

氏 名	長谷川 雅 世
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 708 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	口腔扁平上皮癌の組織形態像に立脚した腫瘍微小環境についての研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 北山 丈二 (委 員) 教授 野口 忠秀 准教授 大西 康晴

論文内容の要旨

1 研究目的

口腔扁平上皮癌（OSCC）は高い局所再発と転移能を有する侵襲性の高い癌で、現行の治療による 5 年生存率は 50～60%と治療成績は不十分である。これまで、がん実質と間質から構成される腫瘍微小環境が、がんの悪性形質に強く影響することが示されている。近年では、癌細胞は間質細胞と相互作用し、あらゆる免疫抑制機構を利用することで、自己の進展に有利な微小環境を作り上げることが明らかになりつつある。OSCC において、免疫抑制機構を解除することを目的として抗 PD-1 阻害薬が臨床応用されるが、奏効率は低く、効果を予測するためのバイオマーカーや新たな治療標的分子の検索が課題となっている。これまで、腫瘍に浸潤するリンパ球等の免疫細胞やがん関連線維芽細胞（CAF）が予後因子となる可能性が議論されてきたが、結論は出ていない。

よって本研究では、OSCC の腫瘍微小環境における包括的な免疫学的性質を明らかにするとともに、新規免疫関連遺伝子/分子の同定をめざし、OSCC 切除標本を用いて組織学的な解析を行った。

2 研究方法

1. 新規の免疫関連遺伝子/分子の選定

TCGA と GEO データベースから得た OSCC のトランスクリプトームデータを解析し、2 つのデータセットに重複する発現変動遺伝子（DEGs）を抽出した。重複する DEGs と既知の免疫関連遺伝子（マクロファージ、T 細胞、制御性 T 細胞および免疫抑制系に関連）との相関分析を行い、OSCC に特異的な免疫関連遺伝子を同定した。

2. 病理組織学的検討

2010 年から 2021 年の間に、自治医科大学附属病院で外科的切除を受けた OSCC 新規治療症例の計 110 例を対象とした。切除標本にて、分化度（Grade）、深達度（pT）、所属リンパ節転移（pN）、浸潤の深さ（Depth of invasion）、腫瘍先進部の形態パターン（YK 分類）、脈管および末梢神経侵襲の有無（Ly, V, Neu）を評価した。また、浸潤先進部の腫瘍間質で Stromal pattern（SP）を評価し、Inflammatory, Mature, Intermediate, Immature type に分類した。さらに、腫瘍最深部の標本にて免疫細胞サブセット（CD3, CD4, Foxp3, CD8, CD20, CD68, CD163）、PD-L1, GBP5

(guanylate binding protein 5) について免疫組織化学染色を行った。免疫細胞については、浸潤先進部で、腫瘍と間質を含む代表的な 5 視野 (×200 倍) での陽性細胞数をカウントした。PD-L1 は、全腫瘍細胞に対する腫瘍細胞における発現率 (TC) または免疫細胞における発現率 (IC) >5% を陽性とした。GBP5 は、免疫染色の強度と範囲による半定量法で、腫瘍細胞での陽性スコア (GBP5 tumor スコア) と間質細胞での陽性スコア (GBP5 stromal スコア) を評価した。免疫組織化学染色の結果と臨床病理学的因子、予後との関連について解析を行った。

3 研究成果

TCGA と GEO の両データセットに重複する DEGs は 127 の upregulated DEGs と 193 の downregulated DEGs で、計 320 DEGs であった。既知の免疫関連遺伝子との相関分析から、ADAMDEC1, CXCL9, CXCL13, EPSTI1, GBP5, IDO1, PLA2G7 が、OSCC に特異的な免疫関連遺伝子として同定された。これらのうち、OSCC への染色性と免疫細胞浸潤との関連が組織学的に確認できた GBP5 を新規バイオマーカーの候補とした。

免疫細胞と臨床病理学的因子との関連では、上皮内癌および比較的小型の浸潤癌 (pTis から pT2) では、CD3, CD4, Foxp3, CD8, CD20 陽性細胞が多かった。比較的早期のステージ (pStage0-pStageII) と浅い浸潤 (DOI<10mm) では、CD3, CD4, Foxp3, CD20 陽性細胞が多かった。進行期 (pStageIII-pStageIV) で CD163 陽性細胞が多かった。SP の Immature type では、Inflammatory type に比べてすべての免疫細胞が少なく、免疫細胞における低い PD-L1 陽性率および間質細胞での GBP5 低発現と関連し、Immature type 以外の SP type と比べて overall survival (OS), recurrence-free survival (RFS) が短縮した ($p=0.019$, $p=0.007$)。PD-L1 の IC 陽性例は RFS が延長した ($p=0.042$)。腫瘍細胞および間質細胞での GBP5 スコアは全免疫細胞の陽性細胞数と関連した。GBP5 tumor スコアは TC 陽性例 ($p<0.001$) と IC 陽性例 ($p<0.001$) で高かった。GBP5 stromal スコアは IC 陽性例 ($p<0.001$) で高かった。GBP5 が腫瘍で低発現、間質で高発現する例は OS と RFS が延長した ($p=0.015$, $p=0.017$)。

4 考察

腫瘍への免疫細胞浸潤と臨床病理学的因子の相関から、進行期の腫瘍で T 細胞と CD20 陽性細胞が少なくなり、逆に CD163 陽性細胞は多くなる傾向があった。この結果は、癌が増大、進展するとともに宿主からの免疫逃避能を獲得し、腫瘍微小環境中の免疫学的性質が抑制性へと変化したことを示唆している。SP は、CAF による間質のリモデリングの結果観察される、組織学的な指標である。CAF は腫瘍の浸潤に関与するだけでなく、免疫調節能を有することも知られている。本研究結果から、SP 分類はこの両者を反映した予後マーカーであることが示唆された。また PD-L1 については、免疫細胞での PD-L1 発現のみ予後と関連したという結果から、腫瘍細胞と免疫細胞の PD-L1 は独立して制御され、それぞれ異なる機序で免疫抑制や予後に関与する可能性が考えられた。さらに、免疫関連分子として GBP5 を同定し、OSCC の微小環境中での免疫学的性質や予後に与える影響について検討した。既報と同様に、GBP5 の発現は豊富な腫瘍への免疫細胞浸潤と高い PD-L1 発現と相関したが、これは IFN- γ の誘導による結果であると考えられる。今回われわれは、OSCC における組織学的な GBP5 の発現と予後との関連をはじめて報告した。本研究

結果から、GBP5 が腫瘍と間質で微小環境に対して異なる働きをすることが推察され、予後あるいは治療効果に対する層別化に役立つ因子である可能性が示唆された。

5 結論

SP は, OSCC において CAF の浸潤能と免疫調整能の両者を反映する指標である可能性がある。本研究より、GBP5 は予後あるいは免疫チェックポイント分子阻害薬に対する治療効果予測のためのバイオマーカーとして有望視される分子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

研究内容

既知の 2 つのデータベースから、口腔扁平上皮癌(OSCC)における免疫関連遺伝子として GBP5 を同定した。自治医科大学附属病院で切除を受けた 110 例の OSCC コホートにて GBP5 が豊富な腫瘍への免疫細胞浸潤と高い PD-L1 発現と相関し、予後予測のバイオマーカーとなることを明らかにした。

学問的意義、新規性、独創性

独創性にはやや欠けるが、GBP5 の新たな臨床的意義、特に免疫チェックポイント分子阻害薬に対する治療効果予測になる可能性があるということが明らかとなった点に新規性がある。

問題点および改訂

BP5 に関する既知の事象や 110 例の患者群の臨床的背景が不明確なまま、結果、考察に進んでいるため、論文の形式として整えること、OSCC 組織における GBP5 の機能、特に癌細胞と間質での発現の違いなどの関する検討が十分とは言えないので、考察でふれること、などが指摘され、審査員から minor revision が要求された。

学位論文についての評価と可否の判断結果

改訂にて、審査員の指摘事項には適正に対応できていたため、英文論文が受理されることを前提として合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

質、量ともに学位として十分な内容であり、今後の研究についての展望も示すことはできていた。研究に関連する周辺領域の知識も十分であると思われ、質疑の内容を正しく理解し、適切な応答が出来ており、記載様式の変更など指摘された点に対する対応も良好で、研究能力及び科学的素養の点からも学位に値すると判断した。