



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1674号
学位記番号	第1191号
氏名	的場 拓磨
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	<p>Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer (細胞表面に CTLA-4 を多く発現した制御性 T 細胞は増殖性の遺伝子プロファイルを持ち、ヒトの頭頸部癌における鍵となる特徴である)</p> <p>International Journal of Cancer. 2018 DOI: 10.1002/ijc.32024. In press.</p>
論文審査担当者	主査： 稲垣 宏 副査： 飯田 真介, 村上 信五

論文内容の要旨

【背景】

制御性 T 細胞は転写因子である FOXP3 を発現し、様々な免疫応答を制御する。その中には抗腫瘍免疫も含まれる。制御性 T 細胞は、マウスのみならずヒトにおいても抗腫瘍免疫を抑制し、免疫治療の効果を減弱してしまうと報告されている。よって免疫治療を進展させるためにも、癌における制御性 T 細胞の特徴や機能を解明することが求められる。

頭頸部癌は、主に咽喉頭や口腔の扁平上皮癌であり、世界的に増加傾向にある。頭頸部癌に対する免疫治療は抗 PD-1 抗体によるものがすでに行われている。頭頸部癌は遺伝子異常が多く、抗原を提示して CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞を活性化することが知られている。しかしながら、免疫治療の効果をえられる患者は限られており、頭頸部癌において抗腫瘍免疫がどのように制御されているかを同定することは非常に重要な課題である。

細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4) は、制御性 T 細胞による免疫抑制において重要な分子であり、過剰な抑制を防ぐために CTLA-4 の制御性 T 細胞表面への発現は厳しく制御されている。細胞内の CTLA-4 が必要に応じて表面へ輸送されるが、すぐに細胞内へ取り込まれる仕組みとなっている。制御性 T 細胞の表面に発現した CTLA-4 は、樹状細胞上の CD80 や CD86 を減少させるという重大なメカニズムによって抑制能を示すと報告されている。制御性 T 細胞による抗腫瘍免疫の抑制には CTLA-4 が大きく関わっていると思われるが、ヒトの頭頸部癌において、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞の重要性は今までに検討されていない。そこで私たちは、ヒト頭頸部癌に浸潤する制御性 T 細胞、特に細胞表面に発現する CTLA-4 に着目して研究を行った。

【方法】

頭頸部腫瘍を有し、もしくはリンパ節腫脹があり、名古屋市立大学病院において生検もしくは手術を受ける症例を対象とした。倫理審査委員会で承認されたのち、文書による同意を得られた症例 26 例について解析を行った。標本が抽出されたらすぐに、病理診断に影響しない範囲で研究用に検体を採取し、そこからリンパ球を既存の方法で採取して凍結保存した。リンパ球は後日解凍して洗浄した後、フローサイトメトリーや RNA シークエンスによって解析を行った。

【結果】

今回私たちはヒトの頭頸部癌組織で、腫瘍に浸潤する制御性 T 細胞が増えていることを発見した。その中でも細胞表面に多く CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞がヒトの頭頸部癌組織において増殖していることを見出した。高いものでは CD4 陽性 T 細胞のうちの 60% にまで達する割合となっており、前述のように CTLA-4 は通常細胞内に存在するという報告を鑑みると、これは非常に興味深い結果である。よって私たちは細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞についてさらに詳しく検討を行うこととした。

私たちは解剖学的な複雑性や上気道という特殊な局在性から小さなサンプルしか採取できないヒトの頭頸部癌組織から、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞を純度良く採取し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行うことに成功した。遺伝子発現について、細胞表面に CTLA-4 を発現していない制御性 T 細胞や、conventional T 細胞との比較を行い、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定した。その結果、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞において、制御性 T 細胞に関係すると報告された遺伝子発現のみならず、今までに報告のない、細胞周期や細胞増殖、DNA 複製にかかわる遺伝子の発現が上昇していることを見出した。

実際に、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞は Ki-67 という増殖マーカーが陽性であり、また T 細胞受容体が活性化された制御性 T 細胞に特徴的である CD137 (4-1BB) を多く発現していた。つまり、おそらく頭頸部癌由来の腫瘍抗原に反応し、実際に腫瘍内で増殖していることが示唆された。さらに、頭頸部癌に浸潤する細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は、PD-1 も発現しているものが多かった。また、CD45RA と FOXP3 の発現で制御性 T 細胞は分画 1, 2, 3 に分けられるが、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は、強い抑制能を持つと言われている分画 2 の制御性 T 細胞と正の相関があった。

【まとめ】

以上のことから、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は頭頸部癌における鍵となる特徴といえる。私たちの研究成果から、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞を標的として頭頸部癌に対する免疫応答を効果的に活性化するような新たな治療戦略の開発につながる。

論文審査結果の要旨

【背景】 CTLA-4 は、制御性 T 細胞による免疫抑制において重要であり、過剰な抑制を防ぐために CTLA-4 の制御性 T 細胞表面への発現は厳しく制御されている。細胞内の CTLA-4 が必要に応じて表面へ輸送されるが、すぐに細胞内へ取り込まれる仕組みとなっている。本研究では、ヒト頭頸部癌に浸潤する制御性 T 細胞、特に細胞表面に発現する CTLA-4 に着目した。

【方法】 頭頸部腫瘍を有する症例 26 例について解析を行った。検体を採取後、そこからリンパ球を既存の方法で採取して凍結保存した。リンパ球は後日解凍して洗浄した後、フローサイトメトリーや RNA シークエンス解析を行った。

【結果】 ヒトの頭頸部癌組織で、腫瘍に浸潤する制御性 T 細胞が増加していることを認めた。中でも細胞表面に多く CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞がヒト頭頸部癌組織において増殖していることを見出した。高いものでは CD4 陽性 T 細胞のうちの 60%にまで達する割合となっていたため、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞についてさらに検討がなされた。ヒト頭頸部癌組織から、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞が純度良く採取され、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析に成功した。遺伝子発現について、細胞表面に CTLA-4 を発現していない制御性 T 細胞や、古典的 T 細胞との比較を行い、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定した。その結果、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞において、制御性 T 細胞に関係すると報告された遺伝子発現のみならず、今までに報告のない、細胞周期や細胞増殖、DNA 複製にかかわる遺伝子の発現上昇が認められた。実際に、細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞は増殖マーカーが陽性であり、また T 細胞受容体が活性化された制御性 T 細胞に特徴的である CD137 (4-1BB) を多く発現していた。これらは頭頸部癌由来の腫瘍抗原に反応し、実際に腫瘍内で増殖していることが示唆された。さらに、頭頸部癌に浸潤する細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は、PD-1 も発現しているものが多かった。また、CD45RA と FOXP3 の発現で制御性 T 細胞は分画 1, 2, 3 に分けられるが、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は、強い抑制能を持つと言われている分画 2 の制御性 T 細胞と正の相関があった。

【まとめ】 細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は頭頸部癌における重要な特徴と考えられた。この研究成果が、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞を標的とした免疫応答を効果的に活性化する新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

【審査の内容】 主査の稲垣教授より、CTLA-4 内在化の意義、CTLA-4 内在化のメカニズムなど 7 項目、第一副査の飯田教授からは、免疫染色解析の意義、抗 CTLA-4 抗体治療との関連など 7 項目、そして第二副査の村上教授からはたばこ、HPV との関連、ニボルマブの適応など 5 項目の質問がなされた。これらの質問に対して十分な回答が得られ、申請者は学位論文の趣旨を理解し専門領域の知識も有しているものと判断した。本論文で申請者らは、頭頸部癌において、制御性 T 細胞は細胞表面に CTLA-4 を発現していることを明らかにし、細胞表面 CTLA-4 は制御性 T 細胞に対する新たな治療戦略の標的である可能性を示した。以上より、審査委員会は申請者に対して博士（医学）の称号を与え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 村上信五