

学位論文審査結果の要旨

氏名	名部 彰悟
審査委員	主査 増本 純也
	副査 薬師神 芳洋
	副査 劉 爽
	副査 矢野 元
	副査 福田 信治

論文名 グルタミン代謝抑制による CD8⁺ T 細胞の抗腫瘍活性の増強
審査結果の要旨 (2,000 字以内)

最近、腫瘍特異的 T 細胞を用いた養子免疫療法の臨床応用が進みつつあるが、体外で培養され活性化された T 細胞はしばしば「疲弊」と呼ばれる機能不全に陥ることが知られている。このような T 細胞の「疲弊」には、T 細胞内の過剰なエネルギー代謝が関係していることが、先行研究で明らかにされている。また、これまでに申請者らは CD8⁺ T 細胞をグルタミン代謝を抑制して培養すると高い抗腫瘍効果が得られることを見出している。そこで、申請者は、グルタミン代謝抑制による CD8⁺ T 細胞の抗腫瘍活性の増強のメカニズムを解明する目的で実験を行なった。

実験には、卵白アルブミン(OVA)を発現させた胸腺腫細胞株 E.G7 を接種した担癌マウスモデルを用いた。抗腫瘍活性は、OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞をマウスに担癌マウスに経静脈的に接種する方法で評価した。細胞外での CD8⁺ T 細胞のグルタミン代謝の抑制は、低グルタミン濃度で培養する方法、グルタミン合成酵素阻害剤の 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (L-Don)や凡アミノ基転移酵素阻害剤の aminooxyacetic acid (AOA), グルタミン酸脱水素酵素阻害剤の epigallocatechin-3-gallate (EGCG)を用いた。細胞傷害活性とサイトカイン産生はフローサイトメトリーで評価した。通常条件および低グルタミン条件で培養した CD8⁺ T 細胞を同数ずつ混合して担癌マウスに移入し、腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) を回収してそれぞれの細胞数、および抑制性受容体 PD-1 等の発現を評価した。CD8⁺ T 細胞のエフェクター機能を解析するために、*in vitro* での腫瘍細胞傷害アッセイを行った。CD8⁺ T 細胞のメモリー機能を解析するために、OVA 特異的 CD8⁺ T 細胞を移入して腫瘍が完全に消失したマウスに、OVA を発現するリステリア菌を感染させ、CD8⁺ T 細胞のメモリー細胞数を評価した。CD8⁺ T 細胞のエネルギー代謝をブラック

スアナライザーを用いて評価した。また、エネルギー代謝酵素の遺伝子発現を定量 PCR で評価した。

その結果、細胞内グルタミン代謝を抑制した CD8⁺ T 細胞をマウスに移入すると抗腫瘍効果と生存率の向上が見られた。低グルタミン状態で CD8⁺ T 細胞では PD-1 の発現低下と ki-67 陽性細胞の増加が観察された。通常培養と低グルタミン培養ではサイトカインの産生に差がなかったが、移入されて腫瘍周囲に浸潤した低グルタミン培養 CD8⁺ T 細胞では IFN γ 産生の増加が観察された。通常培養と低グルタミン培養の CD8⁺ T 細胞を混合してマウスに移入した実験では、低グルタミン培養の CD8⁺ T 細胞の方が細胞数の増加と腫瘍周囲への浸潤細胞数の増加が観察された。これらの細胞では PD-1 の発現が低下していた。低グルタミンでの CD8⁺ T 細胞移入マウスでは、リステリア感染後のメモリー T 細胞の増加が観察された。低グルタミンでの CD8⁺ T 細胞の解糖能およびミトコンドリア呼吸能の向上がみられた。これに相関して、ミトコンドリアの解糖系とエネルギー代謝酵素の遺伝子発現の増加が認められた。 α ケトグルタル酸を加えて培地で活性化培養した CD8⁺ T 細胞を移入したマウスでは抗腫瘍活性の低下が認められた。

以上の結果から、T 細胞の「疲弊」の原因のひとつにグルタミン代謝産物の蓄積が挙げられることが示唆された。

本論文に対する公開審査会は平成 31 年 1 月 21 日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する以下の質問がなされた。1) CD8⁺ T 細胞の培養時間を 4 日に設定している理由。2) *in vitro* では「疲弊」が見られるのに、*in vivo* では見られないのはなぜか。3) *in vivo* の実験での IFN γ 産生の増加の原因として考えられることは何か。4) 代謝物のチャートの意義。5) 脳内のグリア細胞など他の細胞でのグルタミン抑制の意義。6) 腫瘍細胞との CD8⁺ T 間でエネルギー争奪は起こるか。7) ヒストンの脱メチル化と「疲弊」との関係。8) Treg 細胞や CD4⁺ T 細胞ではどうか。9) 各グルタミン代謝阻害剤の濃度依存性について。10) 細胞内のミトコンドリア数に及ぼす影響はないか。11) 「疲弊」とは何か。12) 糖尿病などのメタボリック症候群では「疲弊」はおこっているのか。13) 今後の臨床応用で問題となる点は何か。

これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に応答した。本論文は、T 細胞活性化による癌免疫療法における「疲弊」の原因のひとつを初めて明らかにした。免疫治療の問題解決に重要な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。審査委員は一致して本論文を高く評価し、博士(医学)の学位論文に値するものと結論した。