

氏 名	中澤 優太
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第 9543 号
学位授与年月	令和2年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学位論文題目	がん免疫微小環境における抑制性免疫受容体の機能解析
主 査	筑波大学教授 医学博士 野口 雅之
副 査	筑波大学教授 博士（医学） 小田 竜也
副 査	筑波大学准教授 博士（薬学） 鈴木 裕之
副 査	筑波大学講師 博士（医学） 栗田 尚樹

中澤優太氏の学位論文に含まれた内容の一部は、今後中澤氏が投稿を予定している研究内容に該当するため、ここには論文の内容の要旨および論文審査結果の要旨を公開し、全文の公開が可能になった時点で、学位論文審査報告書を公開する。

論文の内容の要旨

中澤優太氏の博士学位論文は、抑制性免疫受容体（inhibitory immunoreceptor: iIR）の腫瘍微小環境における意義について悪性黒色腫を例に解析したものである。その要旨は以下の通りである。

（目的）

近年、制御性 T 細胞は抗腫瘍免疫に大きな影響を与えることが報告されている。しかし、腫瘍微小環境内で制御性 T 細胞がどのように蓄積し、腫瘍免疫に働いているのかは未だ不明な点が多い。著者は、抑制性免疫受容体（inhibitory immunoreceptor: iIR）の腫瘍微小環境における意義を明らかにすることを目的に研究を行なった。

（対象と方法）

著者は、iIR を欠損したマウスを実験に用いている。マウス B16 melanoma 細胞をマウスの皮内に投与してマウス担癌モデルを作製し、マウスの骨髄より 10 ng/ml GM-CSF と 10 ng/ml IL-4 を用いて1週間かけて骨髄由来樹状細胞を誘導している。The Cancer Genome Atlas (TCGA)データベース内の Skin Cutaneous Melanoma (SKCM) のデータを用いてバイオインフォマティクス解析を行い、そのデータ内で、iIR 発現量の中央値を算出し、中央値以上を高発現群、中央値以下を低発現群に分け、患者の予後を比較している。NCBI に登録されている Single cell RNA-seq データ（アクセスコード No. GSE72056）を統計解析ソフト R とそのパッケージソフトである Seurat を用いて解析している。

（結果）

著者はまず、腫瘍内におけるヒト iIR の機能を解析するために、TCGA データベースを用いて iIR の発現量と生存率を比較し、ヒト悪性黒色腫患者における iIR の発現量は患者の予後に関係し、iIR 発現

が低い者ほど予後が悪いことを示している。加えて、抗腫瘍免疫応答の指標である IFN- γ の発現と iIR の発現に相関があることを見出している。

次に著者は、パイオインフォマティクス解析により、ヒト悪性黒色腫組織に存在する免疫細胞間での iIR の発現量を解析し、骨髄球系細胞に iIR が高発現していることを示している。以上の結果に基づき、著者は骨髄球系細胞に発現するヒト iIR が抗腫瘍免疫応答を制御していることを示している。

次に著者は、野生型及び iIR 遺伝子欠損マウスを用いて、担癌モデルでより詳細な解析を行い、iIR 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、腫瘍径や生存率に変化が観察されることを示している。次に、腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞より産生される IFN- γ を測定することにより、*in vivo* の結果を支持する結果を示している。iIR 遺伝子欠損マウスで、腫瘍内の制御性 T 細胞数が変化していることも示している。これらの結果に基づき、著者は、マウス iIR が抗腫瘍免疫応答及び、制御性 T 細胞数に影響を及ぼすことを発見している。

著者はさらに、iIR コンディショナル遺伝子欠損マウスを用いて、腫瘍に浸潤する樹状細胞上の iIR が腫瘍の増悪に関与していることを示すとともに、腫瘍組織より単離した樹状細胞の遺伝子発現解析により、iIR 遺伝子欠損マウスで IFN- β の発現が亢進していることを示している。

次に著者は、iIR がどのように IFN- β 産生を抑制するかのメカニズムを解析している。骨髄由来樹状細胞 (BMDCs) にマウス B16 melanoma 細胞の培養上清を添加して Ifn- β の遺伝子発現を測定し、iIR 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs で IFN- β の遺伝子発現が亢進していることから、培養上清中に IFN- β の産生を促す物質と iIR のリガンドが含まれていることを示している。iIR のリガンドは、小型膜小胞であるエクソソームに露出している可能性が報告されていることに基づき、著者はマウス B16 melanoma 細胞培養上清より単離したエクソソームを BMDCs に添加することで、iIR 遺伝子欠損マウス由来の BMDCs で Ifn- β の遺伝子発現が亢進することを示している。また、単離したエクソソームに対する iIR Fc タンパク質の結合能を検討することにより、*in vitro* での結果を支持する結果を得ている。つまり、この結果は樹状細胞上の iIR が腫瘍細胞由来のエクソソームを認識し、IFN- β の産生を制御していることを示している。また、エクソソームの合成阻害薬をマウス B16 melanoma 担癌マウスに投与する *in vivo* の実験においても、樹状細胞上の iIR が腫瘍細胞より産生されるエクソソームを介して、腫瘍径増大や腫瘍内制御性 T 細胞の数に影響を及ぼしていることを示している。

(考察)

著者は本研究において、マウス iIR が腫瘍免疫微小環境で、制御性 T 細胞数を負に制御することにより、免疫応答を調整していると考察している。その制御は、腫瘍細胞由来のエクソソームを介した IFN- β 産生を負に制御することによるものであると推測される。また、ヒト悪性黒色腫患者においても骨髄球系細胞にヒト iIR が発現し、その生存率に影響を及ぼすことから、ヒト iIR もマウスと同様の機能を持つことが推察される。著者は本研究より、iIR のアゴニスト抗体投与により、腫瘍内制御性 T 細胞を制御できる可能性を示し、このような抗体を用いた新規治療法の開発が可能であることを考察している。

結語：上記の結果から、著者は腫瘍免疫微小環境において、樹状細胞上の iIR が腫瘍細胞由来のエクソソームと結合し、IFN- β の産生を負に制御することで、腫瘍内制御性 T 細胞数を減少させている可能性を示唆している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は iIR がヒト悪性黒色腫内の腫瘍免疫微小環境で、制御性 T 細胞を負に制御することにより、免疫応答を調整していることを発見し、その制御は、腫瘍細胞由来のエクソソームを介した IFN- β 産生を負に制御することによるものであることを示した。本研究は、iIR のアゴニスト抗体投与により、腫瘍内制御性 T 細胞を制御する新規治療法の開発に役立つ可能性を期待させる優れた内容である。

令和2年1月20日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。