HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CRISPR/Cas9 screeningによって同定されたCD48はPTCL細胞におけるNK細胞免疫監視からの逃避機構に深く関与する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	千葉, 雅尋
Description	配架番号：2742
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15238号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87685
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	CHIBA_Masahiro_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　千葉雅尋

審査担当者　主査　教授　佐藤　典宏
副査　教授　真部　淳
副査　教授　園下　将大

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 screening によって同定された CD48 は PTCL 細胞における NK 細胞免疫監視からの逃避機構に深く関与する
(CRISPR screen identifies CD48 as a key molecule for evasion from NK cell surveillance in peripheral T-cell lymphomas)

審査にあたり、まず副査の園下教授から CD48 ノックアウト ST1 の CD48 MFI が山になっておらず、なだらかになっているのはなぜかという質問と、PTCL の mRNA での CD48 の低下の程度が弱いのではないかという質問と、臨床サンプルの CD48 の蛋白発現が正常 T 細胞と比べて半減しているのであれば、細胞障害アッセイのときに完全なノックアウトではなく、遺伝子が半分ノックアウトされている細胞もしくは shRNA でノックダウンした細胞を使わなかったのはなぜか、またスクリーニングのときは本当に１つの細胞につき１つの遺伝子しかノックアウトできていないのか、更にはスクリーニングで ATLL 細胞がよく殺される分子を検討できなかったのかという質問があり、申請者は１つ目の質問には Cas9 で遺伝子が切れる効率に差がでているので、CD48 ノックアウト ST1 の CD48MFI が大きな山になっていないだろうと回答し、２つ目の質問には ATLL を含めた PTCL の CD48 mRNA 低下は乏しいが、ATLL に関しては CD48 の蛋白レベルの発現が半減しているので、少なくとも ATLL においては CD48 発現が大きく減少しているだろうと回答し、3 つ目の質問には遺伝子が半分ノックアウトした細胞を作ろうとしたが作れなかったと回答し、4 つ目のスクリーニングの質問にはこのスクリーニングは様々な既報で行われており、これらの既報は基本的には１つの細胞につき１つの遺伝子をノックアウトしていると仮定していたので申請者たちもそのように仮定したが、詳しくは分からないと回答し、５つ目の ATLL 細胞で NK 細胞によってよく排除された遺伝子の検討については、実際にスクリーニングでノックアウトにより ATLL 細胞の生存数が低かった遺伝子の sgRNA を作成して、ノックアウトによる CD48 発現変化を調べたが、CD48 発現変化は認めなかったと回答した。最後の回答を受けて、副査の園下教授は、既報で NK 細胞や細胞障害性 T 細胞の活性化などが報告されていない遺伝子を調べることが今回の研究のような実験では大きな発見につながるので、正確に調べるべきだと発言した。副査の真部教授からは今回の drug screening でなぜ CD48 発現を上昇させる薬剤に注目しなかったのか、ルキソリチニブは JAK1 と比べ JAK2 阻害作用が強いと思われるが、その点は今回の実験結果と矛盾しないのか、CD48 は NK 細胞を活性化させる以外の役割はないのかという質問があり、申請者は１つ目の質問に対しては今回の screening では CD48 発現が上昇すると考えられる薬剤を抽出できず、かつ既報から CD48 発現を上昇させると報告されている

薬剤を数個使用したが、ATLL 細胞の CD48 発現上昇を認めなかったと回答し、２つ目の質問には JAK1 と JAK2 の影響を調べるために JAK1 と JAK2 ノックアウトの実験を行ったと回答し、3 つ目の質問には、調べた限りでは腫瘍細胞もしくはウイルス感染細胞の CD48 は NK 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞の 2B4 と結合して、NK 細胞もしくは細胞傷害性 T 細胞を活性化させる作用が報告されているのみであると回答した。申請者の２つ目の質問の回答に対して、副査の真部教授は CD48 発現を上昇させる機序や薬剤を調べることが臨床的に重要であるので、その点について検討を行うようにと発言した。主査の佐藤教授から免疫チェックポイント阻害薬の影響は細胞障害性 T 細胞が主体であることから、ATLL の CD48 発現と免疫チェックポイント阻害薬の治療効果は相関しないのではないだろうかという質問と今回の研究での今後の展望について質問があり、申請者は１つ目の質問に対しては、確かに免疫チェックポイント阻害薬は細胞傷害性 T 細胞に与える影響が大きいが、NK 細胞はサイトカインなどの産生を通じて細胞傷害性 T 細胞の活性化に関わるので、ATLL 細胞の CD48 発現と免疫チェックポイント阻害薬の効果が相関しないとも限らないと回答し、2 つ目の質問に対しては、CD48 発現が ATLL の予後予測のバイオマーカーになる可能性が今回の研究で明らかになったので、ATLL の患者検体を多く保有しており、ATLL の研究が盛んな久留米大学医学部病理学講座と共同研究を行っていると回答した。

この論文は ATLL の NK 細胞免疫に関わる分子を CRISPR screening により機能的に網羅的に検討を行ったことが評価され、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。