

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	桑原 淳
審査委員	主査 今村 健志 副査 山下 政克 副査 廣岡 昌史 副査 伊賀瀬道也 副査 藤原 弘

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

審査結果の要旨

【背景と目的】 CD200 は、I 型膜糖タンパク質で、血液系細胞に発現している受容体 CD200R に結合し、細胞内の RasGAP を介した抑制機構を活性化し、免疫抑制に関わっている。申請者らは、いくつかのがんで高発現している CD200 の腫瘍免疫における役割を明らかにするため、強制的に CD200 の splicing variant である CD200L (C6-L) または CD200S (C6-S) を発現させたラット C6 グリオーマ細胞株を、生後 24 時間以内のラットの背部皮下に移植し、がん遠隔転移に対する効果を検討した。

【方法と結果】 まず、*in vitro* で C6-L 株と C6-S 株を比較すると、細胞増殖率、移動能、浸潤能に有意差は認めなかった。ラット C6 グリオーマ細胞 100 万個を生後 24 時間以内のラットの背部皮下に移植すると、出生後 28 日までに 90% 弱のラットで肺転移を認めた。このモデルで、C6-L 株と C6-S 株を比較すると、C6-L 株移植ラットで 100%、C6-S 株移植ラットで 44% の肺転移を認めた。生存率の比較では、C6-L 株移植群では 100%、C6-S 株移植群では 80% のラットが死亡した ($p < 0.01$)。C6-S の肺転移抑制のメカニズムを明らかにするために、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にかけて比較・検討した。その結果、C6-S 株移植群腫瘍 (C6-S 腫瘍) で C6-L 株移植群腫瘍 (C6-L 腫瘍) に比べ、接着因子 cadherin-1、ケモカインの *Ccl14*、*Ccl17*、*Ccl112*、*Cd24*、グランザイム B およびインターロイキン 12A (*Il-12a*) mRNA

が高発現していた。次に、移植後 35 日後の背部腫瘍塊から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。その結果、C6-S 腫瘍で C6-L 腫瘍に比べ、生細胞中の CD45⁺白血球が約 2 倍多く存在し、逆に C6-L 腫瘍では CD45⁺白血球に比べ、腫瘍細胞がより多く存在していた。さらに、CD3⁺T 細胞、CD3⁻/NK1.1⁺細胞（ナチュラルキラー細胞；NK 細胞）、CD4⁺T 細胞および CD8⁺T 細胞も C6-S 腫瘍で C6-L 腫瘍に比べ多く存在した。また、C6-S 腫瘍で C6-L 腫瘍に比べより腫瘍内に CD11bc^{hi}と CD11bc^{lo}の 2 つの population が多く集積していた。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 腫瘍で C6-L 腫瘍に比べ、CD45⁺/CD8⁻/CD103⁺細胞、および CD103⁺/CD8⁺細胞と複数種類の DC 様細胞が増加していた。

【考察】C6-S 腫瘍で mRNA 発現が増えているグランザイム B は、細胞傷害性 T 細胞（CTL）および NK 細胞が発現し、がん細胞のアポトーシスに関与する。また、また同じく IL-12 は、ナイーブ CD4⁺T 細胞から Th1 細胞を誘導し、抗腫瘍免疫を活性化させる。以上から、*in vivo* サンプルの次世代シーケンサー解析で得られた結果は、C6-S 腫瘍で抗腫瘍免疫が活性化され、肺転移抑制に繋がることを示唆する。一方、フローサイトメトリーの結果から、CD200S が CD200R 陽性 TAM を介して、ケモカイン産生を増加させた結果、リンパ球、DC や 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⁺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。

本論文に対する公開審査会は平成 30 年 1 月 23 日に開催され、申請者は、CD200S の遠隔転移抑制効果から、その分子メカニズム、臨床応用の可能性まで英語で明確に発表した。①ラットへのがん細胞の生着率と免疫系の関係、特に免疫寛容について、②同一細胞での C6-L と C6-S の発現レベルの関係、C6-L と C6-S を一緒に移植した結果について、③原発巣と遠隔転移巣での免疫系の違いについて、④タイムポイントや統計学的な有意差など実験や解析の詳細な条件について、⑤C6-L と C6-S の発現レベルや FACS の解釈について、⑥ペプチドワクチンを含め今後の臨床応用の展望について、等について日本語で質疑応答があり、申請者は的確に答えた。動物モデルを用いた詳細な解析から、CD200S に関係した新たながん遠隔転移抑制方法の可能性が示唆された点を高く評価し、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見識と能力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。