



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1947号
学位記番号	第1377号
氏名	蓑原 潔
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Mature dendritic cells enriched in regulatory molecules may control regulatory T cells and the prognosis of head and neck cancer</p> <p>(制御分子に富む成熟樹状細胞は、制御性 T 細胞と頭頸部癌の予後をコントロールする可能性がある)</p> <p>Cancer Science, in press</p>
論文審査担当者	<p>主査： 稲垣 宏</p> <p>副査： 飯田 真介, 渋谷 恭之</p>

論文内容の要旨

<はじめに>

我々は以前、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)において、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞(Treg)が豊富であることを報告した。しかし HNSCC の腫瘍微小環境における拡大した Treg の役割は、依然として不明である。HNSCC に対する効果的な免疫療法の革新的な戦略を開発するためには、ユニークな腫瘍微小環境を理解することが不可欠である。

<材料と方法>

本研究のすべてのサンプルは、名古屋市立大学病院で採取した。HNSCC 腫瘍サンプルよりフローサイトメトリー解析、マスサイトメトリー解析、免疫組織化学染色を行った。また同サンプルの既発表バルク RNA-sequencing (RNA-seq)データを使用し再解析を行った。また公開データベース、The Cancer Genome Atlas (TCGA)を利用し、腫瘍の mRNA 発現と全生存率解析を行った。また公開シングルセル RNA-sequencing (scRNA-seq)データセット (GSE13932416, GSE10332217, GSE16469018)を利用し、解析を行った (Python, R 使用)。

<結果>

HNSCC の腫瘍微小環境を調べるために、まず TCGA で HNSCC と他癌の間で Treg および樹状細胞 (DC)に関連する遺伝子の発現を比較すると HNSCC で高値を認めた。またフローサイトメトリーでも HNSCC の腫瘍微小環境は成熟 DC に富んでいた。次に、HNSCC 患者を含む公開 scRNA-seq 解析を行うと cDC1、cDC2 とは違う第 3 の DC 集団が確認され、その高発現遺伝子は、過去の報告の制御分子に富む成熟樹状細胞 (mregDC)と一致し、mregDC と同定した。次に我々は、HNSCC 患者の転移性リンパ節において、移動性 DC 集団を発見し、mregDC の遺伝子発現と同様に CCR7 と IL7R のタンパク質発現が高いことを明らかにした。それは HNSCC の移動性 DC 集団は、mregDC を反映していると考えられた。そして、mregDC 高発現遺伝子と、以前に報告した HNSCC Treg の高発現遺伝子は強く相関していた。さらに mregDC と Treg の位置を調べるため、mregDC の高発現分子であった LAMP3 の免疫蛍光染色を行うと、LAMP3 高発現 DC が HNSCC の転移性リンパ節において FOXP3⁺Treg と密接に位置していた。これらの結果は、HNSCC の腫瘍微小環境において、mregDC が Treg 細胞の拡大に関与している可能性を示唆するものであった。

次に、mregDC において特異的である *IL12B* の発現に注目した。*IL12B* は、*IL23* と *IL12* のサブユニットを翻訳するため、HNSCC と他癌の間で *IL23A*、*IL12B*、*IL12A* の発現を比較した。その結果、HNSCC では他癌に比べ *IL23A* の発現が高く、*IL23A* の高発現群では予後延長していた。さらに HNSCC において *IL23A* と *IL12B* の両方を発現する細胞集団を公開 scRNA-seq で分析すると HNSCC の腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)の mregDC は *IL23A* と *IL12B* を高発現していた。したがって、mregDC は HNSCC の腫瘍微小環境において IL-23 を産生することで免疫状態を制御し、HNSCC の予後に寄与する重要な役割を担っている可能性が示唆された。

IL-23 は IL-17 産生において重要なサイトカインである。そこで TCGA で *IL17A* をはじめとした IL-17 関連遺伝子の発現を検討すると、HNSCC では他癌に比べて高かった。さらに *IL17A*、*IL17F* の高発現群では、HNSCC において予後延長を認めた。したがって、*IL17A*、*IL17F* の発現が豊富な HNSCC の腫瘍微小環境は良好な予後に関連しており、*IL12B* と *IL23A* を発現する mregDC は IL17 を誘導する役割を担っている可能性がある。

そこで *IL17A* を発現している細胞を調べるために、公開 scRNA-seq を検討すると、HNSCC TIL に

において *IL17A* の高発現が Th17 CD4⁺T 細胞と疲弊 CD8⁺T 細胞で主に検出された。また、フローサイトメトリーにおいても HNSCC TIL の T 細胞から *IL-17A* が産生されていることを確認した。これらの結果から、HNSCC の腫瘍微小環境における *IL17A* の高発現は、主に Th17 細胞や疲弊 CD8⁺T 細胞に対応することが示唆された。さらに、フローサイトメトリーで HNSCC のリンパ節において、疲弊 PD-1⁺CD8⁺T 細胞、Th17 細胞を確認した。したがって、腫瘍の微小環境における *IL17A* を発現する Th17 細胞および疲弊 CD8⁺T 細胞は、HNSCC の予後に寄与している可能性がある。

IL-17 の産生は腫瘍微小環境における乳酸によって誘導され、乳酸は解糖系の高い腫瘍微小環境において、Treg 上の PD-1 の発現を促進すると報告されている。TCGA において、解糖系に関連する *MYC* と *LDHA* が、HNSCC では他癌に比べて高発現していることを明らかにした。また Treg に発現する MCT1 は、乳酸を取り込み、Treg 細胞上の PD-1 の発現を促進するとされる。そのため、我々の HNSCC のバルク RNA-seq を解析すると、HNSCC の表面 CTLA-4⁺ Treg が、MCT1 をコードする *SLC16A1* を高発現していた。これらのことは、MCT1 を高度に発現した HNSCC からの表面 CTLA-4⁺ Treg が、乳酸を吸収し、HNSCC の腫瘍微小環境に影響を与えることを示唆している。

<結論>

HNSCC の腫瘍微小環境は Treg および IL-17 関連分子に富んだユニークなものであることを示した。Treg と mregDC の遺伝子シグネチャーの関連と密接な接触は、HNSCC の腫瘍微小環境における Treg に mregDC が重要な役割を果たすことを示唆している。注目すべきは、mregDC が *IL23A* と *IL12B* の両方を発現しており、HNSCC における IL-17 産生 T 細胞の誘導に寄与している可能性があることである。そして HNSCC の腫瘍微小環境では、IL-17 関連の炎症は増加した Treg によって微調整され、予後を良くしている可能性がある。mregDC をターゲットにして、IL17 産生細胞と Treg のバランスをコントロールすることは、HNSCC の免疫状態を制御する新しい戦略となるかもしれない。

論文審査結果の要旨

<背景・目的>頭頸部癌の腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫を明らかにすることは重要である。我々は以前、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)において、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞(Treg)が豊富であることを報告した。このような特徴的な腫瘍微小環境を作り出す要素として抗原提示細胞である樹状細胞(DC)に注目し、HNSCC の腫瘍微小環境における DC の特徴を明らかにすることを目的として研究を行った。

<材料と方法>本研究のサンプルは、名古屋市立大学病院で採取し、フローサイトメトリ解析、マスサイトメトリ解析、免疫組織化学染色、バルク RNA-sequencing (RNA-seq)解析を行った。また公開データである The Cancer Genome Atlas (TCGA)を利用し、腫瘍の mRNA 発現と全生存率解析を行った。また公開シングルセル RNA-sequencing (scRNA-seq)データを利用し、解析を行った。

<結果>データベースによる RNA 発現解析、サイトメトリ解析によるタンパク発現解析で HNSCC の腫瘍微小環境において制御分子に富む成熟樹状細胞(mregDC)を認め、これらは免疫組織化学染色で Treg と接していた。また Treg と mregDC の高発現遺伝子が高度に相関していた。よって mregDC が Treg 増加を誘導している可能性が考えられた。次にサイトカイン検討によって DC の機能解析を行った。TCGA において HNSCC は他癌に比べて *IL23A*, *IL17A* を高発現しており、また *IL23A*, *IL17A* 高発現群は予後延長を認めた。また scRNAseq で発現細胞を検討すると mregDC は *IL23A* を、Th17, 疲弊 CD8⁺ T 細胞は *IL17A* を高発現していた。つまり mregDC は IL-23 を産生し、effector T 細胞に IL-17 を産生させて HNSCC の予後を改善する可能性が考えられた。また特徴的な HNSCC の腫瘍微小環境を作り出す要因として乳酸について検討した。TCGA において HNSCC は他癌に比べて解糖系関連遺伝子 *MYC*, *LDHA* 高発現を認め、バルク RNA-seq において HNSCC の表面 CTLA-4⁺ Treg が、乳酸輸送体 MCT1 をコードする *SLC16A1* を高発現していた。つまり MCT1 を高度に発現した表面 CTLA-4⁺ Treg が HNSCC の亢進した解糖系から産生される乳酸を吸収し、腫瘍微小環境に影響を与えることを示唆していた。

<結論>HNSCC の腫瘍微小環境は Treg および IL-17 関連分子に富んだ特徴的なものであることを示した。今後 mregDC をターゲットにして、IL-17 産生細胞と Treg のバランスをコントロールすることは、HNSCC の免疫状態を制御する新しい戦略となるかもしれない。

<審査内容>主査の稲垣教授からは①TCGA データの対照群として選んだ癌腫の理由、②HPV ステータスやステージを分けた場合の解析、③免疫組織化学染色における“細胞間が close である”の定義や定量的な評価、④生存解析における P 値の統計学的意義と臨床的意義について、など含む 8 項目について質問がなされた。副査の飯田教授からは①TCGA データにおける患者の治療内容や変数について、②mregDC の *IL23A* 発現誘導機序について、③腫瘍の炎症惹起による予後改善のメカニズム、④今後の展望に対する方法や PDX モデル作成、など含む 8 項目について質問がなされた。副査の渋谷教授からは①転移リンパ節の意義や捉え方、②IL-17 の実際の予後に対する働き、③腫瘍をヌードマウスに移植した場合の考え、など含む 6 項目について質問がなされた。これらの質問に対し、おおむね適切な回答が得られ、学位論文の趣旨を十分理解していると判断した。本研究は HNSCC の DC を中心とした特徴的な腫瘍微小環境を明らかにしたものであり、頭頸部癌新規治療開発に対して医学的発展に寄与するものと考えられる。以上より、これら新しい知見を報告した本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 稲垣 宏 副査 飯田 真介、渋谷 恭之