

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	松井 健作
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 口腔癌患者における腸内ならびに口腔内細菌叢の多様性解析			
論文審査担当者			
主査	教授	高橋 一郎	印
審査委員	教授	菅井 基行	
審査委員	講師	林堂 安貴	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p><b>【研究目的】</b>  ヒトの腸管内には約 1000 種類，総数 100 兆個に及ぶ腸内細菌が共存しており，腸内細菌叢は実質的な臓器とも呼ばれている。腸内細菌が産生する代謝産物は全身の代謝系や免疫系に影響を与えており，腸内細菌叢の細菌種の構成の異常(dysbiosis)は癌や種々の疾患の発症，進展に関与していることが明らかにされつつある。また，口腔常在菌叢は歯周病やう蝕などの感染症に関与するだけでなく，腸内細菌叢や全身疾患との関連性が指摘されてきているが，その詳細は不明の点が多い。一方，申請者の所属する研究室では，口腔癌患者が治療期間中に発酵食品を摂取することで肝機能障害予防効果や予後改善効果が得られることを明らかにしてきた。</p> <p>本研究では，口腔扁平上皮癌(OSCC)患者の口腔ならびに腸内細菌叢と，癌免疫や臨床病態との関係を明らかにするために，OSCC 患者および健常人の口腔ならびに腸内細菌の <i>16SrRNA</i> 遺伝子の Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析を行った。さらに，癌微小環境における癌免疫様態を明らかにするために，OSCC 組織における免疫チェックポイント関連分子 Programmed cell death-ligand 1 (PD-L1)，および PD-1 の発現を免疫組織学的に検討し，臨床病態や生存率との相関について明らかにした。また，PD-L1/PD-1 発現と細菌叢との関連性について検討し，相関性を示した細菌群が産生する短鎖脂肪酸の扁平上皮癌細胞における <i>PD-L1</i> 遺伝子ならびに蛋白発現に及ぼす影響について検討した。</p> <p><b>【研究方法】</b>  2001 年 1 月から 2013 年 9 月までの間に広島大学病院顎・口腔外科にて主として外科的治療を行なった OSCC 患者 210 例のうち，試験切除標本に対して免疫組織学的解析が可能であった 72 例を対象に，PD-L1，PD-1 の発現と汎 T 細胞マーカー CD3 および細胞障害性 T 細胞マーカー CD8 の発現を免疫組織学的に検討した。また，PD-L1，PD-1 発現をそれぞれ陽性群と陰性群に，CD3，CD8 発現をそれぞれ High 群と Low 群に分類し，これら分子の発現と臨床病態因子や生存率との関係を検討した。</p> <p>2016 年 11 月から 2017 年 9 月までの間に広島大学病院顎・口腔外科で加療を行った OSCC 患者 18 名(平均年齢 65 歳，男性 10 名，女性 8 名)および健常人 8 名(平均年齢 60.7 歳，男性 4 名，女性 3 名)を対象に，臨床研究「口腔癌患者と健常人における腸内細菌叢ならびに口腔内細菌叢の比較検討(疫受-1979)」および「ケフィアの摂取による口腔癌患者の口腔細菌叢ならびに腸内細菌叢の変動と臨床経過に関する臨床研究(許可番号 C-102)」にもとづき同意を得た後，未治療時に口腔内プラークと大便を採取し，T-RFLP 法による細菌叢解析を行った。また，上記患者の生検 OSCC 組織における PD-L1 および PD-1 の発現を免疫組織学的に検討し，腸内ならびに口腔内細菌叢との関連性を検討した。</p> <p>上記検討で関連性が明らかとなった癌患者で特徴的な口腔ならびに腸内細菌群が産生する短鎖脂肪酸である，コハク酸，酢酸，プロピオン酸および酪酸の無血清培養下での扁平上皮癌細胞株 A431 における <i>PD-L1</i> 遺伝子ならびに蛋白発現に及ぼす影響を定量 PCR 法，Western blotting 法および蛍光免疫染色法で検討した。</p>			

#### 【結果】

口腔扁平上皮癌 72 例中、PD-L1 陽性群は 22 例、陰性群は 50 例であった。5 年生存率はそれぞれ 55.5%、80.3%で、PD-L1 陽性群は陰性群に比べ有意に予後不良であり、PD-L1 陽性群における CD8 陽性 T 細胞数は陰性群のそれと比較して有意に低下していた。一方、PD-1 陽性群と陰性群ならびに CD3 および CD8 発現の High 群と Low 群では 5 年生存率に有意差は認められなかった。一方、PD-1 陽性細胞数と CD3 および CD8 陽性細胞数の間には正の相関を認めた。

OSCC 患者群 (18 名) と健常人群 (8 名) における口腔および腸内細菌叢の主成分分析の結果、健常人群と OSCC 患者群の口腔および腸内細菌叢は異なる菌叢構造を有していた。さらに、PD-L1 および PD-1 の発現と細菌叢の相関を検討した結果、PD-L1 陽性群では腸内細菌叢の *Clostridium* subcluster XIVa の占有率が有意に高く、PD-1 陽性群では腸内細菌叢の *Clostridium* cluster IV、および口腔内細菌叢の *Parvimonas* の占有率が有意に高いことが明らかとなった。

A431 細胞における *PD-L1* 遺伝子および蛋白発現は、プロピオン酸 (1.0mM) および酪酸 (0.5mM) により促進された。

#### 【考察】

口腔癌患者の腸内ならびに口腔内細菌叢の菌叢構造は、健常人のそれらと異なるクラスターを示し、*dysbiosis* の状態であることが明らかとなった。また、OSCC 組織における PD-L1 の発現は予後不良因子と考えられ、PD-L1 陽性群においては腸内細菌叢の *Clostridium* subcluster XIVa の占有率が有意に高いことが明らかになった。さらに、これら細菌叢が産生する短鎖脂肪酸は培養扁平上皮細胞における *PD-L1* の発現を促進したことから、臨床病態や予後に影響を与えていることが示唆され、口腔癌の発症や病態における疾患特異的な腸内および口腔内細菌叢の重要性が明らかとなった。

癌微小環境における宿主の免疫能と癌細胞の免疫逃避システムとのバランスは、細菌叢を介して制御されている可能性が示唆されたことから、これら細菌叢を標的とした新たな癌治療の可能性が考えられた。

本論文は癌研究および口腔外科学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	松井 健作
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 口腔癌患者における腸内ならびに口腔内細菌叢の多様性解析			
最終試験担当者			
主査	教授	高橋 一郎	印
審査委員	教授	菅井 基行	
審査委員	講師	林堂 安貴	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年12月20日の第8回広島大学研究科発表会（歯学）及び平成30年2月9日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p>			
<ol style="list-style-type: none"> <li>1 口腔癌患者におけるPD-L1発現と生活習慣の関連性について</li> <li>2 口腔癌組織におけるPD-L1およびPD-1発現とCD3およびCD8発現との関連性について</li> <li>3 メタゲノム解析でなくTRFLP法を用いた理由とそれらの特徴と相違について</li> <li>4 口腔癌患者で特徴的な口腔内細菌叢と発がんとの関連性について</li> <li>5 口腔内細菌による口腔癌におけるPD-L1発現との関連性について</li> <li>6 細菌由来毒素の口腔癌治療や予後への影響について</li> <li>7 酪酸によるがん細胞におけるPD-L1発現亢進のメカニズムについて</li> <li>8 デンタルプラークの採取方法について</li> <li>9 口腔癌患者と健常人間で口腔内および腸内細菌叢が異なっている原因について</li> <li>10 細菌叢の変化が口腔癌患者の予後に及ぼす影響について</li> <li>11 現在までに報告されている口腔癌の予後マーカーについて</li> </ol>			
<p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			