



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dual epigenetic interventions with DNA demethylation and HDAC inhibition synergistically boost MHC-I-dependent anti-cancer immunity through NLRC5 [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	安, 寧
Description	配架番号 : 2748
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15430号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89877
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	AN_Ning_review.pdf, 審査の要旨



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 An Ning

主査 教 授 近 藤 亨
審査担当者 副査 教 授 松 野 吉 宏
副査 准教授 橋 本 茂

学 位 論 文 題 名

Dual epigenetic interventions with DNA demethylation and HDAC inhibition synergistically
boost MHC-I-dependent anti-cancer immunity through NLRC5

（DNA 脱メチル化と HDAC 阻害の 2 つのエピジェネティック治療は、NLRC5 を介する MHC-I 依存性
の癌免疫応答を相乗的に増強する）

本学位論文は、癌抗原の提示に係る MHC クラス I の発現を制御する転写共役因子 NLRC5 のプロモーター領域が癌細胞において高度にメチル化されていること、脱メチル化剤 5-Aza と MHC クラス I の発現を亢進する HDAC 阻害剤の組み合わせが癌細胞における MHC クラス I 発現を相乗的に活性化することを解明したものである。更に、B16F10 メラノーマ細胞株を移植した担癌マウスを用いて、両剤の投与が B16F10 細胞の MHC クラス I 発現亢進と宿主の CD8+細胞の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮することを実証したものである。

審査にあたり、まず副査の松野吉宏教授から本研究で使用した MCF7 と B16F10 を選んだ理由についての質問に対し、申請者は NLRC5 プロモーター領域のメチル化がヒトメラノーマと乳がんでは最も高いこと、代表的なこれらの癌細胞である MCF7 と B16F10 細胞株の NLRC5 プロモーター領域がメチル化されていることを確認したこと、更に B16F10 細胞に MHC クラス I 発現が消失していたため、これらの細胞を本研究に使用したと回答した。次に、他の癌種に対する 2 剤投与の効果についての質問に対し、申請者は肺がん細胞株と HeLa 細胞に対して行った実験では MHC クラス I 発現が劇的に増強されなかった。この結果はこれらの細胞のヒストンがある程度アセチル化されていることが原因と考えられると回答した。また、MCF7 と B16F10 でエピジェネティックプロトコルの順番が異なるとの質問に対して、申請者は初めに 5-Aza 処理後に HDAC 阻害剤を加えた実験を行い、MCF7 細胞では MHC クラス I の発現を誘導できたが、B6F10 細胞は細胞死し MHC クラス I 発現を確認できなかった。そこで薬剤の投与順を変えたところ B6F10 細胞は細胞死せずに MHC クラス I 発現を誘導することができたと回答した。

次に橋本茂准教授からエピジェネティック制御が MHC クラス I 発現と抗原提示パスウェイを誘導することは多くの論文で既に報告されているが、申請者のプロジェクトの新規性は何かの質問に対し、申請者は同様の実験結果は数多く報告されているが、5-Aza と HDAC 阻害剤の組み合わせが相乗的に MHC クラス I 発現癌細胞に誘導すること、この発現誘導が NLRC5 依存的であることをそ

のノックアウト細胞を用いて証明したことが本プロジェクトの新規性に当たると回答した。ATAC-seq を用いて DNA メチル化とヒストンアセチル化の変化を詳細に検討したかの質問に対し、申請者は ATAC-seq は行っていないが bisulfite シークエンスにより NLRC5 プロモーター領域のメチル化を調べたデータがある。この結果は他のラボメンバーのデータであることから博士論文に使用していない。MHC クラス I プロモーターのアセチル化については ChIP アッセイをこれから試みる予定であると回答した。NLRC5 ノックアウト細胞が NLRC5 タンパク質を発現していないことを Western Blotting で確認したかの質問に対し、申請者は現在までに Western Blotting に使える抗体が販売されていないと回答した。NLRC5 プロモーターのメチル化レベル (β -value) と CD8 T 細胞の活性化の関係についての質問に対し、申請者は臨床データベースを基に NLRC5 プロモーターメチル化、MHC クラス I 発現、T 細胞活性化マーカー発現を比較検討することが可能である。また、様々な濃度の 5-Aza を加えた癌細胞に CD8 T 細胞を加え、NLRC5 プロモーターメチル化と CD8 T 細胞の活性化を検討できると回答した。

主査の近藤亨教授から NLRC5 の NBD ドメインの欠失は NLRC5 の不活化に十分であるかの質問に対し、申請者は NLRC5 の核移行に NBD ドメインは必要であるため、そのドメインの欠失は本タンパク質の不活化に十分と考えられると回答した。NLRC5 プロモーターのメチル化に関わる因子と何故がん細胞ではこの領域がメチル化されるのかについての質問に対し、申請者は 3 種類の DNA メチル化転移酵素 (TET、DNMT1、DNMT3) が NLRC5 プロモーターのメチル化に関与していることが報告されているが、癌細胞で NLRC5 プロモーターがメチル化される分子メカニズムについて未解明であると回答した。また、NLRC5 が他の転写因子群のプラットフォームとして働いているのかの質問に対し、申請者はそのように機能していると考えていると回答した。

全ての質問に対して申請者は文献的知見と実験結果をもって適切に回答した。また本研究で解明した研究成果の意義、今後解明すべき点を明確に理解し、次段階の研究指針や応用の方向性も十分把握していた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士（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。