

学位論文審査結果の要旨

氏名	小林加奈
審査委員	主査 渡部 祐司 副査 阪中 雅広 副査 丹司 望 副査 北澤 理子 副査 東 太地

論文名：CD200 欠失型 (CD200S) 分子は、腫瘍関連マクロファージに対して樹状細胞様の表現型を誘導することにより、ラット神経膠腫モデルにおける生存を延長する
審査結果の要旨 (2000 字以内)

【緒言】 CD200 とその受容体である CD200R は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 1 回膜貫通型蛋白である。CD200 は血液細胞 (骨髄系・リンパ系細胞) に加え、神経細胞・心筋細胞・血管内皮細胞にも広く発現している。一方で、CD200R は主に骨髄系血液細胞に発現し、正常脳内ではマイクログリアが発現している。CD200R は、CD200 と異なりシグナル伝達機能を有し、CD200/CD200R 相互作用により CD200R 発現細胞内で RasGAP を介した抑制機構が活性化され、結果として免疫抑制状態を生じる。いくつかの固形腫瘍において、正常組織に比べ悪性腫瘍で CD200 の発現が高く、また CD200 の発現が高いほど腫瘍が進行しているとの報告がある (Moreaux et al. BBRC, 2008;366:117-122)。

一方で、CD200 にはスプライシングによって生じる一部のアミノ酸配列を欠失したバリエーションである CD200 truncated form (以下 CD200S) が存在し、CD200S は CD200/CD200R 相互作用に対する生理的 antagonist として機能するという報告がある (Chen et al. Transplantation. 2008;86:1116-24)。我々はヒト肝細胞癌や胆管細胞癌において CD200 はその全長を持つ CD200L 分子と CD200S 分子の両方を発現していることを見いだした。そこで、これまで全く調べられていなかった腫瘍免疫における CD200S の役割の解明を目指し、本研究では CD200S 分子を強制発現させたグリオーマ細胞を用いて、CD200S 分子の腫瘍免疫に対する影響を解析した。

【材料と方法】 ラット C6 グリオーマ細胞にウイルスベクターを用いて CD200L (C6-L) および CD200S (C6-S) をそれぞれ強制発現させた細胞株を作成した。対照細胞株として空ベクターを導入した

C6-empty 株 (C6-e) および親株を用いた。これらの株の増殖率や特性を定量的リアルタイム RT-PCR (qPCR) で調べた。各細胞を生後 24 時間以内のウィスターラット新生仔線条体に注入し、実験的脳腫瘍モデルを作成し、その生存率や病理組織像の検索を行うとともに、qPCR による腫瘍免疫に関わる種々の因子の発現の違いを検討した。親株腫瘍から分離した腫瘍関連マクロファージ (TAM) と、各細胞株との共培養を行い、TAM の形質変化を調べた。

【結果】 4 つの細胞株では、増殖率、腫瘍進展、腫瘍免疫に関わると思われる因子の発現に有意な差はみられなかった。ラット実験的脳腫瘍モデルでは、親株・C6-e、C6-L 株注入モデルと比べて C6-S 株注入モデルでは有意な生存期間の延長 ($p < 0.01$) を認めた。また C6-S 腫瘍内 (C6-S) では腫瘍細胞にアポトーシスが多発し、腫瘍のサイズは有意に小さかった。一方で、C6-e や C6-L 細胞ではアポトーシスはほとんど生じておらず、周囲の正常組織にアポトーシス細胞を認めるのみであった。これは、腫瘍増大により周囲の正常組織が圧排により死滅しているためと考えられた。また、腫瘍増大に関連する因子 (増殖因子や TGF β など) について、各細胞株の qPCR にて検討を行ったが、上記の現象を説明するような結果は得られなかった。脳腫瘍内には骨髄由来の TAM の集積が認められ、TAM は一般的に腫瘍増悪に関与することが言われている。しかし、C6-S 腫瘍内では TAM は樹状細胞様の形態と性質を示し、CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞を取り囲むようにして存在していた。このことから樹状細胞化した TAM が T 細胞へ抗原提示を行っていることが示唆された。また、同腫瘍内では、グランザイムやパーフォリンなどのアポトーシス誘導因子の高発現を認めた。各種細胞株と TAM を 48h 共培養すると、C6-S 株と共培養した TAM では樹状細胞マーカーの発現が誘導されることが qPCR および蛍光免疫染色により確認できた。

【考察】 今回の実験的ラット脳腫瘍モデルにおいて、CD200S 分子により腫瘍内に集積した TAMs が樹状細胞様へと機能変化し、樹状細胞化した TAM が腫瘍に対する細胞性免疫を活性化することが判明した。

【結論】 CD200S 分子が CD200/CD200R 相互作用に対する生理的 antagonist として作用するという先行研究で提唱されているような結果は得られず、むしろ同分子が全く新しい機能を有している可能性が示唆された。今後、CD200S 分子が新たながん免疫療法の標的となることが期待できる。

本論文は、実験的脳腫瘍モデルを用いて、CD200/CD200R 相互作用においてその機能が解明されていない CD200S の働きを明確にした研究であり、明瞭な結果と考察が提示され、創薬育薬に繋がる可能性を示している。公開審査会は、平成 28 年 2 月 3 日に開催され、申請者は研究内容を英語で明確に発表し、以下の内容を含む多くの質問に対し日本語で的確に回答した。

質問内容：

1) CD200L の機能、2) CD200S と TAM との関係、3) 腫瘍細胞が CD200S を発現しているのか、4) CD200L と CD200S との interaction はあるのか、5) 樹状細胞が腫瘍抗原を CTL に提示するのか、6) その腫瘍抗原は同定されているのか、7) 制御性 T 細胞等との関係、8) アポトーシスには CD200S 発現が必須か、9) TAM に CD200S 関連ペプチドを作用させた場合の反応は、10) 他の腫瘍でも CD200S を発現しているのか、11) ヒトの脳でも同様の現象が起こっているのか、12) CD200S の作用が CD200R を介するかどうか、13) cytotoxic drug との組み合わせによる抗腫瘍効果、などに関する質問がなされた。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な能力と見識を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。

(第8号様式)

最終試験の結果の要旨

氏 名	小林加奈
審 査 委 員	主 査 印
	副 査 印
	副 査 印
	副 査 印
	副 査 印

実施年月日

平成 28 年 2 月 3 日

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

口 頭 筆 答

試験結果の要旨

申請者は、愛媛大学大学院医学系研究科に在学中であり、所定の単位を修得している。平成 28 年 2 月 3 日に開催された公開審査会において、提出論文の内容及び関連領域に関する試問を行った。

申請者はそれらの質問に対して明確に応答し、学位授与に値する十分な見識と研究遂行能力を備えていることが確認されたので、最終試験に合格と判定した。

