

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	東 康加
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 智原 栄一 (副 査) 朝日大学歯学部教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部教授 近藤 信夫
論文題目 マウス口腔扁平上皮癌細胞株 Sq1979, Sq233 および転移型クローン L5 による Th1 免疫反応の抑制	

【目的】

癌の臨床的な悪性化には癌細胞固有の形質のみならず、患者の免疫応答能や組織の微小環境などの患者の全身状態も影響している。口腔扁平上皮癌 (OSCC) 患者では、原発腫瘍径の増大に伴い末梢血液細胞の IFN- γ 産生量が抑制されるが、そのメカニズムについては十分に理解されていない。本研究では、OSCC が患者免疫系にどのような影響を与えるのかより詳細に検討する目的で、マウス OSCC 細胞株を用いた癌移植実験系を構築し、宿主免疫能の動態変化を検討した。

【方法】

- 1) OSCC 細胞株 L5 および Sq233 の樹立: C3H マウス由来頬粘膜扁平上皮癌細胞株 (Sq1979: 理化学研究所より提供) を C3H/HeN マウスの側腹皮下または後頭部皮下に移植し、原発巣および頸部リンパ節転移巣から、それぞれサブクローン Sq233 と L5 を樹立した。
- 2) OSCC 細胞株の形質の検討: 6 週齢 C3H/HeN 雄性マウスの側腹皮下に、 $10^5 \sim 10^7$ 個の OSCC 細胞株 Sq1979, Sq233 および L5 を移植した。移植後 1 週間毎に腫瘍の長径・短径を計測し、腫瘍の生着率および増大を観察した。腫瘍体積は測定した腫瘍径をもとに以下の式を用いて算出した (腫瘍体積 = 長径 \times 短径² \times 0.52)。OSCC が宿主免疫能に与える影響を検討するために、以下の実験を行った。
- 3) 血清サイトカイン濃度の測定: 癌細胞移植 1 か月後に開胸し、全血採血して血清分離後、インターフェロン(IFN)- γ , インターロイキン(IL)-6 および IL-10 濃度を酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) にて測定した。
- 4) 脾細胞のサイトカイン産生能の測定: 試験管内で抗 CD3 抗体を用いてマウス脾細胞に T リンパ球特異的抗体刺激を加え、48 時間 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 存在下で刺激培養した。上清中の IFN- γ , IL-10 および IL-4 濃度を ELISA 法にて測定した。
- 5) 脾リンパ球亜集団構成の比率: 癌移植 1 か月後に脾臓を摘出し、脾細胞を分離した後、CD4⁺(CD8⁻)および CD8⁺(CD4⁻)それぞれの亜集団における CD25⁺/⁻, CD49b⁺/⁻, CD122⁺/⁻細胞および CD49b⁺($\alpha\beta$ TCR⁻)細胞の動態を FACS 法にて測定した。

【結果】

- 1) Sq1979 とそのサブクローン Sq233 および L5 の形質：
 - ・クローン Sq233 は親細胞の Sq1979 とよく似た敷石状の形態を示した。
 - ・クローン L5 はやや小型で部分的に積層する形態を示した。
 - ・癌組織の H・E 染色像では Sq233 は Sq1979 と類似の胞巣状増殖を示し、一方、L5 は浸潤性の高い形状の増殖を示した。
 - ・*in vitro* における増殖速度は、クローン Sq233, L5 とともに Sq1979 と同程度であったが、移植後の生着率および癌組織の増殖速度は、クローン L5 が他の 2 細胞に比べ顕著に高く、より高い悪性形質を示した。
- 2) OSCC 移植マウスにおける血清中サイトカイン濃度の変化：
 - ・IL-10 および IFN- γ は、すべての群において検出限界以下であった。
 - ・IL-6 は、有意差を示さなかった。
- 3) 脾細胞のサイトカイン産生能の変化：
 - ・IFN- γ : Sq1979, Sq233, L5 移植群それぞれで、腫瘍の増大に伴い産生能の低下が認められた。
 - ・IL-10 : Sq1979 移植群では腫瘍の増大に伴い産生能が増加したが、L5 移植群では低下した。一方、Sq233 移植群では変化がみられなかった。
 - ・IL-4 : Sq1979 移植群では腫瘍の増大に伴い産生能は低下しなかったが、L5 移植群では低下した。一方、Sq233 移植群では、相関が認められなかった。
- 4) 脾 T リンパ球亜集団構成の変化：
 - ・Sq1979 移植群における Th, Treg, CD4⁺NKT, Tc, T-NK および NK 細胞の脾リンパ球中の構成比には、対照群との間で有意な差が認められなかった。

【考察】

- 1) OSCC 移植マウスでは、腫瘍の増大に伴って脾細胞の IFN- γ 産生能が低下することから、腫瘍の進展により宿主の Th1 型免疫応答能が抑制されることが示唆された。
- 2) OSCC 移植マウス脾細胞における Th2 サイトカインである IL-4 および IL-10 の産生能は、移植した OSCC クローンに依存して異なることから、少なくとも Th2 サイトカインを介した Th1 免疫系の拮抗的な抑制作用によって、IFN- γ 産生能の低下が引き起こされるのではないことが示唆された。
- 3) 今回の結果は既に報告されている OSCC 患者における観察結果を支持しており、OSCC による免疫制御機構を解析するための動物実験系が構築された。
- 4) この実験系を用いて、様々な条件における担癌個体の全身免疫能を検討し、患者の抗腫瘍免疫能を効果的に維持するための周術期管理法等を考案することが可能と考えられる。