

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 原田 生起

横浜市立大学 大学院 医学研究科 医科学専攻 免疫学

審査員

主査	横浜市立大学 大学院 医学研究科 生化学	教授	緒方 一博
副査	横浜市立大学 大学院 医学研究科 がん総合医科学	教授	市川 靖史
副査	横浜市立大学 大学院 医学研究科 病態病理学	准教授	奥寺 康司

博士の学位論文審査結果の要旨

Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients

(慢性骨髄性白血病患者の骨髄系細胞は抗腫瘍免疫能が損なわれた特徴を持つ)

学位論文の要旨

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia: CML) の予後は、病因タンパク BCR-ABL による恒常的なチロシンキナーゼ活性に対する阻害剤 (Tyrosine Kinase Inhibitors: TKIs) によって、劇的に改善した。しかし TKIs 療法には服薬中止後の再発など問題点があり、CML は未だに根治できていない疾患である。近年、多くのがんで腫瘍に対する免疫療法が注目されている。CML は IFN- α 療法の有効例があることなどから、腫瘍免疫に感受性があると考えられてきた。しかし、CML において腫瘍免疫は有効に作用しておらず、そのメカニズムの解析は不十分である。本研究では、CML で腫瘍免疫が自発的に働かないメカニズムを理解するために、フローサイトメーターで CML 患者と健常人の末梢血および骨髄中の免疫細胞 (特に骨髄系細胞) およびその前駆細胞集団の解析を行った。また RNA-sequence を行い、CML 患者と健常人の各骨髄系細胞の遺伝子発現を比較した。すると、CML 患者において、血球系前駆細胞段階で転写因子 IRF8 の発現低下により、腫瘍免疫を誘導する樹状細胞 (DC) の分化が阻害され、腫瘍免疫を抑制する骨髄系細胞が増加することが示された。さらに、骨髄系細胞の中でも好塩基球が CML の予後を予測しうる細胞であることが見出された。

学位審査会での質疑応答

審査にあたり以上の論文要旨説明の後に以下の質疑応答が行われた。

奥寺副査のコメントおよび質問の概要

- (1) CML の DC は腫瘍性のもので非腫瘍性のものでどちらに着目しているのか。
- (2) 腫瘍性の DC に着目しているのであれば、腫瘍細胞が自身を攻撃すると考えているのか。
- (3) 好塩基球・単球・好中球はどのように分離して RNA-seq を行なったのか。
- (4) 変化の大きい好中球は好塩基球や単球のように十分な解析はしたのか。
- (5) 予後不良遺伝子の発現解析が脈絡もなく出てきたが、なぜこの解析をしたのか。

それらに対する申請者の回答

- (1) 研究を始めた当初は腫瘍性と非腫瘍性を分けて考えてはいなかった。今回の報告では主

に腫瘍性のものを想定している。今後は非腫瘍性の方にも着目した解析を行いたい。

- (2) 腫瘍細胞が自身を攻撃できる可能性を想定している。CML は他の造血器腫瘍とは異なり、多くの免疫細胞は産生される一方で、DC 分化は阻害される。また当研究室の過去の報告で、BCR-ABL 発現細胞に IRF8 を遺伝子導入すると DC 分化は回復し、その BCR-ABL 発現 DC は正常 DC よりも高機能性だったことを見出していた。以上から、腫瘍性でも DC 分化さえ回復させれば、腫瘍免疫を誘導できる可能性があると考えている。
- (3) 表面抗原上の各細胞種の定義に従い、フローサイトメーターで単離したものを使った。
- (4) GO 解析や GSEA など様々な解析を行なったが、機能解析などはやるべきだった。
- (5) CML 患者の各骨髄系細胞種を分離して、RNA-seq を行なった data は世界ではじめての報告である。文献を調べていると、患者のバルク末梢血で遺伝子発現解析を行い、予後を予測するような報告があった。そこに登場する遺伝子群が CML のどの患者で発現が高いかわかっていなかったのので、CML 病態をより理解するために行なった。

市川副査のコメントおよび質問の概要

- (1) DC の割合が減少しているという結果だが、細胞数はどうだったのか。
- (2) CML 患者が他のがんになりやすいという報告はあるか。

それに対する申請者の回答

- (1) 細胞数は減っていない。健常人と同程度であった。
- (2) 申請者が調べた限り、そのような報告はない。

緒方主査のコメントおよび質問の概要

- (1) CML 患者の骨髄前駆細胞で、DNMT3A, FLT3, IRF8 発現が低下しているが、その発現低下は互いに影響すると考えているのか。
- (2) TKI 治療後に各免疫細胞の割合はどのようになるのか。
- (3) 免疫に関する機能的な解析は行っていないので、RNA-seq による遺伝子発現だけで、CML 患者の好中球が免疫抑制性の細胞であると結論づけるには早計ではないか。具体的な遺伝子発現をみると、細胞増殖に関する分子の発現が高く、アポトーシスに関わる分子の発現が低いので、細胞の性質としては幹前駆細胞様になっているのではないか。
- (4) CML 患者の好中球を免疫の観点だけではなく、分化やその異常の観点でも面白かったのではないか。
- (5) 文献と RNA-seq による遺伝子発現解析で、全体的な発現をみて好塩基球が CML の悪性を担うと結論づけるのは早計で、実験的に証明する必要があるのではないか。また、

遺伝子の機能にも着目して個々の予後不良分子の発現と細胞種に関して考察すべきではないか.

それに対する申請者の回答

- (1) CML ではそれぞれの分子が独立して発現低下すると考えている. FLT3 と IRF8 は共に DC 分化に関連する分子で, FLT3 は IRF8 の上流の分子という報告もあるが, 培養実験で FLT3 を血球系前駆細胞に遺伝子導入しても IRF8 発現は上昇しなかったため, 現状はどのような関係性かはわからない.
- (2) 申請者は調べていないが, TKI 治療後の DC の割合は回復しないことは報告されている.
- (3) 免疫抑制細胞と断定するよりも遺伝子発現プロファイル上, そのような細胞に近いという表現の方が妥当だったかもしれない. 機能解析などは行っていないので, 今後は機能などを詳細に調べた上で, どのような細胞なのか判断したい. また, ご指摘頂いた分化や細胞増殖など幹前駆細胞の観点も抜けていたので, その観点も今後に生かしたい.
- (4) 今回の研究は腫瘍免疫に観点が偏っていたので, 今後は様々な観点を data を再解析したい.
- (5) 予後不良関連遺伝子の発現が全体的にみて, 好塩基球で高い傾向にあったことと臨床的な知見から推察しました. 実験的には証明できていないので, 今後の課題です.

総括

本研究は, CML で腫瘍免疫が自発的に働かないメカニズムを理解するために, CML 患者検体を用いて骨髄系細胞について詳細な解析を行ったものである. そして, CML 患者では骨髄系細胞の中でも, 腫瘍免疫を誘導する細胞が減少し, 腫瘍免疫を抑制するような細胞が増加していることを調べた. さらに, バイオインフォマティクスを駆使した詳細な解析を行うと, CML 患者の造血幹前駆細胞で転写因子 IRF8 の発現低下が認められた. IRF8 は腫瘍免疫を誘導する樹状細胞の分化に必須である一方で, 好中球の分化を抑制する. すなわち, IRF8 の発現低下が CML における骨髄系細胞の分化に偏りを生じさせると考察できる. これらから, 本研究成果は CML 病態をより詳細に理解する研究だといえる. 申請者の研究は, 前のめりな考察や論理展開も見受けられたが, 中間審査時の指摘も研究に取り入れ, 意義深い研究を行なった. また, 博士の学位審査会においては十分なプレゼンテーション力を示した. 以上より, 申請者は医学博士の学位授与に相応しい研究を行ったと判定された.