

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11385

研究課題名(和文) 舌癌に対する制御性T細胞除去療法の研究

研究課題名(英文) The research of regulatory T cell depletion therapy for tongue cancer

研究代表者

折田 頼尚(Orita, Yori-hisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：90362970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに4NQO誘発性舌癌モデルマウスを用いた研究の中で、制御性T細胞(Treg)の浸潤は前癌病変～初期癌において最大量となり癌の進行とともに減少することを発見しました。今回、ジフテリアトキシン誘導性にTregを排除することが可能なDEREGマウスに同様の手法で発癌させ、高度異形成が生じる15週目でジフテリアトキシンを投与しTregを排除したところ、25週目になっても舌癌が発症しないという結果が得られました。しかし、DEREGマウスの必要個体数確保に難渋し、更には発癌しない個体も複数確認され、統計学的に明確な結果をまだ出せていない状況です。個体によって結果が異なる原因を究明中です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞(Treg)の浸潤は近年多くの癌種において予後不良因子として報告されており、例えば分子標的治療薬イピリムマブはTregの機能低下および腫瘍組織におけるTreg数の減少により腫瘍免疫反応を亢進させ抗腫瘍効果を狙ったものです。この治療薬を癌進行のどの時期に投薬するのが有効かわかれば、より患者の肉体的・経済的負担に見合ったカスタマイズされた治療計画の立案が可能になると思われます。また、この動物実験で観察されたように前癌病変の段階でTregを制御することによってそれ以上の進行を食い止められるのであれば、癌予防治療にもつながると考えています。

研究成果の概要(英文)：A mouse model of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)-induced-tongue squamous cell carcinoma (SCC) was established. We found that the amount of Tregs of the experimental mice at the tumor site was over 10 times as much as control mice at the early stage of tumor progression. This time 4NQO was administered to DEREG (Depletion of regulatory T cell) mice same as the former experiments using wild-type-mice to develop tongue SCC, and diphtheria toxin was given to exclude Treg at the early stage of tumor progression. We found that further progression of the tongue SCC was blocked and the mice were free from SCC. However, it was difficult to breed DEREG mice to the number enough for statistical analysis, and moreover, some of them did not develop tongue SCC even without diphtheria toxin. We are still studying about the reasons for dispersion of the results.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：HNSCC 4NQO Treg DEREGマウス

1. 研究当初の背景

近年多くの癌において regulatory T cell (Treg)の集積が予後不良因子として報告されています。Treg は胸腺あるいは抗原に暴露した末梢で産生され、Effector T cell 等の抗腫瘍作用を抑制します。我々はこれまでに舌癌モデルマウスを用いた研究で舌癌微小環境中の Treg, IL-10, TGF- β の動向を観察し、舌癌においては癌発生初期に Treg、IL-10 が多くそれらは癌の進行とともに減少していくこと、逆に TGF- β は癌発生初期には減少しており、進行とともに増加していくことを観察しました。癌発生初期に Treg を抑制すれば以後の進行が食い止められるのではないかと、進行してからの Treg 抑制は無効ではないかと予想しました。

免疫チェックポイント阻害剤の登場に伴い、頭頸部癌の治療は大きな変革を遂げました。中でも抗 PD-1 抗体の頭頸部癌への保険適応は、頭頸部癌の治療戦略を根底から変えたと言っても良いと思われます。免疫チェックポイント阻害剤が一般的にかなり高価な薬品であることも加味すると、これからはそれらの薬をより効果的に、個々の症例にカスタマイズされた治療計画を立てることが重要ではないかと考えられます。まだ治験の段階ですが、Treg を抑制する働きのある抗 CTLA-4 抗体も間もなく頭頸部癌に保険適応となる可能性があります。まずは舌癌に対し実際に Treg を抑制する治療法に効果があるのか、またどのタイミングで投与するのが最も有効であるか、ということをはっきりとすることが大切だと思われま

2. 研究の目的

本研究は実験的にマウスに舌癌を発生・進行させ、その種々の段階で Treg を除去しその治療効果を観察し、更にはどのタイミングで Treg 排除するのが最も効果的であるかを検討することが目的です。本研究によって得られる成果は舌癌に対する新たな治療法の開発に寄与するものとなることが期待されます。

3. 研究の方法

マウスに 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)を飲料水に混じて与えることによって舌癌を誘発させるモデルは過去にも多く報告されており、我々も同手技にて 100%の確立で野生型マウスに舌癌を発症させることに成功しました。今回はヒトやサルに比べてマウスがジフテリアトキシンに対して 1000 倍もの耐性を持つことを利用して作られたジフテリアトキシン受容体保持トランスジェニックマウス (DEREG マウス) を用います。高価で入手困難のため、DEREG マウス 3 ペア (1 2×3) マウスから繁殖させ、150 匹を実験に用います。4NQO を飲料水に 200 μ g/ml の濃度で混じて与えると、投与開始から 10~15 週目で中等度~高度異形成が、15~20 週で高度異形成と扁平上皮癌が、そして 25 週目にはほぼ 100%のマウスに扁平上皮癌が発症するため、給水瓶に 4NQO を 200 μ g/ml で混入させた水を入れ、6 週齢に達した DEREG マウスに与え始めます。4NQO 混入飲料水投与開始後 10 週 (n=20)

15 週(n=15)、20 週(n=10)、25 週目(n=5)の 4 時期にジフテリアトキシンを腹腔内投与し、体内の Treg を除去します。4NQO 混入飲料水投与開始後 10 週目にジフテリアトキシンを投与したマウスは 15、20、25、30 週目に 5 匹ずつ、15 週目に投与したマウスは 20、25、30 週目に 5 匹ずつ、20 週目に投与したマウスは 25、30 週目に 5 匹ずつ、25 週目に投与したマウスは 30 週目に 5 匹屠殺します(計 n=50、25、25 で、5 匹ずつ選ぶ際には 2/3 或いは 3/2 とする)。飲料水に 4NQO は混じらないがジフテリアトキシンを投与する DEREГ マウス(n=50、25、25)、4NQO 混入飲料水を与えるがジフテリアトキシンを溶解する溶媒(生理食塩水)のみを投与する DEREГ マウス(n=50、25、25)も 4NQO 混入飲料水を与えジフテリアトキシンを投与するマウスと同様のやり方で屠殺します。30 週目までには全てのマウスをペントバルビタールナトリウム 50mg/kg 腹腔内投与下の断頭により屠殺します。文献によると 32 週目頃から癌死するマウスが出てくるとのことなので、それより 2 週間早くすべてのマウスを安楽死させることにより苦痛を軽減します。舌癌発生・進行の過程、或いはジフテリアトキシンの感受性において雌雄差が有るといふ報告は無いため、今回の実験では雌雄差は考慮しません。各群から舌組織を採取し癌の発生進行状況、サイトカイン、Treg の分布を PCR および免疫染色を用いて検討します。実験の過程で 3 日間で体重の 20%以上の減少、摂水・摂餌量の低下、運動性の低下など動物の苦痛が耐えがたいものと判断された場合には、直ちに当該動物を安楽死させ、苦痛からの解放をはかります(人道的エンドポイント)。

4 . 研究成果

DEREG マウスは繁殖能力が野生型に比べると弱く、また、新たに生まれた個体一匹ずつ尾静脈から採血を行い、DEREG 遺伝子のヘテロもしくはホモのタイピングをする必要があるため、実験に必要な個体数を準備するのにまず時間を要しました。そこで、4NQO を投与し、かつジフテリアトキシンを様々なタイミングで投与する DEREГ マウスモデルから順に作成し、舌癌の発生状況の観察を開始しました。すると、まず 4NQO 投与開始後 10 週目にジフテリアトキシンを投与した群には全く舌癌が発症せず、個体も元気であることがわかりました。次に、15 週目にジフテリアトキシンを投与した群も舌癌を発症しない、あるいは発症しても進行が遅いか軽症であることがわかりました。そこで、次に得た個体からは 4NQO を与えるだけでジフテリアトキシンを投与しない(つまり Treg を抑制しない) DEREГ マウス群として実験を行ったところ、多くは野生型と同様に舌癌を発症したのですが、その中の一部の個体には Treg を抑制していないにも関わらず舌癌が発症しないことがわかりました。最初に舌癌が発症しないのは 4NQO の与え方や濃度の問題かと考え、様々な投与法を用いて DEREГ マウスに 4NQO を投与してみたのですが、やはり同様の結果で、舌癌の進行具合もまちまちでした。次に、マウスの種の問題かと考え、同系統の野生型マウスを 10 匹購入し、4NQO を同様の手法で投与しましたが、全例に問題無く以前の我々が行った実験と同様に舌癌が発症することを確認しました。そこで、改めて 4NQO を与える

だけでジフテリアトキシンを投与しない DEREГ マウスを 10 匹用意し観察しましたが、10 匹のうちの 6 匹に舌癌が発症したものの、残り 4 匹では舌癌の進行が野生型に比べると穏やか、あるいは全く発症しないことがわかりました。ジフテリアトキシンを投与せず、つまり Treg を抑制しなくても舌癌を発症しない理由を探索する必要性がありましたので、ジフテリアトキシンを投与していない DEREГ マウスの血液、および舌組織内の Treg を検出、定量することにしました。その結果、特に野生型と比較して Treg の染まり方、検出量に大きな差はないことがわかりました。だとするならば、DEREG マウスには Treg の浸潤以外に舌癌発症に影響をおよぼす要因があるということになり、ここで実験が一旦行き詰りました。この実験は、1クールが 30 週間、最低でも 1 群 5 匹準備する必要があり、膨大な時間と労力を使います。この状況下で大前提である 4NQO 投与によって 100%舌癌が発症できることがくつがえされたため、DEREG マウスに 100%舌癌を発症させる方法を検討中です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tachibana T	4. 巻 139
2. 論文標題 Young adult patients with squamous cell carcinoma of the tongue strongly express p16 without human papilloma infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2018.1541506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akagi Y	4. 巻 139
2. 論文標題 KRAS mutation in tongue squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol	6. 最初と最後の頁 647-651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2019.1610574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyamaru S	4. 巻 24
2. 論文標題 Phonatory function in patients with well-differentiated thyroid carcinoma following meticulous resection of tumors adhering to the recurrent laryngeal nerve.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1536-1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2019.1610574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 (101)Makino T, Orita Y, Tachibana T, Marunaka H, Miki K, Akisada N, Akagi Y, Usui Y, Sato Y, Yoshino T, Nishizaki K.	4. 巻 72
2. 論文標題 Computed tomography findings for diagnosing follicular thyroid neoplasms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 577-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/56375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 (96)Tachibana T, Orita Y, Marunaka H, Makihara S, Hirai M, Gion Y, Ikegami K, Miki K, Makino T, Noyama Y, Komatsubara Y, Kimura M, Yoshino T, Nishizaki K, Sato Y.	4. 巻 45
2. 論文標題 Neck metastasis in patients with T1-2 supraglottic cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2017.06.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 (98)Orita Y, Gion Y, Tachibana T, Ikegami K, Marunaka H, Makihara S, Yamashita Y, Miki K, Makino T, Akisada N, Akagi Y, Kimura M, Yoshino T, Nishizaki K, Sato Y.	4. 巻 48
2. 論文標題 Laryngeal squamous cell papilloma is highly associated with human papillomavirus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 350-355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 折田 頼尚	4. 巻 36
2. 論文標題 頭頸部がんと制御性T細胞	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー	6. 最初と最後の頁 35~39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5648/jjiao.36.35	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三木 健太郎 (Miki Kentaro) (20747448)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 康晴 (Sato Yasuharu) (00579831)	岡山大学・保健学研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関