03	0.27±0.04	(4.32)	<0.01
MICB	NKG2D	10.76±0.94	23.09±1.21	(2.15)	<0.01
PCNA	NKp44	158.08±3.87	128.60±5.54	(0.81)	<0.01
CADM1 (TSLC1)	CRTAM	25.85±1.12	35.36±2.60	(1.37)	<0.01
ULBP1 (NKG2DL1)	NKG2D	0.03±0.04	0.00±0.00	(0.00)	n.d.

*RNA 発現量は Transcripts per million (TPM, 平均 ± 標準偏差) で表す。 **False discovery rate で補正した *p* 値 (*q* values) は Trimmed mean of M-values 法で正規化したデータを用いて計算した。

補足表 S3 異種移植実験におけるマウス NK 細胞マーカーの発現

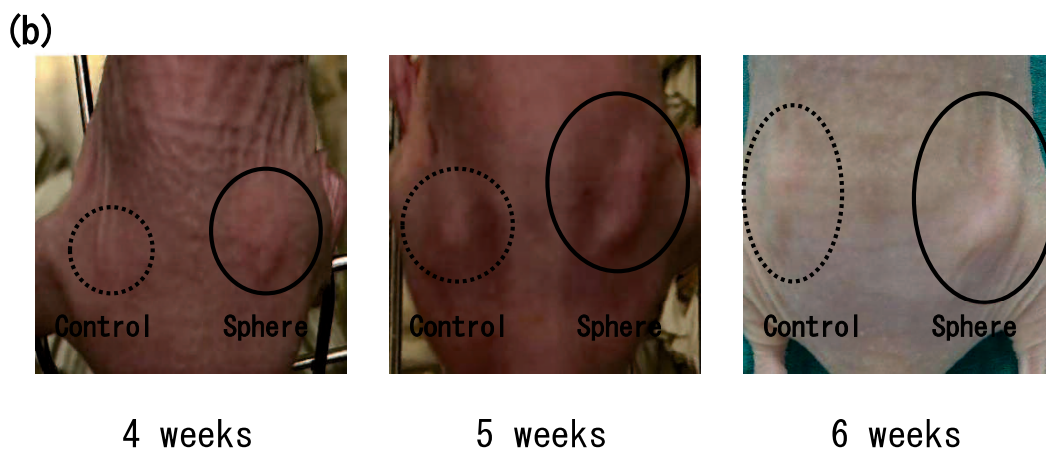
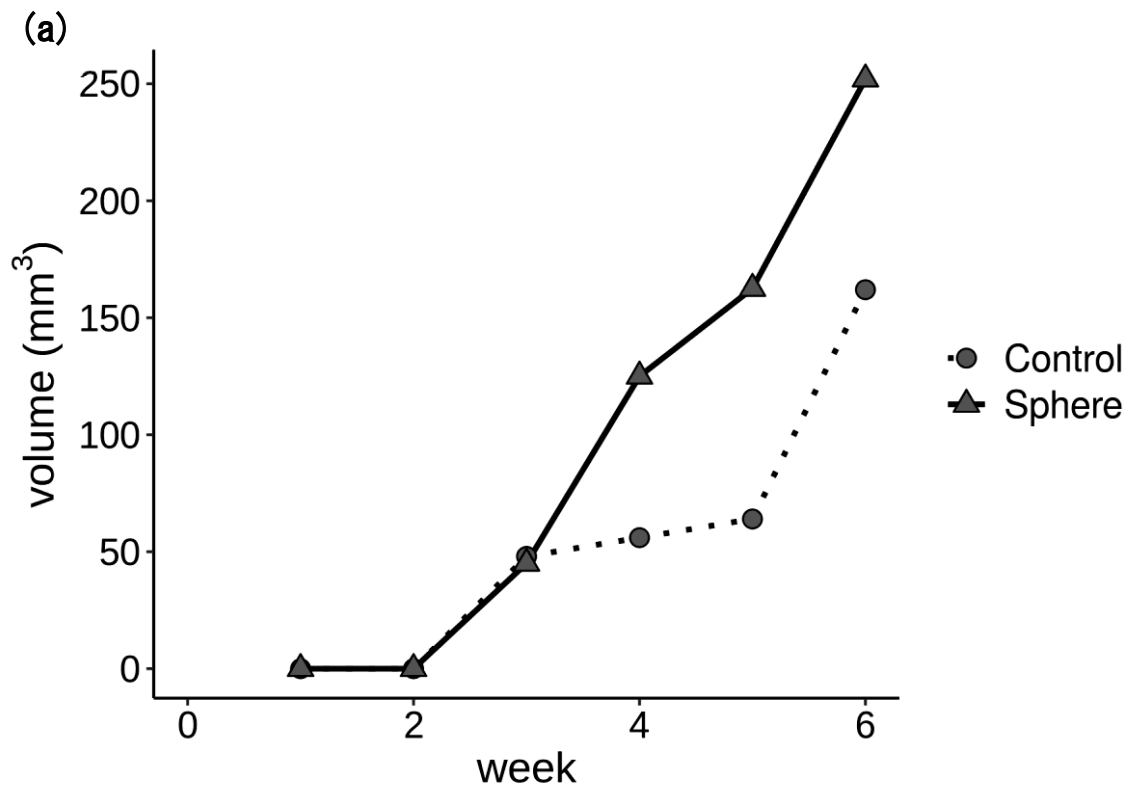
genes	TPM*			q value**
	Parental cells	Sphere cells	(ratio)	
Ncr1 (NKp46)	11.88±1.02	14.10±1.91	(1.19)	0.652
Il2rb (CD122)	26.34±3.03	28.21±2.22	(1.07)	0.923
Klrb1c (NK1.1)	2.03±0.55	2.29±0.92	(1.13)	n.d.
Klrk1 (NKG2D)	17.83±1.67	19.85±1.99	(1.11)	0.713
Itga (CD49b)	9.03±0.89	11.80±0.72	(1.31)	0.100
Spn (CD43)	36.28±5.09	39.02±0.85	(1.08)	0.717

*マウスから抽出した各皮下腫瘍より全 RNA を抽出した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina, Tokyo, Japan) を用いてライブラリー調整を行った。NextSeq 500 (Illumina) を用いてペアエンドシーケンスを実施した STAR (version 2.5.1b) にてショートリードをリファランスゲノム (mm10) にマッピングした。鎖特異的なカウントは RSEM (version 1.3.3.) を用いて取得した。RNA 発現量は Transcripts per million (TPM, 平均 ± 標準偏差) で表した。**False discovery rate で補正した p 値 (q values) は Trimmed mean of M-values 法で正規化したデータを用いて計算した。n. d.; not determined, 低カウントのため、 q values の算出が不可能であった



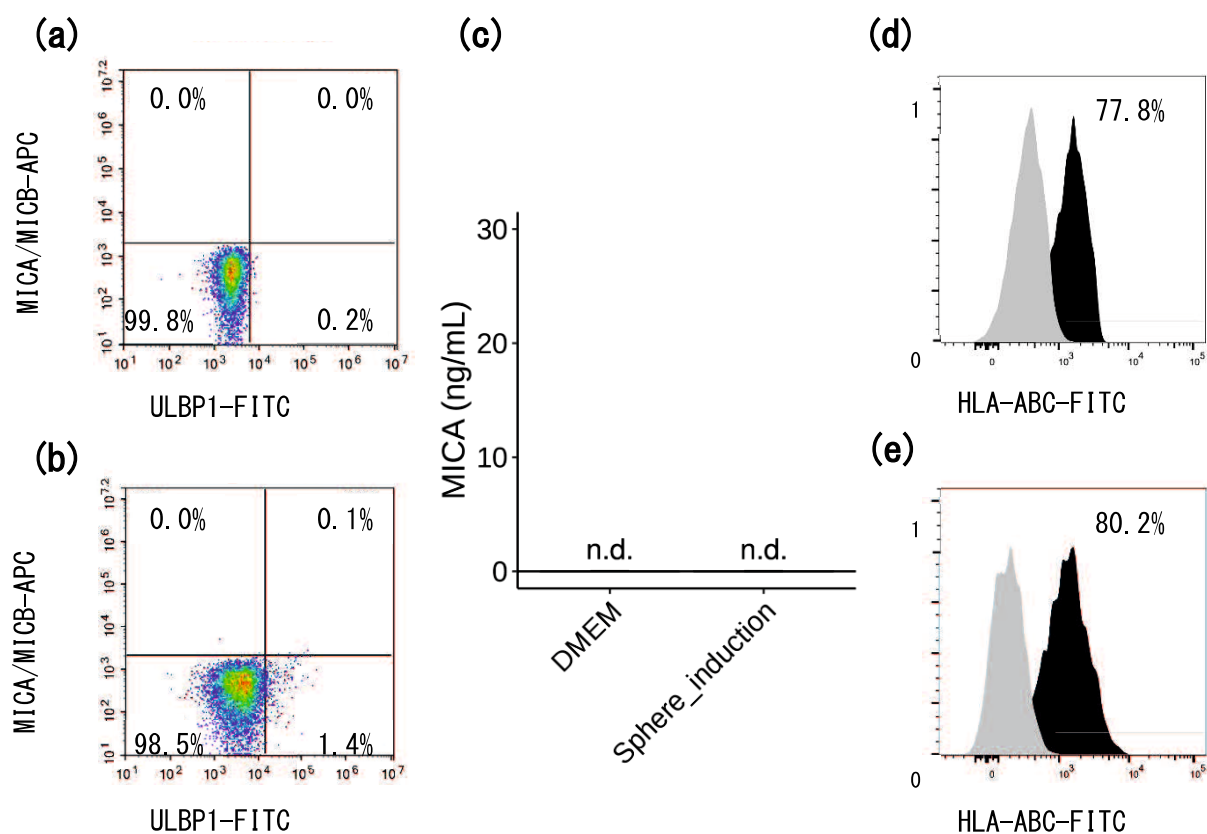
補足図 S1 別ドナー由来のNK細胞を用いた細胞障害性試験。

別の非がん患者の全血から、Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いた密度勾配遠心法で末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を分離した。さらにNK Cell Isolation Kit, Human (Miltenyi) を用いてPBMCからNK細胞を分離した。 ^{51}Cr で標識した標的細胞を Effector/ Target 比 (E:T 比) 10:1 でNK細胞と共培養した。37°C、4時間の共培養後、培養上清中の放射線を 2480 Wizard gamma counter (PerkinElmer) で測定した。細胞障害性は% specific lysisを用いて評価した {% specific lysis = [(試験放出値-自然放出値) / (最大放出値-自然放出値)] × 100}。 ^{51}Cr の最大放出値は標的細胞に終濃度 5% のドデシル硫酸ナトリウムを加えたサンプルで、自然放出値はNK細胞を加えないサンプルでそれぞれ測定し、取得した。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*, $P < 0.05$ 。



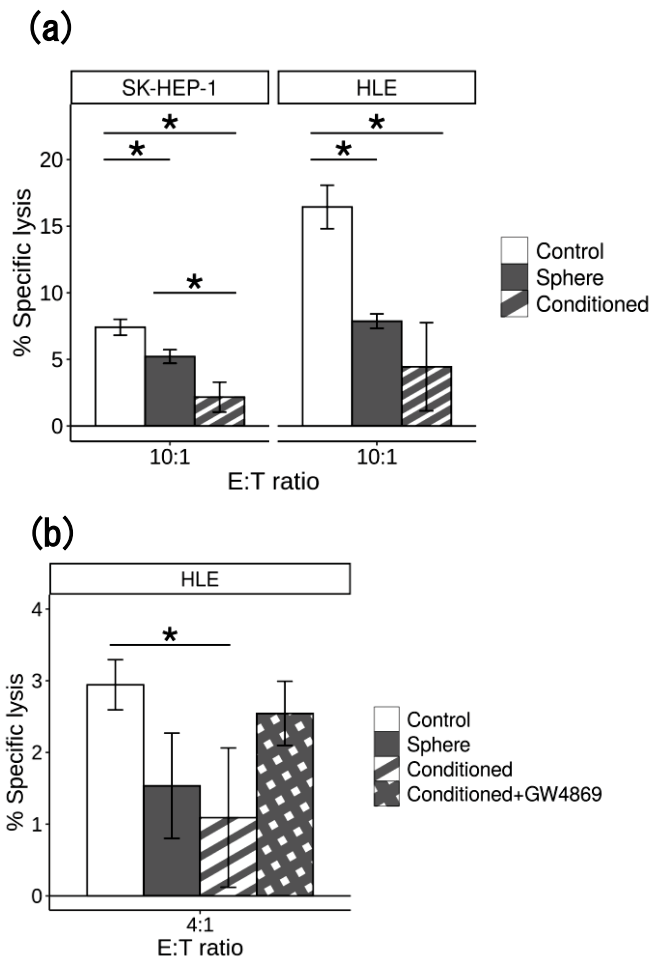
補足図 S2 異種移植実験における皮下腫瘍の経時的変化。

a; 1.0×10^6 個の Sphere (三角) および同数の親株 SK-HEP-1 (丸) を BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に注射し、経時的な腫瘍体積を評価した。b; 皮下腫瘍の肉眼所見。腫瘍体積は {腫瘍体積 = [(長径) × (短径)²] / 2} で算出した。



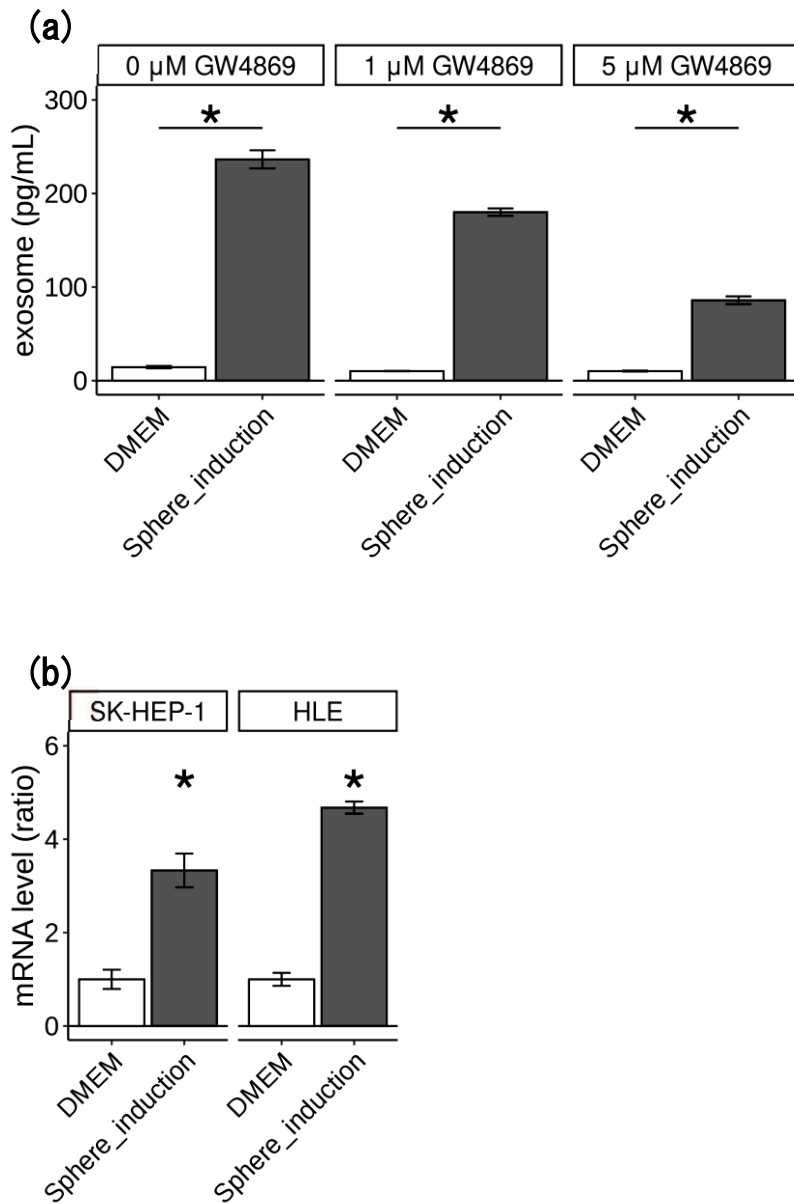
補足図 S3 HLE および HLE 由来 Sphere における NKG2D リガンド、可溶性 MICA、HLA-class I 発現。

a, b; 細胞を APC 抗 MICA/MICB 抗体 (320908; Biolegend, Tokyo, Japan) および抗 ULBP1 抗体 (ab1765566; Abcam, Tokyo, Japan) と FITC-二次抗体 (11-4839-81; Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) で染色した後、NovoCyte フローサイトメーター (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) で解析した。c; 培地上清中の可溶性 MICA 濃度。培地交換から 24 時間後に培養上清を回収し、ELISA 法にて測定した。n. d., not detectable (<0.1 ng/mL)。d, e; 細胞を FITC-抗 HLA-ABC 抗体 (555552; BD Biosciences, Tokyo, Japan) で染色後、フローサイトメーターで解析した。黒色のヒストグラムは標的抗原陽性の細胞を、灰色のヒストグラムはアイソタイプコントロール陽性の細胞をそれぞれ表す。



補足図 S4 条件培地の NK 細胞感受性に及ぼす影響。

標的細胞を ^{51}Cr で標識後、NK 細胞と 37°C 、4 時間共培養した。細胞障害性は% specific lysis を用いて評価した {% specific lysis = [(試験放出値-自然放出値) / (最大放出値-自然放出値)] $\times 100$ }。 ^{51}Cr の最大放出値は標的細胞に終濃度 5% のドデシル硫酸ナトリウムを加えたサンプルで、自然放出値は NK 細胞を加えないサンプルでそれぞれ測定し、取得した。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*、 $P < 0.05$ 。 a; SK-HEP-1、HLE、それぞれから誘導した Sphere を標的細胞とし、Effector/Target 比 (E:T 比) 10:1 で共培養した。Sphere 誘導 6 日目の培地上清を回収し、条件培地として共培養時に使用した (縞模様)。灰色の縦棒は通常の培地を用いた Sphere の共培養を、白の縦棒はコントロールとして用いた親株を表す。 b; 標的細胞として HLE とそこから誘導した Sphere を ^{51}Cr で標識し、E:T 比 4:1 で共培養した。灰色と白の縦棒は a と同じ条件を表す。条件培地は a と同じ条件で回収したもの (縞模様)、および $5 \mu\text{M}$ GW4869 塩酸塩水和物を回収 24 時間前に追加したもの (網目模様) の 2 種類を使用した。



補足図 S5 エクソソーム分泌および RAB27B mRNA 量。

a, HLE 由来 Sphere からのエクソソーム分泌量。白と灰色の縦棒はそれぞれ親株と Sphere の培地中の濃度を示す。必要に応じてエクソソーム分泌阻害剤 GW4869 塩酸塩水和物を追加した。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*, $P < 0.05$ 。b; SK-HEP-1、HLE およびそれぞれから誘導した Sphere における RAB27B mRNA 量。RAB27B mRNA 量は qRT-PCR で測定し、コントロールの親株を対照とした平均比率で標準化した。縦棒は測定平均値を、バーは標準偏差を表す。*, $P < 0.05$ 。