

学位論文内容の要旨

論文提出者	森本 宏衣
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 柏俣 正典
論文題目	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
論文内容の要旨	<p>【目的】</p> <p>口腔扁平上皮癌の悪性化の過程では、腫瘍微小環境における間葉系細胞等による免疫系制御が重要な役割を果す。C3H マウス口腔扁平上皮癌細胞株 Sq-1979 やそのサブクローンと、同系マウス由来の線維芽細胞 (10T1/2) による微小環境モデルを構築し、Sq-1979 細胞の放出する液性因子が 10T1/2 細胞と協調して、抗 CD3 抗体刺激脾細胞の IFN-γ 産生能を抑制することが報告されている。Sq-1979 細胞が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発現量の変化を解析した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none">1) <u>培養細胞と馴化培地の調製</u>： C3H マウス由来口腔粘膜扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株 Sq-1979 と、Sq-1979 移植マウスの頸部リンパ節転移巣より樹立した細胞株 L5-11 を用いた。間葉系間質細胞として、C3H マウス胎児由来線維芽細胞株 10T1/2 を用いた。液性因子の作用を検討する目的で、Sq-1979 細胞株を RPMI 10 ml に懸濁し、48 時間後に馴化培地 (conditioned medium : CM) を採取した。2) <u>マイクロアレイ法による発現遺伝子解析</u>： Sq-1979 細胞と L5-11 細胞を用いて cDNA マイクロアレイ (SuperPrint G3 Mouse GE Microarray Kit, Agilent) を行い、Sq-1979 細胞特異的に発現の高いサイトカイン遺伝子群を同定した。3) <u>T 細胞分画活性化脾細胞の IFN-γ 産生能の測定</u>： C3H/HeN マウス (24 週齢・雄) の脾細胞を摘出し、あらかじめ抗サイトカイン中和抗体処理した CM やサイトカイン添加培地を、10T1/2 細胞の共存下または非共存下で混合し、抗マウス CD3ϵ 抗体による刺激培養を行った。48 時間後に培養上清を回収し、IFN-γ 濃度を酵素結合免疫吸着 (ELISA) 法にて測定した。本実験は、朝日大学動物実験専門査委員会の承認のもとで実施された (承認番号 ; 17-038) 。4) <u>10T1/2 細胞を用いた定量的 PCR 法</u>： 3) で用いた馴化培地やサイトカイン添加培地で 10T1/2 細胞を 48 時間培養し、遺伝子発現を定量的 PCR 法により測定した。5) <u>統計解析</u>： 統計解析各実験群の測定値は、平均\pm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 <i>t</i>-test を用いて行い、$p < 0.05$ をもって有意とした。

【結果】

- 1) マイクロアレイ解析の結果、Sq-1979細胞でL5-11細胞よりも発現の高いサイトカインのmRNAとして*Ccl2*, *Ccl17*, *Il11 α* , *Il1f6*, *Il6*が同定された。
- 2) 1)のうち、特に発現が高いと思われるIL-1 α , IL-1f6およびIL-6それぞれに対する中和抗体でCMを吸収し、10T1/2細胞存在下における混合培養で刺激脾細胞のINF- γ 産生能を比べると、未処理CMの有するINF- γ 産生抑制促進作用が抗IL-1 α 抗体処理により消失した。一方、CMの免疫抑制促進作用は抗IL-6および抗IL-1f6抗体により吸収しても変化しなかった。10T1/2細胞非存在下では、CMの免疫抑制促進作用はみられなかった。
- 3) CMで10T1/2細胞を培養しサイトカイン遺伝子のmRNA発現を調べると、対照の増殖培地と比べ*Ccl2*, *Ccl17*および*Il6*発現が顕著に誘導され、その効果は抗IL-1 α 抗体を用いた吸収により消失した。一方、*B7-1*, *B7-H3*, *PD-L1*および線維芽細胞マーカーの α SMA mRNA発現には、各種抗体処理による変化はみられなかった。
- 4) 10T1/2細胞存在下で刺激脾細胞をIL-1 α 処理すると、CMと同様にINF- γ 産生能の抑制が促進された。10T1/2細胞非存在下では、IL-1 α の免疫抑制促進作用はみられなかった。
- 5) 10T1/2細胞をIL-1 α で処理すると、*Ccl2*, *Ccl17*, *Il6* mRNA発現が誘導されたが、*B7-1*, *B7-H3*, *PD-L1*および α SMA mRNA発現に有意な変化はみられなかった。

【考察】

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*, *Ccl17*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。

【結論】

本研究の解析結果から、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患者の予後や生存率の改善に貢献すると考えられた。