

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	小西 周
審査委員	主査 茂木 正樹 副査 松浦 文三 副査 矢野 元 副査 高田 秀実 副査 末盛 浩一郎

論文名 グルココルチコイドは CD8 T 細胞に対し低代謝状態を記憶させ、免疫応答を長期にわたって抑制する

### 審査結果の要旨

【研究の目的】免疫抑制・抗炎症活性を有する糖質コルチコイド (GC) は、リンパ球を含む細胞の増殖・分化・機能に様々な影響を及ぼすが、T 細胞における GC の長期的な影響については十分に解明されていなかった。今回行われた学位審査対象研究は、合成 GC であるプレドニゾロン (PSL) を用いてナイーブ CD8 T 細胞を処理し、エフェクター機能や免疫記憶の形成、さらに代謝に与える GC の長期的な影響について解析し、上記の問題の解決を目指した。

【方法】マウス脾臓由来のナイーブ CD8 T 細胞を、抗 TCR $\beta$  抗体、抗 CD28 抗体、IL-2 存在下で活性化する際に、PSL (1 $\mu$ M) 処理の有無により 2 群に分け、*in vitro* の解析を行った。また、養子免疫実験や OVA-expressing *Listeria monocytogenes* (Lm-OVA) を用いた感染実験モデルによる *in vivo* の解析が行われた。

【結果】PSL で処理したナイーブ CD8 T 細胞では、処理していない CD8 T 細胞と比較して IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、granzyme B 等の産生低下を認め、PD-1 や BTLA などの抑制性受容体の発現が増加し、*in vitro* での細胞障害性活性の低下が認められた。この抑制的な影響は糖質コルチコイド受容体 (GR) のアンタゴニストである RU-486 の共存下で拮抗されたことから GR 依存性であった。養子免疫実験から、PSL で処理した CD8 T 細胞では抗腫瘍活性の低下が確認された。また、PSL で処理した CD8 T 細胞では移入後の免疫記憶形成能や二次免疫応答能が低下しており、メモリー T 細胞関連転写因子の発現低下がみられた。次に PSL の T 細胞の代謝に与える

影響を、細胞外フラックスアナライザーを用いて検討したところ、PSLで処理したCD8 T細胞ではグルコーストランスポーターの発現が低下し、メタボローム解析にて解糖系中間代謝産物の低下が認められた。さらに解析することにより、mTORを介したシグナルが重要であることが判明し、PSLによりmTORによりリン酸化されるタンパク質(4E-BP、S6K)のリン酸化レベルの低下が認められ、mTORの下流シグナルである細胞の代謝調節に関与する転写因子(c-Myc、HIF-1、Srebp1)の発現量もPSLで処理したCD8 T細胞では明らかに低下していることが示された。最後にmTORの上流で作用し、PI3K/Akt/mTOR経路を介して解糖系を活性化するインスリン様増殖因子1(IGF-1)に着目して、PSL処理時にIGF-1を共処理したところ、PSLの作用が拮抗されることが*in vitro*、*in vivo*の検討にて証明された。

【結語】CD8 T細胞活性化時におけるPSLの存在は、細胞に低代謝状態をインプリントし、長期にわたるエフェクター機能、免疫記憶形成、抗腫瘍活性の低下を引き起こす可能性が明らかになった。また、IGF-1の投与により、こうしたPSLの作用は抑制されたことから、ステロイドによる免疫抑制状態の改善への糸口となる可能性を持つ、臨床的に有用な知見が示された。

本論文に対する公開審査会は、令和3年1月8日に開催された。申請者は学位論文の内容について、膨大な実験結果をわかりやすくかいつまんで説明し、既報論文の知識も織り交ぜて、英語で明確に発表した。その後、審査委員からは本研究に関連する以下の多岐にわたる質問がなされた。

- 1) 使用したリンパ球は主にマウスのものであるが、ヒトのリンパ球でも検討しているか。
- 2) PSLの濃度は臨床で使用する投与量と比較して妥当か。またPSL作用の雌雄差はあるか。
- 3) PSLの濃度を下げる、あるいは濃度を上げることによる作用の変化について。
- 4) PSLではないGCを用いた場合の影響について。
- 5) 他のT細胞分画やB細胞など他の免疫細胞や全身の臓器へのPSLの影響について。
- 6) 内因性のステロイドと外因性ステロイド投与との作用の違いについて。
- 7) IGF-1を単独で投与した場合の影響やインスリンの作用について。
- 8) グルタミン酸などアミノ酸代謝への影響について、また一部アミノ酸の測定に関して。
- 9) mTORとインプリントとの関連と、インプリントに着目した今後の研究の発展性について。
- 10) mTORを阻害するラパマイシンを投与した場合の影響について
- 11) PSL投与によるIGF-1受容体やインスリン受容体の発現量への影響について。
- 12) HIF-1への影響があったことから、虚血再灌流などによる他臓器への影響について。
- 13) 交感神経の活性化によるカテコラミンなど他の副腎系ホルモンの影響について。
- 14) ステロイドには良い側面もある。マイナス面を回避する適切な使い方について。
- 15) 麻酔科の立場として今回の結果について臨床に応用するアイデアについて。

これら多くの試問に対して申請者は、質問者の意図を十分に理解した上で、先行研究や文献的考察を交えながら、明瞭かつ的確に回答した。申請者は麻酔科医として、麻酔時のストレスによる内因性のステロイドの活性化や、治療としての外因性のステロイド投与が、担癌患者に与える影響を今後検討したいという将来展望を提示し、本論文がトランスレーショナル研究としてさらに発展することが期待され審査会は終了した。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。