







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第683号	氏名	Astri Dewayani
審査委員会委員	主査氏名	石崎 叔理	
	副査氏名	柴田 詩孝	
	副査氏名	沖本 忠義	
論文題目			
<p>TRAF6 Signaling Pathway in T Cells Regulates Anti-Tumor Immunity Through the Activation of Tumor Specific Th9 Cells and CTLs (T細胞における TRAF6 シグナルは腫瘍抗原特異的な Th9 細胞および CTLs の活性化を介して抗腫瘍免疫を制御する)</p>			
論文掲載雑誌名			
Biochemical and Biophysical Research Communications			
論文要旨			
<p>CD8 +細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) および CD4+ヘルパー T (Th) 細胞は、腫瘍細胞に対する防御免疫応答において重要な役割を担っている。特に、IL-9 を産生する Th9 細胞は抗腫瘍活性を発揮することが報告されたことにより、近年、注目を浴びている研究領域となった。</p> <p>TNF 受容体 family や IL-1R/TLR family の下流で機能するアダプタータンパク質 TRAF6 は、骨代謝、免疫・炎症反応、胸腺構築、リンパ節や汗腺などの器官形成等、多岐にわたる生理機能を担っており、申請者らのグループでも、T 細胞特異的 TRAF6 欠損 (TRAF6ΔT) マウスを用いた解析により、全身性炎症性疾患を発症することを報告している。このように TRAF6 の生理的機能に関する報告されている一方で、T 細胞における TRAF6 の抗腫瘍免疫応答への機能については依然として不明な点が多い。</p> <p>本研究で申請者は、TRAF6 欠損 (TRAF6ΔT) マウスにおいて、同種移植された結腸癌細胞 CMT93 の腫瘍細胞増殖が、対照マウスと比較して、亢進されていることを見出した。また、OT-II マウスと交配した TRAF6 欠損 (TRAF6ΔT) マウスから採取した T 細胞では、特定抗原 (OVA) に応答するが、野生型マウスの T 細胞に比べ IL-9 産生量の減少を認めた。さらに TRAF6ΔT マウスの CD4 +腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) においても、野生型マウスの TIL よりも IL-9 の発現量が低下していた。これらの結果から、TRAF6 欠損マウスにおける腫瘍細胞増殖亢進は、IL-9 産生に依存するのではとの仮定の下、組換え IL-9 (rIL-9) 投与実験を実施した。その結果、TRAF6ΔT マウスにおいても rIL-9 投与すると腫瘍細胞増殖が著しく抑制されることが判明した。</p> <p>次に申請者は、CD8 +細胞傷害性 T リンパ球での TRAF6 の機能に着目した。TRAF6 欠損 CD8+T 細胞において、T ボックス転写因子 Eomesodermin、IFN-γ、グランザイム B の発現、細胞傷害性活性が低下していた。以上のことから、TRAF6 は T 細胞において抗腫瘍効果の発揮に寄与することが明らかになった。</p> <p>この TRAF6 による抗腫瘍効果の分子機序として、申請者らは TRAF6 欠損 T 細胞において、免疫チェックポイント分子 (CTLA-4、PD-1) の発現が有意に上昇していることを見出した。</p> <p>本研究は、T 細胞の TRAF6 シグナル伝達経路が、腫瘍微小環境における腫瘍特異的 Th9 細胞および CTL の活性化を通じて抗腫瘍免疫を調節することを示したものであり、今後の腫瘍免疫領域に加え、薬物創出への新たな知見を見出した研究である。</p> <p>このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第 683 号	氏名	Astri Dewayani
審査委員会委員	主査氏名	石井 友理 	
	副査氏名	柴田 詩彦 	
	副査氏名	沖本 忠義 	



学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

1. TRAF6 の組織分布や生理的役割は何か。
2. Th9 細胞は naive T 細胞から分化する新しいサブセットであるが、Th2 細胞から TGFβ 存在下で分化した亜型とも考えられるが、Th2 細胞の関与について検討しているか。
3. 今回使った TRAF6 deficient mice は systemic inflammatory disease が発症しているのか。
4. TRAF6 deficient mice の寿命は野生型と同等か。
5. TRAF6 deficient mice に癌の自然発生は認めないか。
6. in vivo 実験において、なぜ大腸癌細胞株 CMT93 細胞を移植したのか？その他の腫瘍細胞でも同様の結果が得られるか？
7. 細胞を培養する際、メルカプトエタノールを使用している理由は。
8. T 細胞特異的 TRAF6 欠失マウス (TRAF6ΔT) では Th9 細胞への分化が増加しているが、3%程度の少数にもかかわらず、抗腫瘍作用に係わっていると結論できるか。他論文と比較して評価したか。
9. TGFβ の代わりにサイトカインはないのか。
10. TRAF6ΔT では、Th9 細胞への分化自体が阻害されるのか、あるいは Th9 細胞への分化は通常通り起きるが IL-9 産生だけが抑制されると考えられるのか。
11. CMT93 細胞移植動物において、移植腫瘍組織の組織学的検討はどうか。また、Th9 細胞の集積は野生型マウスと TRAF6ΔT マウスでは異なっているのか。
12. 腫瘍発育の評価を腫瘍の最長径で評価しているが、サイズのばらつきが大きい。用量・重量での評価の方が正確に評価できるのではないか。
13. CD4 特異的に TRAF6ΔT マウスを作成しているが、CD8 陽性 T 細胞も影響を受けたのはなぜか。
14. TRAF6ΔT マウスでは、in vitro の結果とは異なり、IL-9 産生が低下しており、この乖離の理由として免疫チェックポイント分子 PD-1, CTLA-4 の発現亢進がどのように IL-9 産生を抑制したのか。
15. 免疫チェックポイント阻害薬の前投与により、TRAF6ΔT マウスの Th9 細胞誘導は改善できるか。
16. なぜ免疫チェックポイント関連分子の発現に注目したのか。
17. 本研究の結果に基づいて、将来的に TRAF6 を標的とした新しい癌治療の提案が可能であるか。
18. TRAF6 欠損もしくは抗 TRAF6 抗体、TRAF6 に対する阻害薬物は、血球系細胞の癌では有用と考えるか。
19. TRAF6 欠損 T 細胞の Th9 分化が in vitro で促進されるが、TIL (腫瘍浸潤リンパ球) では IL-9 は低値となった。動物実験でも、rIL-9 の投与で腫瘍増殖が抑制されており、腫瘍内環境の IL-9 は低いと考察している。その仮説について説明せよ。

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Astri Dewayani

論 文 題 目

TRAF6 Signaling Pathway in T Cells Regulates Anti-Tumor Immunity Through the
Activation of Tumor Specific Th9 Cells and CTLs

(T細胞における TRAF6 シグナルは腫瘍抗原特異的な Th9 細胞および CTLs の活性化を介して抗
腫瘍免疫を制御する)

要 旨

Background:

T cells play a critical role against tumors through cytotoxic CD8⁺ T cells (CTLs) and CD4⁺ helper
T (Th) cells. Particularly, Th9 cells exert anti-tumor activity by producing IL-9. Tumor necrosis
factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) is an adaptor protein mediating signals from
TNFR superfamily and Toll-like receptors (TLRs) which essential in the inflammatory immune
response. However, TRAF6 function in tumor immunity remains largely unclear. Therefore, we
investigated TRAF6 roles in T cells-mediated tumor immune response using T cell-specific
TRAF6 deficient mice (TRAF6 Δ T).

Method:

1) Naive T cells of wild-type (WT) and TRAF6 Δ T mice were cultured under Th9 conditions *in
vitro*. Th9 cell populations were quantified by flowcytometry and IL-9 in the culture supernatant
was measured by ELISA.

- 2) TRAF6 Δ T mice were inoculated with syngeneic murine colon cancer (CMT93 cells) and tumor growth was compared with WT mice.
- 3) We generated OVA-specific TCR transgenic mice on a T cell-specific TRAF6 deficient background (OT-II Tg/TRAF6 Δ T) to examine Th9 cells' ability to respond to tumor antigens. Splenocytes from OT-II Tg/TRAF6 Δ T mice were stimulated with OVA peptide, and IL-9 in the culture supernatant were measured by ELISA.
- 4) Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were collected from tumor sites of TRAF6 Δ T mice. IL-9 and on T cells were quantified by flowcytometry.
- 5) To confirm whether IL-9 could rescue the anti-tumor activity, we administered recombinant IL-9 to TRAF6 Δ T and control tumor-bearing mice, and tumor growth was compared between the groups.
- 6) CD8⁺ T cells of OT- I Tg/TRAF6 Δ T mice were stimulated with OVA peptide *in vitro* and IFN- γ in culture supernatant was measured by ELISA. Eomes, IFN- γ , perforin, and granzyme B expression levels also analyzed using quantitative PCR analysis. TILs were collected from tumor sites of transgenic mice and IFN- γ level were quantified by flowcytometry.
- 7) To confirm the killing ability of T cells, a cytotoxic assay was performed by co culturing OVA-luciferase CMT93 with purified CD8⁺ T cells of either OT-I Tg/ WT or TRAF6 Δ T mice.
- 8) The splenocytes of transgenic mice were stimulated with OVA peptide. The expression levels of PD-1 as well as CTLA-4 on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were measured by flowcytometry.

Result:

- 1) Th9 differentiation of TRAF6 deficient T cells was enhanced compared with that of WT T cells. The concentration of IL-9 in the culture supernatant of TRAF6-deficient T cells were significantly higher than those in WT T cells.
- 2) Tumor formation in TRAF6 Δ T mice was accelerated compared to WT mice.
- 3) Splenocytes from OT-II Tg/TRAF6 Δ T mice produced significantly lower amounts of IL-9 in response to OVA peptides compared to those of splenocytes from OT-II Tg mice.

- 4) IL-9 levels on T cells were significantly lower in TILs of TRAF6 Δ T mice than that of WT mice.
- 5) Administration of recombinant IL-9 significantly suppressed the tumor progression in TRAF6 Δ T mice.
- 6) When stimulated with OVA peptide, IFN- γ levels were lowered in OT-I Tg/TRAF6 Δ T mice than in OT-I Tg control mice. Eomes, IFN- γ , perforin, and granzyme B expression levels were also downregulated in TRAF6 deficient OT-I T cells.
- 7) In addition, IFN- γ expression on T cells in TILs of OT-I Tg/TRAF6 Δ T mice was reduced than in control mice.
- 8) The cytotoxic activity of CD8⁺ T cells in OT-I Tg/TRAF6 Δ T mice was significantly attenuated compared to that of OT-I Tg/WT mice.
- 9) The expression levels of CTLA-4 and PD-1 were elevated in TRAF6-deficient CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Conclusion:

TRAF6 signaling pathway in T cells regulates anti-tumor immunity by the activation of tumor specific Th9 cells and CTLs in the tumor microenvironment. Taken together, fine-tuning of optimal TRAF6 signaling in tumor antigen-specific T cells may enhance the anti-tumor immunity.