

マウス口腔扁平上皮癌細胞株を用いた腫瘍
微小環境モデルにおける免疫抑制機構の解
析

もりもと ひろえ
森本 宏衣

本論文の要旨は，第199回朝日大学歯学研究科発表会（2017年10月5日，岐阜）にて発表した．また，本論文の一部は，第59回歯科基礎医学会学術大会（2017年9月17日，長野），において発表した．

緒 言

頭頸部癌の5年生存率は、ここ10数年の間の目覚ましい技術的進歩にもかかわらず大幅な改善が見られないため、予後および生存率の改善が期待されている^{1,2)}。癌の臨床的悪性度は、癌細胞固有の細胞生物学的な形質のみならず、癌組織を取り巻く微小環境 (tumor micro environment: TME) や患者の免疫応答などの全身状態も影響することが知られている^{3,4)}。したがって、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) 患者の予後を正確に予測するためには、患者の免疫系を含む全身状態を総合的に把握することが重要である。

癌による免疫系制御には、特異的な受容体を介した制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の誘導⁵⁾や、様々な因子を介した腫瘍関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblast: CAF)⁶⁾や、骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) の誘導が重要な役割を果たすことが報告されている⁷⁾。

腫瘍との相互作用により、TMEのニッチを占める線維芽細胞の一部はCAFに変化し、癌の悪性化に関与する活動的な役割を担う⁸⁻¹¹⁾。CAFは臨床的に、肺癌¹²⁾、大腸癌¹³⁾、口腔癌^{14,15)}などにおいて血管新生、浸潤、転移を促進することが知られており、その存在は予後不良と密接に関連する。CAFは、様々な液性因子を介

して腫瘍細胞と相互作用する。CAF自身の放出するCCL2, CCL7, IL-6, COX2, CXCL8, TNF, VEGF, IL-33など¹⁴⁻¹⁸⁾のサイトカインや酵素は腫瘍の増殖, 浸潤, 転移や免疫抑制を促進することが報告されている。CAFはさらに, Tregの誘導やMDSCの誘導に関わることが知られている^{14,15)}が, その上位において直接的にCAFの免疫抑制作用を制御する因子やその作用機序についてはまだ十分に明らかにされていない。

稲垣ら¹⁹⁾はC3Hマウス口腔扁平上皮癌細胞株Sq-1979またはそのサブクローン, および同系マウス由来の線維芽細胞(10T1/2)と抗CD3抗体刺激脾細胞により構成される癌組織微小環境モデルを構築し, Sq-1979細胞が特異的に放出する液性因子が10T1/2細胞との共培養下において, 抗体刺激脾細胞のIFN- γ 産生能を強制的に抑制することを突き止めた。一方, Sq-1979細胞移植マウスの頸部転移リンパ節巣から樹立したL5-11を始めとするL細胞群にはその作用が見られなかった。

本研究では, Sq-1979細胞が特異的に放出する免疫抑制因子を同定する目的でSq-1979細胞株で特異的に活性化しているサイトカイン群をスクリーニングし, 中和抗体およびサイトカイン産物を用いてその機能を解析し, さらに10T1/2細胞の発現する免疫調節因子の動態を観察した。

材料および方法

1 実験動物

雄性 5 週齢あるいは 24 週齢の C3H/HeN マウス（清水実験材料，京都）を，朝日大学動物飼育施設において 1 週間以上飼育して馴化した後，実験に用いた．すべての動物実験は，朝日大学動物実験専門委員会の審査，承認を得て実施した（承認番号：17-038）．

2 細胞株および培養条件

Sq-1979 細胞（理化学研究所バイオリソースセンター（BRC），茨城）および Sq-1979 細胞を C3H/HeN マウス側腹皮下に移植して，転移リンパ節巣より樹立した L5-11 細胞²⁰⁾ の継代は，37°C，5% CO₂ 含有混合気インキュベーター内で 10% 牛胎児血清（FBS，ニチレイバイオサイエンス，東京），1% antibiotic solution（100mg/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, Gibco®, Life Technologies, NY, USA）を含んだ Eagle's Minimum Essential Medium（NaHCO₃，グルタミン含有，和光純薬，大阪：E-MEM 培地）を用いて行った．

C3H マウス胎児由来線維芽細胞である 10T1/2 は理研 BRC より提供を受け，10% FBS，1% antibiotic solution 含有 Basal Medium，Eagle（Gibco®）で継代して使用した．

3 マイクロアレイ法による発現遺伝子の検討

1×10^7 個の Sq-1979 細胞と L5-11 細胞より, ISOGEN (Nippon Gene, 東京) を用いて total RNA を所定の方法により抽出した. cDNA マイクロアレイ法は, SuperPrint G3 Mouse GE Microarray 60K Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて, 所定の Cy5 単色法にて行った.

4 定量的 RT-PCR による発現遺伝子解析

始めに complementary (c) DNA 合成を以下の手順で行った. すなわち OSCC 細胞より抽出した total RNA $1 \mu\text{g}$ に, 400 ng の Oligo dT を添加して超純水で $10 \mu\text{l}$ に調製し, 5 分間 65°C にて処理の後, 氷上で急冷した. これに 10 mM の dATP, dGTP, dCTP, dTTP mix を $1 \mu\text{l}$, 5 倍バッファー $4 \mu\text{l}$, 100 mM DTT 溶液 $2 \mu\text{l}$, Superscript III 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 100 U , RNase inhibitor 20 U を加え, 超純水を添加して $20 \mu\text{l}$ とした. 反応液を 42°C , 1 時間, 次いで 70°C , 15 分処理し, cDNA 原溶液とした.

次いで PCR 反応液は, 50 倍希釈した cDNA 原溶液 $2.5 \mu\text{l}$, SYBR Premix EX Taq (タカラバイオ, 大津) $10 \mu\text{l}$ に, Forward および Reverse primer 各 6 pmol を加え, 超純水で $20 \mu\text{l}$ に調製した. 定量的 PCR 法は, サーマルサイクラー TP800 (タカラバイオ, 大津) を用いて, 95°C , 10 秒の初期変性の後, 95°C , 5 秒の熱変性ならび

に 60℃, 30 秒のアニーリング/伸長反応からなる 2 ステップ 40 サイクルの条件で行った. 定量的 PCR 法により得られた特定の mRNA 遺伝子発現量と, 内在性コントロールである RPS5m RNA 発現量との比を求め, 細胞間や組織間で比較した.

Primer の設計は, Primer Express (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) を用いて行い, 実験に用いたプライマーを表 1 にまとめた.

表1 実験に用いたプライマー

Symbol	Forward	Reverse	Accession No.
<i>Il1α</i>	TTGACATGTATGCCTACTCGTCGG	CTGTGATGAGTTTGGTGTTCCTGGC	NM_010554.4
<i>Il6</i>	CCTACCCCAATTTCCAATGCTCTC	GCATAACGCACTAGGTTTGCCG	NM_031168.2
<i>Il1f6</i>	CTTGCTCCCATGCCAATATCTGGA	CCTTTGTGCAGAACAGGCAGCT	NM_019450.3
<i>Ccl2</i>	AAAAACCTGGATCGGAACCAAAATG	TGCTTGAGGTGGTTGTGGAAAAG	NM_011333.3
<i>Ccl7</i>	TGCTCATAGCCGCTGCTTTCAG	GCTTCCCAGGGACACCGACTAC	NM_013654.3
<i>Cd274</i>	TGCATAATCAGCTACGGTGGTGC	CCTCAGCTTCTGGATAACCCTCG	GQ904196.1
<i>αSMA</i>	ACCGCTCCACCATGTGTGAAGAA	CCCACCATCACACCCTGATGTC	M26689.1
<i>CD276</i>	GAGTGCCCTTGACTGGCAATGTG	CCGTGAGCATCTTGCTGCAACAC	NM_133983.4
<i>CD80</i>	AAACAACAGCCTTACCTTCGGGC	TGTCCGAAAGATCAGCTAGCACG	NM_009855.2
<i>CD276</i>	GAGTGCCCTTGACTGGCAATGTG	CCGTGAGCATCTTGCTGCAACAC	NM_133983.4
<i>RPS5</i>	AGAAGACTCAACACGCATTGGGC	GCACTCAGCGATGGTCTTGATGT	BC158718

5 マウス脾細胞の採取

C3H/HeN マウスから脾臓を摘出し, 2ml の 10 % FBS, 1 % antibiotic antimycotic solution (100mg/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 250ng/ml amphotericin B, Gibco®), 50 μ M 2-mercaptoethanol (ナカライテスク, 京都) を含んだ Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MD, USA: RPMI 培地) 中で金属メッシュを用いて押しつぶし, 脾細胞を分離した. 分離した細胞に 8ml の 10 % FBS 含有 RPMI 培地を加え, 遠心分離 (1500rpm, 4°C, 5 分間) により細胞を回収した. 細胞成分を 2ml の 140 mM NH₄Cl-10 mM Tris (pH7.3) 1 mM EDTA に懸濁し, 室温で 10 分間放置して赤血球を溶血した. その後, 8 ml の 10% FBS 含有 RPMI 培地を加え脾細胞を含む沈殿を 3 回洗浄し, ナイロンメッシュ (40 μ m, Falcon®, Corning, NY, USA) で濾過して脾細胞を得た.

6 馴化培地の作製と抗サイトカイン抗体による吸収

液性因子の作用を検討する目的で, 1×10^6 個の Sq-1979 細胞株を 10cm ディッシュに, RPMI 10 ml に懸濁して播種し, 48 時間後に馴化培地 (conditioned medium: CM) を採取した. 1 ml の CM に, 抗 IL-1 α , IL-1 β , IL-6 抗体 (Affinity purified goat IgG: R&D systems, Minneapolis, MN, USA) をそれぞれ 1 μ g/ml

となるように加え，4℃，4時間ローテーターで振盪し吸収した．比較対照として，正常 Goat IgG (Affinity purified goat IgG : R&D systems) を同様に用いた．

7 脾 T 細胞刺激培養および混合培養

脾細胞に含まれる全 T リンパ球の活性化は，T リンパ球受容体の特異的に刺激する抗マウス CD3 ϵ モノクローナル抗体 (145-2C11, BD biosciences, San Diego, CA, USA, 以下抗 CD3 mAb) を用いて行った．すなわち，Phosphate buffered saline (PBS) で希釈した抗 CD3 mAb (1 μ g/ml) を，96 穴プレート (No.3599, Corning) 上に分注し，4℃で4時間以上静置，固相化した．プレートは PBS および 10% FBS 含有 RPMI 培地で洗浄し，以下の実験に用いた．

馴化培地との混合培養は，無菌的に採取した脾細胞 (4 \times 10⁵ 個) と条件に応じて 3000 個/well の 10T1/2 細胞を混合し，CM および抗体で吸収した CM を RPMI 培地で3倍に希釈し，10% の FBS を添加し CM 総量が 200 μ l になるよう調整して，これを抗 CD3 mAb 固相化 96 穴プレート上の各ウェルに播種し，5% CO₂ 存在下，37℃で実施した．48 時間後，培養上清を 4℃，3000rpm で5分間遠心して回収し -80℃にて保存した．IL-1 α (R&D systems) を 10% FBS 含有 RPMI 培地に添加した物を用いて，上記と同様に混合培養実験を行った．

8 酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法)

培養上清中に産生された IFN- γ は, BD OptEIA set Mouse IFN- α および BD OptEIA set Mouse IL-10 (BD Biosciences) をそれぞれ用いて以下の手順にて定量した. まずウェル当たり 100 μ l の一次抗体を含む Coating buffer (IFN- γ : 0.1M 炭酸ナトリウム緩衝液 pH9.5, IL-10: 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH6.5) を ELISA 用プレート (MS-8896F, 住友ベークライト, 東京) に加えて, 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した後, プレートを ELISA 洗浄液 (Wash Concentrate, BD OptEIA, BD Biosciences) で規定回数洗浄した. 希釈緩衝液で希釈した培養上清をウェル当たり 100 μ l 加えて室温にて 2 時間静置した後, プレートを ELISA 洗浄液で規定回数洗浄した. 次に, ビオチン標識二次抗体とペルオキシターゼ標識アビジンを含む希釈緩衝液をウェル当たり 100 μ l 加えて, 室温に 1 時間静置した後, プレートを ELISA 洗浄液で規定回数洗浄した.

3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine (TMB) substrate reagent A (BD Biosciences) と TMB substrate reagent B (BD Biosciences) を, 1:1 で混合して調製した Substrate Solution を, ウェル当たり 100 μ l 加え, 室温, 暗室にて 30 分間静置して可視化させた.

各ウェルに 1M 硫酸を 50 μ l 加えて発色反応を停止させた後, 450nm の吸光度にて, マイクロプレート・スペクトロフォトメーター (infiniteM200 Pro[®], Tecan,

テカンジャパン，神奈川）で測定した．サイトカイン
産生量（％）は，刺激培養上清中の各サイトカイン濃
度を，対照群（脾細胞のみを刺激培養した場合）に対
する相対量（％）で表した．

9 統計解析

各実験群の測定値は平均±標準偏差で表記した．
ELISA法による刺激脾細胞のサイトカイン産生能およ
び発現遺伝子解析の有意差検定は，Student's *t*-test を
用いて行い， $p < 0.05$ をもって有意とした．

結 果

1 Sq-1979 細胞で特異的に発現の上昇しているサイトカイン群の同定

cDNA マイクロアレイの結果, *Ccl2*, *Ccl7*, *Il1 α* , *Il1f6*, *Il6* の各 mRNA 発現が L5-11 細胞に比べ Sq-1979 細胞において顕著に高いことが示唆された (表 2). mRNA 発現を Sq-1979 および L5-11 細胞から採取した RNA を用いた RT-PCR で比較すると, これらすべての mRNA 発現は Sq-1979 細胞において有意に上昇していた (図 1).

表 2 Sq-1979細胞で特異的に高発現している遺伝子

GeneSymbol	GeneName	Description	Fold change L5-11vs.Sq-1979
<i>Ccl2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 2 (<i>Ccl2</i>), mRNA	22.260
<i>Ccl7</i>	chemokine (C-C motif) ligand 7	Mus musculus chemokine (C-C motif) ligand 7 (<i>Ccl7</i>), mRNA	61.194
<i>Il1a</i>	interleukin 1 alpha	Mus musculus interleukin 1 alpha (<i>Il1a</i>), mRNA	28.806
<i>Il1f6</i>	interleukin 1 family, member 6	Mus musculus interleukin 1 family, member 6 (<i>Il1f6</i>), mRNA	773.959
<i>Il6</i>	interleukin 6	Mus musculus interleukin 6 (<i>Il6</i>), mRNA	48.158

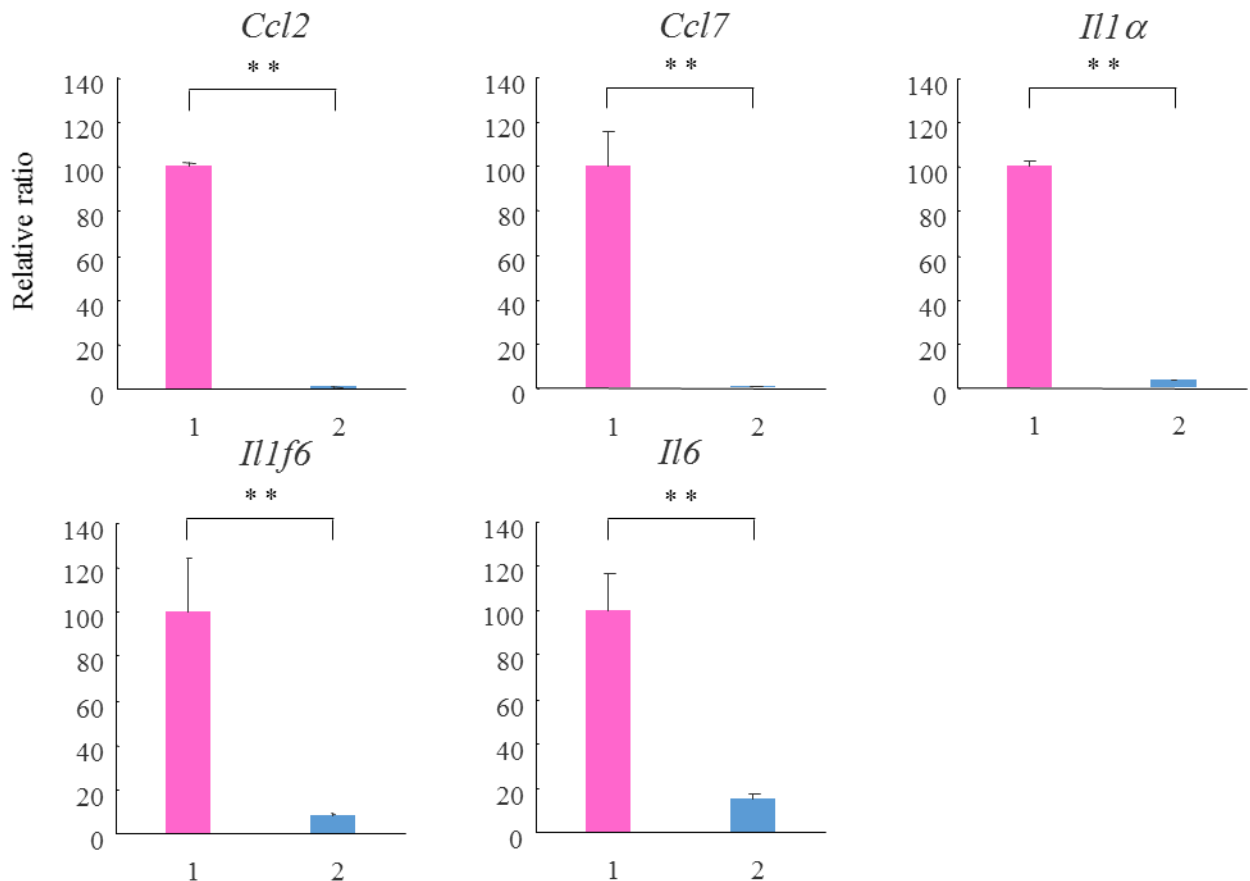


図1 Sq-1979およびL5-11細胞におけるサイトカイン遺伝子mRNA発現
各遺伝子のシンボルを図の中央に表し, Sq-1979細胞の発現を100%とした相対的発現量を縦軸, 細胞を横軸に示す.
Sq-1979細胞 (レーン1), L5-11細胞 (レーン2). ** P < 0.01

2 中和抗体を用いた免疫抑制増強因子の検討

免疫制御に関連すると思われる IL-1 α , IL-1f6 および IL-6 に対する中和抗体で CM を吸収し, 抗 CD3 mAb, 刺激脾細胞と 10T1/2 細胞の共培養系に添加して, IFN- γ 産生能を測定した. 共培養系に CM を添加すると, 10T1/2 細胞による免疫抑制作用が顕著に促進した (レーン 3, 4). 一方, 抗 IL-1 α 抗体で吸収した CM では, 免疫抑制作用の促進は消失した (レーン 7, 8). 対照的に, 抗 IL-1f6, 抗 IL-6 抗体処理した CM を添加した実験群 (レーン 9, 10 および 11, 12) は, 対照としてマウス IgG を添加した実験 (レーン 5, 6) や, 未処理 CM (レーン 3, 4) と同様の免疫抑制促進作用 (レーン 3, 4) を示した.

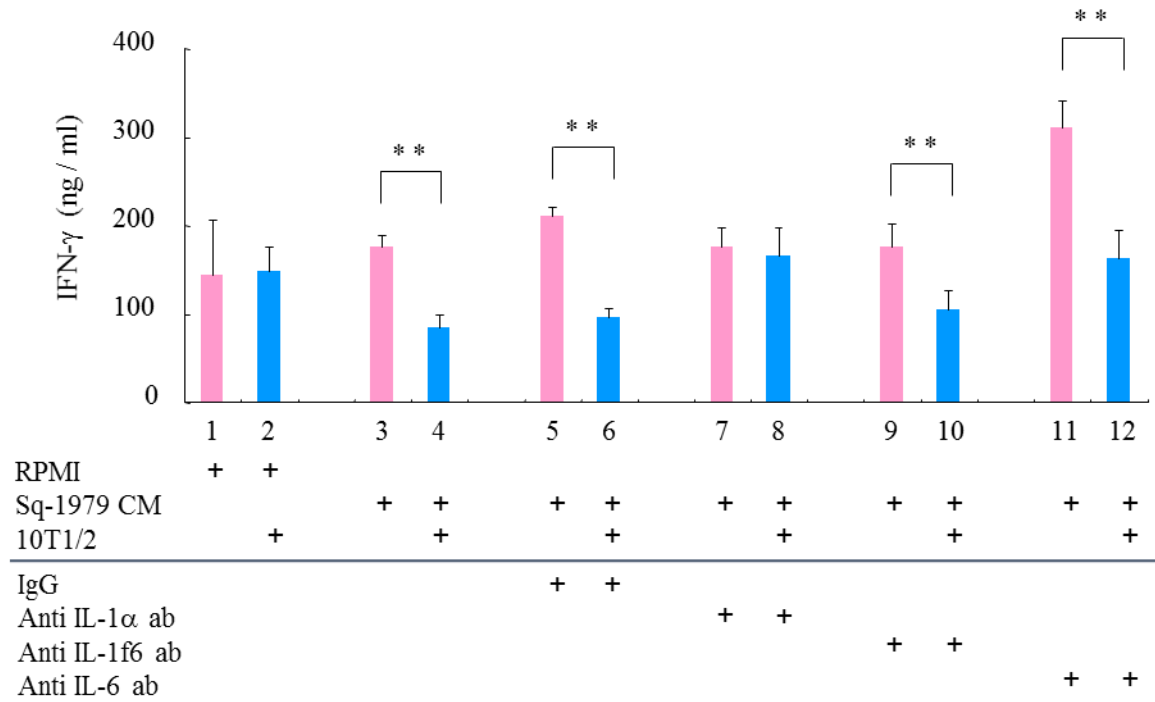


図2 10T1/2細胞と、抗サイトカイン中和抗体で吸収したCMによる刺激脾細胞のIFN- γ 産生能抑制効果

抗CD3 mAb刺激脾細胞を10T1/2細胞共存下（レーン2, 4, 6, 8, 10, 12）または非共存下（レーン1, 3, 5, 7, 9, 11）で、RPMI培地（レーン1, 2）、またはCM添加培地（レーン3, 4）、抗IL-1 α 抗体吸収CM添加培地（レーン7, 8）、抗IL-1f6抗体吸収CM添加培地（レーン9, 10）、抗IL-6抗体吸収CM添加培地（レーン11, 12）と共培養し、IFN- γ 産生量（ng/ml）を測定した。中和抗体のコントロールとしてIgGを添加した（レーン5, 6）。**P < 0.01

3 Sq-1979 細胞の CM が 10T1/2 細胞に引き起こす遺伝子発現の変化

CM および各種サイトカイン中和抗体で吸収した CM 添加培地で培養した 10T1/2 細胞における *Ccl2*, *Ccl7*, *Il1f6* および *Il6* mRNA 発現の変化を観察すると, *Ccl2*, *Ccl7* および *Il6* mRNA は, CM を含まない増殖培地で非常に低い発現しか示さないが (図 3A, レーン 1), CM および, 対照として CM に IgG を加えた培地では顕著に発現が上昇した (レーン 2, 3). ところが抗 IL-1 α 抗体で吸収した CM 添加培地では CM 無添加培地と同様に非常に低い発現が観察された (レーン 4). 一方, 抗 IL-1f6, IL-6 抗体吸収 CM 添加培地では, CM のみ, または CM に IgG を加えた培地と同様の高い発現が観察された (レーン 5, 6). *Il1f6* mRNA 発現は, CM 添加培地による有意な発現変化は観察されなかった.

同様の条件下で, 10T1/2 細胞における B7 ファミリー遺伝子の *Cd276*(*B7-H3*), *Cd80*(*B7.1*), *Cd274*(*PD-L1*) および CAF のマーカー遺伝子である α 平滑筋アクチン (*α SMA*) mRNA 発現の変化を観察すると, *Cd80*(*B7.1*) 以外の mRNA 発現は, CM 添加による影響を受けず, また, これらすべての mRNA において, 中和抗体処理による有意な発現変化は観察されなかった (図 3B).

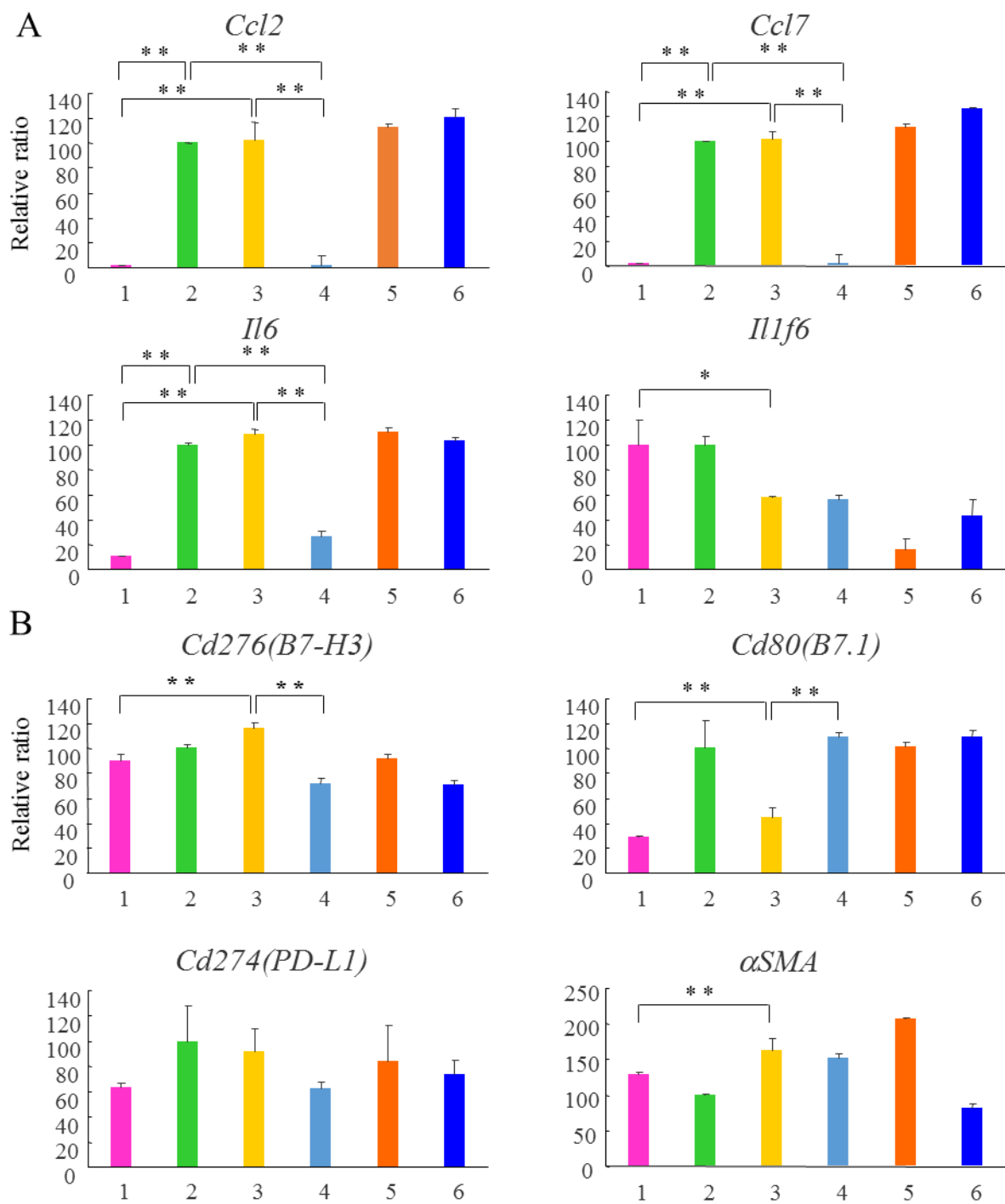


図3 Sq-1979細胞のCMが10T1/2細胞に引き起こす遺伝子発現の変化
 サイトカインmRNA (A), B7ファミリーおよび α SMA mRNA (B), Sq-1979CM添加培地におけるmRNA発現を100%とする相対的発現量を縦軸, 培地を横軸に示す。
 RPMI培地 (レーン1), Sq-1979 CM添加培地 (レーン2), IgG+CM添加培地 (レーン3),
 抗IL-1 α 抗体吸収CM添加培地 (レーン4), 抗IL-1 β 抗体吸収CM添加培地 (レーン5),
 抗IL-6抗体吸収CM添加培地 (レーン6). *P < 0.05, **P < 0.01

4 IL-1 α による 10T1/2 細胞の免疫抑制作用の促進

10T1/2 細胞存在下における抗体刺激脾細胞の抑制された IFN- γ 産生 (図 4, レーン 2) は, 増殖培地に 50 pg/ml の IL-1 α を加えることで, さらに顕著に抑制され (レーン 6), その効果は CM 添加培地による抑制促進効果に匹敵していた (レーン 4). 増殖培地に 150 pg/ml の IL-1 α を加えても, ほぼ同様の抑制促進作用が観察された (レーン 8). 一方, 10T1/2 細胞非存在下で CM や IL-1 α を培地に添加しても, 抗体刺激脾細胞の IFN- γ 産生は抑制されなかった (レーン 3, 5, 7).

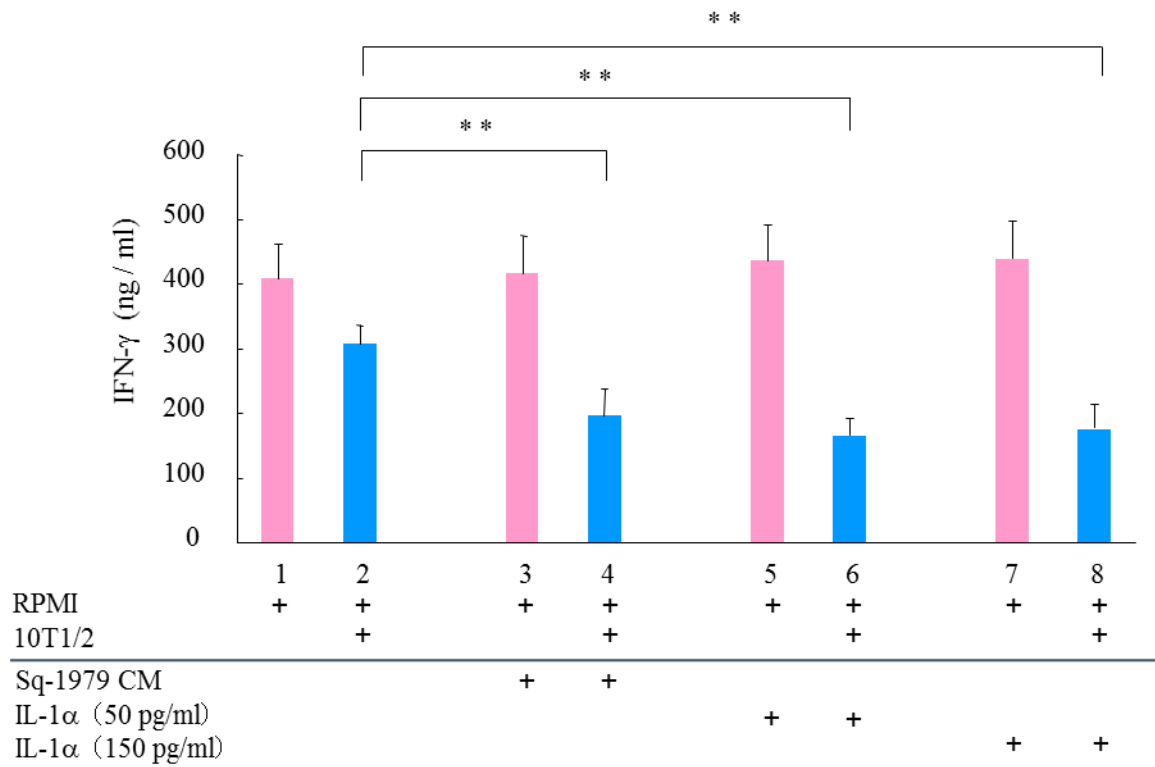


図4 10T1/2細胞とIL-1 α 添加培地による刺激脾細胞のIFN- γ 産生能抑制効果
 抗CD3 mAb刺激脾細胞を10T1/2細胞共存下（レーン2, 4, 6, 8）または非共存下（レーン1, 3, 5, 7）で、RPMI培地（レーン1, 2）、CM添加培地（レーン3, 4）、50 pg/ml IL-1 α 添加培地（レーン5, 6）、150 pg/ml IL-1 α 添加培地（レーン7, 8）と共培養し、IFN- γ 産生量（ng/ml）を測定した。 ** P < 0.01

5 IL-1 α による 10T1/2 細胞の遺伝子発現の変化

10T1/2 細胞の *Ccl2*, *Ccl7* および *Il6* mRNA 発現は, 50 pg/ml, および 150 pg/ml の IL-1 α 添加培地 (図 5A, レーン 3, 4) において, 3 倍希釈した CM 添加培地 (レーン 2) と同様に顕著に上昇した. 一方, *Il1f6* mRNA 発現は CM 添加培地では上昇しなかったが, IL-1 α 添加により濃度依存的に発現が上昇した (レーン 3, 4).

同様の条件下で, 10T1/2 細胞における B7 ファミリー遺伝子である *Cd276* (*B7-H3*), *Cd80* (*B7.1*), *Cd274* (*PD-L1*) および CAF のマーカー遺伝子である α SMA mRNA 発現の変化を観察すると, IL-1 α 添加による有意な発現変化は観察されなかった (図 5B).

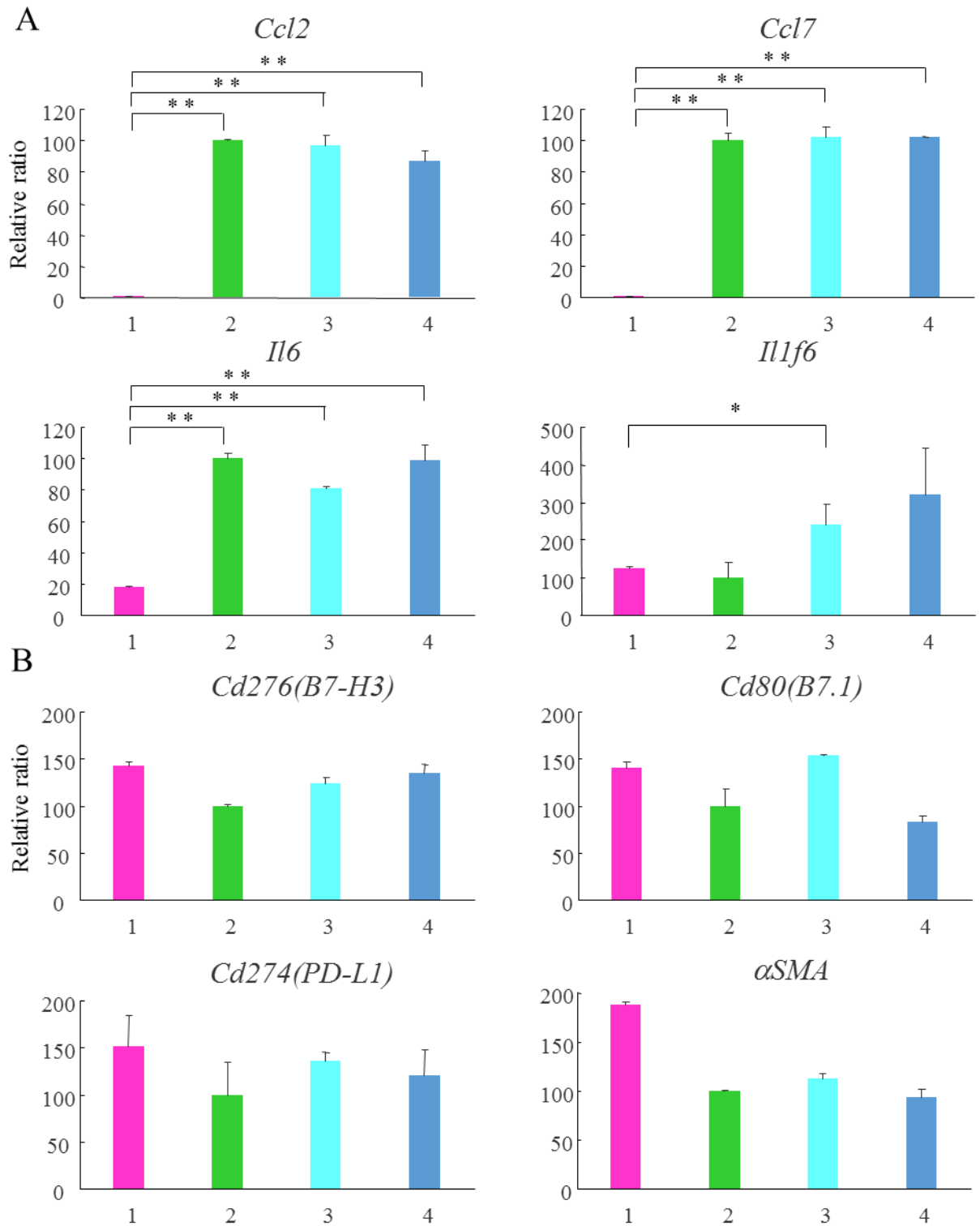


図5 IL-1αによる10T1/2細胞の遺伝子発現の変化
 サイトカインmRNA (A), B7ファミリーおよびαSMA mRNA (B), Sq-1979CM添加培地におけるmRNA発現を100%とする相対的発現量を縦軸, 培地を横軸に示す。
 RPMI培地 (レーン1), Sq-1979CM添加培地 (レーン2),
 50 pg/ml IL-1α添加培地 (レーン3), 150 pg/ml IL-1α添加培地 (レーン4)。
 * P < 0.05, ** P < 0.01

考 察

腫瘍組織では，間質の線維芽細胞が腫瘍の影響下でCAFとしての性質を獲得し，腫瘍原生，増殖や転移というような悪性形質の促進に寄与することが知られている^{21,22)}．稲垣ら¹⁹⁾は腫瘍微小環境モデルを用いて，抗CD3抗体により刺激を受けた脾細胞のIFN- γ 産生が，10T1/2細胞との接触共培養により抑制され，さらにSq-1979細胞の放出する液性因子がその免疫抑制作用を促進すること，およびL5-11を始めとするL細胞群にはその作用が見られないことを突き止めている．

10T1/2細胞による免疫抑制作用はSq-1979細胞が特異的に放出する液性因子によって増強されるので，本研究ではまず，L5-11で発現が低くSq-1979細胞で発現の上昇しているサイトカイン群を発現遺伝子レベルでスクリーニングした．その結果，Sq-1979細胞特異的にmRNA発現の高かったサイトカイン遺伝子として*Il1 α* ，*Il1f6*，*Il6* mRNAが見出された．これらに対する中和抗体を用いた検討から，IL-1 α がこの免疫抑制作用を促進するが，IL-1f6およびIL-6は関与していないことが示唆された．さらにIL-1 α タンパク質を用いた検討から，IL-1 α が単独で間葉系細胞存在下で誘導される免疫抑制作用を促進すること，さらにSq-1979細胞の培養上清は150 pg/ml以上のIL-1 α と同等の生理活性を有

していることが判明した。IL-1 α はIL-1 β とともに上皮-間葉系細胞の相互作用に関わることがすでに知られている。正常上皮はIL-1 α やIL-1 β を放出し、その刺激により上皮下線維芽細胞はケラチノサイト増殖因子(KGF)を分泌して上皮細胞の増殖を誘導する²³⁾が、今回の結果から、OSCCのTMEでは同様のサイトカインが、間葉系間質細胞を介した免疫抑制に対する促進作用を持つことが示された。

頭頸部扁平上皮癌では、CAFがB7H1(PD-L1)やB7CD(PD-L2)などのB7ファミリー遺伝子を介して活性化T細胞の増殖を抑制することが報告されている¹⁴⁾。OSCCのCAFは、筋線維芽細胞(MF)の性質を獲得する²⁴⁾が、今回の検討においてMFのマーカであるmRNA発現は、IL-1 α 処理により上昇しなかった。これらの事実から、IL-1 α による免疫抑制の促進作用は、少なくともこれらB7ファミリー遺伝子の発現変化や、10T1/2細胞のMFへの形質変化を介して引き起こされるものではないことが示唆された。一方、IL-1 α の作用により10T1/2細胞のCcl2, Ccl7, IL-6 mRNA発現が顕著に誘導された。OSCC組織由来のCAFがCCL2やCCL7を強発現している¹⁴⁾ことや、OSCC由来のCAFにおいて、IL-1 α がCCL7やIL-6を誘導していることが既に報告されており^{17,25)}、今回実験で用いた微小環境系は腫瘍組織モデルとして適切に機能していることが支持されている。CCL2やIL-6、あるいはCCL7は、

癌細胞の遊走能や浸潤能を高め、上皮-間葉細胞移行を促進することが知られている^{16,17,26)}。さらに IL-6 は膵臓癌において STAT3 シグナルを介して MDSC を誘導することが報告され²⁷⁾、また、前立腺癌では CCL2 が TME に M2 マクロファージを動員し免疫抑制性の環境を形成することが知られており²⁸⁾、IL-1 α シグナルの一部は IL-6 や CCL2 の機能を介して免疫抑制に関与することが推測される。

したがって、Sq-1979 細胞の放出する IL-1 α が、腫瘍組織において間葉系間質細胞に依存する T 細胞免疫能の抑制作用を促進することが示唆された。さらに、IL-1 α は間葉系間質細胞の *Ccl2*、*Ccl7* および *IL-6* mRNA 発現を誘導し、これら因子が免疫抑制などを介して腫瘍の悪性化に寄与することが推測された。今後さらに、OSCC 細胞由来の IL-1 α を介した免疫制御機構を解明し、OSCC 患者の予後および生存率の改善に貢献すると考えられた。

結 論

本研究結果から，OSCC組織におけるT細胞抗腫瘍免疫能の抑制機構の一つとして，間葉系間質細胞の接触とOSCC細胞由来のIL-1 α が重要な役割を果たすことが示唆された．OSCC細胞由来のIL-1 α を介した免疫制御機構の検討により，新規免疫チェックポイント分子を解明し，OSCC患者の予後および生存率の改善に貢献すると考えられた．

引用文献

- 1) Siegel R, Naishadham D and Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62:283-298.
- 2) Leemans CR, Braakhuis BJ and Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11:9-22.
- 3) Petitprez F, Vano YA, Becht E, Giraldo NA, de Reyniès A, Sautès-Fridman C and Fridman WH. Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother.* 2017. doi: 10.1007/s00262-017-2058-z.
- 4) Sathiyasekar AC, Chandrasekar P, Pakash A, Kumar KU and Jaishlal MS. Overview of immunology of oral squamous cell carcinoma. *J Pharm Bioallied Sci.* 2016;8(Suppl 1):S8-S12.
- 5) Condamine T, Ramachandran I, Youn JI and Gabrilovich DI. Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells. *Annu Rev Med.* 2015; 66:97-110.

- 6) Nazareth MR, Broderick L, Simpson-Abelson MR, Kelleher RJ Jr, Yokota SJ and Bankert RB. Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells. *J Immunol.* 2007; 178:5552-5562.
- 7) Heim CE, Vidlak D, Scherr TD, Kozel JA, Holzapfel M, Muirhead DE and Kielian T. Myeloid-derived suppressor cells contribute to *Staphylococcus aureus* orthopedic biofilm infection. *J Immunol.* 2014; 192:3778-3792.
- 8) Leef G and Thomas SM. Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013; 49 : 381-386.
- 9) Turley SJ, Cremasco V and Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:669-682.
- 10) Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol.* 2014; 4:62.
- 11) Franco OE, Shaw AK, Strand DW and Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21:33-39.

- 12) Ito M, Ishii G, Nagai K, Maeda R, Nakano Y and Ochiai A. Prognostic impact of cancer-associated stromal cells in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Chest*. 2012 ; 142:151-158.
- 13) Herrera M, Herrera A, Domínguez G, Silva J, García V, García JM, Gómez I, Soldevilla B, Muñoz C, Provencio M, Campos-Martin Y, García de Herreros A, Casal I, Bonilla F and Peña C. Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Sci*. 2013; 104:437-444.
- 14) Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M and Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64:1407-1417.
- 15) Takahashi H, Sakakura K, Kudo T, Toyoda M, Kaira K, Oyama T and Chikamatsu K. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget*. 2017; 8:8633-8647.

- 16) Fujisaki K, Fujimoto H, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Shiina N, Kuroda M, Aoyagi Y and Miyazaki M. Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 150:255-263.
- 17) Jung DW, Che ZM, Kim J, Kim K, Kim KY, Williams D and Kim J. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. *Int J Cancer.* 2010; 127:332-344.
- 18) Dudás J, Fullár A, Bitsche M, Schartinger V, Kovalszky I, Sprinzl GM and Riechelmann H. Tumor-produced, active interleukin-1 β regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2011; 317:2222-2229.
- 19) 稲垣俊弘, 神谷真子, 川木晴美, 高山英次, 伊藤宏衣, 鷺見成紀, 足立充隆, 住友伸一郎, 村松泰徳, 近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌の悪性化にともなう脾細胞のサイトカイン産生能の改変機構. *J Oral Biosci Supplement.* 2015; 2015: 275.

- 20) Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Sumi S, Motohashi M, Muramatsu Y, Sumitomo S, Shikimori M, Yamazaki Y and Kondoh N. Gene expression analyses associated with malignant phenotypes of metastatic subclones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma cell line, Sq-1979. *Oncol Lett*. DOI:10.3892/ol.2017.7648
- 21) Kalluri R and Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:392-401.
- 22) Räsänen K and Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*. 2010 ;316:2713-2722.
- 23) Maas-Szabowski N, Stark HJ and Fusenig NE. Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2000;114:1075-1084.
- 24) Gupta K, Metgud R and Gupta J. Evaluation of stromal myofibroblasts in oral leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral squamous cell carcinoma--an immunohistochemical study. *J Cancer Res Ther*. 2015;11:893-898.

- 25) Bae JY, Kim EK, Yang DH, Zhang X, Park YJ, Lee DY, Che CM and Kim J. Reciprocal interaction between carcinoma-associated fibroblasts and squamous carcinoma cells through interleukin-1 α induces cancer progression. *Neoplasia*. 2014;16:928-938.
- 26) Lin WJ and Izumi K. Androgen receptor, ccl2, and epithelial-mesenchymal transition: A dangerous affair in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2014;3:e27871,1-3.
- 27) Mace TA, Ameen Z, Collins A, Wojcik S, Mair M, Young GS, Fuchs JR, Eubank TD, Frankel WL, Bekaii-Saab T, Bloomston M and Lesinski GB. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Res*. 2013 ;73:3007-3018.
- 28) Roca H, Varsos ZS and Pienta KJ. CCL2 is a negative regulator of AMP-activated protein kinase to sustain mTOR complex-1 activation, survivin expression, and cell survival in human prostate cancer PC3 cells. *Neoplasia*. 2009;11:1309-1317.