



Title	抗腫瘍エフェクター細胞の誘導におけるNK2Rの役割に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	SHEN, Weidong
Description	配架番号 : 2801
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15575号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90398">https://hdl.handle.net/2115/90398</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	SHEN_Weidong_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 沈 煒棟

主査 教授 清野 研一郎  
審査担当者 副査 准教授 北條 慎太郎  
副査 准教授 外丸 詩野

### 学位論文題名

抗腫瘍エフェクター細胞の誘導における NK2R の役割に関する研究  
(Studies on the role of NK2R in the induction of anti-tumor effector cells)

本論文は、担がん生体内における抗腫瘍エフェクター細胞としての CD8 陽性 T 細胞の誘導に、神経ペプチド受容体 NK2R の STAT1 依存的発現に関与することを報告したものである。

免疫細胞の抗腫瘍免疫に神経伝達物質が関与していることが報告されている。担がん個体における抗腫瘍エフェクター細胞の持続的な誘導は、有効ながん免疫治療法の開発において重要である。タキキニン受容体 2 (*Tacr2*) 遺伝子によってコードされているニューロキニン受容体 2 (NK2R) は、ニューロキニン A (NKA) の G タンパク質共役型受容体で、NK2R を介した神経ペプチドシグナルは標的細胞の多様な生理機能を制御することが知られている。ヒト単球由来樹状細胞では、I 型あるいは II 型 IFN や Poly I:C による刺激が STAT1 依存的に NK2R の発現を誘導することが報告されている。一方、NK2R アンタゴニストの使用による NK2R シグナルの遮断は、樹状細胞の抗原提示能や抗原特異的 T 細胞応答を抑制することが知られている。しかしながら、担がん個体における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導に対する NKA-NK2R シグナル伝達の影響は明らかになっていない。そこで本研究で申請者は、担がん個体における抗腫瘍エフェクター細胞の誘導機序を解析した。まず申請者は、マウス肝がん Hepal-6 細胞を移植した肝がんマウスモデルに対して poly I:C を投与すると IFN- $\alpha/\beta$  および IFN- $\gamma$  の産生が亢進して腫瘍形成が著しく抑制されることを見出した。また申請者は、この抗腫瘍効果が *STAT1* 欠損マウスや抗 CD8 抗体投与下では減弱することを発見した。IFN- $\gamma$  で刺激した CD8 陽性 T 細胞は、STAT1 依存的にニューロキニン A (NKA) の受容体 NK2R を発現誘導した。そして申請者は、*Tacr2* 欠損マウスを使用した肝がんモデルにおいては腫瘍形成が亢進するとともに T 細胞の腫瘍内浸潤が減弱すること、poly I:C 投与による抗腫瘍効果が減弱することを確認した。さらに申請者は、*Tacr2* を欠損した CD8 陽性 T 細胞に対して CD3 および CD28 刺激を行った結果、IFN- $\gamma$  およびグランザイム B の産生誘導レベルが低下することを見出した。最後に申請者は、野生型あるいは *Tacr2* 欠損マウスから単離した CD8 陽性 T 細胞に対して CD3 および CD28 の刺激を行い、野生型 CD8 陽性 T 細胞と比較して ERK1/2 のリン酸化レベルの増加および I $\kappa$ B のタンパク質レベルの減少が観察されないことを見出した。以上のことから、担がん個体における IFN-STAT1 シグナルの活性化は、CD8 陽性 T 細胞における NK2R を

介して抗腫瘍エフェクターT細胞の誘導を促進し、NK2Rを介した神経ペプチドシグナルが抗腫瘍免疫制御機構の一端を担っていることを示唆している。

審査にあたり、まず副査の外丸准教授より、本研究に使用した *STAT1* 欠損マウスおよび *Tacr2* 欠損マウスにおける免疫異常についての質問があり、申請者は *STAT1* 欠損マウスが IFN- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  に対する応答性を欠いており微生物病原体やウイルスによる感染に非常に脆弱であること、一方 *Tacr2* 欠損マウスにおける免疫異常の報告は少ないが、胃内容物の排出障害が報告されていると回答した。また、使用した *STAT1* 欠損マウスおよび *Tacr2* 欠損マウスの CD8 陽性 T 細胞と CD4 陽性細胞の数に関する質問があり、申請者はこれらの欠損マウスと野生型マウスとの間で両細胞の数は同じだったと回答した。さらに、poly I:C 投与モデルにおける CD8 陽性 T 細胞以外の免疫細胞への poly I:C の刺激や影響に関する質問があり、申請者は、poly I:C 投与による抗腫瘍効果には NK 細胞など他の免疫細胞も重要な役割を果たしていると考えられ、NK1.1 抗体の投与により poly I:C 投与による抗腫瘍効果が抑制されることを確認したと回答した。

続いて副査の北條准教授より、poly I:C 投与モデルにおける免疫細胞以外の細胞を確認する必要性についての提案があった。これに対し申請者は、今後の検討課題であると回答した。また、CTL を腫瘍に誘導するケモカインの発現についての質問があった。申請者は、そのようなケモカインの発現は検討していないが、CXCR3 阻害剤の投与により poly I:C の抗腫瘍効果が抑制されることを確認しており、CTL の腫瘍への誘導には CXCL4、CXCL9、CXCL10、CXCL11 が関与している可能性があるという回答した。次に、CD8 陽性細胞が NKA を発現する可能性についての質問があり、申請者は、IFN- $\gamma$  で刺激された CD8 陽性 T 細胞が NKA を発現することを確認しているという回答した。さらに、野生型マウスと *Tacr2* 欠損マウスにおける、NKA によるグランザイム B 発現細胞の制御機構についての質問があり、申請者は CD8 陽性 T 細胞から産生される NKA がオートクライン的に同細胞を刺激して抗腫瘍効果が現れたと回答した。また同副査から、CD3/28 刺激後の CD8 陽性 T 細胞における IFN- $\gamma$  とグランザイム B の遺伝子発現量の解析に関して、より短い刺激時間での検討をすべきとの指摘があった。これに対し申請者は、刺激時間は短い方が、指摘の通り短い刺激時間の方が刺激の直接の応答の解析に有用と考えられるため、今後実施したいと回答した。また、CD3/28 刺激後に CD8 陽性 T 細胞が発現するリン酸化 ERK および I $\kappa$ B タンパクを検出するアッセイにおいて、20 分間刺激した後の解析時に CD8 陽性 T 細胞が NKA を産生している可能性があるか質問があった。申請者は、NKA の発現を直接検出してないが NKA は産生されていると考えており、さらに培養液中にも元々 NKA が含まれていることが報告されていると回答した。

最後に主査の清野教授より、IFN- $\gamma$  で刺激された野生型マウスの CD8 陽性 T 細胞における *Tacr2* 遺伝子を解析した際にエラーバーが大きくなった理由についての質問があった。申請者は、エラーバーが大きいのには技術的な要因とサンプル数の少なさに起因しているという回答した。また、肝腫瘍患者における NK2R の発現について質問があり、臨床検体は未解析で今後の検討課題であると申請者は回答した。さらに、データベースを使用した肝腫瘍患者における *Tacr2* の遺伝子発現解析についての質問があり、申請者は肝腫瘍患者においては *Tacr2* 遺伝子がそれほど高く発現していないと回答した。最後に、肝腫瘍患者における *Tacr2* 遺伝子の発現の解析は本研究の臨床的意義を考察する上で重要であるとのコメントがあり、申請者は指摘の解析の重要性を認識しており今後検討したいと回答した。

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、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。