

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16911

研究課題名（和文）喉頭乳頭腫における宿主局所免疫応答の解明

研究課題名（英文）Roles of the tumor immune microenvironment in laryngeal papilloma

研究代表者

栗田 卓（Kurita, Takashi）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20569355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：喉頭乳頭腫はしばしば病変が多発あるいは再発する。腫瘍周囲の免疫環境がこの現象に関係しているとの仮説のもと研究を行った。手術で得られた乳頭腫組織の免疫染色を行い、その結果を再発群と非再発群の間で比較した。CD8陽性細胞（腫瘍を排除する免疫細胞）の数は、非再発群の方が多かった。腫瘍免疫の抑制に関わるPD-1とFoxp3の陽性細胞数は、非再発群の方が多かった。本研究により、喉頭乳頭腫における免疫環境は再発群と非再発群で異なり、この違いが乳頭腫の発生や再発に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再発性の喉頭乳頭腫症に対しては、現在の主治療である手術のみでは再発を制御することが難しいため、薬物等での補助療法を確立することが求められている。本研究は喉頭乳頭腫における局所の腫瘍免疫について明らかにしたものであり、喉頭乳頭腫症に対する新たな治療法の開発に寄与しうる知見である。本研究で得られた結果をもとに、今後は乳頭腫に対する局所免疫に着目した治療法の開発につなげていくことが望まれる。

研究成果の概要（英文）：The tumor immune microenvironment (TIME) regulates tumor regression and progression. This research aimed to investigate the relationship between the TIME and recurrence of laryngeal papilloma. Immunohistochemistry for surgically resected papilloma specimens was performed for CD8 (cytotoxic T lymphocyte marker), PD-1 and PD-L1 (immune checkpoints-related molecules), and Foxp3 (regulatory T lymphocyte marker). The staining results shows that the numbers of intratumoral CD8+ and Foxp3+ cells as well as subepithelial CD8+, Foxp3+, and PD-1+ cells in patients with recurrence were significantly lower than those in patients without recurrence, statistically. This study reveals that the TIME of laryngeal papilloma differs between groups with and without recurrence. This difference may contribute to the mechanism of papilloma development and recurrence.

研究分野：喉頭科学

キーワード：喉頭乳頭腫 ヒトパピローマウイルス 細胞性免疫 腫瘍免疫微小環境 免疫チェックポイント関連分子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

喉頭乳頭腫症はヒトパピローマウイルス (以下 HPV) 6 型、11 型の感染が原因で生じる良性腫瘍である。現状では手術が主たる治療であるが、乳頭腫が多発し再発繰り返す症例がしばしば見られ、反復する手術による音声の悪化を来すことがある。そのため過去には様々な補助療法が試みられているが、喉頭乳頭腫症における乳頭腫の多発や再発の機序は未だ不明であるため、確立された補助療法は存在しない。

喉頭乳頭腫の病原微生物である HPV は重層扁平上皮の基底細胞に潜伏感染すると考えられている。一方で喉頭乳頭腫は組織学的に重層扁平上皮と多列線毛上皮の移行部とされる部位に好発する。我々は過去に喉頭粘膜上皮の分布特性と喉頭乳頭腫の好発部位に着目し、HPV の上皮基底細胞への感染に加えて、上皮の重層化が乳頭腫の発生に重要であることを報告した。これは、HPV が感染する上皮の特性という宿主側の要因によって HPV 感染後に乳頭腫が生じることを示したものである。このように HPV の感染が病因の喉頭乳頭腫について、感染病原体ではなく宿主側因子に着目して病態を明らかにする試みには大きな意義があると考えられる。

喉頭乳頭腫を含む腫瘍性疾患の病態における宿主側因子として考慮すべきものの一つに、腫瘍に対する免疫がある。一般的に、細胞内の DNA の損傷やその塩基配列の変化が原因で腫瘍細胞は生じるが、そのような細胞は免疫系により宿主内における非自己と認識される。非自己と認識された細胞は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食され、その断片が抗原として MHC クラス I 分子上に提示される。これにより細胞障害性 T 細胞 (CTL) が活性化し、細胞性免疫により腫瘍細胞は生体内から排除される。しかし、腫瘍細胞がこの免疫機序からの逃避能を獲得すると腫瘍細胞が増殖すると考えられている。このように宿主の免疫系は腫瘍細胞の増殖抑制に大きく関わっており、喉頭乳頭腫においても免疫系からの逃避能を得ることによって、多発や再発を繰り返している可能性がある。喉頭乳頭腫と免疫の関連性を示唆する報告として、再発性の喉頭乳頭腫に対してインターフェロンや漢方の投与が一定の効果をあげた報告がある。薬剤の作用から考えるに、これらは宿主の免疫系を賦活されて効果を示したものである。喉頭乳頭腫の治療において宿主の免疫系が重要な因子であることを示唆するものである。

腫瘍細胞が宿主免疫系から逃避する機序の一つとして、免疫チェックポイント分子の関連が明らかになっている。特に悪性腫瘍に対する治療においてはこれを標的とした薬物治療が近年注目されている。細胞性免疫に対して抑制的に働く免疫チェックポイント分子である Programmed death-1 (以下、PD-1) は CTL に発現している。Programmed death-ligand1 (以下、PD-L1) に代表される PD-1 に対するリガンドが PD-1 に結合すると、CTL の活性が抑制される。悪性腫瘍では腫瘍細胞が PD-1 に対するリガンドを発現することで免疫系から逃避しており、これに対して抗 PD-1 抗体による薬物療法が行われるようになっている。また、腫瘍に対する免疫に対して抑制的に働く因子として、制御性 T 細胞の存在も挙げられている。制御性 T 細胞は CTL のようなエフェクター T 細胞の働きに対して抑制的に働くとされている。我々は喉頭乳頭腫もこれらの因子が免疫からの逃避に関わった結果、多発や再発を繰り返している可能性を考えている。喉頭乳頭腫に対する局所免疫が明らかになることで、疾患予後の推定や治療戦略に寄与しうると考える。

2. 研究の目的

局所腫瘍免疫と免疫逃避機構に主に関わっていると考えられる CTL、PD-1 ならびに PD-L1 陽性細胞、制御性 T 細胞の喉頭乳頭腫における局在と分布を明らかにする。その結果を踏まえて喉頭乳頭腫の再発と腫瘍免疫微小環境との関連性を明らかにする。

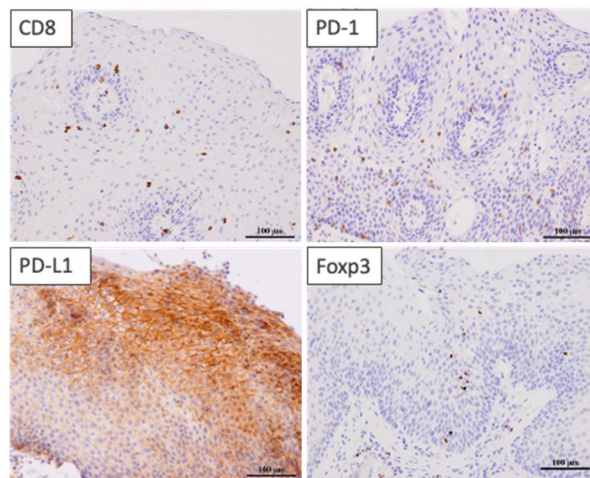
3. 研究の方法

2006 年 1 月から 2019 年 12 月までの間に喉頭乳頭腫症の治療として久留米大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて手術を行った患者の試料 (残余検体) 及び診療情報を使用した。対象症例は 27 例であった。本研究は久留米大学倫理委員会の承認を得た (研究番号: 20279)

手術で一塊切除した喉頭乳頭腫組織のパラフィン包埋薄切片を作製した後に、CTL マーカーである CD8、免疫チェックポイント関連分子である PD-1、PD-L1、制御性 T 細胞マーカーの Foxp3 の免疫組織化学染色を行った。染色結果の解析では CD8、PD-1、Foxp3 に関しては各組織内で強く染色されている任意の 3 箇所において陽性細胞数を計測し、その平均を算出した。PD-L1 に関しては染色強度と陽性細胞の割合をそれぞれスコア化し、それらの合計したものを評価に用いた。陽性細胞数の計測ならびにスコア化を用いた評価は、乳頭腫が存在する上皮内と、上皮よりも免疫細胞がより多く存在する上皮直下 (研究に用いる光学顕微鏡の強拡大 1 視野に相当する、上皮基底膜から 550um の深さの粘膜固有層までの範囲と定義) の両方について個別に行った。各項目に関して再発群と非再発群間での有無について統計学的に解析した。

4. 研究成果

免疫組織化学染色の代表的な染色像を図に示す。CD8 陽性細胞、PD-1 陽性細胞、Foxp3 陽性細胞は乳頭腫内と上皮下に散在性に存在していた。PD-L1 は乳頭腫の細胞膜に陽性を示し、陽性細胞は領域性をもって存在していた。各染色項目についての統計学的検討では、CD8 陽性細胞数は上皮内、上皮下ともに非再発群の方が有意に多かった。PD-1 陽性細胞数は上皮内では有意差を認めなかったが、上皮下で非再発群の方が有意に多かった。PD-L1 のスコアに関しては統計学的な有意差を認めなかった。Foxp3 陽性細胞数は上皮内・上皮下ともに非再発群の方が有意に多かった。以上の結果より、すなわち喉頭乳頭腫の免疫微小環境は再発群と非再発群では異なっていた。



CD8 の染色結果は、非再発群が再発群と比較して乳頭腫内に CTL が多いことを示すものであった。このことから、非再発群は再発群よりも乳頭腫細胞を CTL による細胞性免疫により排除しやすい状態にあることが示唆された。PD-1 陽性細胞数が上皮下において非再発群の方が再発群より有意に多かったこと、ならびに Foxp3 陽性細胞数は上皮内・上皮下ともに非再発群の方が有意に多かったことから、非再発群の CTL の機能が再発群に比べて免疫チェックポイントや制御性 T 細胞によって抑制されている可能性が示唆された。

以上の内を総合すると、喉頭乳頭腫の非再発群では乳頭腫に CTL が存在するにもかかわらず、免疫チェックポイント活性や制御性 T 細胞が多い腫瘍免疫微小環境によって CTL の機能が抑制されている可能性が考えられた。非再発群における乳頭腫の発生には、このような腫瘍免疫微小環境が寄与しうると考えられた。また、再発群では腫瘍局所への CTL の浸潤が十分でないために細胞性免疫が十分に働いておらず、そのような環境が再発の一因となっている可能性があると考えられた。

本研究結果は再発性喉頭乳頭腫症の病態解明や、新たな治療法の確立に寄与しうる知見である。特に治療法に関しては腫瘍局所への CTL の浸潤を主とする細胞性免疫を誘導する、あるいは局所における CTL を活性化するような治療につながる可能性がある。臨床応用につながるように、今後のさらなる研究展開が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 栗田 卓、梅野博仁、千年俊一、小野剛治、深堀光緒子、末吉慎太郎
2. 発表標題 喉頭乳頭腫症における組織学的知識に基づいた手術と局所免疫環境に関する病理学的検討
3. 学会等名 第33回日本喉頭科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Kurita, Takeharu Ono, Akihiko Kawahara, Kiminobu Sato, MD, Fumihiko Sato, Jun Akiba, Shun-ichi Chitose, Hirohito Umeno
2. 発表標題 Roles of Tumor Immune Microenvironment for Development and Recurrence of Laryngeal papilloma; Comparative study between recurrence and non-recurrence cases
3. 学会等名 アメリカ気管食道科学会（Combined Otolaryngology Spring Meeting 2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Kurita
2. 発表標題 Clinical and pathological impact of intralesional Cidofovir Injection for patients with Recurrent Respiratory Papillomatosis
3. 学会等名 The 12th East Asian Conference on Phonosurgery（国際学会）
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
---------	---------