

令和元年6月14日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10806

研究課題名(和文) 炎症性がん微小環境を考慮した樹状細胞による頭頸部がん免疫化学療法の新規開発

研究課題名(英文) Development of dendritic cell-based cancer chemoimmunotherapy in head and neck cancer to target inflammatory tumor microenvironment

研究代表者

増山 敬祐 (MASUYAMA, Keisuke)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：30181663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌を対象とした低用量抗がん剤併用の樹状細胞を用いたがん免疫療法において、未熟樹状細胞のフェノタイプや機能へ与える低用量ドセタキセルの影響を解析した。低用量ドセタキセルで処理した頭頸部癌細胞上清中で培養した未熟骨髄細胞の生存率は増加し、IL12AやIL12Bなど炎症性サイトカインの発現上昇およびIL12 p70産生を増加させることができた。さらに低用量ドセタキセル併用腫瘍周囲未熟骨髄細胞局注療法を施行した頭頸部癌患者では、末梢血中のeffector T細胞の有意な上昇を認め、一方、制御性T細胞の低下を認めていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して樹状細胞を用いたがん免疫療法において低用量ドセタキセルを併用することにより、効率的に未熟骨髄細胞の機能や生存を高めることがわかった。一般的に樹状細胞療法に限らずがん免疫療法は現在単独使用されている背景があり、本研究は、その効果を高めるため既存の抗がん剤を組み合わせることが可能であることをサポートする内容である。これらが応用されれば頭頸部癌治療において効果的ながん免疫療法開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Influences of low-dose docetaxel (DTX) on cellular markers or immunological functions of immature dendritic cells (iDCs) in head and neck cancer (HNC) were examined. Compared to conditional supernatant (CS) from DMSO control- or high-dose-DTX treated HNC cells, the CS from low-dose DTX-treated HNC cells increased cell viability of iDCs, and enhanced IL12A and IL12B gene expressions and production of IL-12 p70 in iDCs. Furthermore, effector T cells were significantly increased in the peripheral blood mononuclear cells from HNC patients who were treated by low-dose DTX and injected iDC in peritumoral region. regulatory T cells also decreased in those patients. These data suggest that low-dose DTX contribute to activation of iDCs in HNC.

研究分野：樹状細胞療法

キーワード：樹状細胞療法 低用量抗がん剤 頭頸部癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、画像診断技術の進歩やスクリーニング概念の広がりによって、がんが早期で発見される頻度も多くなってきたが、頭頸部がんでは未だに約半数は進行期で診断されるという現状がある。手術手技の進歩や新規抗がん剤の開発にも関わらず進行がんの5年生存率は40%以下とここ数年大きく改善されていない。これら進行がんに対して既存の外科的手術、放射線療法、化学療法の大きな3つの柱となる治療に次ぐ治療法として免疫療法が注目されている。免疫療法の一つに樹状細胞(DC)療法がある。樹状細胞は非常に強力な抗原提示能を持ち、腫瘍由来抗原を取り込んで所属リンパ節に移動し、ナイーブCD8+T細胞を活性化することでCTL誘導・活性化する。その結果CTLががん細胞を認識し抗腫瘍効果を発揮する。現在、腫瘍抗原ペプチド刺激によるDC療法や腫瘍関連抗原を遺伝子導入しワクチン担体として生体に投与するがんワクチン療法など精力的に研究されているものの、腫瘍特異的抗原が限局されるため適応が限られ、さらに頭頸部がんを対象とした樹状細胞療法の報告は少ない。我々の施設では2011年度から樹状細胞を用いた標準治療抵抗性再発頭頸部がん患者に対するがん免疫化学療法に関する第1相臨床試験を開始している。本臨床研究の特徴としてターゲットとするがん抗原を限定せず、低用量化学療法によって局所のがん抗原を増やした後、直接腫瘍本体に樹状細胞を打ち込むことでin vivoにおいて樹状細胞ががん抗原を取り込み、抗原プロセッシング、そしてがん抗原提示を狙うことにある。しかしながら樹状細胞療法の抗腫瘍効果については満足できるところには達しておらず、頭頸部がんにおける樹状細胞の機能制御メカニズムを解明することでより効果の高い治療法開発への応用へとつながると考えられる。最近、海外でEGFR阻害剤であるCetuximabを用いた頭頸部がん治療において、cetuximab誘導NK細胞の活性化が樹状細胞の成熟化およびCD8+T細胞のプライミングを促進するという報告(RM. Srivastava et al. [Clin Cancer Res.](#) 2013. 19(7):1858-72.)が出ており、cetuximabの併用が当科がん免疫化学療法における樹状細胞の局所での成熟化を増強できる可能性もある。

### 2. 研究の目的

進行頭頸部がんを対象に、低用量抗がん剤による化学療法と樹状細胞局所投与による免疫細胞療法を併用した新規頭頸部がん免疫化学療法について、臨床応用を進める中で安全性の確立と、それと同時にさらなる治療効果改善を目指し、炎症性がん微小環境由来のEMT誘導因子(IL-6やTGFβなど)と樹状細胞の機能制御メカニズムとの関連を免疫学的手法、遺伝工学的手法を用いて進めていく。さらに、頭頸部がん発がんマウスモデルを作製し、in vivoにおいて樹状細胞を対象とした腫瘍免疫と炎症性がん微小環境およびそこから誘導されるEMTとの関連を明らかにし、進行頭頸部がんにおける第4の治療法としての樹状細胞を用いたがん免疫化学療法のさらなる確立を目指す。

### 3. 研究の方法

まずヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株(HSC4、Ca9-22)を用いて、低用量ドセタキセル(DTX)の未熟骨髄細胞への影響を調べた。HLA-A24を発現しているHSC4細胞とCa9-22細胞をDMSO、3.125μMおよび12.5μMの異なる濃度のDTXで24時間培養してその培養上清を回収。その培養上清をコンディショニングメディアム(CS)として使用した(図1)。未熟骨髄細胞はHLA-A24を持つ健常人より末梢血単核球分画(PBMC)を採取、37度、60分間フラスコで培養し底面に付着した細胞分画を回収し1000 U/ml GM-CSFと1000 U/ml IL-4を含むAIM-V培地で5日間培養することで作成した。



図1

#### (1) iDCへの低用量DTXの影響の解析

前述の方法で作成したiDCsをDMSO、低用量DTX、高用量DTX処理後のHSC4- or Ca9-22-CSで24時間培養しフローサイトメトリーを用いて培養後の細胞の生存を解析した。

#### (2) 低用量DTXのiDC表面マーカーへの影響

24時間培養後のiDCsの細胞表面マーカーの変化に関してフローサイトメトリーを用いて解析した。CD11c、CD80、CD86、HLA-DRにて未熟骨髄細胞を同定した。各分子の発現量はMFIで評価比較した。

#### (3) 低用量DTXのiDCの機能への影響

24時間培養後のiDCsよりtotal RNAを回収しRT-qPCR法にて*IL12A*、*IL12B*、*TNF*遺伝子発現を調べた。*GAPDH*をhousekeeping遺伝子として用いた。発現解析は2-ΔΔCt法で解析比較した。さらにiDCsの培養上清を用いてIL-12p70濃度をELISAにて調べた。

#### (4) OK432の低用量DTX処理iDCsの成熟過程への効果

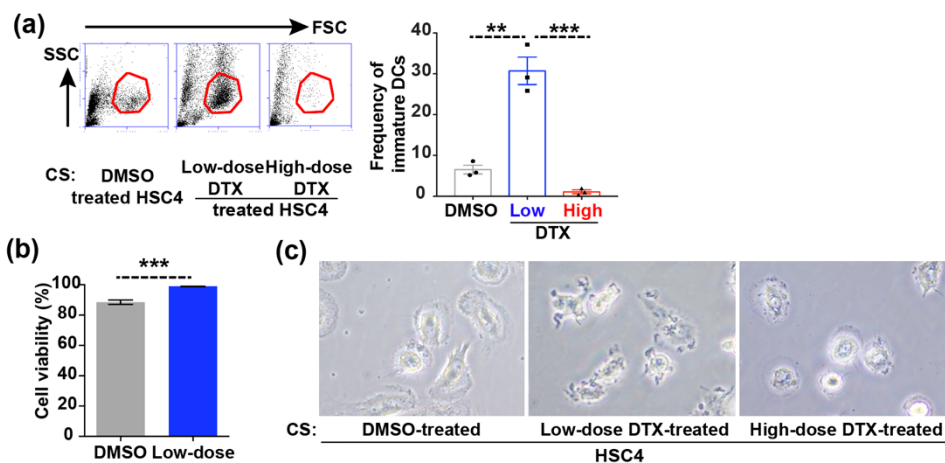
当科で行なった低用量DTXと未熟骨髄細胞を用いたがん免疫療法の臨床治験(UMIN00003725)に参加した4人の頭頸部癌患者より治療の前後で回収した末梢血を用いてT細胞分画(Naïve T細胞、Central Memory T細胞、Effector T細胞、Effector Memory T細胞分画)およびRegulatory

T細胞、骨髄由来免疫抑制細胞分画の変化をフローサイトメトリーを用いて解析した。CD3、CD4、CD8、CD11b、CD14、CD45RO、CD25、CD62L、CD127をマーカーとして用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) iDCへの低用量ドセタキセル (DTX) の影響

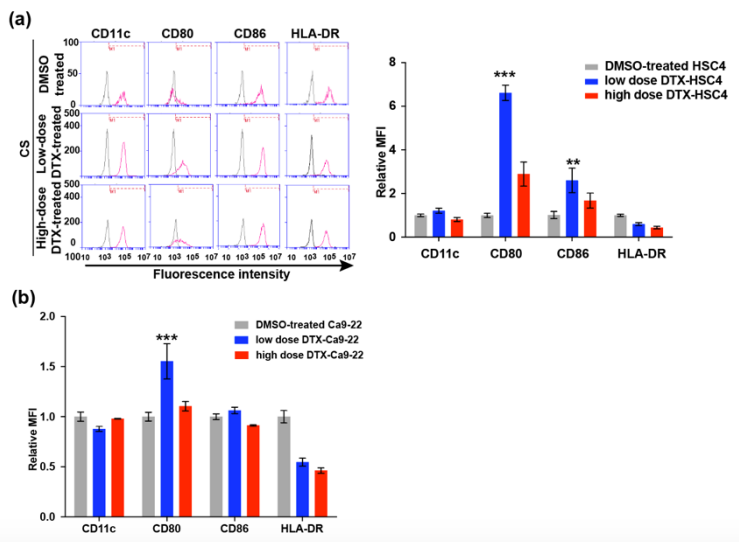
DMSO処理後HSC4-CSに比較して、低用量DTX処理後HSC4-CS中で培養した場合iDCs分画の有意な上昇を認めたが高用量DTX処理後HSC4-CS中で培養した場合その分画は減少してしまった(図2-a)。続いて7-AAD染色にてiDCsの生存率を確認したところ、iDCsはDMSO処理後HSC4-CS中より、低用量DTX処理後HSC4-CS中でより高い生存率を示していた(図2-b)。この低用量DTX処理HSC4-CS中で培養されたiDCの細胞形態を観察すると細胞膜上に突起をより多く維持していることが観察された(図2-c)。これらのデータから低用量DTXはiDCの生存を長くする作用があることがわかった。



(図 2)

##### (2) 低用量DTXのiDC表面マーカーへの影響

低用量DTX処理後HSC4-CS中で培養したiDCs上のCD80およびCD86発現はDMSO処理後HSC4-CS中で培養した時よりそれぞれ6.6倍、2.6倍に上昇していたが、CD11cおよびHLA-DR発現は有意な変化を認めなかった(図3-a)。低用量DTX処理後Ca9-22-CS中で培養したiDCs場合はCD86は変化なく、CD80のみが有意に上昇していた(図3-b)。これらの結果より低用量DTXで処理した細胞上清はDCの成熟化をサポートし、促進させることを明らかにできた。

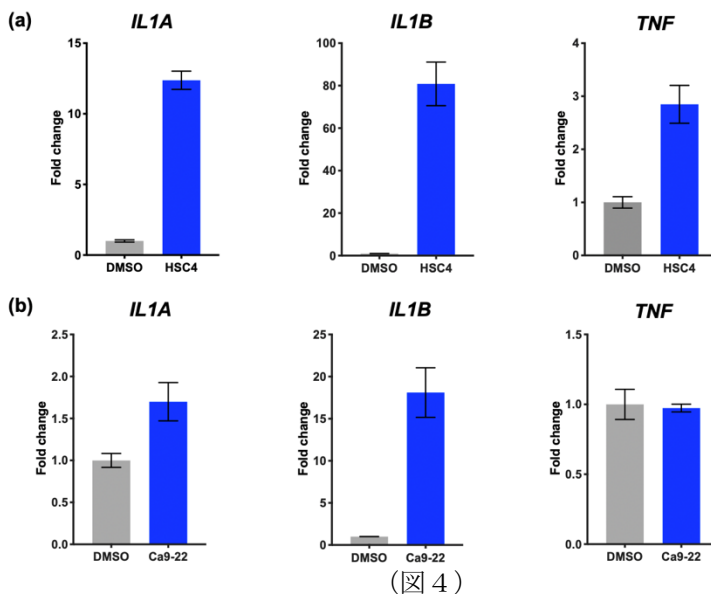


(図 3)

##### (3) 低用量DTXのiDCの機能への影響

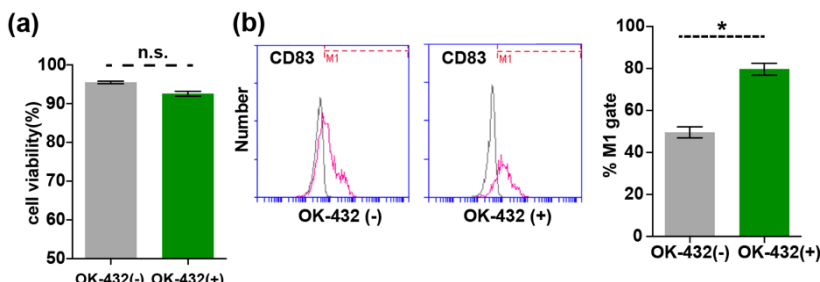
iDCは免疫システムを活性化させるためにIL-12やTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生する。低用量DTX処理後HSC4-CSで培養したiDCsでは、DMSO-control CSに比べてIL12A、IL12B、およびTNF遺伝子発現は12.4倍、80.8倍、2.85倍上昇していた(図4-a)。低用量DTX処理後Ca9-22-CSではIL12Bが18.1倍に上昇していたのみでIL12AおよびTNFは変化がなかった。さらにその培養上清中のIL-12p70濃度を調べたところ、Control-CSに比較してHSC4-CS培養後では217.4倍、Ca9-22-CS培養後では11.2倍に有意に上昇していた(図4-b)。以上の結果から頭頸部扁平上皮癌において低用量DTXは宿主の免疫システムを活性化させるためにiDCsの機能

に好影響を与えることがわかった。



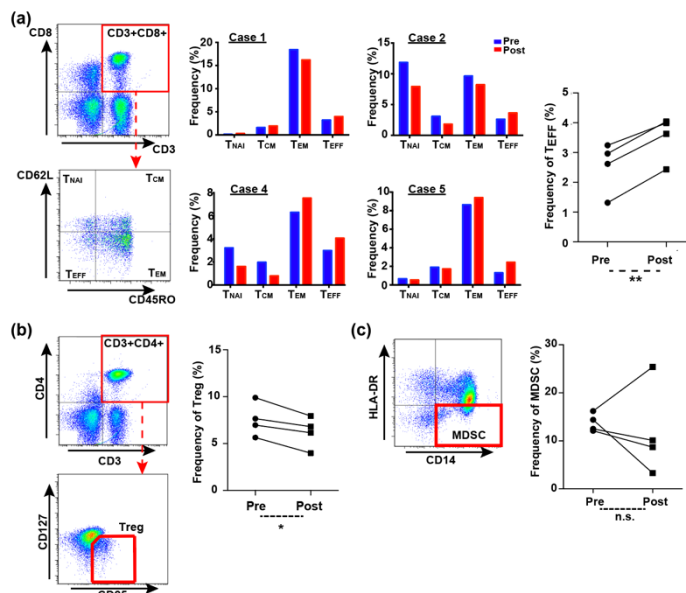
#### (4) OK432 の低用量 DTX 処理 iDCs の成熟過程への効果

OK432 は HSC4-CS 中で培養された iDCs の生存率には影響は与えなかった (図 5-a)。興味深いことに OK432 刺激は iDCs 上の CD83 発現を有意に上昇させていた (図 5-b)。これらのデータから OK432 は iDC の生存に影響せずその活性を有意高めることができたことがわかった。



#### (5) DC-低用量 DTX 併用がん免疫療法治療を受けた患者における T 細胞分画の解析

Phase I 臨床試験として再発頭頸部癌患者に対して iDCs を用いた低用量 DTX 併用がん免疫療法治療を行なった 4 人の患者から末梢血を治療前後で回収し、Naïve T 細胞、Central Memory T 細胞、Effector T 細胞、Effector Memory T 細胞分画および Regulatory T 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞分画を解析した。治療前後で Naïve T 細胞、Central Memory T 細胞、Effector Memory T 細胞分画への影響は見られなかったが Effector T 細胞分画は全例で有意に増加していた (図 6 a)。一方で免疫抑制作用を持つ regulatory T 細胞分画は治療後有意に低下していた (図 6b)。骨髄由来免疫抑制細胞分画については治療前後で低下する傾向にあった (図 6c)。



5. 主な発表論文等

雑誌論文] (計 3 件)

(1) Sakamoto K, Fujita Y, Chikamatsu K, Tanaka S, Takeda S, Masuyama K, Yoshimura K, Ishii H. Ambient mass spectrometry-based detection system for tumor cells in human blood. *Transl Cancer Res* 査読有 2018;7(3):758-764. doi: 10.21037/tcr.2018.04.20

(2) Ishii H, Chikamatsu K, Igarashi S, Takahashi H, Sakamoto K, Higuchi H, Tanaka S, Matsuoka T, Masuyama K. Establishment of Synergistic Chemoimmunotherapy for Head and Neck Cancer Using Peritumoral Immature Dendritic Cell Injections and Low-Dose Chemotherapies. *Transl Oncol*. 査読有 2018 Feb;11(1):132-139. doi: 10.1016/j.tranon.2017.11.006.

(3) Ashizawa K, Yoshimura K, Johno H, Inoue T, Katoh R, Funayama S, Sakamoto K, Takeda S, Masuyama K, Matsuoka T, Ishii H. Construction of mass spectra database and diagnosis algorithm for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 査読有 2017 Dec;75:111-119. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.11.008.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 五十嵐 賢

ローマ字氏名: IGARASHI Satoshi

所属研究機関名: 山梨大学

部局名: 大学院総合研究部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 10597016

研究分担者氏名: 石井 裕貴

ローマ字氏名: ISHII Hiroki

所属研究機関名: 山梨大学

部局名: 大学院総合研究部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 40568250

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。