

氏 名 ふせ ひろき
布施 浩樹

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 229 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Enhanced expression of PD-L1 in oral squamous cell carcinoma-derived CD11b⁺Gr-1⁺ cells and its contribution to immunosuppressive activity
(口腔扁平上皮癌由来 CD11b,Gr-1陽性細胞によるPD-L1発現増強とその免疫抑制機能)

論文審査委員

(主査) 教授 清水 忠道
(副査) 教授 村口 篤
(副査) 教授 近藤 隆
(副査) 教授 戸邊 一之
(指導教員) 教授 野口 誠

論文内容の要旨

【目的】 癌の免疫逃避機構の一つに、免疫抑制性細胞集団を介した抗腫瘍免疫抑制がある。ミエロイド系抑制性細胞(myeloid derived suppressor cell、MDSC)は、マウスではCD11b、Gr-1を表面マーカーとする細胞で、T細胞免疫応答などの抗腫瘍免疫反応を強く抑制する免疫抑制性細胞であることが報告されている。しかし、このCD11b、Gr-1陽性細胞は極めて多様な性質を示し、癌種によってもその機能は異なり、口腔癌においては未だその性質が不明である。

本研究では、口腔癌におけるCD11b、Gr-1陽性細胞の担癌宿主の免疫応答における役割について解明することを目的とした。

【方法】 C3H/HeNマウスの咬筋部に同マウス由来扁平上皮癌細胞株であるNR-S1Kを移植して、口腔扁平上皮癌担癌モデルを作製した。腫瘍組織、脾臓、末梢血、末梢リンパ節、所属リンパ節でのCD11b、Gr-1陽性細胞の出現頻度についてFACS解析し、脾臓と腫瘍組織よりCD11b、Gr-1陽性細胞を分離回収して *in vitro* においてCD4、CD8陽性T細胞免疫応答に対する作用を解析した。腫瘍組織、脾臓、末梢血におけるCD11b、Gr-1陽性細胞の各種表面抗原の発現解析を行った。さらに、PD-L1がT細胞に与える影響について、CD11b、Gr-1陽性細胞にPD-L1の中和抗体を添加し、FACS解析によりT細胞分裂を蛍光強度の減弱で調べた。

【結果】 担癌マウスの腫瘍組織、脾臓、末梢血では、腫瘍の増大とともにCD11b、Gr-1陽性細胞の経時的な集簇が確認できた。一方、末梢リンパ節、所属リンパ節では、CD11b、Gr-1陽性細胞の経時的な変化が認められなかった。さらに免疫抑制能を確認するため、腫瘍組織および脾臓内より分離したCD11b、Gr-1陽性細胞を、抗CD3、抗CD28抗体存在下でCD4、CD8陽性T細胞と共培養した。腫瘍組織から分離したCD11b、Gr-1陽性細胞は、共培養したCD4T細胞とCD8T細胞の増殖を抑制したが、脾臓から分離したものは抑制効果を示さず、むしろT細胞の増殖を促進した。従って、口腔癌担癌マウスにおけるCD11b、Gr-1陽性細胞は、解剖学的な部位の違いによって機能が異なり、脾臓のCD11b、Gr-1陽性細胞では、免疫抑制性の性質が失われ、むしろ免疫刺激系の細胞へと分化していることが示された。腫瘍組織、脾臓、末梢血のCD11b、Gr-1陽性細胞の表面抗原分子であるMHC classI、MHC classII、CD80、CD83、CD86、CD40、CD54、CD115、CD124、B7H4、PD-L1(B7H1)、PD-L2(B7DC)の発現解析を行ったところ、腫瘍組織から分離したものでは脾臓や末梢血のものに比べて、PD-L1が3倍以上高発現していることが確認された。また、腫瘍組織内のCD11b、Gr-1陽性細胞では、MHC classIIの発現が著しく減少していることも確認された。すなわち、腫瘍組織のCD11b、

Gr-1陽性細胞は、脾臓や末梢血のものとは表面抗原の発現が異なっており、これらの発現の違いと機能面での差異との関連性が示唆された。さらに、腫瘍組織から分離したCD11b、Gr-1陽性細胞におけるCD4、CD8陽性T細胞の増殖抑制効果は、PD-L1の中和抗体により減弱することが確認された。一方、脾臓から分離したCD11b、Gr-1陽性細胞におけるCD4、CD8陽性T細胞に対する増殖抑制効果は、PD-L1の中和抗体の有無で明らかな変化を認めなかった。このことから、PD-L1の高発現がCD4、CD8陽性T細胞の増殖抑制の主要因であることが示された。

【総括】 口腔扁平上皮癌担癌マウスを用いた本研究で、CD11b、Gr-1陽性細胞は、腫瘍組織由来のものではCD4、CD8陽性T細胞免疫応答を強く抑制するのに対して、脾臓由来のものでは抑制機能を示さず、むしろT細胞免疫応答を促進する機能を有することを解明した。さらに、口腔癌担癌マウスの腫瘍組織由来CD11b、Gr-1陽性細胞では、細胞表面のPD-L1の発現が増強し、このPD-L1の発現が免疫抑制機能に重要な役割を果たしていることが確認された。

本研究において、口腔癌担癌マウスでは腫瘍組織や脾臓など解剖学的な部位の違いによりCD11b、Gr-1陽性細胞の機能が異なることを初めて明らかにし、特に腫瘍組織から分離したCD11b、Gr-1陽性細胞のPD-L1高発現がT細胞増殖抑制に重要な役割をもつことを解明した。

学位論文審査の要旨

【目的】

癌の免疫逃避機構の一つに、免疫抑制性細胞集団を介した抗腫瘍免疫抑制がある。ミエロイド系抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cell, MDSC) は、マウスでは CD11b、Gr-1 を表面マーカーとする細胞で、T 細胞免疫応答などの抗腫瘍免疫反応を強く抑制する免疫抑制性細胞であることが報告されている。しかし、この CD11b、Gr-1 陽性細胞は極めて多様な性質を示し、癌種によってもその機能は異なり、口腔癌においては未だその性質が不明である。

本研究では、口腔癌における CD11b、Gr-1 陽性細胞の担癌宿主の免疫応答における役割について解明することを目的とした。

【方法】

C3H/HeNマウスの咬筋部に同マウス由来扁平上皮癌細胞株であるNR-S1Kを移植して、口腔扁平上皮癌担癌モデルを作製した。腫瘍組織、脾臓、末梢血、末梢リンパ節、所属リンパ節での CD11b、Gr-1 陽性細胞の出現頻度について FACS 解析し、脾臓と腫瘍組織より CD11b、Gr-1 陽性細胞を分離回収して *in vitro* において CD4、CD8 陽性 T 細胞免疫応答に対する作用を解析した。腫瘍組織、脾臓、末梢血における CD11b、Gr-1 陽性細胞の各種表面抗原の発現解析を行った。さらに、PD-L1 の T 細胞に与える影響について、CD11b、Gr-1 陽性細胞に PD-L1 の中和抗体を添加し、FACS 解析により T 細胞分裂を蛍光強度の減弱で調べた。

【結果】

担癌マウスの腫瘍組織、脾臓、末梢血では、腫瘍の増大とともに CD11b、Gr-1 陽性細胞の経時的な集簇が確認できた。一方、末梢リンパ節、所属リンパ節では、CD11b、Gr-1 陽性細胞の経時的な変化は認められなかった。さらに免疫抑制能を確認するため、腫瘍組織および脾臓内より分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞を、抗 CD3、抗 CD28 抗体存在下で CD4、CD8 陽性 T 細胞と共培養した。腫瘍組織から分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞は、共培養した CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の増殖を抑制したが、脾臓から分離したものは抑制効果を示さず、むしろ T 細胞の増殖を促進した。従って、口腔癌担癌マウスにおける CD11b、Gr-1 陽性細胞は、解剖学的な部位の違いによって機能が異なり、脾臓の CD11b、Gr-1 陽性細胞では、免疫抑制性の性質が失われ、むしろ免疫刺激系の細胞へと分化していることが示された。腫瘍組織、脾臓、末梢血の CD11b、Gr-1 陽性細胞の表面抗原分子である MHC class I、MHC class II、CD80、CD83、CD86、CD40、CD54、CD115、CD124、B7H4、PD-L1 (B7H1)、PD-L2 (B7DC) の発現解析を行ったところ、腫瘍組織から分離したものでは脾臓や末梢血のものに比べて、PD-L1 が 3 倍以上高発現していることが確認された。また、腫瘍組織内の CD11b、Gr-1 陽性細胞では、MHC class II の発現が著しく減少していることも確認された。すなわち、腫瘍組織の CD11b、Gr-1 陽性細胞は、脾臓や末梢血のものとは表面抗原の発現が異なっておりこれらの発現の違いと機能面での差異との関連性が示唆される。

さらに、腫瘍組織から分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞における CD4、CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制効果は、PD-L1 の中和抗体により減弱することが確認された。一方、脾臓から分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞における CD4、CD8 陽性 T 細胞に対する増殖抑制効果については、PD-L1

の中和抗体の有無で明らかな変化を認めなかった。このことから、PD-L1の高発現がCD4、CD8陽性T細胞の増殖抑制の主な要因であることが示された。

【総括】

口腔扁平上皮癌担癌マウスを用いた本研究でCD11b、Gr-1陽性細胞は、腫瘍組織由来のものではCD4、CD8陽性T細胞免疫応答を強く抑制するのに対して、脾臓由来のものでは抑制機能を示さず、むしろT細胞免疫応答を促進する機能を有することを明らかにした。さらに、口腔癌担癌マウスの腫瘍組織由来 CD11b、Gr-1陽性細胞では、細胞表面のPD-L1の発現が増強し、このPD-L1の発現が免疫抑制機能に重要な役割を果たしていることを確認した。

本研究において、口腔癌担癌マウスでは腫瘍組織や脾臓など解剖学的な部位の違いにより CD11b、Gr-1陽性細胞の機能が異なることを初めて明らかにし、特に腫瘍組織から分離した CD11b、Gr-1陽性細胞のPD-L1高発現がT細胞増殖抑制に重要な役割をもつことを解明した点に新規性があり、医学における学術的重要性も高い。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。