

氏 名 むはんまど いるふあん らする
Muhammad Irfan Rasul

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 417 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目
Innate immune responses against oral squamous carcinoma
in an orthotopic murine model
(マウス口腔がんモデルを用いた自然免疫応答の解析)

論文審査委員

(主査)	教授	林	龍二
(副査)	教授	岸	裕幸
(副査)	教授	將積	日出夫
(副査)	准教授	山本	誠士
(指導教員)	教授	野口	誠

論 文 要 旨

論 文 題 目

Innate immune responses against oral squamous carcinoma in an orthotopic murine model
マウス口腔がんモデルを用いた自然免疫応答の解析

医学薬学教育部博士課程 生命・臨床医学専攻
総合口腔科学

氏 名 Muhammad Irfan Rasul

[目的]

Although immune checkpoint inhibition has been shown to be highly effective in patients with metastatic or advanced squamous cell carcinomas including oral cancer, the role of innate immune responses in controlling the progression of oral cancers is less understood. Therefore in this present study, I sought to explore the impact of the innate immune response, particularly Ly-6G⁺ myeloid cells, against orthotopically inoculated NR-S1-Luc cells tumor-bearing mice using bioluminescence imaging. Some studies reported TLR3 stimulation by dsRNA viruses or Poly I:C is able to activate some cytokines and able to stimulate innate immune cells to inhibit tumor growth.


[方法並びに成績]

In vitro experiment was performed to established luciferase-expressing of NR-S1 cells to generated NR-S1-Luc and proceed to make cell viability assay to both of cells using WST-8 analysis and our finding revealed growth of both tumor cell line is not different. Further, in vivo experiment was performed to compare orthotopically and subcutaneously inoculation NR-S1-Luc cells in murine model and demonstrated there is no significant differences in tumor growth between orthotopic and subcutaneous inoculation and flowcytometry analysis demonstrated Ly-6G⁺ myeloid cells are significantly more dominant than Ly-6C⁺ myeloid cells in both tumor and spleen either both in orthotopically and subcutaneously inoculation. Depletion of Ly-6G⁺ myeloid cells of orthotopic NR-S1-Luc tumor bearing mice did not affect to control tumor growth. In contrast, exogenous TLR3 stimulation significantly inhibited orthotopic NR-S1-Luc tumor growth in vivo along with significant increase in the mean fluorescence intensity (MFI) of Ly6C in Ly-6G⁺ myeloid cells in tumor, but not in spleen, in response to poly I:C treatment in flowcytometry analysis. To determine the role of Ly-6G⁺ myeloid cells in controlling orthotopic NR-S1-Luc tumor growth in poly I:C treated mice, depletion Ly-6G⁺ cells using anti-Ly6G mAb in combination with poly I:C treatment is performed. Along with the results shown, there was no obvious contribution of Ly-6G⁺ cells in controlling NR-S1-Luc tumor growth in naïve mice whereas poly I:C treatment significantly inhibited the growth of NR-S1-Luc tumor. Importantly, the depletion of Ly-6G⁺ in poly I:C treated mice impaired partly the anti-tumor effect of poly I:C

[結論]

Exogenous TLR3 stimulation could transform Ly-6G⁺ myeloid cells into innate antitumor immune cells in an OSCC mouse model. In addition, TLR3 stimulation suppresses orthotopic NR-S1-Luc tumor growth partly through Ly-6G⁺ myeloid cells-dependent mechanism.

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	Muhammad Irfan Rasul
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 准教授	氏 名 林 龍二 岸 裕幸 將積 日出夫 山本 誠士	
指導（紹介）教員	教 授	野口 誠	
(論文題目 英文の場合は和訳，日本文の場合は英訳を付記すること) Innate immune responses against oral squamous carcinoma in an orthotopic murine model (マウス口腔がんモデルを用いた自然免疫応答の解析)			(判定) 合格
(論文審査の要旨)			
[目的]			
<p>口腔がんを含む転移性ないし進行型扁平上皮癌に対して免疫チェックポイント阻害が有効であることが示されてきたが、口腔がんの進行を抑えることにおいて自然免疫が果たす役割はよくわかっていない。一方、頭頸部癌を含む腫瘍の微小環境においてCD11b⁺Ly-6G⁺の骨髄由来細胞がしばしば異常集積しており、好中球と類似の形態を示す多核骨髄由来抑制細胞 (polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells PMN-MDSC) あるいは腫瘍関連好中球 (tumor-associated neutrophils TAN) と同定されている。さらに、前臨床試験においてdsRNAあるいはPoly I:CによるTLR3の刺激がサイトカイン誘導や自然免疫細胞を刺激することにより腫瘍の増殖を抑えたとする報告がある。こうした背景からRasul氏は本研究において、生物学的蛍光イメージングを用いたNR-S1-Luc細胞をマウス口腔内に移植し、Ly-6G⁺ myeloid cellsを主体とした自然免疫応答の役割について調べることを目的とした。</p>			
[方法並びに成績]			
<p>Rasul氏はマウス口腔扁平上皮癌細胞株であるNR-S1細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、NR-S1-Luc細胞を樹立した。また、WST-8解析にてNR-S1-Luc細胞株は親細胞株と変わらない増殖を示すことを確認し、NR-S1-Luc細胞をマウスの口腔及び皮下に移植し両部位での増殖に差がないことも確認した。両移植部位から採取された</p>			

細胞のフローサイトメトリー解析では Ly-6G⁺ myeloid cells が Ly-6C⁺ myeloid cells よりも有意に増加していることが示され、これは腫瘍組織、脾臓両部位に同様に見られた。抗 Ly-6G 抗体単独による Ly-6G⁺ myeloid cells 除去を行ったが腫瘍増殖に影響は見られなかった。対照的に poly I:C による外因性 TLR3 刺激では NR-S1-Luc 腫瘍増殖を有意に抑制し、同時に腫瘍内の Ly-6G⁺ myeloid cells において Ly-6C mean fluorescence intensity (MFI)の上昇があった。しかし、この増加は脾臓では見られなかった。Rasul 氏は Poly I:C 刺激による腫瘍コントロールにおける Ly-6G⁺ myeloid cells の役割を調べるために poly I:C と抗 Ly-6G 抗体の同時投与を行った。この結果、poly I:C による腫瘍抑制効果は Ly-6G⁺ myeloid cells の除去により部分的に抑制された。以上から、Poly I:C による外因的 TLR3 刺激は Ly-6G⁺ myeloid cells を介して腫瘍の増殖抑制効果を示すことが示唆された。

[総括]

Rasul氏は腫瘍免疫において意義があまり解明されていない自然免疫の役割に注目し、ルシフェラーゼを導入した蛍光イメージング口腔がんモデルマウスを用いた実験を行った。実験結果ではPoly I:Cによる外因性TLR3の刺激が腫瘍増殖を抑制することが示された。この機序には、Ly-6G⁺ myeloid cellsが重要であり、TLR3シグナルが腫瘍免疫抑制性と考えられる Ly-6G⁺ myeloid cellsを抗腫瘍性の自然免疫細胞へと転換させ得ることが示唆された。今回の実験結果はがん治療の改善、特に、骨髄由来細胞によるがん免疫療法という新たな道を開くものである。

以上のことからRasul氏は口腔がんモデルマウスにおいてPoly I:CによるTLR3刺激がLy-6G⁺ myeloid cellsを介して腫瘍抑制効果を示すことを初めて明らかにした点は新規性があり、自然免疫の抗腫瘍効果を示したという点から医学における学術的重要性も高く、TLR3シグナル経路の重要性を示した点から臨床的発展性が期待できるものと判断される。以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。