

（様式4）

学位論文の内容の要旨

高橋 秀行 印

（学位論文のタイトル）

Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma.

（頭頸部扁平上皮癌における癌関連線維芽細胞の免疫抑制能）

（学位論文の要旨）

目的

癌組織には腫瘍細胞だけでなく線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞等の多数の間質細胞が存在し、癌の進展に関与している。なかでも癌関連線維芽細胞（Cancer-associated fibroblasts: CAFs）は様々なサイトカインや成長因子を分泌し、癌細胞の増殖や転移に影響を及ぼしていると報告されている。

一方、自然免疫系・獲得免疫系は共同で癌細胞の認識・除去を担っているが、なかでもT細胞免疫系は中心的な役割を果たしている。これに対し癌細胞は、免疫抑制性サイトカインの分泌や免疫チェックポイントのリガンド発現等を通じてT細胞免疫系を抑制し、自己の増殖・転移に有利な環境を構築している。しかしながら、癌微小環境においてCAFsが免疫系に及ぼす影響については未知の部分が多い。

今回我々は、頭頸部扁平上皮癌においてCAFsがT細胞免疫系に及ぼす影響について検討することを目的とした。

対象と方法

頭頸部扁平上皮癌患者6名の手術切除標本の癌部および非癌部より得た組織試料を細切・培養し線維芽細胞を分離した後、全てのペアに対し以下の検討を行った。CAFsおよび非癌部のnormal fibroblasts (NFs)における各種表面抗原および α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現、免疫チェックポイントリガンドの発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。次に、CAFs・NFsにおけるサイトカイン遺伝子のmRNA発現をreal time qRT-PCRを用いて解析した。CAFs・NFsがT細胞増殖能に及ぼす影響について、CAFs・NFsもしくはそれらの培養上清を使ってCarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-based suppression assayにて解析した。さらにCAFs・NFsの培養上清存在下に健常成人の単核球を抗CD3/CD28抗体刺激下で培養し、CAFs・NFsのT細胞アポトーシス、制御性T細胞誘導に及ぼす影響について検討した。6例中3例のペアを用いてCAFs・NFsにおける遺伝子発現を網羅的に解析するためマイクロアレイ解析を行った。

結果

分離した線維芽細胞の表面抗原の発現を解析すると、CAFs・NFsともにCD11b(-), CD34(-), CD45(-), CD90(+)であり、線維芽細胞として矛盾しない結果であった。一方で、線維芽細胞の活性化の指標である α -SMAはCAFsにおいて高発現しており、頭頸部扁平上皮癌間質の線維芽細胞が活性化したmyofibroblastであることが確認された。続いて免疫チェックポイントリガンドの発現を解析すると、CAFsではPD-1受容体のリガンドであるPD-L1とPD-L2の発現を認めたが、NFsでは

認めなかった。real time qRT-PCR による解析では、*IL6*、*CXCL8*、*TNF*、*TGFBI*、*VEGFA*のmRNA発現がNFsと比較しCAFsで増強していた。単核球との共培養では、CAFsとその培養上清はNFsと比較してT細胞増殖抑制能、制御性T細胞誘導能、T細胞アポトーシス誘導能のいずれも有意に高かった。CAFとその培養上清下のT細胞増殖能は抗PD-L1抗体・抗PD-L2抗体及び抗TGF- β 抗体・抗VEGF抗体存在下に回復した。マイクロアレイ解析で得られた遺伝子発現データに対しパスウェイ解析を行ったところ、CAFsではNFsと比較し白血球の血管外遊走能およびパキシリンシグナル経路が亢進していた。

考察

癌微小環境における免疫抑制機構の構築には、癌細胞だけでなくCAFsも大きく関与していることを今回我々は解明した。頭頸部扁平上皮癌において、CAFsはPD-L1・PD-L2の発現、TGF- β ・VEGFの分泌によりT細胞増殖を抑制していると考えられた。TGF- β ・VEGFは制御性T細胞の誘導・維持に重要であることが報告されており、CAFsがこれらの分泌を通じて制御性T細胞を誘導していると考えられた。またCAFsで*TNF*のmRNA発現が亢進していたことから、CAFsより分泌されたTNF- α がT細胞アポトーシスの誘導に関与している可能性が示唆された。更に、CAFsが制御性T細胞のような免疫抑制機能をもつ白血球の腫瘍局所への集簇に関与している可能性が示唆された。

結語

頭頸部扁平上皮癌の癌微小環境では、CAFsはT細胞免疫を抑制することで癌の免疫逃避に寄与していると考えられた。