

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	鷲見 成紀
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 住友 伸一郎 (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 高井 良招
論文題目 口腔扁平上皮癌細胞株 (Sq-1979) およびその転移リンパ節由来癌細胞株 (L5-11) 移植マウスにおける骨髓由来免疫抑制細胞の比較	
論文内容の要旨 【目 的】 がんによる免疫系制御機構の1つとして、骨髓由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC) の誘導が重要な役割を果たすことが報告されている。MDSC は、Polymorphonuclear (PMN) -MDSC と、Monocytic (M) -MDSC の2つの群に分類される。これらは担癌状態などで、腫瘍組織、脾臓などの造血器官、末梢血中やリンパ節において増加し、T細胞の機能を中心に免疫機能を抑制するが、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の高い腫瘍増殖能の獲得や転移に伴いそれらの制御がどのように変化するかは十分に知られていない。 本研究では、C3H マウス頬粘膜 OSCC 細胞株 Sq-1979 および Sq-1979 移植マウスの頸部転移リンパ節巣より樹立した L5-11 細胞を同系統マウスに移植し、腫瘍組織内および脾臓における MDSC の変化を観察した。	
【材料と方法】 1. 培養細胞： Sq-1979 (理研 BRC) および Sq-1979 移植マウスの頸部転移リンパ節より樹立した L5-11 を用いた。 2. <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 増殖速度： <i>in vitro</i> における増殖は、細胞を 1×10^3 個ずつ 96 穴プレートに播種し、測定キット (Roche Diagnostics) を用いて生細胞数を比較した。 <i>in vivo</i> における腫瘍増殖は、6 週齢♂ C3H/HeN 系統マウスの側腹皮下に 1×10^6 cells/body の腫瘍細胞を移植し、腫瘍体積を3日ごとに測定した。腫瘍体積は (長径×短径 ²) / 2 の計算式で算出した。 3. 腫瘍組織細胞および脾細胞の採取： 6 週齢♂ C3H/HeN 系統マウスの側腹皮下に OSCC 細胞株を移植し、21 日後に摘出した腫瘍組織および脾臓から所定の方法で細胞を単離した。	

4. Flow cytometry (FACS) 解析：腫瘍および脾臓から得た細胞を、PE 抗マウス CD11b 抗体、FITC 抗マウス Ly6G 抗体、APC 抗マウス Ly6C 抗体で染色の後、EC800 Flow cytometry Analyzer[®]および EC800 analysis software[®] (Sony Biotechnology Inc.) にて解析した。また、マウス T 細胞サブセットを観察するために、FITC 標識抗 CD8a 抗体、PE 標識抗 CD4 抗体にて染色し同様に観察した。統計は、Turkey-Kramer test および Student's *t*-test で行い、 $P < 0.05$ を有意差有りとした。これらの実験は朝日大学動物実験管理委員会の承認（承認番号：第 16-017）を得ている。

【結果】

in vitro における細胞増殖速度は Sq-1979 と L5-11 間で有意な差は認められなかったが、*in vivo* において L5-11 移植マウス群の腫瘍および脾臓は有意に速く増大した。

腫瘍組織内における M-MDSC の総数および分画の比率は、Sq-1979 移植マウス群（平均 0.003×10^6 個，0.1%）に比べ L5-11 移植マウス群（平均 0.2×10^6 個，0.9%）で有意に高かった。一方、PMN-MDSC の総数および分画の比率は、Sq-1979 移植マウス群（平均 0.01×10^6 個，2.7%）に比べ L5-11 移植マウス群（平均 9.14×10^6 個，38.1%）において顕著に高かった。脾臓内における M-MDSC の総数および分画の比率は、コントロール群（平均 1.2×10^6 個，2.3%）、Sq-1979 移植マウス群（平均 1.3×10^6 個，2.0%）、L5-11 移植マウス群（平均 2.0×10^6 個，2.0%）の間で有意な差はなかった。PMN-MDSC の総数および分画の割合も、コントロール群（平均 2.8×10^6 個，5.0%）と Sq-1979 移植マウス群（平均 3.4×10^6 個，5.9%）の間では、有意な差はなかったが、L5-11 移植マウス群（平均 8.8×10^6 個，8.4%）では有意に高く、この変化は CD11b⁺ 細胞分画の変化と相関していた。

腫瘍組織内における CD8⁺T 細胞は細胞数、比率ともに Sq-1979 移植マウス群（平均 0.05×10^6 個，1.3%）と比較し L5-11 移植マウス群（平均 0.55×10^6 個，2.3%）で有意に増加していたが、CD4⁺T 細胞の比率は変化しなかった。脾臓における CD8⁺T 細胞の総数および比率は、コントロール群（平均 1.64×10^6 個，2.8%）に比べ Sq-1979 移植マウス群（平均 3.05×10^6 個，5.2%）で共に有意に増加したが、L5-11 移植マウス群（平均 0.31×10^6 個，0.3%）では、顕著に減少した。脾臓における CD4⁺T 細胞の総数および比率は、コントロール群（平均 6.63×10^6 個，11.5%）、Sq-1979 移植マウス群（平均 7.66×10^6 個，13.1%）の間で差は見られなかったが、L5-11 移植マウス群（平均 3.02×10^6 個，2.8%）では有意に減少した。

【考察と結論】

腫瘍組織における MDSC は、より高い腫瘍増殖能を持つ L5-11 移植マウスにおいて有意に上昇し、特に PMN-MDSC 誘導は顕著に脾臓内にも認められ、それと拮抗して脾臓内では CD4⁺、CD8⁺T 細胞が共に抑制され、PMN-MDSC により強力な全身免疫能の抑制が引き起こされていることが示唆された。

一方、Sq-1979 移植マウスの脾臓では、CD8⁺T 細胞が増加しており、MDSC 非依存性の免疫制御を受けていることが示唆された。

L5-11 移植マウス群の腫瘍組織では Sq-1979 由来の腫瘍組織に比べ CD8⁺T 細胞が増加しており、腫瘍組織と脾臓とでは異なる免疫制御が行われていることが推測された。

以上のことからマウスでは腫瘍の増大や転移能の獲得などに伴い MDSC が腫瘍組織および脾臓において増加し、全身免疫系における T 細胞の抑制をもたらすことが示唆された。