

学 位 論 文 の 要 約
(研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 桑原 淳

学位論文名 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

学位論文の要約

【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⁺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。ほかにも、CD3⁺T 細胞、CD3⁻/NK1.1⁺細胞 (NK 細胞)、CD4⁺T 細胞および CD8⁺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^{hi} と CD11bc^{lo} 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⁺/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】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⁺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。

なお、この学位論文の内容は以下の原著論文にすでに公表済である。

主論文：Jun Kuwabara, Akihiro Umakoshi, Naoki Abe, Yutaro Sumida, Shota Ohsumi, Eika Usa, Kana Taguchi, Mohammed E. Choudhury, Hajime Yano, Shirabe Matsumoto, Takeharu Kunieda, Hisaaki Takahashi, Toshihiro Yorozuya, Yuji Watanabe, Junya Tanaka : Truncated CD200 stimulates tumor immunity leading to fewer lung metastases in a novel Wistar rat metastasis model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 496:542-548, 2018 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.065