

# 論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	小野 翔矢
論文審査 委員氏名	主査 副査	長尾 徹 前田 初彦 野本 周嗣	
論文題名	口腔扁平上皮癌の CCR4 標的制御性 T 細胞 (Treg)除去療法に MEK1/2 阻害薬が与える細 胞傷害性 T 細胞(CTL)減少の緩和効果		

インターネットの利用による公表用

免疫チェックポイント阻害薬をはじめとするがん免疫療法は、がんに対する薬物療法を大きく変えた。しかし、口腔扁平上皮癌(OSCC)に対する効果は限定的である。近年、がん免疫療法の新たなターゲットとして、制御性 T 細胞(Treg)が注目されている。Mogamulizumab は抗 C-C chemokine receptor type4(CCR4)モノクローナル抗体で、Treg 除去療法の候補薬剤の一つである。しかし、固形癌を対象とした臨床試験では、ほとんど効果がみられなかった。この失敗の一因として、抗腫瘍活性を有する CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が除去されていることが示唆されている。本研究では、抗腫瘍免疫応答に重要な細胞傷害性 T 細胞(CTL)に焦点を当て、CCR4<sup>+</sup>CTL を保護する方法を検討した。

まず、本研究では、OSCC 組織中における CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の存在を、多重蛍光免疫染色とシングルセル RNA シークエンシングデータに基づくバイオインフォマティクス解析を用いて確認した。多重蛍光免疫染色で確認された CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の局在から、この細胞集団が腫瘍抗原を認識し活性化しているという仮説を立てた。そのため、ヒト OSCC 細胞株である HSC-3 にサイトメガロウイルス(CMV)pp65 抗原を導入した HSC-3pp65 と、健常人および OSCC 患者の末梢血単核細胞から誘導した CMV 抗原特異的 CTL(CMV-CTL)を共培養し、抗原提示プロセスを再現した。抗原刺激、サイトカイン刺激が CTL の CCR4 発現に与える影響を評価し、CCR4 発現に関連するシグナル伝達経路を予測した。さらに、予測されたシグナル伝達経路を阻害するチロシンキ

ナーゼ阻害剤が、CTL の CCR4 発現に影響するか評価した。また、これらのチロシンキナーゼ阻害剤が下流のシグナル伝達経路を阻害しているかどうか、ウェスタンブロットでリン酸化タンパク質を確認した。CCR4 発現の制御に有効であると考えられた MEK1/2 阻害薬を用いて、CTL の機能に与える影響を評価した。また、MEK1/2 阻害薬と抗 CCR4 抗体を併用した際の、CCR4<sup>+</sup>CTL の保護、Treg 除去への影響を検討した。

本研究で得られた知見は、以下の如くである。

多重蛍光免疫染色の結果、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は腫瘍抗原を認識し得る腫瘍蜂巢内および腫瘍周辺部に浸潤していた。また、シングルセル RNA シークエンシングデータを用いたバイオインフォマティクス解析の結果、腫瘍浸潤リンパ球中に *CCR4* mRNA を発現する CD8<sup>+</sup>T 細胞が存在することを確認した。しかし、CTL の活性化や疲弊に関わる免疫関連分子との相関は明らかでなかった。HSC-3pp65 と CMV-CTL の共培養モデルにおいて、特異的な抗原刺激は CTL の CCR4 発現を増加させ(3.14%から 29.0%、 $p = 0.012$ )、TGF- $\beta$ 1 は CCR4 発現を増強した(29.0%から 51.2%、 $p = 0.045$ )。また、MEK1/2 阻害薬である Trametinib は、TGF- $\beta$ 1 の投与の有無に関わらず CCR4 の発現を抑制した(TGF  $\beta$ 1 非添加群：29.0%から 6.98%、 $p = 0.045$ ；TGF- $\beta$ 1 添加群：51.2%から 11.4%、 $p < 0.001$ )。さらに、Trametinib は CTL に対して ERK1/2 のリン酸化を抑制した。CTL の機能について、Trametinib は CTL のサイトカイン産生を抑制したが、HSC-3pp65 に対する細胞傷害活性へ変化しなかつ

た。Trametinibによる細胞増殖抑制は、CTLよりHSC-3pp65に選択的に観察された。抗CCR4抗体は、抗原を認識しCCR4を発現したCTLを除去した。抗CCR4抗体とTrametinibを併用すると、TrametinibがCTLのCCR4発現を低下させるため、抗CCR4抗体によるCTL減少は緩和された。この結果、抗CCR4抗体単独と比較して、Trametinibの併用投与群ではCTLの細胞数が増加した。Tregに対しては、TrametinibによるCCR4発現抑制は認められず、抗CCR4抗体単独とTrametinib併用投与群でTreg除去率に変化はみられなかった。

本研究では、MEK1/2阻害薬であるTrametinibはCTLのCCR4発現を抑制することで、抗CCR4抗体によるCTL減少を緩和することを見出した。これは、OSCCに対するMogamulizumabの抗腫瘍効果を向上させるために、Trametinibがアジュバントとして有望であることを示すものである。よって、本研究は口腔外科学、口腔病理学、歯科病態関連外科学、および関連緒学科に寄与するところが大きく、博士(歯学)の学位授与に値するものと判定した。