

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10798

研究課題名(和文) 単球系細胞とHLA-Gを標的とした頭頸部癌に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Novel immunotherapy targeting monocyte and HLA-G for head and neck cancer

研究代表者

坂倉 浩一 (Sakakura, Koichi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40400741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 癌患者における末梢血中の単球の動向は未だ不明であり、本研究では頭頸部癌患者の単球の亜群の動向を明らかにするため、癌患者の単球の発現分子を調べ、腫瘍組織の免疫染色を行った。

その結果、癌患者ではIntermediate monocyteの比率が低下し、免疫抑制性分子の発現が増えていた。さらに癌患者のIntermediate monocyteは未熟であり、それが予後不良因子に相関することが分かり、単球の制御が新たな免疫療法のターゲットとなり得ることが示唆され、それは試験管内の実験でも確認できた。

この成果は国内外の学会で報告され、現在英文国際誌に投稿中である。

研究成果の概要(英文)： Roles of circulating monocytes in patients with cancer have been still unclear. This study investigated expressions of molecules in monocytes and primary tumors in head and neck cancer patients to elucidate features of monocyte subsets.

As a result, proportion of Intermediate monocyte was decreased and expressions of immunosuppressive molecules was increased in cancer patients. Moreover, Intermediate monocyte was immature in patients with cancer, and that was associated with unfavorable prognosis. These results suggest that control of monocyte may be a novel target of cancer immunotherapy, and were also confirmed in vitro experiments. A part of the results have been reported in scientific meetings, are ready to submit to an international journal.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 単球 HLA-G PD-L1 Intermediate monocyte CD16 CD51 MFG-E8

1. 研究開始当初の背景

単球はマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞の、末梢血中における前駆細胞である。近年単球はその CD14 と CD16 の発現によって、3 つのサブセットに分かれることが明らかになり、特に CD16 陽性の Intermediate / nonclassical monocyte は、炎症性サイトカインを分泌したり血管新生を促したりして、炎症の中心的な役割を果たすことが明らかになってきた。さらには血管壁の脂質代謝や動脈硬化、に参与することが注目を浴びているが、癌患者における末梢血中の単球の役割は、未だ明らかになっていない。

さらに癌細胞に多く発現している免疫抑制性分子 HLA-G の受容体が、CD16 陽性単球に発現する ILT2/ILT4 であることが分かっており、これら癌細胞上の免疫抑制性分子と単球が抗腫瘍免疫応答に深く関与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

癌患者、特に頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血における、単球サブセットの動向やその分子発現プロファイルを明らかにする。またそれらと原発巣の腫瘍組織の分子発現や血管新生との関係を調べる。

それらによって最終的に、単球をターゲットとした免疫療法の可能性を模索する。

3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌症例 54 例と、非癌症例 24 例の末梢血単核球を分離し、multi-color flow cytometry にて単球のサブセットを解析し、さらにそれぞれの分子発現を調べた。以下の分子発現を調べた：

抗原提示分子：HLA-A/B/C・HLA-DR・HLA-G

免疫抑制性受容体：ILT2・ILT4・PD-L1

血管新生因子：Tie-2・MFG-E8・CD51(Integrin α V chain)

成熟マーカー：CD68・CD163・CCL2・CX3CR1・slan

一方、原発巣のパラフィン包埋検体の HLA-G と MFG-E8 の免疫組織学的染色を行い、また CD34 染色による腫瘍血管の密度(MVD: mean vessel density)を測定した。

また *in vitro* study として、健康人末梢血から分離された単球を、頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC-4・Gun-1 と共培養し、発現分子の変化を調べた。

4. 研究成果

癌患者では CD14+CD16-Classical monocyte の比率が非癌患者と比べて減少し、CD14+CD16+ Intermediate と CD14^{dim}CD16+ Nonclassical monocyte の比率が増加していた。また Intermediate monocyte の HLA-G 発現が著明に増加していたが、HLA-G の受容体 ILT2・ILT4 は有意な変化は見られず、また原発巣の HLA-G 発現とも相関は見られなかった。Intermediate monocyte では "Eat me signal"

である MFG-E8 の受容体である CD51 (Integrin α V chain)の発現が増加していた。このように癌患者においては Intermediate monocyte の機能が重要であることが示唆された。

さらに全てのサブセットにおいて、免疫抑制性分子 PD-L1 の発現が増加しており、がん患者の単球に免疫抑制機構が働いていることが分かった一方で、免疫療法の新たなメカニズムを見出した。

一方で *in vitro* でも同様の検討を行い、頭頸部癌細胞株と健康人由来の単球を 3 日間共培養したところ、単球のほとんどが Intermediate monocyte に分化した。さらに Intermediate monocyte 上の HLA-DR の発現が優位に低下し、HLA-A/B/C も低下する傾向を認め、また患者検体の解析同様 CD51 の増加を認めた。

原発巣の HLA-G、MFG-E8 発現と血管新生の指標である MVD を調べたが、末梢血の単球における発現分子や臨床病理因子との有意な発現は認められなかった。すなわち予想に反して、原発巣の HLA-G はその受容体である単球上の ILT2/ILT4 発現と相関せず、また血管新生因子かつ食食促進因子である MFG-E8 発現は、単位面積当たりの新生血管数(MVD)や単球上の受容体 CD51 発現と相関しなかった。

さらに臨床病理因子と、末梢血中単球のパラメータとの関係を調べた。単球の成熟マーカーである CX3CR1 の発現は、神経浸潤・再発・死亡と有意に関係し、同じく成熟マーカーの HLA-DR は患者死亡に相関した。

またログラック検定により、Intermediate monocyte の HLA-A/B/C 発現と disease free survival (DFS)が相関し、また Nonclassical の ILT2 や CX3CR1 が DFS や overall survival (OS) が有意に相関を示した。さらに Classical と Intermediate monocyte の成熟マーカーの CD68 と CD163 は、DFS と OS に相関した。

以上の結果の一部は国内外の学会で発表され、多くの反響を呼んでいる。現在最終報告を英文でまとめ、Clinical Cancer Research 誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)(全て査読あり)

Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, et al.

CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma.

Head Neck. 2015 Nov;37(11):1569-74. doi: 10.1002/hed.23797.

Sakakura K, et al.

Immunological significance of the accumulation of autophagy components in

oral squamous cell carcinoma.
Cancer Sci. 2015 Jan;106(1):1-8. doi: 10.1111/cas.12559.
Yokobori Y, Toyoda M, Sakakura K, et al. (18)F-FDG uptake on PET correlates with biological potential in early oral squamous cell carcinoma.
Acta Otolaryngol. 2015 May;135(5):494-9. doi: 10.3109/00016489.2014.969385.
Nikkuni O, Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, et al.
Expression of Amino Acid Transporters (LAT1 and ASCT2) in Patients with Stage III/IV Laryngeal Squamous Cell Carcinoma.
Pathol Oncol Res. 2015 Sep;21(4):1175-81. doi: 10.1007/s12253-015-9954-3.
Takahashi H, Sakakura K, et al.
Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma.
Cancer Immunol Immunother. 2015 Nov;64(11):1407-17. doi: 10.1007/s00262-015-1742-0.
Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Shino M, Sakakura K, et al.
Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in adenoid cystic carcinoma.
Acta Otolaryngol. 2016;136(1):1-7. doi: 10.3109/00016489.2015.1083120.
Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Imai H, Sakakura K, et al.
Prognostic significance of GRP78/BiP expression in patients with Stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma.
Neoplasma. 2016;63(3):477-83. doi: 10.4149/319_151002N513.
Takahashi H, Sakakura K, et al.
Dynamic changes in immune cell profile in head and neck squamous cell carcinoma: Immunomodulatory effects of chemotherapy.
Cancer Sci. 2016 Aug;107(8):1065-71. doi: 10.1111/cas.12976.
Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Mori K, Shino M, Sakakura K, et al.
Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in patients with tongue cancer.
Neoplasma. 2016;63(4):588-94. doi: 10.4149/neo_2016_412.
Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Imai H, Sakakura K, et al.
Decreasing expression of glucose-regulated protein GRP78/BiP as a significant prognostic predictor in patients with advanced laryngeal squamous cell carcinoma.
Head Neck. 2016 Oct;38(10):1539-44. doi: 10.1002/hed.24471.
Sakakura K, et al.
Relationship between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression in

squamous cell carcinoma of the head and neck in the tumor microenvironment.
Lab Invest. 2016 Sep;96(9):994-1003. doi: 10.1038/labinvest.2016.70.
Takahashi H, Sakakura K, et al.
Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages.
Oncotarget. 2017 Jan 31;8(5):8633-8647. doi: 10.18632/oncotarget.14374.
Kawada T, Takahashi H, Sakakura K, et al.
Circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Feasibility of detection and quantitation.
Head Neck. 2017 Nov;39(11):2180-2186. doi: 10.1002/hed.24893.
Motokawa Y, Kokubo M, Kuwabara N, Tatematsu KI, Sezutsu H, Takahashi H, Sakakura K, et al.
Melanoma antigen family A4 protein produced by transgenic silkworms induces antitumor immune responses.
Exp Ther Med. 2018 Mar;15(3):2512-2518. doi: 10.3892/etm.2018.5703.
坂倉浩一「頭頸部癌患者における骨髄系細胞の動向と制御」**頭頸部癌** 2017;43(3):345-8.
坂倉浩一「免疫チェックポイント分子と頭頸部癌における骨髄系細胞の動向」**耳鼻咽喉科免疫アレルギー** 2017;35(4):287-90.
〔学会発表〕(計 18 件)
Sakakura K, et al. Relation between tumor-associated macrophage subsets and CD47 expression on oral squamous cell carcinoma.
The Joint Meeting of 4th Congress of Asian Society of Head and Neck and 39th Japanese Society for Head and Neck, 2015.
Sakakura K, et al. Possible relation between tumor-associated macrophage (TAM) subsets and CD47 expression on squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) in tumor microenvironment.
International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophage 2015.
Sakakura K, et al. Imbalance of circulating monocyte subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.
107th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2016.
Sakakura K, et al. Immunological and clinicopathological significance of MFG-E8 expression on oral squamous cell carcinoma.
6th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic

Societies, 2016 Annual Meeting of American Head and Neck Society.
___ Sakakura K, et al. Papillary thyroid carcinoma shows immunologically more suppressive features than anaplastic thyroid cancer.
86th Annual Meeting of the American Thyroid Association, 2016.
___ Sakakura K, et al. Pretherapeutic Parameters and Functional Prognosis of Dysphagia in Chemoradiotherapy for Oropharyngeal Cancer.
25th Dysphagia Research Society, 2017.
___ Sakakura K, et al. Features of circulating monocyte subsets in head and neck cancer.
International Federation of Oto-rhino-laryngological Societies ENT World Congress Paris 2017.
___ Sakakura K, et al. Immunological characteristics of circulating monocyte subsets in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.
2nd International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer, 3rd International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer, 2018.
___ 坂倉浩一他「腫瘍微小環境における tumor-associated macrophage (TAM)と CD47 発現との関係」
第 33 回日本耳鼻咽喉科免疫・アレルギー学会(2015)
___ 坂倉浩一他「中咽頭癌の化学放射線療法における摂食・栄養パラメータと白血球分画との関係」
第 21 回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会(2015)
___ 坂倉浩一他「Significance of differential white blood cell counts on dietary/nutritional parameters in oropharyngeal cancer patients with concomitant chemoradiation」
第 70 回日本癌学会(2015)
___ 坂倉浩一他「頭頸部癌患者末梢血の単球サブセットの変化」
第 13 回日本免疫治療学研究会(2016)
___ 坂倉浩一他「口腔癌における MFG-E8 発現と免疫学的・臨床病理学的因子との相関」
第 40 回日本頭頸部癌学会(2016)
___ 坂倉浩一他「甲状腺乳頭癌と未分化癌細胞株における免疫系分子発現の相違」
第 59 回日本甲状腺学会(2016)
___ 坂倉浩一「免疫チェックポイント分子と頭頸部癌における骨髄系細胞の動向」
第 35 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(2017)
___ 坂倉浩一他「舌癌組織におけるマクロファージ関連分子の発現とオートファジー作用/免疫細胞浸潤との相関」
第 118 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会

(2017)
___ 坂倉浩一「頭頸部癌における骨髄系細胞の動向と新規免疫療法」
第 116 回日本耳鼻咽喉科学会群馬県地方部会学術講演会(2017)
___ 坂倉浩一「頭頸部癌患者における骨髄系細胞の動向と制御」
第 41 回日本頭頸部癌学会(2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://jibika.med.gunma-u.ac.jp/~main_contents/?page_id=245

http://jibika.med.gunma-u.ac.jp/~main_contents/?page_id=31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂倉 浩一 (Sakakura, Koichi)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40400741

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()