



|              |                                                                               |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 口腔癌における細菌叢と腫瘍内免疫プロファイル                                                        |
| Author(s)    | 加島, 佳奈                                                                        |
| Citation     | 大阪大学, 2025, 博士論文                                                              |
| Version Type | VoR                                                                           |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/101538">https://doi.org/10.18910/101538</a> |
| rights       |                                                                               |
| Note         |                                                                               |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 （ 加 島 佳 奈 ）

論文題名 口腔癌における細菌叢と腫瘍内免疫プロファイル

## 論文内容の要旨

## 【緒言・目的】

口腔癌は全癌の約2%、頭頸部癌の40%を占め、扁平上皮癌がその90%以上を占める。治療法の進展にも関わらず、5年生存率は依然として低く、新規治療法の開発が急務である。近年、全身疾患と細菌叢と腫瘍微小環境との関連性が大きな注目を集めており、悪性腫瘍においては*Fusobacterium*や*Prevotella*などの嫌気性菌を筆頭に腫瘍浸潤細菌叢が腫瘍内免疫プロファイルに影響することが明らかとなってきた。腫瘍免疫環境はCD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞といったTリンパ球を中心とした腫瘍浸潤リンパ球で構成される。CD8<sup>+</sup> T細胞は抗腫瘍免疫の中心的役割を担うが、その活性状態により腫瘍排除能や患者予後が大きく異なる。一方、制御性T細胞は免疫抑制機能を有し、腫瘍免疫を抑制することで予後不良と関連することが報告されている。これらは従来の免疫組織化学や末梢血フローサイトメトリーによる解析では限界があり、新鮮腫瘍組織から抽出した腫瘍浸潤リンパ球を用いた詳細な解析が求められる。

当研究遂行講座では以前より、腫瘍組織内における細菌叢と局所免疫環境の関連性を研究対象としており、大腸癌において腫瘍に浸潤する*Fusobacterium*が制御性T細胞の浸潤頻度に影響することを報告している。そこで我々は、腸内と並んで豊富な細菌叢が存在する口腔に着目した。口腔扁平上皮癌は、腫瘍へアプローチしやすいという利点を持つにもかかわらず、腫瘍浸潤細菌叢と腫瘍内免疫プロファイルの関連性を解析した報告は極めて少ない。

本研究では、口腔扁平上皮癌における細菌叢を16S rRNAシーケンシングにて解析し、新鮮腫瘍組織から腫瘍浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーにて解析することで、細菌叢、腫瘍免疫環境、臨床病理学的因子や患者予後との関連を包括的に評価し、口腔内細菌叢が抗腫瘍免疫に与える影響や患者予後への影響を分析することを目的とした。

## 【方法】

2022年1月から2023年5月までに当科で根治手術を施行した23例の口腔扁平上皮癌一次症例を対象とした。

細菌叢解析の試料採取は、腫瘍表面、腫瘍深部、正常口腔粘膜部、糞便の4部位にて行った。腫瘍表面と正常口腔粘膜部（腫瘍対側）は手術時に滅菌綿棒にてスワブした。腫瘍深部は摘出新鮮検体を滅菌メスにて擦過した。糞便は手術前3日以内に試料採取した。各試料より細菌DNAを精製し、16S rRNAシーケンス法にて細菌叢を解析した。

腫瘍内免疫プロファイルは、新鮮腫瘍組織から免疫担当細胞を精製し、T細胞の活性化・疲弊化状況について、複数の免疫マーカー（CD45、CD3、CD4、CD8、PD-1、FOXP3等）を用いてフローサイトメトリーにて解析した。

各試料における細菌叢解析結果と臨床病理学因子の関連性を評価し、さらに腫瘍内免疫プロファイルへの影響を解析した。

## 【結果】

全例で細菌叢検出が可能であった。細菌叢の多様性について、試料内の菌種の多様性を示す $\alpha$ 多様性は、腫瘍表面および腫瘍深部において正常粘膜部より有意に高かった。便も同様であったが、便と腫瘍サンプル間では有意差はなかった。試料間の菌種の多様性を示す $\beta$ 多様性では、便サンプルは腫瘍および正常粘膜と構成が大きく異なり、細菌叢構成は採取部位より個人間での相違が大きかった。

腫瘍表面の細菌叢をクラスタリングすると、相同性により嫌気性菌優位群と好気性菌優位群に分類された。嫌気性菌優位群は好気性菌優位群と比較して、腫瘍サイズ、腫瘍浸潤深度、Stageが進行しており、白血球数や好中球リンパ球比が高値であった。また嫌気性菌優位群は再発率が高く、生存期間が有意に短かった。

細菌叢と腫瘍免疫プロファイルの関連性を解析すると、嫌気性菌優位群ではCD8<sup>+</sup> T細胞におけるPD-1<sup>+</sup> Tim3<sup>+</sup> 発

現が好気性菌優位群より有意に高頻度であり、終末分化疲弊T細胞の増加が示唆された。

個々の細菌属の採取部位間への影響を調べるため、今回検出された254属でLEfSe解析を行った。嫌気性菌優位群では細菌A・細菌B・細菌Cの構成頻度が上位を占め、好気性菌優位群では細菌Dの構成頻度が高かった。腫瘍表面と正常口腔粘膜部の比較では、腫瘍表面では細菌A・細菌B・細菌Cが上位を占め、正常口腔粘膜部で細菌Dが多かった。腫瘍表面と腫瘍深部のLEfSe解析では、腫瘍深部で細菌Aが多く、腫瘍表面で細菌Dが多かった。そこで、A・細菌B・細菌Cと細菌Dの比率を用いて嫌気性細菌スコアを設定したところ、嫌気性細菌スコア高値群は進行症例、腫瘍浸潤深度の深い症例、頸部リンパ節転移症例が多く、無再発生存期間が有意に短かった。これらを裏付けるように、嫌気性細菌スコア高値群では腫瘍浸潤免疫細胞におけるCD8<sup>+</sup>T細胞中のPD-1<sup>+</sup>Tim3<sup>+</sup>の頻度が高かった。

#### 【考察】

本研究では、口腔扁平上皮癌の腫瘍表面および深部から採取した細菌叢を正常粘膜と比較し、腫瘍部で有意に高いα多様性を観察した。本結果は、腫瘍周辺の細菌叢に関する過去の報告と一致しているが、生検組織や唾液サンプルを用いた他の報告とは異なる点もあり、採取方法が結果に影響を与える可能性が示唆された。β多様性においては、口腔内と腸内で顕著な相違が観察された。口腔内と腸内の細菌叢は、pH、酸素濃度、栄養素供給などの異なる環境因子の影響を受けて、異なる生態系として機能している可能性が示された。腸内細菌叢が炎症反応や免疫制御を通じて口腔癌の予防や進行に寄与する可能性もあり、腸内微生物移植（FMT）が将来的な癌治療において有望な手段となることが期待される。

腫瘍表面から得られた細菌群集データをクラスタリングすると、嫌気性菌優位群と好気性菌優位群に分類された。嫌気性菌優位群で優位に検出された細菌A・細菌B・細菌C、好気性菌優位群で優位に検出された細菌Dは、口腔扁平上皮癌に特異的に関連しており、予後を規定する因子として機能する可能性が示唆された。さらに、腫瘍表面において、嫌気性菌優位群では疲弊したCD8<sup>+</sup>T細胞の構成頻度が有意に高く、予後不良と関連することが示唆された。細菌がT細胞の疲弊化を引き起こして腫瘍免疫を減弱させる可能性があり、このメカニズムは他の癌種でも観察されている。

細菌A・細菌B・細菌Cおよび細菌Dの比率を用いて設定した嫌気性細菌スコアが、腫瘍の進行度や予後と関連した。本結果は、口腔扁平上皮癌の腫瘍表面の細菌叢を利用した簡便な予後予測法の開発に寄与し、将来的なスクリーニングや治療法の開発に繋がる可能性がある。

本研究の限界としては、サンプル数が少なく、単一施設でのデータに基づいている点が挙げられる。今後は多施設での大規模な検討が必要であり、腫瘍内細菌叢の機能的解析をより精緻に行うべきである。ショットガンメタゲノム解析や細菌シングルセルゲノム解析など、さらなる技術革新を活用することで、口腔扁平上皮癌における細菌叢と予後との関連性をより深く理解し、治療戦略の向上に応用していく。

#### 【結語】

口腔扁平上皮癌における細菌叢解析では、腫瘍部は正常部よりα多様性が高く、個人間でβ多様性が高かった。嫌気性菌の優位性は、腫瘍進行度に関連し、不良な予後、疲弊した腫瘍免疫細胞状態に関連した。さらに特徴的な4種の細菌属を同定することができ、これら4菌種による嫌気性細菌スコアを設定したところ、高スコアを示す症例群では、不良な予後および疲弊した腫瘍免疫細胞状態に関連した。今回の研究結果から、口腔扁平上皮癌症例の治療計画を立てる上で嫌気性細菌スコアが一定の指標となるのみならず、術前においても口腔内細菌叢環境の改善による局所免疫環境の改善、腫瘍免疫の増強、再発の抑止、そして最終的に患者予後の改善を期待できる可能性が示された。今後、口腔内細菌叢をターゲットとしたプロバイオティクス、さらには菌移植などに応用することで、抗腫瘍免疫を増強し、腫瘍進行を抑制し、口腔癌患者の転帰を改善する新たな治療戦略に繋がることを期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 加島佳奈 ) |     |     |      |
|--------------|-----|-----|------|
|              | (職) | 氏 名 |      |
| 論文審査担当者      | 主 査 | 教授  | 鵜澤成一 |
|              | 副 査 | 教授  | 豊澤悟  |
|              | 副 査 | 准教授 | 波多賢二 |
|              | 副 査 | 講師  | 山下元三 |

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、口腔扁平上皮癌における細菌叢、腫瘍免疫環境、臨床病理学的因子の関連性を包括的に解析し、口腔内細菌叢の抗腫瘍免疫や患者予後への影響を分析した。その結果、腫瘍部は正常部と比べて細菌叢構成が多様であり、腫瘍部細菌叢が嫌気性菌優位である症例のほうが腫瘍免疫状態の疲弊化がみられ、予後不良であることが明らかとなった。また、特異的に検出された4種の細菌属の比率による嫌気性細菌スコアを設定し、本スコアが予後予測に有用であることを示した。本研究結果から、口腔内細菌叢環境の改善を通して局所免疫環境の改善、腫瘍免疫の増強、さらに患者予後の改善に繋がる可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。