

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

近藤 祐太郎

論文題目

口腔扁平上皮癌におけるトランスフォーミング
増殖因子 β の阻害は細胞傷害性 T 細胞の抗原特異的
反応を改善する

I. 緒言

トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) は、口腔癌を含む多くの癌種で発現の増加を認め、癌の浸潤・転移・予後不良などとの相関が報告されている。さらに近年の免疫療法の普及に伴い、腫瘍微小環境 (TME) 内の免疫細胞に対する TGF- β の作用についての関心が高まっている。免疫系における TGF- β の作用としては、forkhead box protein P3 (Foxp3) の発現促進による制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導、がん関連線維芽細胞の誘導、TGF- β /Smad3 経路による細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の増殖・機能の抑制などが知られている。免疫細胞のなかでも CTL は、プライミング期に抗原提示細胞によって誘導され、エフェクター期に抗原特異的に癌細胞を障害する直接的なエフェクター細胞であるため、TGF- β が CTL に与える影響についてさらなる解明が必要と考えられる。本研究では、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における抗原特異的 CTL のプライミング相とエフェクター相における TGF- β の作用に着目し、免疫抑制性の TME の形成における TGF- β の役割を明らかにすることを目的とした。

II. 実験材料および方法

1. 細胞培養

ヒト OSCC 細胞株 HSC-3 は、Japanese Collection of Research Bioresource Cell Bank から入手した。また、HSC-3 細胞にサイトメガロウイルス (CMV)

pp65 抗原と Td-Tomato を強制発現させた HSC-3pp65 細胞を調整した。

2. 解析対象患者

愛知学院大学顎顔面外科学講座で外科的切除を行った OSCC 患者のうち、術前に化学療法や放射線療法を受けていない 25 例を対象とした。標本が脱灰処理されていた場合には、術前の生検組織を使用した。

3. CMV-CTL およびエプスタイン・バーウイルス (EBV)-CTL の誘導

CMVpp65 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) および EBV LMP2 抗原特異的 CTL (EBV-CTL) を、健常成人の末梢血単核球 (PBMC) に HLA-A*24:02 CMVpp65 T-cell epitope peptides (QYDPVAALF aa 341-349)、HLA-A*02:01 CMVpp65 T-cell epitope peptides (NLVPMVATV aa 495-503) (いずれも MBL) または HLA-A*24:02 EBV LMP2 T-cell epitope peptides (TYGPVFMSL および PYLFWLA AI) (Thermo Fisher Scientific) を $1 \mu\text{M}$ 添加し誘導した。誘導時に、TGF- β 1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec) および SB525334 (TGF- β I 型受容体阻害剤、 $1 \mu\text{M}$, Selleck Chem) を添加し、抗原特異的 CTL の誘導に対する TGF- β 1 の効果を評価した。

4. フローサイトメトリー

抗原特異的 CTL 集団の解析のため、CMV-CTL は APC-HLA-A*24:02 CMVpp65 tetramer-QYDPVAALF または APC-HLA-A*02:01 CMVpp65 tetramer-NLVPMVATV

で、EBV-CTL は APC-HLA-A*24:02 EBV LMP2 tetramer-TYGPVFMSL + PYLFWLAAI (いずれも MBL) で細胞を染色後、APC-Cy7-抗 CD8 モノクローナル抗体 (mAb) (Biolegend) で染色した。

CTL のサブセット解析では、FITC-CD45 mAb (Biolegend) および BV421-抗 CCR7 mAb (Biolegend) を追加染色した。

CTL 増殖の解析では、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加後、抗原特異的 CTL を染色し、4%ホルムアルデヒドで固定した。その後、1% Triton X で細胞を透過させ、DNase を添加後に FITC-抗 BrdU 抗体 (Biolegend) で染色した。

培養液上清中の Tumor necrosis factor (TNF)- α および Interferon (IFN)- γ は、Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Biosciences) を用いて測定した。細胞は BD LSRFortessa (BD Biosciences) で測定し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star) で解析した。

5. 水溶性テトラゾリウム-1 (WST-1) による CMV-CTL の細胞毒性の測定

HSC-3pp65 細胞を 96-well plate に 10^4 個/well で播種し 2 日間培養した。その後、TGF- β 1、SB525334 および CMV-CTL を指定の濃度で添加し、100IU/ml の IL-2 および 5%ウシ胎児血清を添加した ALyS505N 培地 (細胞科学研究所) で 5 日間培養し、HSC-3pp65 細胞の生存率を測定した。生存率は、死細胞除去後に WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ) を使用し、

吸光度を iMark (Bio-RAD Laboratories) で測定した。

6. アネキシン V による CMV-CTL の細胞毒性の測定

HSC-3pp65 細胞を 24-well plate に 5×10^4 個/well で播種し、2 日間培養後、 10^5 個の CMV-CTL、TGF- β 1、TGF- β 3、SB525334 の存在下または非存在下で 48 時間共培養した。細胞を APC-HLA-A*24:02 CMVpp65 tetramer-QYDPVAALF および APC-Cy7-抗 CD8 mAb で染色し、アネキシンバッファー (10mM HEPES、150mM NaCl、2mM CaCl₂ [pH7.4]) で洗浄した。その後、FITC-アネキシン V 抗体で染色し、フローサイトメトリーで Tomato 陽性細胞集団におけるアネキシン V の陽性率を解析した。

7. 多重蛍光免疫組織化学染色 (MF-IHC)

OSCC 組織標本を脱パラフィン化し、Universal HIER antigen retrieval reagent (Abcam) で賦活化した。一次抗体は、CD3 (クローン M4622、Spring Biosciences)、CD8 (クローン 1A5、Biogenex)、Foxp3 (クローン 236A/E7、Abcam)、Ki-67 (クローン MIB-1、DAKO) およびサイトケラチン (Biogenex) を使用した。切片を peroxidase polymer 抗マウス IgG または抗ウサギ IgG (いずれも Vector Laboratories) と反応させ、TSA system および OPAL system (いずれも PerkinElmer) を用いてシグナルを検出した。

8. *TGFB1* RNA-*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

OSCC 組織標本中の *TGFB1* mRNA 発現を、RNAscope (Advanced Cell Diagnostics) を用いた RNA-ISH によって検出した。プローブは Hs-*TGFB1*-CDS、Hs-*POLR2A*、および *DapB* (Advanced Cell Diagnostics) を使用した。Hs-*POLR2A* はポジティブコントロールとして、*DapB* はネガティブコントロールとして使用した。発色は DAB を用いて行い、カウンター染色はヘマトキシリンで行った。

9. 画像解析

スライドを Vectra システムで低倍率スキャンし、腫瘍の浸潤先端部の関心領域 (ROI) を Phenochart ソフトウェアで選択した (いずれも Perkin Elmer)。3 つ以上の ROI を、MF-IHC では $\times 200$ 、RNAscope では $\times 400$ で撮影し、Inform ソフトウェア (Perkin Elmer) でマーカー陽性細胞数またはドットシグナル数をカウントした。染色パターンにより、CD8⁺T 細胞 : CD3⁺CD8⁺Foxp3⁻細胞、CD4⁺T 細胞 : CD3⁺CD8⁻Foxp3⁻細胞、Treg : CD3⁺CD8⁻Foxp3⁺細胞と定義した。

10. 統計解析

数値データは、独立した実験の平均値 \pm 標準誤差 (SE) として示した。2 群間では Student の t 検定を行った。RNA-ISH 解析では、Mann-Whitney U 検定および対応のある 2 標本 t 検定を行った。RNA-ISH 解析データと MF-IHC 解析データとの相関は、スピアマンの順位相関係数により求めた。統計解

析は R ソフトウェアを使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

III. 結果

1. TGF- β 1 は PBMC からの抗原特異的 CTL の誘導を阻害した

健常人の PBMC を T 細胞エピトープペプチドで刺激して CMV 抗原または EBV 抗原特異的な CTL を *in vitro* で誘導することで、プライミング期の腫瘍抗原特異的 CTL による免疫反応を再現した。TGF- β 1 は、CMV 抗原ペプチド刺激による PBMC からの CMV-CTL の誘導を抑制し、SB525334 による TGF- β シグナル伝達の阻害は TGF- β 1 による誘導抑制を回復した。ドナーの HLA を変更した場合、抗原を EBV に変更した場合にも同様の結果が得られた。これらの結果により、TGF- β 1 が抗原特異的 CTL の誘導を阻害することが示唆された。

次に、CMV-CTL のサブセットの推移を解析した。0 日目は、CMV-CTL の 50% がセントラルメモリー T 細胞 (TCM; CCR7⁺CD45RA⁻)、32.1% がエフェクターメモリー T 細胞 (TEM; CCR7⁻CD45RA⁻) であった。7 日目には、CMV-CTL の TCM 分画の割合は 18.6% に減少し、TEM 分画の割合は 57.1% に増加し、抗原ペプチド刺激による CMV-CTL の分化促進が示唆された。一方、TGF- β 1 を添加した場合の CMV-CTL の TCM 分画の割合は 82.5% に増加し、逆に TEM 分画の割合は 10.0% に減少し、CMV-CTL の分化阻害が示唆された。

2. TGF- β 1 はエフェクター期の抗原特異的 CTL の細胞障害活性と増殖を抑制した

CMV-CTL と HSC-3pp65 を共培養することで癌抗原特異的な細胞傷害活性を *in vitro* で再現し、エフェクター期の CTL に対する TGF- β の影響を検討した。WST-1 アッセイとアネキシン V アッセイの双方において、TGF- β 1 による CTL の細胞障害活性の抑制を認めた。また、TGF- β 1 の添加により TNF- α および IFN- γ 産生の抑制を認めた。さらに、TGF- β 1 による CMV-CTL の細胞増殖および BrdU 取り込みの抑制を認めた。SB525334 による TGF- β シグナル伝達阻害は、これらの機能抑制を解除した。

以上により、TGF- β はサイトカイン産生、増殖、DNA 合成を抑制し、CTL の細胞毒性を抑制することが示唆された。

3. OSCC 組織中の *TGFBI* mRNA の発現・分布と T 細胞浸潤との関係

RNA-ISH による *TGFBI* mRNA の発現と、MF-IHC による T 細胞浸潤を解析した。

TGFBI mRNA は、主に癌細胞の浸潤先端部に発現する傾向があり、その発現量は間質中よりも高かった ($p < 0.0001$)。また、*TGFBI* mRNA の発現は、隣接正常上皮細胞と比較して癌巣に多く認められた ($p < 0.0001$)。さらに、*TGFBI* mRNA 発現と CD8⁺T 細胞/Treg 比および CD8⁺Ki-67⁺ T 細胞数との間に有意な負の相関関係が認められた (それぞれ $p = 0.038$, $p = 0.041$)。

IV. 考察

1. TGF- β 1 による抗原特異的 CTL の機能抑制

OSCC 患者の遺伝子変異量は比較的高く、また、頭頸部癌では HPV ウイルスが発症に関連していることから、免疫療法を行う際にはネオアンチゲンやウイルス抗原などの腫瘍特異的抗原 (TSA) を標的とすることが合理的であると考えられる。本研究の *in vitro* の実験系は、CMVpp65 抗原を TSA に代替した人工的なものであるが、CMV-CTL の CMVpp65 抗原に対する親和性は、CTL の TSA に対する親和性と同様に高いため、生体内における TSA 特異的ヒト CTL による抗腫瘍免疫応答を反映していると考えられる。本研究では、*in vitro* で TGF- β がプライミング期とエフェクター期の双方で抗原特異的 CTL の抗腫瘍免疫応答を抑制することを明らかにした。TGF- β が T 細胞の機能を抑制することは一般的に知られているが、TGF- β によるヒト CTL の抗原特異的応答の抑制を示した報告は渉猟する限り本研究が初である。

2. OSCC 組織中の *TGFB1* mRNA の発現・分布と T 細胞浸潤との関係

OSCC 組織中の *TGFB1* mRNA の発現は主に癌の浸潤先端部に存在し、正常上皮と比較して高い発現を認めた。さらに、癌細胞は間質細胞よりも多くの *TGFB1* mRNA を発現しており、OSCC では浸潤先端部の癌細胞が TGF- β 1 の主要な供給源となり、免疫抑制的な TME の形成に寄与している可能性が示唆された。しかし、OSCC 組織には Treg の強い浸潤が観察されたため、Treg

も TGF- β の重要な供給源の1つと考えられる。OSCC 組織における TGF- β の発現の局在や、その機能の役割を明らかにするには、さらなる研究が必要と考えられる。

また、OSCC 組織中の CD8⁺ Ki-67⁺ T 細胞数は *TGFBI* mRNA の発現と逆相関しており、TGF- β 1 が組織内の CTL の増殖を抑制している可能性が示唆された。

さらに、癌巣内における CD8⁺ T 細胞/Treg 比と *TGFBI* mRNA の発現には負の相関関係を認めた。近年の研究では、TGF- β が CTL の腫瘍内への浸潤を抑制することが報告されており、また、CD8⁺ T 細胞/Treg 比の低下は癌の予後不良因子として知られている。これまでの研究では、TGF- β 阻害剤と抗 PD-1 抗体の併用や、抗 TGF- β 抗体とワクチン療法を併用することで、CD8⁺ T 細胞/Treg 比が増加し、単独療法よりも高い治療効果が得られることが報告されている。これらは、本研究結果を裏付ける報告であり、TGF- β の阻害は CD8⁺ T 細胞/Treg 比を増加させることで、抑制性の TME を改善する有用な治療法となる可能性が示唆された。

V. 結語

TGF- β がプライミング期およびエフェクター期の抗原特異的 CTL の機能を抑制することが明らかになった。さらに、TGF- β は CD8⁺ T 細胞/Treg 比を低下させることで、抑制性の TME を形成することが示唆された。これらの結果は、TGF- β の阻害が、免疫チェックポイント阻害剤とは異なるメカニ

(論文内容の要旨)

No. 10

愛知学院大学

ズムで免疫抑制性 TME を回復させることを示しており、これらの阻害剤の併用が OSCC の新たな治療戦略につながる可能性が示唆された。