

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論文提出者	松並 晃弘
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 村松 泰徳 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典
論文題目 低血清および低酸素下で分泌の増加したマウス口腔扁平上皮がん細胞由来 IL-1 $\alpha$ による間葉系細胞の免疫抑制作用の増強	
<p><u>論文審査の要旨</u></p> <p>口腔扁平上皮がん (OSCC) は、頭頸部に発症する最も一般的な悪性腫瘍であり、再発、頸部リンパ節および局所転移により予後不良なことが知られている。OSCC の進行や悪性度は、がん細胞を取り巻く腫瘍微小環境 (TME) の構成要素により制御されており、頭頸部がんではがん関連線維芽細胞 (CAF) の放出するサイトカインが血管新生、がん浸潤および制御性 T 細胞 (Treg) の誘導などを促進することが示されている。すでに、Kondoh らは、高悪性形質の OSCC 細胞 (L 細胞) を移植した同系の C3H マウスにおいて、脾細胞からの IFN-<math>\gamma</math> および IL-10 産生能が、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の誘導に伴い顕著に抑制される一方で、低悪性形質の OSCC 細胞 (Sq-1979-1) 移植マウスでは MDSC 誘導なしに IFN-<math>\gamma</math> 産生能のみが抑制されていること、さらに <i>in vitro</i> の実験系では、Sq-1979-1 細胞から放出される IL-1<math>\alpha</math> によって、間葉系細胞 (10T1/2) の免疫抑制能が特異的に増強されることを示した。また、高悪性形質の OSCC 細胞株との比較検討により、Sq-1979-1 細胞移植したマウスでは、TME の血管新生等が不十分なため局所的な飢餓を引き起こし、成長因子、栄養素、酸素供給の欠乏をきたしていることが推測された。</p> <p>そこで、本研究では、Sq-1979-1 細胞の IL-1<math>\alpha</math> 発現を低血清および低酸素条件下で比較検討し、TME における免疫抑制活性に対する影響を評価した。</p> <p>C3H/HeN マウス口腔扁平上皮がん細胞 Sq-1979-1 および同マウス胎児線維芽細胞 10T1/2 を用いた。Sq-1979-1 細胞を様々な濃度の牛胎児血清 (FBS) 存在下、または正常酸素分圧下 (酸素濃度 20%) およびテドラーバッグを用いた低酸素分圧環境 (酸素濃度 1%) で 36 時間培養し、上清を馴化培地 (CM) とした。また、IL-1<math>\alpha</math> mRNA を定量的 PCR 法で、タンパク質発現を Western blot 法および enzyme linked immune solvent assay (ELISA) 法で検討した。24 週齢雄 C3H/HeN マウスより脾細胞を採取し、抗 CD3<math>\epsilon</math> 抗体で刺激したものを 10T1/2 細胞および、上記の様々な CM または抗 IL-1<math>\alpha</math> 抗体で吸収処理を施した CM と共に混合培養した。培養上清中の IFN-<math>\gamma</math> を ELISA 法にて測定し、免疫抑制活性を評価した。Sq-1979-1 細胞移植マウスの OSCC 組織の IL-1<math>\alpha</math> 発現を免疫組織化学染色で検討した。</p> <p>その結果、Sq-1979-1 細胞の IL-1<math>\alpha</math> mRNA 発現は、10% FBS を含む標準増殖培地と比較して、1.0% FBS 以下低血清培地において顕著に上昇した。IL-1<math>\alpha</math> タンパク質発現も、10% FBS を含む標準増殖培地に比較して、1.0% FBS の低血清培地において顕著に上昇した。低血清条件では、IL-1<math>\alpha</math> タンパク質の CM への放出量も増加した。</p>	

低酸素分圧下（1.0% 酸素）で培養した Sq-1979-1 細胞の IL-1 $\alpha$  mRNA およびタンパク質発現は、正常酸素分圧下（20%）で培養したものに比べ、変化しなかったが、低酸素分圧下における CM への IL-1 $\alpha$  タンパク質の放出は、正常酸素分圧下に比べ顕著に上昇した。

低血清（1% FBS）および、低酸素（1.0% 酸素）条件下で作製したそれぞれの CM を添加し、10T1/2 細胞を刺激脾細胞と混合培養すると、標準増殖条件下の CM を用いたものに比べ、10T1/2 細胞存在下の免疫抑制能が有意に促進された。この促進効果は、CM を抗 IL-1 $\alpha$  中和抗体で処理することにより消失した。

そのことから、低血清状態では、Sq-1979-1 細胞における IL-1 $\alpha$  の発現が少なくとも転写レベルで上昇し、タンパク質産物およびその放出量も上昇することが考えられた。一方、低酸素条件下では、Sq-1979-1 細胞における IL-1 $\alpha$  発現は転写およびタンパク質産生レベルで全く上昇しないにもかかわらず、分泌は有意に上昇したことから、低酸素条件では IL-1 $\alpha$  のプロセッシング過程の変化で分泌促進することが推測され、低血清または低酸素条件下で調製した CM は、10T1/2 細胞存在下で免疫抑制作用を促進し、この作用は分泌量の増加した IL-1 $\alpha$  に依存して引き起こされることが判明した。

さらに Sq-1979-1 移植マウスの腫瘍組織における免疫組織染色では、IL-1 $\alpha$  タンパク質の発現は、がん細胞塊中心部や、壊死部周辺領域で顕著に高く、特に顕著な発現領域では核への濃染が観察された。このことから、低酸素および供給不良領域と思われる高細胞密度および壊死領域近傍での IL-1 $\alpha$  発現が高く、またそうした領域では IL-1 $\alpha$  の核への濃染が観察され、その領域近傍では間葉系細胞を介した免疫抑制作用が亢進していることが推測された。

Sq-1979-1 細胞の IL-1 $\alpha$  を介した、間葉系細胞の免疫抑制促進作用は、低血清および低酸素状態で特異的に増強され、その背景には IL-1 $\alpha$  の放出促進が関与していることが示された。本研究によって、OSCC 組織における IL-1 $\alpha$  発現様式が、がんによる免疫抑制作用の指標となりうることが示され、中和抗体等を用いた IL-1 $\alpha$  を標的とする免疫療法の有効性が示唆された。

よって審査委員は、OSCC 組織における IL-1 $\alpha$  発現様式に関する研究が、今後のがん免疫制御に関する研究に大いに貢献するものと高く評価し、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。