

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	田中 泰生
論文題目	IFN- γ 応答を一細胞レベルで定量するバイオセンサーの開発		
(論文内容の要旨)			
<p>免疫細胞が分泌する IFN (Interferon)-γ は腫瘍免疫における重要なエフェクター分子のひとつであり、がん細胞に作用して多角的な効果を発揮する。しかし腫瘍微小環境における IFN-γ の時空間的な広がりに関する情報は未だ明らかになっておらず、IFN-γ 応答を一細胞の分解能で可視化するツールも成熟していない。</p> <p>本研究ではがん細胞における IFN-γ 応答を可視化する新規ツール開発を目指した。STAT1 が IFN-γ に応答してリン酸化し、ホモ二量体を形成して核内へ移行することに着目し、STAT1 の cDNA に蛍光タンパク質を付加した融合タンパク質を細胞に導入した。その結果、導入した STAT1 バイオセンサーが IFN-γ に応答して核内へ移る様子が観察され、定量的評価が可能となった。</p> <p>また、IFN-γ に応答して核内へ移行した STAT1 が下流因子の転写を開始することに着目し、IFN-γ 応答プロモーター活性を生物発光及び蛍光で検出する IFN-γ センシングプローブ (ISP) を作製した。ISP は IFN-γ 応答プロモーターと PGK 安定発現プロモーターを双方向に組み合わせた構造をとる。IFN-γ シグナルに応答して赤色蛍光タンパク質 mCherry と生物発光酵素 Akaluc を発現し、IFN-γ 応答プロモーター活性を生物発光及び蛍光で検出することができる。加えて、PGK プロモーター下でシアン色蛍光タンパク質 Turquoise-GL を安定的に発現し、ゲノム内挿入サイトの影響を補正することが可能である。5 種類の IFN-γ 応答プロモーターを比較した結果、GAS (Gamma-interferon activation site) 及び ISRE (interferon-stimulated response element) が IFN-γ に応答したプロモーター活性を示すことがわかった。これらを組み込んだ ISP を 4 種類の細胞に導入して IFN-γ 刺激を <i>in vitro</i> で与えたところ、すべての細胞種で ISP の活性上昇が見られ、かつその上昇度合いには IFN-γ に対する容量依存性が見られた。また、これら 4 種類の細胞を IFN-γ で刺激した際、IFN-γ に対する感受性及び ISP の活性度合いが細胞種により異なることがわかった。</p> <p>作製した STAT1 バイオセンサー及び ISP-GAS 発現がん細胞の皮下への同種移植モデルを利用することにより、生体マウスにおける移植がんの IFN-γ 応答可視化を試みた。STAT1 バイオセンサーを発現する Braf^{V600E} 細胞を皮下担がんしたところ、担がん後 5 日の時点で STAT1 バイオセンサーが核内に集積している様子が観察された。ISP-GAS を発現する B16F10 細胞を皮下担がんしたところ皮下担がん後 7 日の時点で IFN-γ 依存的な ISP-GAS 活性上昇を発光イメージングにより認めた。またこのとき、二光子顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによる蛍光検出によりがんの IFN-γ 応答を一細胞レベルで検出することに成功した。</p> <p>以上のことから、STAT1 バイオセンサーは IFN-γ 初期応答を、ISP-GAS は IFN-γ 二次的応答を可視化するバイオセンサーであることが示され、特に双方向性プロモーターを導入した ISP-GAS は、バイオセンサーのゲノム内挿入サイトの影響を克服しうる新規ツールとして有用であることが示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

IFN- γ は腫瘍免疫による排除過程において、中核を担う分子の一つである。どの免疫細胞が主な IFN- γ 分泌細胞であるかについては、遺伝学的な手法により解析可能である。しかしながら、その分泌動態と効果範囲については、不明な点が多い。本論文著者は、生体マウスにおける癌細胞と免疫細胞の相互作用を、IFN- γ とその受容体を用いて可視化することを試みた。最終目標は、*in vivo* において、1細胞レベルの解像度で IFN- γ の濃度を計測することである。

本論文著者は、上記の問題を鑑み、2種の方法を準備した。

1つは STAT1 の核内移行の検出である。内在性 STAT1 は、IFN- γ -Jak (Janus kinase) によってリン酸化されると核内移行し、転写能をもつ。STAT1 の上記特性を用いることにより、蛍光タンパク標識した外因性 STAT1 は、IFN- γ 刺激後 30 分以内での核内移行を検出できている。*In vivo* においても、核内移行を検出できている。このように、蛍光タンパク標識した外因性 STAT1 は速い動態を観察するのに有用であるが、A) *vivo* においては長期間観察する系を準備出来ていない、B) 外因性 STAT1 の発現量が高い細胞ほど核内/核外移行の S/N 比が低下するという二点の欠点を抱えている。

2つめは IFN- γ 依存的な転写活性を蛍光/発光タンパクの発現に置換する手法である。発光量の追跡により週単位の経時的な変化を追跡できるのが利点であり、1細胞レベルの解像度は蛍光タンパク発現量にて検出できる。反面、ある程度の発現量を要するため、IFN- γ 刺激後数時間のタイムラグが発生する。また、転写活性を検出するためのエレメント配列に対して特異度の検討が必要である。

本論文著者は上記の二つを比較しながら、*in vitro* と *in vivo* の系を用いて問題点を洗い出し、IFN- γ 可視化の系を構築している。また、特異度の検討や、癌細胞内のカルシウムの一過性上昇が、癌細胞の IFN- γ 暴露量を下げるという新たな知見も示しており、今後の有用性が期待できる。

本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されており、生体マウス内の IFN- γ 分泌動態の観察につながったものといえる。また、その内容は申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力を十分に示すものである。以上より、本論文を博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、令和 4 年 2 月 8 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日