


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	安部 智之
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Signal regulatory protein alpha blockade potentiates tumoricidal effects of macrophages on gastroenterological neoplastic cells in syngeneic immunocompetent mice (癌細胞免疫回避機構の解明とその制御法の開発 CD47-SIRP α シグナルを介したマクロファージの役割)			
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	大上	直秀
			
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>ヒト型の CD47 分子をブタ細胞に遺伝子導入することで、ヒトマクロファージに抑制性シグナル(do not eat me signal)が CD47-SIRPα 経路を介して伝達されることで宿主マクロファージからの食食を回避されることを証明した。白血病や悪性腫瘍において CD47 分子を強発現することで、免疫回避機構を構築している報告は散見される。しかしながら、それらの報告は全て免疫不全マウスや異種移植モデルを用いたものであり、正常免疫を有する同種同系マウスモデルでの報告はされていない。今回、同種同系マウスモデルにおいて CD47-SIRPα を介したマクロファージの抗腫瘍効果に与える影響について研究を行った。</p> <p>C57BL/6J(B6)マウス腹腔内マクロファージを採取し、同種同系マウス肝癌細胞株(Hepa1-6)と大腸癌細胞株(CMT93)を用いて in vitro と in vivo マクロファージ食食試験を行った。CD47-SIRPα 経路を遮断するのに CD47shRNA を用いて、Hepa1-6 と CMT93 に表出する CD47 発現をノックダウンした細胞株を作成した。CD47 発現に関しては、mRNA やフローサイトメトリー、蛍光免疫染色法を用いて確認した。抗 CD47 モノクローナル抗体(anti-CD47mAb)と抗 SIRPα モノクローナル抗体(anti-SIRPα mAb)を用いて CD47-SIRPα 経路を遮断することで、マクロファージ食食活性に与える影響について検討した。マクロファージ遊走能に与える影響については、anti-CD47mAb と anti-SIRPα mAb を共培養することで検討した。また、大腸がん自然発生マウスモデル(CPC-APC マウス)を用いて、anti-SIRPα mAb 投与による腫瘍縮小効果と予後改善効果について検討した。生体肝移植ドナー肝から抽出したマクロファージを用いて、ヒト肝癌細胞株(Huh-7)への anti-CD47 mAb と anti-SIRPα mAb による食食試験を行った。</p> <p>Hepa1-6 と CMT93 の CD47 をノックダウンした細胞株 CD47KD#1 と CD47KD#2 を作成した。フローサイトメトリーと mRNA を用いて、CD47 発現が scramble と比較して有意に減少しているのを確認した。また、蛍光免疫染色法においても CD47 発現が CD47KD#1 と CD47KD#2 で低下しているのを確認した。SIRPα は、Hepa1-6 や CMT93 には発現がなくマクロファージに強く発現していることを確認した。腹腔内マクロファージとの食食試験において、CD47KD#1 と CD47KD#2 いずれも scramble と比較して著明な食食促進効果を認めた。次に、anti-CD47 mAb と anti-SIRPα mAb を用いてマウスマクロファージの食食活性効果について検証した。In vitro と in vivo のいずれにおいても、anti-SIRPα mAb 投与による Hepa1-6 と CMT93 へのマクロファージ食食活性効果を認めた。In vivo 食食試験において、anti-CD47 mAb 全身投与によるマウス食食活性効果は得られなかったが、anti-SIRPα mAb 投与による著明な食食活性効果が得られた。CMT93 と Hepa1-6 をマウス投与前に anti-CD47 mAb を co-culture することで、anti-SIRPα mAb</p>			


との食食上乗せ効果が得られた。マクロファージ遊走能試験では、anti-CD47 mAb によるマクロファージ遊走能が anti-SIRPa mAb 投与と比較して抑制されることが分かった。大腸がん肝転移マウスモデルでは、anti-CD47 mAb 投与群を対照とした際、anti-SIRPa mAb 投与群における明らかな予後延長効果が示された。大腸がん自然発生マウスモデル (CPC-APC マウス) の anti-SIRPa mAb 投与における腫瘍抑制効果においては、マウス大腸内視鏡検査によって経時的に確認した。Anti-SIRPa mAb 投与 12 週から大腸癌発生と増殖抑制効果が示された。Isotype control Ab 投与群と比較して、anti-SIRPa mAb 投与によって有意な予後延長効果が得られた。腫瘍内マクロファージは anti-SIRPa mAb 投与によって明らかに増加していた。ヒト由来肝マクロファージの食食効果が、anti-CD47 mAb 投与群よりも anti-SIRPa mAb 投与群で明らかに促進されていた。

癌細胞が CD47 分子を細胞表面に強く表出することで、宿主免疫からの回避機構を構築していることが証明された。現在までに、血液疾患や泌尿器系癌モデルを用いられた研究や、免疫不全マウスモデルでの異種移植モデルにおいて CD47-SIRPa 経路を遮断することでマクロファージ食食促進効果が示されてきた。同種同系マウスの正常免疫が保たれた新たなモデルにおいて消化器癌に対する CD47-SIRPa 経路遮断によるマクロファージ抗腫瘍活性効果を証明した。CD47 分子は癌細胞だけでなく正常細胞にも表出しているため、anti-CD47 mAb の全身投与によってマクロファージ遊走能が低下することで食食促進効果が得られていないことを示した。以上のことから CD47 分子を標的とした抗体療法よりも、SIRPa が宿主免疫細胞にのみ表出される特徴を生かした anti-SIRPa mAb 治療が優れている可能性が示唆された。実際に大腸がん自然発生マウスモデルにおいて、anti-SIRPa mAb 投与によって腫瘍発生のみならず予後改善効果が確認できた。

以上の結果から、本論文は anti-SIRPa mAb 投与が anti-CD47 mAb 投与よりも宿主遊走能へ与える影響も少なく、腫瘍発生抑制効果や予後延長効果が得られることを証明した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が安部智之に博士（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	安部 智之
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Signal regulatory protein alpha blockade potentiates tumoricidal effects of macrophages on gastroenterological neoplastic cells in syngeneic immunocompetent mice (癌細胞免疫回避機構の解明とその制御法の開発 CD47-SIRP α シグナルを介したマクロファージの役割)			
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	大上	直秀
			
〔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30年11月1日の第76回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年11月5日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 マクロファージの貪食機構におけるFcレセプターの関与 2 SIRPαを表出するマクロファージ以外の免疫担当細胞 3 マクロファージの癌抗原認識機構 4 SIRPαを標的分子とする場合に懸念される有害事象 5 SIRPα抗体と他の分子標的薬との併用効果 <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>			