

## 論文審査の要旨

報告番号	甲 第 2980 号	氏 名	馬目瑤子
論文審査担当者	主査 教授 嶋根俊和	副査 教授 美島健二	副査 教授 桑田啓貴
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「<b>TLR7 agonist R848 inhibits malignant melanoma cell invasion of bone in manner dependent on inflammatory cytokines produced from bone marrow macrophages</b>」 (TLR7 リガンドの R848 は悪性黒色腫細胞の骨浸潤を抑制する) について上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p><b>【目的】</b> 悪性腫瘍の予後は遠隔転移により著しく悪化する。一方、生体防御機構である Toll like receptor (TLR) は、病原体由来の分子を認識することで、免疫システムを活性化する。本研究ではマウス癌骨転移モデルを用いて TLR7 のリガンドである R848 の骨浸潤に対する効果を検討した。</p> <p><b>【方法】</b> 高骨転移性悪性黒色腫細胞 B16F10 をマウスの左心室に注射し、3 日毎に R848 (500 µg) を腹腔内に投与し、14 日後に下肢を採取したのち骨端の癌浸潤組織切片を作製し、B16F10 細胞の浸潤面積を計測した。マウスの大腿骨・脛骨から採取した骨髄細胞を M-CSF で刺激して誘導した骨髄マクロファージ (BMMs) で、B16F10 細胞の増殖に対する効果を検討した。</p> <p><b>【結果】</b> R848 投与群はコントロールと比較し、B16F10 細胞の浸潤巣が有意に縮小し、骨浸潤面積も有意な低下が認められたため、R848 が B16F10 細胞の骨浸潤を強力に抑制することが示唆された。R848 を腹腔内投与したマウスの血清中のサイトカイン濃度を測定したところ、IL-6、IL-12、IFN-γ が有意に上昇していた。R848 を添加した BMMs 培養系でもこれらのサイトカインの上昇が確認された。R848 を添加し培養した BMMs の上清を B16F10 の培養に加えたところ、増殖が有意に抑制された。この B16F10 の培養に IL-6、IL-12、IFN-γ の中和抗体を加えることで、それぞれの抗体で増殖抑制作用は解除された。</p> <p><b>【考察】</b> 以上の結果より、R848 は BMMs に作用し IL-6、IL-12、IFN-γ の産生を誘導し、これらのサイトカインが B16F10 の骨髄内での増殖を低下させることで、骨浸潤が抑制されることが示唆された。</p>			

(主査が記載)

本論文の審査において副査の美島委員および桑田委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。

#### 美島委員の質問とそれらに対する回答

① R848がTLRを介してマクロファージのサイトカイン産生能を上昇するメカニズムは何が考えられるか。

R848を添加すると、JNK、AKT、I-kBのリン酸化が促進されていることがウエスタンブロットで確認されたため、JNK、AKT、NF-kBがサイトカイン産生に関わっていると考えられる。今後はこれらの経路に対する阻害剤を加えてマクロファージから産生されるサイトカインの発現に変動があるか研究を進める予定である。

② 癌の移植局所におけるマクロファージの集積像は認められるのか。

B16F10を移植しVehicleを投与したコントロール群では骨髄腔ががん細胞で満たされていたのに対し、R848投与群ではがん細胞の浸潤は抑えられ、周囲に骨髄細胞が認められた。

#### 桑田委員の質問とそれらに対する回答

① 異なるサイトカインの中和抗体が同じ効果を示す理由。

培養上清の実験では、マクロファージから分泌されたIL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ の3つが重なることで細胞増殖を抑制する効果を発揮する濃度に達したと考えられる。

② 骨転移を評価する意義。

骨転移は痛みや病的骨折、脊髄圧迫による麻痺など患者のQOLに大きく関与する症状が見られるため、骨転移を評価し予防や転移機序の解明には意義があると考えられる。

③ 転移は骨以外にはどこに見られたか。

肝臓や精巣、腸管への転移が見られました。厳密には比較していませんが、R848投与群では減少傾向にありました。

両副査は、上記を含めた質問に対する回答がいずれも満足のいくものであることを確認した。

#### 主査嶋根委員の質問とそれらに対する回答

① 骨浸潤が抑制されるとあるが直接浸潤に関してはどうなのか。

皮下に悪性黒色腫を移植したマウスにR848と同じイミダゾキノリン系のR837を作用させたところ、生存曲線がコントロールと比較して延長したとの報告があるため、直接浸潤に対しても効果を示すと考えられる。

② TLR7以外のものでは同様の結果が得られる可能性はないのか。

大腸がんはTLR3、胃がんはTLR2、肝がん、子宮頸がん、頭頸部がんにはTLR4が関係するとの報告があるが骨転移への効果を報告した論文はない。

主査の嶋根委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。

（主査が記載）