

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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 $\beta$ 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

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は口腔がんの中で最も多い組織型であり、手術・化学療法・放射線療法による集学的治療が行われる。近年ではそれらに加えて、ニボルマブやペムブロリズマブなどの抗 programmed death receptor 1 (PD-1)免疫チェックポイント阻害剤が新たな治療薬として世界中で使用されている。しかしながら、その奏効率は約 10~20%程度にとどまっており、併用免疫療法などの新規治療法の発見が急務とされている。

トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) は、血管新生・幹細胞性・浸潤・上皮間葉転換を誘導することで腫瘍の成長を促進する多機能サイトカインである。TGF- $\beta$  の発現は口腔癌を含む多くの癌種で増加しており、癌の浸潤・転移・予後不良などとの相関が報告されている。また、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- $\beta$  の影響への関心も高まっている。免疫系における TGF- $\beta$  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- $\beta$ /Smad3 経路による細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の増殖・機能の抑制などがある。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 (APC) 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- $\beta$  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。最近の報告では、TGF- $\beta$ 1 が TME から CTL を排除することで、免疫抑制環境の形成を促進することが示されている。また、抗 PD-1 抗体療法不応性のメラノーマ患者では、TGF- $\beta$  シグナル関連遺伝子の発現スコアの上昇が報告されている。したがって、TGF- $\beta$  の阻害は TME の免疫抑制状態を解除し、抗腫瘍反応を高めることで有望な癌治療戦略となる可能性が考えられる。実際に、TGF- $\beta$  阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用による治療効果の増強が報告されており、頭頸部癌を含む進行性固形癌を対象とした臨床試験が現在進行中である。

本研究では、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- $\beta$  の作用に着目し、免疫抑制性の TME の形成における TGF- $\beta$  の役割を明らかにすることを目的とした。

## II. 対象および方法

### 1. 細胞培養

ヒト OSCC 細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4) は、Japanese Collection of Research Bioresource 細胞バンクから入手した。細胞は、10%ウシ胎児血清 (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) および 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 中で CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培養した。また、HSC-3 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 細胞は、上記培地に 250 $\mu$ g/ml の G418 を添加し培養した。

### 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 例のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を対象とした。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。腫瘍の病期は、Union for International Cancer Control (UICC) 第 7 版の TNM 分類を用いて決定した。Programmed death ligand 1 (PD-L1) の発現は、癌細胞上での陽性率によって評価した (5% ≧ を陽性と判定した)。本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、愛知学院大学歯学部倫理委員会 (承認番号: 82) および愛知医科大学倫理委員会 (承認番号: 2020-H033) の承認を得た。

### 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 (以下、CMV-CTL) および EBV LMP2 抗原特異的 CTL (以下、EBV-CTL) を、健常成人の末梢血単核球 (PBMC) から誘導した。誘導時に、TGF-β1 (10 ng/mL, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) および SB525334 (TGF-β I 型受容体阻害剤, 1 μM, Selleck Chem, Houston, TX, USA) を添加し、抗原特異的 CTL の誘導に対する TGF-β1 の効果を評価した。総生細胞数はトリパンブルー色素封入法を用いて算出し、CMV-CTL および EBV-CTL の細胞数を次の式に従って算出した。

(細胞数) = (総生細胞数) × (tetramer と CD8 の二重陽性率)

### 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 4°C、10 分間染色後、APC-Cy7-抗 CD8 モノクローナル抗体 (mAb) (Biolegend, San Diego, CA, USA) で 4°C、20 分間染色した。CTL のサブセット解析では、FITC-CD45 mAb (Biolegend) および BV421-抗 CCR7 mAb (Biolegend) を上記に追加で染色した。

CTL 増殖の解析では、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) を各サンプルに 10 μM 添加して 1 時間反応後、抗原特異的 CTL を上述のように染色し、4%ホルムアルデヒドで 4°C、30 分間固定した。その後、1% Triton X で 4°C、30 分間細胞を透過させ、200 倍に希釈した DNase を加え、37°C、30 分間反応させた。その後、1 回洗浄し、FITC-抗 BrdU 抗体 (Biolegend) で 4°C、30 分間染色した。

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, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて、製造者のプロトコールに従って測定した。細胞は BD LSRFortessa (BD Biosciences) で測定し、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Ashland, OR, USA) 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<sup>4</sup> 個/well で播種し 2 日間培養した。その後、TGF-β1、SB525334 および CMV-CTL を指定の濃度で添加し、100 IU/ml の IL-2 およ

び 5% FBS を添加した ALyS505N 培地で 5 日間培養し、HSC-3pp65 細胞の生存率を測定した。HSC-3pp65 細胞の生存率は、死細胞の除去後に WST-1 Cell Proliferation Assay System (タカラバイオ) で測定した。吸光度は、iMark マイクロプレートリーダー (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、波長 450nm および 620nm で測定した。細胞生存率は、以下の式に従って算出した。

細胞生存率 (%) = (実験 well の吸光度 - 培地単独 well の吸光度) / (HSC3pp65 単独 well の吸光度 - 培地単独 well の吸光度) × 100

#### 6. アネキシン V による CMV-CTL の細胞毒性およびアポトーシスの測定

HSC-3pp65 細胞を 24-well plate に  $5 \times 10^4$  個/well で播種し、2 日間培養後、 $10^5$  個の CMV-CTL、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3、SB525334 の存在下または非存在下で 48 時間共培養した。細胞は、APC-HLA-A\*24:02 CMVpp65 tetramer-QYDPVAALF および APC-Cy7-抗 CD8 mAb で 4°C、20 分間染色し、500  $\mu$ L のアネキシンバッファー (10mM HEPES、150mM NaCl、2mM CaCl<sub>2</sub> [pH7.4]) で 2 回洗浄した。その後、FITC-アネキシン V 抗体 (Biolegend) で室温で 10 分間染色し、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。細胞毒性は、次の式に従って算出した。細胞毒性 (%) = (実験 well のアネキシン V 陽性率 - HSC-3pp65 単独 well のアネキシン V 陽性率) / (100 - HSC-3pp65 単独 well のアネキシン V 陽性率) × 100

CMV-CTL のアポトーシスは、tetramer と CD8 の二重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. ウェスタンブロッティング

$10^6$  個の CMV-CTL を TGF- $\beta$ 1 (10ng/mL) を添加した培地、または HSC-3 細胞の培養上清中で 30 分間培養した。等量のサンプルを SDS-PAGE ゲルで泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。1% スキムミルクを含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体と反応させた。一次抗体は Smad2/3 および phospho-Smad2/3 (いずれも希釈濃度 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を使用した。その後、TBS で 4 回洗浄し、ペルオキシダーゼポリマー抗ウサギ IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 1:1000 希釈で 30 分間、室温で反応させた。TBS で 4 回洗浄した後、ECL Prime western blotting Detection Reagent (GE Healthcare Systems, Chicago, IL, USA) を用いてタンパク質のシグナルを検出し、Amersham Imager 600 (GE Healthcare Systems) を用いて画像化した。

#### 8. ELISA

OSCC 細胞株を 6-well plate に  $5 \times 10^5$  個/well/2ml で播種し 5 日間培養した後、上清を回収した。培養上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度を、Human TGF- $\beta$ 1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で測定した。

#### 9. 多重蛍光免疫組織化学染色 (MF-IHC)

ホルマリン固定パラフィン包埋 OSCC 組織標本を脱パラフィン化し、オートクレーブで Universal HIER antigen retrieval reagent (Abcam, Cambridge, England) 中で 110°C、10 分間賦活化させた。60°C まで冷却後、10mM トリス緩衝生理食塩水 (TBS) で 5 分間洗浄し、室温で 60 分間一次抗体による染色を行った。一次抗体は、CD3 (クローン M4622, Spring Biosciences, San Francisco, CA, USA)、CD8 (クローン 1A5, Biogenex, San Ramon, CA, USA)、Foxp3 (クローン 236A/E7, Abcam)、Ki-67 (クローン MIB-1, DAKO, Copenhagen, Denmark) およびサイトケラチン (Biogenex) を使用した。次に 5 分間の洗浄を 2 回行い、切片を peroxidase polymer 抗マウス IgG または抗ウサギ IgG (いずれも Vector Laboratories) と室温で 30 分間反応させた。5 分間 2 回洗浄した後、TSA システムおよび OPAL システム (いずれも PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いてシグナルを検出した。2 色目以降の染色に進む前には、切片を 10mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で 95°C、10 分間加熱し、結合した抗体を除去した。最後に核を DAPI で染色して封入した。

#### 10. *TGFBI* RNA-*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)

ホルマリン固定パラフィン包埋 OSCC 組織標本中の *TGFBI* mRNA 発現を、RNAscope (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA) を用いた RNA-ISH によって検出した。切片を 60°C で 60 分間加熱した後、脱パラフィン化し過酸化水素で室温で 10 分間反応させ、蒸留水で洗浄した。次に、切片を沸騰した target retrieval buffer 中で 25 分間反応させ、蒸留水で洗浄後、100%エタノールで脱水した。その後、切片を HybEZ hybridization oven (Advanced Cell Diagnostics) 中で 40°C、30 分間プロテアーゼ処理した。洗浄後に標的プローブを切片に添加し、オープン中で 40°C で 2 時間反応させた。プローブは Hs-*TGFBI*-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。続いて、Signal amplification reagents (AMP1-6 試薬、Advanced Cell Diagnostics) をそれぞれ 30 分、15 分、30 分、15 分、30 分、15 分と順次反応させた。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。

#### 11. 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 ×200、RNAscope では ×400 で撮影し、マルチスペクトル画像を Inform ソフトウェア (Perkin Elmer) で再構成し、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。MF-IHC の解析では、ソフトウェアでサイトケラチン染色により ROI を癌巣領域と間質領域に分離し、細胞の識別およびカウントを行った。染色パターンにより、CD8<sup>+</sup>T 細胞 : CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞 CD4<sup>+</sup>T 細胞 : CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞 Treg : CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞と定義した。RNA-ISH の解析では、ROI をマニュアルで癌巣領域と間質領域に分離し、ソフトウェアによりドット数をカウントした。Density

は、以下の式に従って算出した。

$$\text{Density} = (\text{細胞数またはドット数}) / \{\text{組織面積 (メガピクセル)}\}.$$

## 12. 統計解析

数値データは、独立した実験の平均値±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 (version 3.6.3; Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を使用し、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## III. 結果

### 1. TGF- $\beta$ 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 細胞エピソード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。

フローサイトメトリー解析の結果、ドナー 1 (HLA-A24) 由来の PBMC を CMVpp65 ペプチドで刺激すると、CMV-CTL の陽性率 (CD8 と A24-CMVpp65 tetramer 二重陽性細胞集団) が 0 日目の 0.01% 未満から 14 日目には 45.4% に増加した。TGF- $\beta$ 1 は、ペプチド刺激による CMV-CTL の陽性率の増加を抑制し、SB525334 による TGF- $\beta$  シグナルの阻害は抑制された陽性率を回復した。また、ペプチド刺激により、CMV-CTL の細胞数は 0 日目の 120 個から 14 日目には  $8.6 \times 10^5$  個と、約 7200 倍に増殖した。TGF- $\beta$ 1 は、CMV-CTL の 14 日目の細胞数を  $0.7 \times 10^5$  個と、約 1/12 に抑制した。SB525334 による TGF- $\beta$  シグナルの阻害は、CMV-CTL の 14 日目の細胞数を  $1.3 \times 10^6$  個に回復した。ペプチドと SB525334 を加えて培養した場合は、CMV-CTL の陽性率と細胞数はペプチド単独の場合よりも低かった。これは、SB525334 が tetramer 陰性の非特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞数を増加させたためと考えられた。ドナーを HLA-A2 に変更した場合、抗原を EBV に変更した場合にも同様の結果が得られた。これらの結果から、TGF- $\beta$ 1 は抗原特異的 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<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、32.1% がエフェクターメモリー T 細胞 (TEM; CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) 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、CMV-CTL の分化促進が示唆された。一方、TGF- $\beta$ 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。さらに、TGF- $\beta$ 1 と SB325334 を添加した場合は、CMV-CTL の TCM 分画および TEM 分画の割合は、TGF- $\beta$ 1 を添加していない場合と同等であった。これらの結果より、TGF- $\beta$ 1 が抗原特異的 CTL の TCM から TEM への分化を阻害することが示唆された。

## 2. TGF- $\beta$ 1 はエフェクター期の抗原特異的 CTL の細胞障害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- $\beta$  の影響を検討した。5 日間共培養すると、E/T 比 (Effector : CMV-CTL, Target : HSC-3pp65) 依存的な HSC-3pp65 の生存率低下を認めた。コントロールでは、E/T 比 0.125 で約 70% だった生存率が、E/T 比 1.0 では約 10% に低下を認めた。TGF- $\beta$ 1 の添加により、すべての E/T 比において HSC-3pp65 の生存率の増加を認め、CMV-CTL の細胞毒性の抑制が示唆された。

SB525334 の添加により用量依存的に細胞毒性が回復し、コントロールと比較して細胞毒性が増強された。さらに、TGF- $\beta$ 1 の外部からの添加がない場合でも、SB525234 によって HSC-3pp65 に対する細胞毒性が増強された。

次に、アネキシン V アッセイで CMV-CTL の細胞毒性を検討した。コントロールの細胞毒性は 77.1% であったが、TGF- $\beta$ 1 または TGF- $\beta$ 3 を添加した場合はそれぞれ 42.2%、39.4% に低下した。また、TGF- $\beta$  と SB525344 を添加した場合の細胞毒性はコントロールと同等であり、アネキシン V アッセイにおいても TGF- $\beta$  が CMV-CTL の抗原特異的な細胞傷害活性を阻害することが確認された。

また、HSC-3pp65 と CMV-CTL を E/T 比 1 で 24 時間共培養し、培養上清中の TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  の相対濃度を測定した。コントロールの TNF- $\alpha$  と IFN- $\gamma$  の相対濃度は、それぞれ 8400 と 78000 であったが、TGF- $\beta$ 1 の添加により、それぞれ 6000 と 56000 に減少し、SB525334 の添加によって回復した。また、SB525234 単独の添加によって、サイトカインの産生はコントロールより増強された。このことから、TGF- $\beta$ 1 は CMV-CTL のサイトカイン産生を抑制することが示唆された。

続いて、エフェクター期の CMV-CTL の増殖に対する TGF- $\beta$ 1 の作用を検討した。5  $\times$  10<sup>4</sup> 個の CMV-CTL を E/T 比 1 で HSC-3pp65 と共培養し、7 日目の CMV-CTL の細胞数をカウントした。コントロールでは約 4.5  $\times$  10<sup>5</sup> 個まで増加した一方、TGF- $\beta$ 1 を添加した場合は約 1.0  $\times$  10<sup>5</sup> 個に抑制され、SB525334 の添加によって約 3.5  $\times$  10<sup>5</sup> 個まで回復を認めた。これらの結果より、TGF- $\beta$ 1 が CMV-CTL の増殖を阻害することが示唆された。さらに、HSC-3pp65 と CMV-CTL を E/T 比 1 で 2 日間共培養し、CMV-CTL への BrdU の取り込みを調べた。フローサイトメトリー解析の結果、TGF- $\beta$ 1 または TGF- $\beta$ 3 を添加した場合の BrdU 陽性率はそれぞれ 30.2%、31.8% であり、コントロールの 39.3% よりも抑制された。TGF- $\beta$ 1 と SB525334、TGF- $\beta$ 3 と SB525334 を添加した場合の BrdU 陽性率は、いずれもコントロールと同等であった。抗原刺激前の CMV-CTL の BrdU 取り込みは 7.52% であった。これらの結果から、TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 3 は CTL の細胞周期の進行を抑制することが示唆された。

最後に、HSC-3pp65 と共培養した際の CMV-CTL のアポトーシス誘導を検討した。コントロールでは CMV-CTL のアネキシン V 陽性率は 18.8% であったが、TGF- $\beta$ 1 または TGF- $\beta$ 3 を添加した場合は、それぞれ 31.7% または 33.6% に増加した。SB525334 の存在下で TGF- $\beta$ 1 または TGF- $\beta$ 3 を添加した場合は、コントロールと同等の陽性率であった。これらの結果より、TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 3 は CTL のアポトーシスを誘導することが示唆された。

以上により、TGF- $\beta$  はサイトカイン産生や DNA 合成の抑制、アポトーシス誘導など、様々なメカニズムを介して CTL の細胞毒性や増殖を抑制することが示唆された。

#### 4. TGF- $\beta$ 1 と OSCC 細胞の培養上清による CMV-CTL 中の Smad2/3 のリン酸化

$5 \times 10^5$  個の OSCC 細胞 (HSC-2、HSC-3、HSC-4) を 2mL の培地で 5 日間培養し、培養上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度を測定したところ、それぞれ 2.2、1.7、4.2ng/mL であった。また、ウェスタンブロット解析により、TGF- $\beta$ 1 と HSC-3 細胞の培養上清によって CMV-CTL 中の Smad2/3 のリン酸化が確認された。よって、TGF- $\beta$ 1 を含まない SB525334 単独の添加による細胞傷害活性やサイトカイン産生の増強は、HSC-3pp65 が産生した TGF- $\beta$ 1 の影響が考えられた。以上の結果から、OSCC 細胞は TGF- $\beta$ 1 を産生し、CTL の細胞傷害活性を阻害することが示唆された。

#### 5. OSCC 組織における *TGFB1* mRNA の発現・分布と T 細胞浸潤の関係

RNA-ISH による *TGFB1* mRNA の発現と、MF-IHC による T 細胞浸潤を評価した。*TGFB1* mRNA は主に癌巣の先端部に発現する傾向があり、間質中よりも高い傾向を認めた。また、癌巣中の *TGFB1* mRNA の発現は、隣接正常上皮細胞よりも高い傾向を認めた。

次に、T 細胞の浸潤と癌巣中の *TGFB1* mRNA の発現を比較した。*TGFB1* mRNA の発現は、CD8<sup>+</sup> T 細胞および Treg の浸潤とそれぞれ負および正の相関傾向があったが、統計的には有意ではなかった。興味深いことに、*TGFB1* mRNA の発現と CD8<sup>+</sup> T 細胞/Treg 比には、有意な負の相関関係が認められた。さらに、CD8<sup>+</sup> T 細胞の Ki-67 発現を解析すると、CD8<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup> T 細胞数と *TGFB1* mRNA 発現との間に有意な負の相関関係を認めた。

### IV. 考察

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- $\beta$  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。これまでの研究では、マウスモデルで TGF- $\beta$  がグランザイム、パーフォリン、IFN- $\gamma$  の産生を抑制することで CTL のエフェクター機能を直接阻害することが報告されている。また、TGF- $\beta$ 1 がパーフォリンや IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  などの抗腫瘍性サイトカインの産生を阻害し、TGF シグナルの阻害が *in vitro* でキメラ抗原受容体 T 細胞の増殖と生存を改善することが報告されている。このように、TGF- $\beta$  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- $\beta$  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。

OSCC 組織における *TGFBI* 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、これまでの報告と一致していた。さらに、癌細胞は間質細胞よりも多くの *TGFBI* mRNA を発現しており、OSCC では浸潤先端部の癌細胞が TGF- $\beta$ 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- $\beta$  の重要な供給源の 1 つと考えられる。OSCC 組織における TGF- $\beta$  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、CD8<sup>+</sup> Ki-67<sup>+</sup> T 細胞数は *TGFBI* mRNA の発現と逆相関しており、TGF- $\beta$ 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<sup>+</sup> 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- $\beta$  が CTL の腫瘍内への浸潤を抑制することが報告されている。また、CD8<sup>+</sup> T 細胞/Treg 比の低下は、癌の予後不良因子として報告されている。興味深いことに、扁平上皮癌マウスモデルを用いた研究では、TGF- $\beta$  阻害剤と抗 PD-1 抗体を併用することで、CD8<sup>+</sup> T 細胞/Treg 比が増加し、抗 PD-1 抗体を単独で利用するよりも高い治療効果が得られることが報告されている。また、膵臓癌において、抗 TGF- $\beta$  抗体とワクチン療法の併用は、ワクチン療法単独と比較して治療効果や CD8<sup>+</sup> T 細胞/Treg 比が増加することが示されている。これらは、本研究結果を裏付ける報告であり、TGF- $\beta$  の阻害は CD8<sup>+</sup> 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。

しかしながら、これまでモノクローナル抗体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、TGF- $\beta$  関連ワクチン、受容体阻害剤など様々な TGF- $\beta$  阻害剤が過去 15 年以上にわたって臨床試験を行われてきたが、いずれも癌治療薬として承認されていない。その理由としては、TGF- $\beta$  の持つ腫瘍増殖の促進と抑制の、相反する作用が考えられる。現在、TGF- $\beta$  阻害剤を用いた治療法開発の方向性としては、併用に適した治療薬の特定や、TGF- $\beta$  阻害による治療効果が高い患者を選択するためのバイオマーカーの発見が挙げられる。TME における TGF- $\beta$  シグナルの増加は、予後不良や PD-1/PD-L1 阻害に対する抵抗性と相関しているため、例えば PD-L1 と TGF- $\beta$  の両方を阻害する Bintrafusp alfa (M7824) などの薬剤が OSCC の治療に適している可能性が考えられる。本研究の結果は、癌細胞における TGF- $\beta$ 1 および PD-L1 の発現や CD8<sup>+</sup> T 細胞/Treg 比が、このような治療法の実現における有用なバイオマーカーとなる可能性を示唆している。

本研究にはいくつかの制限が考えられる。本研究では OSCC 細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現を RNA-ISH で評価したが、TGF- $\beta$ 1 タンパクは生成後に細胞外マトリックスに結合するため、RNA-ISH では TGF- $\beta$ 1 タンパクの正確な局在を反映できていない可能性があるため、免疫組織化学的な検出が今後必要と考えられる。また、本研究はサンプル数の少ない後ろ向き研究であり、今後、より大きなサンプルサイズでの解析が望まれる。

## V. まとめ

(学位論文の内容を要約したもの)

No. 9

愛知学院大学

TGF- $\beta$  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- $\beta$  は CD8<sup>+</sup> 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- $\beta$  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。