



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies of roles of NLRC5 expression in cancers on antigen presentation and host anti-cancer immunity [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	SUN, Xin
Description	配架番号 : 2832
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15898号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92423
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SUN_Xin_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 Sun Xin（スンシン）

主査 園下 将大 教授
審査担当者 副査 橋本 茂 准教授
副査 矢口 裕章 准教授

学 位 論 文 題 名

Studies of roles of *NLRC5* expression in cancers
on antigen presentation and host anti-cancer immunity
(癌の抗原提示とホストの抗癌免疫における *NLRC5* 発現の役割の研究)

本研究は、抗原提示関連遺伝子群の発現制御因子 *NLRC5* (NLR Family CARD Domain Containing 5) の、抗腫瘍免疫の成立における役割の解明を目指したものである。本研究で申請者は、MHC class I をはじめとする抗原提示に関わる遺伝子群の発現を *NLRC5* が促進すること、そしてこの促進が抗腫瘍免疫を活性化させることを、がん細胞の同系移植モデルで示した。

審査にあたり、はじめに副査の橋本准教授から以下の指摘や質問があった。まず、DNA メチル化が転写因子の DNA への結合を阻害する一方、逆に促進する場合もあることを踏まえ、TDM (Targeted demethylation) 法による DNA の脱メチル化操作後に *NLRC5* の発現が上昇した機序として *NLRC5* プロモーター領域への転写因子群の結合を確認した方が良いとの指摘があった。申請者はこれに対し、Chip-qPCR/Chip-Seq 法を活用することでこれを直接的に解析できる可能性があるとは回答した。次に、*Nlrc5* のノックアウトにより *PD-L1* の発現が上昇した機序について質問があり、申請者はノックアウト細胞をクローン化した際にこの形質を有するクローンを単離したためにこれが観察された可能性があるとは回答した。また、TDM 処置した細胞はよりクラス I MHC を発現し OT-I 刺激下で効率的に T 細胞を活性化しているが、マウスへの移植実験を実施しなかった理由は何か質問があり、申請者は OT-I のような人為的な刺激が存在しないマウス体内ではこの T 細胞活性化の影響を観察しにくい可能性があったとは回答した。そして、*Nlrc5* ノックアウト細胞と対照細胞を同時期にマウスから採取して解析しなかったのはなぜかとの質問があり、申請者は *Nlrc5* のノックアウト自体に腫瘍形成の抑制効果を認めたため、腫瘍がそれぞれの群で一定の大きさに成長するのを待って採取したとは回答した。

続いて副査の矢口准教授から以下の質問があった。まず、抗 PD-1 抗体をマウスに投与した際の副作用を解析したか質問があり、申請者は本研究では解析していないとは回答した。次に、TDMa (Targeted demethylation and activation) 法によって *Nlrc5* やその標的遺伝子の発現が大きく上昇したが、これが自己免疫疾患を招来する可能性があるか質問があった。これに対し申請者は、MHC class I の発現上昇が自己免疫疾患を引き起こすことは報告されておらず、従って *Nlrc5* の発現上昇もそのような副作用を招くことはないと考えていると

回答した。加えて、自己免疫疾患では免疫反応に伴ってサイトカインの過剰な産生が起こるが、*Nlrc5*も IFN- γ によって誘導されることが知られているため、このような間接的な機序によって *Nlrc5* の発現が上昇する可能性がある」と回答した。続いて、TDMa 法を臨床応用できる可能性はあるかとの質問があった。申請者は、最も望ましい手法は TDMa 法の構成要素をがん細胞に直接送達することであるが、TDMa 法は多数の構成要素を有する複雑な系であるため現実的には容易ではないと回答した。併せて、凍結された細胞が抗腫瘍免疫を誘導することが確立されているため、例えばがん細胞を患者から単離して TDMa 法を適用し、この細胞を患者に導入することで有効な抗腫瘍免疫反応を惹起できる可能性がある」とも回答した。

最後に、主査の園下から以下の指摘や質問があった。まず、*Nlrc5* のプロモーター領域の脱メチル化を狙った TDM 処置によって *Nlrc5* や MHC class I 等の発現が上昇しているが、元々この領域は高度にメチル化されておらず、これらの発現上昇は本当に脱メチル化に起因するかとの質問があった。これに対し申請者は、現在までに取得した結果のみではこれらの発現上昇が脱メチル化に起因することを結論することはできないと回答した。併せて、この解析に使用した B16F10-TDM 細胞はクローンだが、TDM-sg*Nlrc5* 処置の前後での *Nlrc5* プロモーター領域のメチル化状態を比較しておらず、質問に回答するためにはこの比較を実施する必要があると回答した。次に、*Nlrc5* ノックアウトによって CD8⁺ T 細胞による抗腫瘍免疫が活性化し腫瘍が退縮するとの本研究の知見はどのくらい広範な種類のがん当てはまると考えられるか質問があった。これに対し申請者は、本研究で使用した B16F10 や E0771 細胞は BL/6 マウスに発生した腫瘍から樹立された細胞株で多数の遺伝子変異を有しており、その結果 neoantigen を提示していること、そして *Nlrc5* が MHC class I を誘導することから、neoantigen を提示しているがん種には本研究の知見が当てはまる可能性がある」と回答した。続いて治療戦略に関して、TDMa システムではなく *Nlrc5* をコードする cDNA の導入を検討した方がいいのではないかと指摘があった。これに対し申請者は、TDMa システムは複雑であるが治験で CRISPR/Cas9 システムの安全性も確認されつつあること、一方で *Nlrc5* を導入する手法の安全性が確立されていないこと等を踏まえ、今後総合的に検討していく必要があると回答した。加えて、免疫組織染色の結果に関して統計解析で有意差がないにもかかわらず差があったとの記載が本文中にあること、複数群の比較をする際に適切な統計解析手法を使用する必要があること、意味が明瞭でない軸ラベルが付されたグラフがあること、そして E0771 細胞で *Nlrc5* をノックアウトした手法やその確認の記述がないことに関して博士論文を修正するよう指示があり、申請者はこれらに対応すると回答した。

本研究の知見は、抗腫瘍免疫の成立機序の一端を解明したもので、現行の免疫療法より効果の高い新規治療法の開発につながる可能性がある。博士論文の改訂も適切であった。研究発表の内容及びその後の質疑応答を通して、申請者は当該領域に関する見識と研究遂行能力を有すると判断するとともに、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、審査員一同は申請者が博士（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。