

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 桑原 淳

論 文 名

Wistar ラットにおいて CD200S 分子は腫瘍免疫を刺激し遠隔転移抑制をもたらす

【諸言】 CD200 はニューロンや血管内皮・血液系細胞など幅広い細胞で発現を認める一方で、その受容体である CD200R は血液系細胞に発現し、CD200 と結合すると 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とされる。CD200 の mRNA は Exon1-6 から構成され、splicing variant である CD200S は exon1, 2 および 3 の一部が欠失しており、その結果、短いペプチドが生じる（全長を有するものを CD200L、欠失するタイプを CD200S と表記）。いくつかの固形癌や血液癌でも CD200 の発現があり、悪性度や予後との関係が議論されている。しかし、一定した結果は得られていない。我々は、腫瘍免疫における、CD200 の役割を明らかにするため、CD200 を発現していないラットの C6 グリオーマ細胞株にウイルスベクターを用いて CD200L (C6-L) または CD200S (C6-S) を恒常的に発現する細胞株を作成した。これらをラット新生仔脳内に移植したところ、C6-S 株移植群では、生存期間が C6-L 株に比べおよそ 30%延長し、その背景に、抗腫瘍免疫の活性化があることを示した。本研究では、腫瘍免疫に対する CD200 の作用をさらに明確にするために、癌遠隔転移に対する効果を検討することとした。

【方法と結果】 C6 グリオーマ細胞 100 万個を生後 24h 以内のラットの背部皮下に移植したところ、出生後 28 日までに 90%近くのラットが肺に遠隔転移を引き起こすことが判明した。このモデルで、C6-L および S 株の転移率および生存期間を調べた。C6-L 株を移植した場合、100%のラットが肺転移を発症した一方、C6-S 株を移植したラットでは 44%の転移率であった (n=25)。生存率は、C6-L 株を移植群では 100%のラットが死亡したが、C6-S を移植したラットでは 80%であった (p < 0.01)。なお、C6-L 株、S 株の間で、in vitro の細胞増殖率、移動能、浸潤能に有意差は認めなかった。

肺転移抑制に関与する因子を調べるために、細胞移植後 35 日目の背部腫瘍塊から、mRNA を採取・精製し、次世代シーケンサー (NGS) にかけて比較してみたところ、接着因子 cadherin-1 (CD103)、ケモカインの CCL4、CCL7、CCL12、CD24、グランザイム B およびインターロイキン 12A (IL-12A) が C6-S 腫瘍で高発現していた。グランザイム B は、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) およびナチュラルキラー (NK) 細胞によって発現され、アポトーシス性癌細胞死の誘導に関与し、また IL-12A はナイーブ T 細胞から Th1 細胞を誘導し、抗腫瘍免疫を活性化させる。そのため、NGS の

氏名 桑原 淳

結果は C6-S 腫瘍において抗腫瘍免疫が活性化され、肺転移抑制につながることを示唆している。

次に、C6-L、S 株の移植 35 日後の背部腫瘍塊の細胞を酵素処理により分散し、フローサイトメトリーにより分析した。C6-S 腫瘍では、C6-L 腫瘍に比べ生細胞中の CD45<sup>+</sup>白血球が約 2 倍多く存在し、逆に C6-L 腫瘍では CD45<sup>+</sup>白血球に比べ、腫瘍細胞がより多く存在していた。ほかにも、CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD3<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup>細胞 (NK 細胞)、CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞も C6-S 腫瘍内でより多く存在した。また、CD11bc と顆粒球に対する抗体を用いて解析すると、CD11bc<sup>hi</sup>と CD11bc<sup>lo</sup>の 2 つの population が腫瘍内に存在し、ともに C6-S 腫瘍内により多くの集積を認めた。これらの population はそれぞれ腫瘍関連マクロファージ (TAM) と樹状細胞 (DC) と考えられた。さらに、C6-S 腫瘍内では CD45<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CD103<sup>+</sup>細胞、および CD103<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>細胞と複数種類の DC 様細胞が増加していた。

【考察】これらの結果は、CD200S が CD200R 陽性マクロファージ、つまり TAM に働きかけ、ケモカイン産生を増加させた結果、リンパ球・DC・NK 細胞の浸潤が促進されたと考えられる。C6-S 腫瘍において著増した DC は、CD4<sup>+</sup>T 細胞を介するか、クロスプレゼンテーションにより直接 CTL を活性化し、NK とともに腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することで抗腫瘍免疫活性が上昇し、遠隔転移を抑制したものと考えられた。しかし、CTL は、C6-L と比較して C6-S の NK 細胞よりも顕著に増加しているため、CTL は肺転移抑制においてより重要な役割を果たしていると思われた。

【結論】今後、CD200S の作用に関連するメカニズムおよびシグナル伝達経路の解明は、悪性腫瘍の遠隔転移抑制のため新しい手段となりえる。

キーワード (3~5)	樹状細胞 TAM (Tumor-Associated Macrophages) 細胞障害性 T 細胞 CD200S
-------------	--