

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17264

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の浸潤・転移におけるPD-L1/PD-1シグナルの関与

研究課題名（英文）Involvement of PD-L1/PD-1 signal in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

丸瀬 靖之（Maruse, Yasuyuki）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90784504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々は、OSCC生検組織を用いて、PD-L1/PD-1シグナルが免疫抑制を引き起こし、浸潤・転移に関与すること、組織でのPD-L1/PD-1共発現が生存率を低下させていることを明らかにしてきた。また、PD-L1過剰発現株（SAS細胞）にrecombinant human PD-1を作用させ、PD-1からPD-L1へのシグナル伝達がOSCCの増殖・遊走・浸潤を亢進することに関しても明らかにしてきた。本研究ではPD-1がPD-L1に作用して、OSCC細胞中のTNF Signaling Pathwayを活性化し、遊走及び浸潤を亢進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、PD-1/PD-L1に関してはその腫瘍免疫学的側面にのみ、フォーカスが当てられていた。しかしながら、本研究結果より、PD-1はOSCCに発現しているPD-L1に作用することで、OSCC細胞中のTNF Signaling Pathwayを活性化することが明らかとなった。これにより、OSCCの遊走及び浸潤を亢進することでOSCCの悪性化に寄与している可能性が示唆された。このことは、抗PD-1抗体の治療効果予測に際して、活用できる可能性を含んでおり、更なる解析が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using OSCC biopsy tissue samples, we show that PD-L1 / PD-1 signals cause immunosuppression and are involved in infiltration and metastasis. We have also shown that PD-L1 / PD-1 co-expression in biopsy tissue samples reduce patient's over-all survival rates. In addition, as a result of binding recombinant human PD-1 to PD-L1 overexpressing cell lines (SAS cells), signal transduction from PD-1 to PD-L1 promotes OSCC proliferation, migration, and infiltration. In this study, it was suggested that PD-1 may act on PD-L1 to activate TNF Signaling Pathway in OSCC cells and promote migration and infiltration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 PD-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の診断技術や治療法の進歩により、癌の治癒率は徐々に向上している。特に早期発見、早期治療がなされた場合、多くは治癒を見込むことができるが、**転移を伴う場合、その予後は悪化する**。OSCC においても、**所属リンパ節である頸部リンパ節転移や肺、骨などへの遠隔転移により、その生存率が著しく低下する**。このような現状の中、**がんに対する治療戦略として手術療法、放射線療法および化学療法に続く、第4の治療戦略として、腫瘍免疫療法のなかでも PD-L1/PD-1 シグナルの阻害を目的とした抗免疫チェックポイント分子抗体療法**が脚光を浴びつつあった。

a) PD-L1/PD-1 シグナルは免疫抑制を引き起こし、OSCC の浸潤・転移に関与する

われわれはこれまで免疫チェックポイント分子のひとつである PD-L1/PD-1 シグナルに着目し、**腫瘍浸潤先端部腫瘍細胞での PD-L1 発現亢進、およびその周囲炎症性細胞における PD-1 の高発現を認める患者群においてはリンパ球活性化抗原 CD25 の発現減弱を認め、PD-L1/PD-1 シグナルによる免疫応答抑制が引き起こされていることを明らかにした(図 2)**。また、PD-L1/PD-1 高発現群では低発現群と比較して、**頸部リンパ節転移や遠隔転移が有意に多く、予後が不良であることも明らかにしてきた(表 1、図 3)**。また、**頸部リンパ節転移の有無に関して多変量解析を行ったところ、OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の高発現が頸部リンパ節転移の独立した危険因子として抽出された (表 2)**。

表1 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 発現と臨床病理組織学的所見との関連

A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現
B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1 低発現
C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現

	Cases (%)	Group A	Group B	Group C	p-value
Lymph-node metastasis					
Yes	42 (43.3%)	4	16	22	<0.05
No	55 (56.7%)	14	20	21	
Clinical stage					
I/II	54 (55.7%)	11	22	21	N.S.
III/IV	43 (44.3%)	7	14	22	
Local recurrence					
Yes	15 (15.5%)	1	6	8	N.S.
No	82 (84.5%)	17	30	35	
Distant metastasis					
Yes	13 (13.4%)	0	5	8	<0.05
No	84 (86.6%)	18	31	35	

Chi-square test

図2 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と CD25 発現との関連

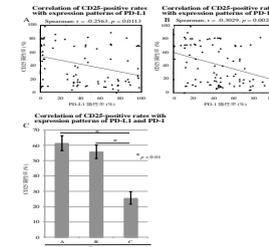


図3 OSCC 生検標本における PD-L1/PD-1 の発現と疾患特異的5年生存率

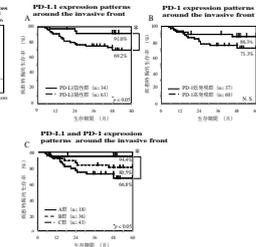


表2 OSCC の頸部リンパ節転移に影響を与える臨床病理組織学的因子の解析

A 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 低発現
B 群: PD-L1 陰性かつ PD-1 高発現、もしくは PD-L1 陽性かつ PD-1 低発現
C 群: PD-L1 陽性かつ PD-1 高発現

PD-L1/PD-1	頸部リンパ節転移		単変量解析		多変量解析	
	有	無	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value
A 群	4	14	Reference	-	Reference	-
B 群	16	20	2.80 (0.82-11.40)	0.103	3.04 (0.84-13.10)	0.093
C 群	22	21	3.67 (1.11-14.59)	0.033	3.99 (1.10-17.26)	0.035

logistic回帰分析; OR: オッズ比、95% CI: 95%信頼区間

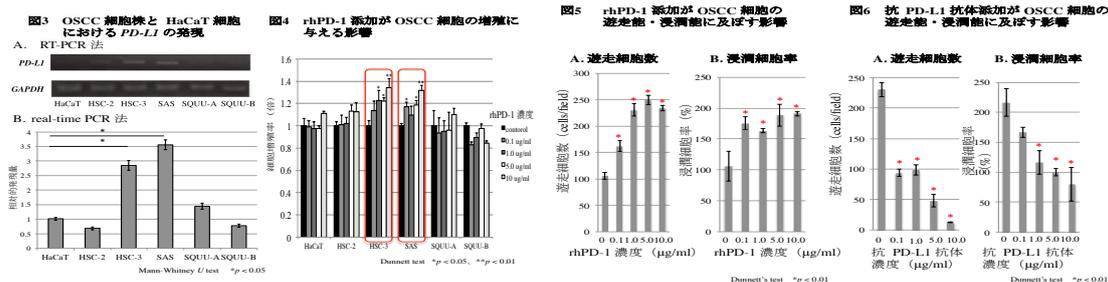
b) PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達は OSCC の増殖を促進する

6 種類の OSCC 細胞に recombinant human PD-1 (rhPD-1) を作用させたところ、**PD-L1 を発現している SAS および HSC3 細胞(図3)において rhPD-1 濃度依存的に細胞増殖率の上昇が認められ、PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達により OSCC の増殖が促進されることを明らかにした(図4)**。過去の報告において、Kleffel らは悪性黒色腫において、腫瘍細胞が PD-L1 のみならず PD-1 をその膜表面に発現しており、オートクラインにその増殖を亢進していることを報告している(Kleffel S. et al.: Cell, 162(6):1242-56.2015)。この報告は、われわれの結果に一部合致しており、今後、**OSCC 細胞自体の PD-1 発現および細胞間での相互作用に関して詳細な解析が必要と考えられた**。

c) PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達は OSCC の遊走能・浸潤能を亢進する

また、PD-L1 を発現している SAS 細胞に rhPD-1 を作用させたところ、rhPD-1 濃度依存的に細胞遊走能・浸潤能の亢進が認められ、その作用は抗 PD-L1 抗体の濃度依存的に減弱し、**PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達により OSCC の遊走・浸潤が促進されることを明らかにした(図 5、6)**。近年、PD-L1 を過剰発現させたヒト正常上皮細胞において、E-cadherin の発現減弱と EMT 関連転写因子 Twist および Slug の発現上昇を認めたことが示されている(Bolos V, Et al.: J Cell Sci 116: 499-511, 2003.)。この報告から器官発生に必須である**上皮-間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT)と PD-L1 の発現が関連していることが示唆される**。また、**EMT が誘導された細胞は癌の浸潤・転移に関与していることはわれわれも過去に報告している (Goto Y., et al.: Clin Exp Metastasis, 214:289-306. 2014)**。これらのことから、PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達による OSCC の細胞遊走能・浸潤能の亢進の詳細な分子メカニズム

に関して詳細はわかっていないものの、今後、PD-L1/PD-1 シグナルと OSCC の増殖・浸潤・転移との関連を明らかにするためには、EMT の分子機構を含めたさらなる詳細な解析が必要であると推察された。



口腔は多くの臓器と近接していることより、OSCC の増大は確実な切除をより困難とする。また、OSCC において、その予後を大きく左右するのはリンパ節転移および遠隔転移である。腫瘍原発巣の確実な切除ののち、なんらかの方法で転移の制御が可能であれば、その生存率の向上に大きな影響を及ぼすこととなる。この点において PD-1 から PD-L1 へのシグナル伝達と直接的に発現が関与している遺伝子は腫瘍の増大に関わる一方、その制御を的確に行えば浸潤・転移を効率的に抑える可能性が示唆される。

2. 研究の目的

一般に、癌細胞は宿主の免疫監視機構から巧妙に逃避し、体内で生存および増殖していると考えられている。近年、そのメカニズムの一つとして、癌細胞に発現している **programmed cell death ligand 1 (PD-L1)** が 活性化 T 細胞の細胞膜上に発現する program cell death 1 (PD-1) を介し、**T 細胞の免疫応答を抑制することが明らかになってきた。** この PD-L1/PD-1 経路を阻害する抗 PD-1 抗体は、T 細胞の免疫応答抑制を解除し、宿主のがん細胞に対する免疫応答を増強することが明らかとなっており、悪性黒色腫、などのいくつかのがんにおいて有用性が報告されている。しかしながら、逆に PD-1 からのシグナルが PD-L1 を介して癌細胞に与える影響や、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における PD-L1/PD-1 の発現については明らかになっていない。 本研究では、OSCC における PD-L1/PD-1 の発現と臨床病理学的所見との関連を検索するとともに、PD-1 から PD-L1 へのシグナルを介した OSCC 細胞の増殖、遊走および浸潤に関わる分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は OSCC において **PD-L1/PD-1 シグナルを介した増殖・浸潤・転移の分子機構** を解明するための基盤となる研究を行うことを目的として、PD-L1 過剰発現株に rhPD-1 を作用させた際に変動する遺伝子の発現を、DNA マイクロアレイを用いてプロファイリングし、OSCC の増殖・浸潤・転移における標的遺伝子の役割を *in vitro* で確認する。

4. 研究成果

SAS細胞に rhPD-1 を作用させた際に変動する遺伝子の発現を、DNA マイクロアレイを用いてプロファイリングし、OSCC の増殖・浸潤・転移における標的遺伝子の特定を行なった。

その結果、SAS と比較して、SAS+PD-1 において、腫瘍細胞の生存、遊走、分化などの機能を制御する中心的役割を担う Activator Protein-1 (AP-1) family のうち、FosB の発現上昇

(Zscore:7.618, Ratio:10.44) を認めた。また、同様に TNF Signaling pathway において、AP-1 より下流の遺伝子群 (Fos, Jun, Cxcl1,2,3,etc) の発現上昇が認められた。また、細胞外基質を分解し、腫瘍の浸潤・転移に寄与すると考えられるマトリックスメタロプロテアーゼのうち、MMP-3 及び MMP-10 についても同様に発現上昇を認めた。

これらのことより、PD-1 は OSCC に発現している PD-L1 に作用することにより、OSCC 細胞中の TNF Signaling Pathway を活性化して OSCC の遊走及び浸潤を亢進することで OSCC の悪性化に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maruse Y., Kawano S., Jinno T., Matsubara R., Goto Y., Kaneko N., Sakamoto T., Hashiguchi Y., Moriyama M., Toyoshima T., Kitamura R., Tanaka H., Oobu K., Kiyoshima T., Nakamura S.	4. 巻 47(7)
2. 論文標題 Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 836-845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2018.01.004.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 T.Hattori, S.Kawano, S.Tanaka, R.Matsubara, T.Sakamoto, Y.Hashiguchi, N.Kaneko, Y.Mikami, M.Morioka, Y.Maruse, R.Kitamura, E.Hamada, M.Hiwatashi, K.Oobu, T.Kiyoshima, S.Nakamura	4. 巻 50(2)
2. 論文標題 Elevated expression of protease-activated receptor 1 via Np63 down-regulation contributes to nodal metastasis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 163-170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2020.04.021	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Shoichi Tanaka, Shintaro Kawano, Taichi Hattori, Ryota Matsubara, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Yurie Mikami, Masahiko Morioka, Yasuyuki Maruse, Ryoji Kitamura, Eiki Hamada, Megumi Hiwatashi, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 Cytokeratin 19 as a biomarker of highly invasive oral squamous cell carcinoma with metastatic potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2019.10.007	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸瀬靖之、川野真太郎、神野哲平、松原良太、後藤雄一、坂本泰基、橋口有真、大部一成、中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprogrammed cell death 1シグナル関連分子の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第39回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸瀬靖之
2. 発表標題 Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会 若手口腔外科医優秀論文賞（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸瀬靖之、川野真太郎、神野哲平、松原良太、後藤雄一、坂本泰基、橋口有真、大部一成、大岩伊知郎、中村誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprogrammed cell death 1シグナル関連分子の発現と機能に関する研究
3. 学会等名 第62回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸瀬靖之、川野真太郎、森岡政彦、坂本瑞樹、木部琴乃、坂本泰基、森山雅文、清島保、中村誠司
2. 発表標題 左側下顎骨軟骨芽細胞型骨肉腫の治療経験
3. 学会等名 第38回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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

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
---------	---------