

京都大学	博士（医学）	氏名	大部 聡
論文題目	CD146 is a potential immunotarget for neuroblastoma (CD146は神経芽腫に対する治療標的となりうる)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>【背景】神経芽腫は最も多い頭蓋外小児悪性固形腫瘍であり、神経提由来未熟細胞から発生すると考えられている。臨床病理学的及び分子生物学的予後因子に基づいた層別化治療により、低リスクと中間リスク症例の予後は改善したが、高リスク症例や再発・治療不応症例などの難治例の予後は極めて不良である。神経芽腫に対する免疫療法として抗GD2抗体療法が開発されたが、肉眼的病変を認める症例に対する治療効果は不十分であり、新規治療開発が必要である。CD146は転移性メラノーマの研究で発見された細胞接着分子で、神経堤などの様々な胎児組織で発現しているが、成体組織での発現は限られている。シグナル伝達、免疫応答、発達などの生理的プロセスに関与するほか、様々な悪性腫瘍で発現しており、治療標的候補として期待されている。</p> <p>【目的・方法】神経芽腫の治療標的としてのCD146の有用性を検討するため、免疫染色やフローサイトメトリー（FCM）を用いて神経芽腫細胞株と臨床検体におけるCD146発現レベルを解析した。次に、CD146を標的とした治療の<i>in vitro</i>抗腫瘍効果を評価するため、ドキシサイクリン（DOX）依存的にCD146発現を抑制するshRNAの導入または抗CD146ポリクローナル抗体による腫瘍増殖能及びスフェア形成能を解析した。また、CD146発現を抑制した後にFCMで早期アポトーシス細胞の割合を評価した。さらに、CD146に関連したシグナル伝達経路を同定するため、ウェスタンブロット法にてCD146の下流標的のリン酸化を解析した。最後に、CD146を標的とした治療の<i>in vivo</i>抗腫瘍効果を評価するため、細胞株や臨床検体を移植した免疫不全マウスにDOX投与によるCD146発現抑制及び抗CD146抗体投与を実施し、腫瘍容積、腫瘍重量、アポトーシス細胞の割合をコントロール群と比較した。</p> <p>【結果】FCMでは細胞株4株全てでCD146が90%以上発現しており、臨床検体41例中20例（49%）でCD146が高発現（Hスコア200点以上）していた。公開データを用いた発現解析では予後不良な染色体11q欠失を有する症例ではCD146発現が低下していた。<i>In vitro</i>におけるCD146の発現抑制により、神経芽腫細胞の腫瘍増殖能とスフェア形成能が抑制された。また、早期アポトーシス細胞の割合が増加し、リン酸化FAK及びNFκBタンパクの減少を認めた。<i>In vivo</i>腫瘍形成モデルでは、CD146の発現抑制により腫瘍容積及び重量は有意に減少し、アポトーシス亢進を認めた。細胞株に対する抗CD146抗体投与により<i>in vitro</i>腫瘍増殖能及びスフェア形成能の有意な低下、<i>in vivo</i>で腫瘍形成能の有意な低下を確認した。さらに、臨床検体に対する抗CD146抗体投与では、細胞株と同様に優れた<i>in vivo</i>抗腫瘍効果を示した。</p> <p>【結論】本研究ではCD146を標的とした治療がFAK/NFκBを介したアポトーシス亢進により神経芽腫の腫瘍増殖抑制効果を発揮することを示した。CD146は様々な予後因子を有する大半の神経芽腫で高発現していたが、様々な分子生物学的特徴を有する多数の臨床検体を用いた<i>in vivo</i>実験により本治療が有効なサブグループの同定が必要と考えられた。抗GD2抗体治療が治療効果を発揮するにはNK細胞を介した抗体依存性細胞障害が作用できる抗腫瘍免疫環境が必須である。一方、抗CD146抗体は機能的なNK細胞が欠損した免疫不全マウス内で効果を示しており、腫瘍細胞に直接作用して抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。以上よりCD146は神経芽腫に対する有望な新規治療標的であることが明らかとなった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

神経芽腫の高リスク症例や難治例の予後は、抗GD2抗体治療の開発により従来の治療と比べ改善したが、抗GD2抗体治療では治療効果が不十分である。CD146は転移性メラノーマで発見された細胞接着分子で様々な悪性腫瘍で発現しており、治療標的の候補として期待されている。

本研究では、神経芽腫に対する分子標的治療における新たな治療標的としてのCD146の有用性を検討することを目的に、神経芽腫の臨床検体と細胞株を対象として、神経芽腫におけるCD146の発現と、CD146を抑制することによる*in vitro*と*in vivo*での抗腫瘍効果を解析した。その結果、フローサイトメトリーと免疫染色を用いて、神経芽腫でCD146が発現していることを示し、shRNAの導入と抗CD146抗体によりCD146を抑制することで、*in vitro*と*in vivo*のいずれも抗腫瘍効果を認め、CD146は神経芽腫に対する有望な治療標的となりうることを示した。また、抗CD146抗体は機能的なNK細胞が欠損したマウス内で効果を示しており、NK細胞を介した抗体依存性細胞障害が作用できる抗腫瘍免疫環境を必須とする抗GD2抗体治療と異なり、抗CD146抗体は腫瘍細胞に直接作用して抗腫瘍効果を発揮する可能性があることを報告した。

以上の研究は、治療に難渋する神経芽腫に対する新規治療標的の可能性を示し、今後の新規治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年2月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。