


## 論文審査の結果の要旨


博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	堀田 龍一
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1、2 項該当		
論文題目 CD52-Negative NK Cells Are Abundant in the Liver and Less Susceptible to Alemtuzumab Treatment (肝臓内には CD52 陰性 NK 細胞が多数存在し、Alemtuzumab 治療に抵抗性である)			
論文審査担当者			
主 査	教授 菅野 雅元		
審査委員	教授 一戸 辰夫		
審査委員	准教授 仲 一仁		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>臓器移植の免疫抑制レジメにおいて、リンパ球除去療法は重要な戦略の一つとなっている。アレムツズマブ（抗 CD52 抗体）は、ほぼすべてのリンパ球の細胞表面に表出する CD52 に対するヒト化モノクローナル抗体である。リンパ球除去療法後には重症感染症が起りやすいと考えられる。しかし、臓器移植後のアレムツズマブ投与は、重症感染症を増加させないと報告されている。著者は、肝臓移植におけるアレムツズマブを用いた免疫抑制導入療法後のリンパ球の推移を解析した。アレムツズマブ投与後に、末梢血中の T 細胞、B 細胞数は急速かつ著明に減少するのに対し、自然免疫系において重要な役割をもつ NK 細胞数は維持されていた。そこで著者は、アレムツズマブ投与後の、T 細胞数が回復してくるまでの数か月間は、NK 細胞が感染防御において重要な役割を果たしていると考えた。肝臓内 NK 細胞は末梢血 NK 細胞と異なり、抗腫瘍活性や抗ウイルス活性が高いと報告されている。そこで著者は、肝臓内 NK 細胞がアレムツズマブ投与に対し、耐性があるのではないかと仮説を立てた。本研究では、アレムツズマブが肝臓内 NK 細胞の生存及び機能に与える影響について検討した。アレムツズマブが NK 細胞に与える影響を調べるため、臓器移植の際にドナー末梢血から分離した Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)、あるいは肝還流液中から分離した Liver mononuclear cells (LMNC) を用いて、末梢血内 NK 細胞及び肝臓内 NK 細胞の CD52 の発現をはじめとした Phenotype を、フローサイトメトリーを用いて解析した。さらに、各種免疫細胞を様々な濃度のアレムツズマブ (0, 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL) と In vitro で co-culture し、アレムツズマブに対する感受性を Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD) を用い解析した。また、肝臓由来 CD52 陰性 NK 細胞の機能を、抗腫瘍活性はフローサイトメトリーを用いた細胞傷害性試験、IFN-γ 産生能は、細胞内染色、あるいは培養上清中の IFN-γ 濃度を ELISA 法にて測定し評価した。アレムツズマブ（抗 CD52 抗体）に対する感受性を検討するために、PBMC、LMNC の CD52 表出率を解析した。PBMC 中の約 90% が CD52 を表出していたが、LMNC 中の CD52 陽性細胞は約 50% であった。LMNC の CD52 表出は二峰性であり、肝臓内には異なる 2 分画が存在していた。また NK 細胞の CD52 表出は、末梢血の約 70% に対し、肝臓内では約 30% であった。一方、T 細胞、B 細胞、NKT 細胞は末梢血由来、肝臓由来ともに、ほぼすべての細胞が CD52 を表出していた。つまり、LMNC 中の CD52 陰性細胞は主に NK 細胞であると考えられた。肝臓内 NK 細胞の中でも、CD56<sup>bright</sup> NK 細胞の約 90% は CD52 陰性で、CD56<sup>dim</sup> NK 細胞と比べ、有意にその表出率が低かった。したがって、肝臓内 CD56<sup>bright</sup> NK 細胞が最も CD52 表出が少なく、アレムツズマブに抵抗性が高いことが示唆された。次にアレムツズマブ感受性を見るために、アレムツズマブ共培養試験を行った。LMNC は PBMC と比べ、生存率が有意に高かった。また LMNC において、NK 細胞は非 NK 細胞よりも生存率が高く、CD56<sup>bright</sup> NK 細胞は特に生存率が高かった。以上の結果より、肝臓内 NK 細胞、特に CD56<sup>bright</sup> / CD52 陰性 NK 細胞はアレムツズマブ存在下でも生存可能であると考えられた。次に肝臓内 CD52 陰性及び陽性 NK 細胞の免疫学的特徴を解析するため、表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。肝臓内</p>			

CD52 陰性 NK 細胞は肝臓内 CD52 陽性 NK 細胞と比べ、CD69、CD107a、NKp46、CD94 の表出率が有意に高く、CD16、CD226 の表出が低かった。NKp30、NKp44、TRAIL、CD158a、CD158b の表出は二つの population で差は認めなかった。つまり、肝臓内 CD52 陰性 NK 細胞は、活性化マーカー及び細胞傷害活性を示す分子の表出が高かった。さらに、アレムツズマブ投与下における感染防御で重要な働きをされると考えられる CD52 陰性 NK 細胞の機能評価を行った。肝臓内 CD52 陰性 NK 細胞は、肝臓内 CD52 陽性 NK 細胞と比べ、4 倍強力な抗腫瘍活性を有し、IFN- $\gamma$  を 20 倍豊富に産生した。以上の結果より、肝臓内 CD52 陰性 NK 細胞は、強力な感染防御機能を有していることが示唆された。

以上の結果から、本論文は肝臓内には、CD52 陰性 NK 細胞が多数存在し、これらの細胞はアレムツズマブ存在下でも生存可能であると同時に、強力な抗腫瘍活性、IFN- $\gamma$  産生能を持つことを示した。本結果より、CD52 陰性 NK 細胞はアレムツズマブに除去されることなく存在し続け、リンパ球除去療法後の感染症の発生の抑制に貢献している可能性を示唆した点において、高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が堀田龍一に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	堀田 龍一
学位授与の条件	学位規則第4条第1項2項該当		
論文題目 CD52-Negative NK Cells Are Abundant in the Liver and Less Susceptible to Alemtuzumab Treatment (肝臓内には CD52 陰性 NK 細胞が多数存在し、Alemtuzumab 治療に抵抗性である)			
最終試験担当者			
主査	教授 菅野 雅元		
審査委員	教授 一戸 辰夫		
審査委員	准教授 仲 一仁		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年5月8日の第69回広島大学研究科発表会（医学）および平成29年4月26日本委員会において最終試験を行い、主として次の諮問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 アレムツズマブの作用機序</li> <li>2 CD52分子の免疫学的機能</li> <li>3 CD52陰性NK細胞の解剖学的局在とライフスパン</li> <li>4 CD52陰性NK細胞の機能的特徴</li> <li>5 NK細胞の分化段階におけるCD52表出パターン</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			