

審査の結果の要旨

氏名 蘇 英晗

本論文は、大きく 2 つのパートから構成されています。第一部では、新規の共培養システムを用いて、非小細胞肺癌 (NSCLC) における CD200 と CD200R の相互作用を検討することを目的としています。第二部では、ヒト NSCLC 腫瘍組織から抽出した T 細胞と肺動脈血 (腫瘍へ注入する血管) から抽出した T 細胞では、CD200R の発現割合が大きく異なるという結果を報告しています。

本研究の第一部では、先行研究で発見された CD200 陽性癌関連線維芽細胞 (CAF) と CD200R を発現する免疫細胞との相互作用を検討するために、新規の共培養系を構築し、検討を行いました。免疫チェックポイント分子 CD200 と CD200R の相互作用が免疫抑制シグナルを誘発することは過去に報告されています。CD200-CD200R axis は、主にマクロファージと腫瘍細胞の相互作用が検討されてきました。しかしながら、CD200 陽性 CAF が、どのような免疫微小環境に関与しているか、に関しては未解明です。筆者は、当研究室ですでに確立されていた CAF のライブラリ (19 症例) を用いて、定量的な逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) およびフローサイトメトリーにより CD200 陽性の CAF 亜集団が実際に存在することを確認しました。

次に、寿命延長した CAF を作製し、そこから CD200 ノックダウンおよび過剰発現の CAF を共培養試験のために樹立しました。腫瘍浸潤白血球 (TIL) を NSCLC 組織より分離し、フローサイトメトリーにより腫瘍組織内の免疫細胞における CD200R の発現を検討しました。T 細胞、B 細胞、単球の中で、T 細胞が最も CD200R を高発現していることが判明しました。さらに、密度勾配遠心分離と磁気ビーズを用いて、肺動脈血中 (腫瘍へ注入する血流) の CD200R 陽性 T 細胞を分離しました。CD200R 陽性 T 細胞と CD200 過剰発現 CAF または CD200 ノックダウン CAF を共培養後、T 細胞を分離し、qRT-PCR およびフローサイトメトリーでサイトカイン発現パターンおよびアポトーシスの変化を検討しました。残念ながら、いずれにおいても再現性のある結果を得ることはできませんでした。さらには、組換え CD200 タンパク質や CD200 ブロッキング抗体のいずれを添加しても、上記検討において有意な変化は見られませんでした。機能解析のための *in vitro* 実験系の確立が、今後の課題と考えます。

本論文の第二部では、CD200R 陽性 T 細胞に焦点を当てています。腫瘍組織内に浸潤する前の T 細胞と腫瘍組織に浸潤した後の T 細胞とでは、性状に大きな違いがあることが知られています。腫瘍組織に浸潤した T 細胞では、肺動脈血、すなわち腫瘍組織内に浸潤する前の血液から抽出した T 細胞と比較して、CD200R 発現陽性細胞の割合が有

意に高いことが判明しました。次に、CD200R 陽性 T 細胞において、CD200R と 3 つの免疫チェックポイント分子 (PD-1、CTLA-4、TIM-3) の共発現を調べました。その結果、CD200R とこれら 3 つの免疫チェックポイント分子とでは高い共発現率を示し、特に腫瘍組織内の T 細胞での共発現率が高いことが確認されました。さらに、TCGA の公開データベース解析を行い、CD200R が 6 つの免疫チェックポイント分子と有意に相関して共発現していることも確認しました。以上より著者は、CD200R と他の免疫チェックポイントの共発現は、T 細胞の表現型変化のバイオマーカーとなり、免疫療法の潜在的なターゲットとなり得ると主張しています。

本研究ではまず、NSCLC 内の CAF には、CD200 陽性亜集団が存在することを確認しました。また、腫瘍組織内の T 細胞に CD200R が高発現していることも発見しました。CD200 陽性 CAF と CD200R 陽性 T 細胞との相互作用解析は実を結びませんでした。しかしながら、筆者は T 細胞が腫瘍組織に浸潤した後、CD200R 発現の陽性率が増加し、さらには PD-1、CTLA-4、TIM-3 もまた、同様の発現変化を伴う現象をあらたに見出しました。

論文の **material and method** の部分が記載不十分であったため、その部分においては修正を行いました。本研究の仮説の提示、実験はすべて筆者本人が行っており、博士 (生命科学) の学位を取得するのに十分な資格を有するものと判断します。

Word count: 1576