

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10291

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害薬の効果に関する研究

研究課題名（英文）Study of the effect of Immune Checkpoint Inhibitor

研究代表者

川崎 五郎（kawasaki, goro）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・准教授

研究者番号：60195071

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌症例において、PD-L1とはPD-L2は腫瘍細胞に発現し、両者が発現している症例は浸潤および増殖マーカーとの関連性が強く悪性度との相関性が示唆された。また、PD-1の発現のない症例でもそれらが発現しており、腫瘍細胞に異常が起こっている可能性が示唆された。培養細胞でもそれらが発現し、両者が発現している細胞は浸潤および増殖能が強かった。またそれらをブロックすると浸潤能、増殖能ともに軽減がみられた。培養細胞でも、PD-L1とPD-L2は独自に発現しており、悪性度との相関がみられた。化学療法剤併用は、有意差はないものの両者が発現している症例では効果が減弱していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に癌細胞においてPD-1によりPD-L1が誘導されることで癌細胞抑制がおこることから、PD-L1が発現している細胞の方が抗PD-1抗体を用いた治療に有効とされている。しかしながら、本研究結果からリンパ球に誘導されないで腫瘍細胞自体に独自に発現するPD-L1とPD-L2が認められ、それらが腫瘍の悪性度や治療抵抗性に關与している可能性が示唆された。口腔癌における抗PD-1抗体療法に抵抗性がある場合には、これらの抗体を調べ、予後の予測をすることや、抗体療法を含めた治療法を考えることが必要とされる研究結果となった。

研究成果の概要（英文）：PD-L1 and PD-L2 were immunohistochemically expressed in oral cancer patients. The cases of both expressions have correlation with invasion and growth of the cancer cells, therefore it was suggested that both expressions of PD-L1 and PD-L2 has a correlation with abnormality of tumor cells. In oral cancer cell lines, PD-L1 and PD-L2 were expressed, and there was significant difference with cancer cell invasion and cell growth. In blockade cell line of PD-L1 and PD-L2, the abilities of invasion and cell growth of the cancer cells were decreased. In some of the cell lines, PD-L1 and PD-L2 was admitted without effect of PD-1, and it was suggested to be concerned the degree of malignancy. Both expressions of PD-L1 and PD-L2 tended to affect the effect of chemotherapeutic agent to the cancer cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 PD-L1 PD-L2 PD-1

1. 研究開始当初の背景

PD-1 分子は、**CD28** ファミリーに属する免疫抑制補助シグナルであり、活性化した **T** 細胞、**B** 細胞および骨髄系に発現し、そのリガンドとの結合によって、抗原特異的に **T** 細胞活性を抑制することから、末梢性免疫寛容や、がん免疫（抑制）など多岐にわたり中心的役割を担う分子である。**PD-1** のリガンドには、**PD-L1** と **PD-L2** があり、**PD-L1** は樹状細胞のほかに血管や心筋、肺、胎盤などに幅広く発現しており、**PD-L2** は樹状細胞のみに発現する。

PD-1 経路は、主に抹消組織で働き、標的細胞（がん微小循環）への免疫抑制にかかわっている。多くの基礎的研究がなされているが、臨床検体を用いた検討では、胃癌、悪性黒色腫、食道がん、頭頸部がんなどの多くのがん細胞が **PD-L1** を高発現しており、臨床経過や予後と関連していたことから、**PD-1** 経路を標的とした抗体医薬の開発が進み、抗がん治療の実用化が進められた。

PD-1 経路阻害薬は様々ながん腫で新たながん治療の選択肢としての可能性が期待されている。しかしながら、ホジキンリンパ腫のように **PD-1** 経路阻害薬が著効するがん腫は例外的で、これまで治療効果が認められた悪性黒色腫や非小細胞がん、腎がん、卵巣がんでも奏効率は **20 - 40%**前後とされている。口腔がんにおいても、必ずしも治療効果が高いとは言えない。すなわち **PD-1** 経路阻害薬は、すべてのがん患者に治療効果があるわけではないといえる。今後、**PD-1** 経路阻害薬を臨床的に発展させていくためには、その原因について検討し、有効例と無効例を層別化し事前に患者を選択するためのバイオマーカーを探索する必要がある。また、**PD-1** 経路阻害薬の奏効率をさらに上乘せするような最適な併用療法の開発とそれらを組み合わせたがん免疫治療の個別化、免疫関連副作用の軽減が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔がんに対する **PD-1** 経路阻害薬の治療効果を予測するバイオマーカーの研究と、化学療法剤の併用効果について研究することを目的とする。

これまでの多くの臨床試験の結果では、免疫チェックポイント阻害薬は、腫瘍で **PD-L1** 発現が高い症例ほど、**PD-1** 阻害薬の治療効果が高いと報告されており、統一した診断法の確立が求められている。しかしながら、**PD-L1** 陰性症例でも治療効果を認める症例もあるため、患者選択に際し単に **PD-L1** 発現だけでは不十分とされており、悪性黒色腫や膀胱がんなどでは腫瘍内浸潤した **T** 細胞数や **PD-1** 発現陽性細胞数の方が治療効果の指標となるという報告もある。口腔がんにおいても、抗腫瘍 **T** 細胞の誘導が不良で、十分に **T** 細胞が腫瘍浸潤していない症例は多いと考えられ、**PD-1** 阻害薬の効果に対する抗腫瘍 **T** 細胞検討が必要である。また、その原因として、抗腫瘍免疫誘導系にかかわる免疫調節分子の低下、ドライバー変異などによるがん遺伝子活性化、それに伴うシグナル亢進を起点として多様な免疫細胞や免疫調節分子がかかわる免疫抑制カスケードが作動することが考えられる。がん細胞は遺伝子異常により、サイトカインや免疫抑制作用をもつ可溶性分子を分泌し、免疫抑制性物質を産生する。これらの分子は直接に免疫細胞を抑制するだけでなく、免疫抑制細胞群を誘導して、がん関連微小環境において免疫抑制状態を形成する。がん微小環境では、本来抗腫瘍免疫応答の促進作用をもつ樹状細胞やマクロファージなどもサイトカインなど

の影響を受けて寛容性樹状細胞や **M2** 様マクロファージなどの免疫抑制性細胞へ変化する。これらは上皮間葉転換も含めて免疫抑制的な間葉系の環境を構築するが、それは血管新生や組織修復リモデリング環境とも重複する。このような免疫抑制分子や免疫抑制細胞の除去や阻害について検討する必要がある、その起点となるがん遺伝子シグナル阻害剤の利用を基礎的に研究しておく必要があると考える。

腫瘍局所の免疫抵抗機序である **PD-L1** 発現は、抗腫瘍 **T** 細胞で誘導されるだけではなく、がん細胞自体の遺伝子異常により内因性に高発現する場合がある。そして、がん細胞自体の遺伝子異常による内因性の **PD-L1** 高発現も免疫逃避に関与する可能性がある。研究代表者は過去の研究で口腔癌において **AKT** シグナル経路の亢進と予後についての相関性を認めているが、脳腫瘍では **PIK3/AKT/PTEN** シグナル経路の亢進と内因性の **PD-L1** 高発現との相関性が報告されている。口腔がんにおいて、**mTOR** を含め **AKT** に関与する遺伝子やたんぱく異常と **PD-L1** 発現との相関性について検討しておくことは重要と思われる。

3．研究の方法

口腔癌症例の臨床検体を用いて免疫組織化学的研究を行った。**PD-L1**、**PD-L2**、**PD-1** の腫瘍細胞およびその周辺での発現について検討した。**PD-L1** および **PD-L2** の発現と **PD-1** の発現分布に関する検討を行い、さらに、臨床的ならびに病理組織学的要因として **WHO** 分類、**TNM** 分類、浸潤様式としての **YK** 分類を中心とした様々な因子との相関性を検討した。また、**PD-L1**、**PD-L2** の発現結果と他因子との関係を調べるために、腫瘍側因子として、**MIB-1**、**PCNA**、**MMP2**、**MMP9**、**mTORC1**、**mTORC2**、**VEGF-A**、**VEGF-C**、**HIF-1** の発現とそれらとの相関性について検討した。宿主側因子としては、**PD-1** の他、**CD-8**、**CD14** について染色を行い発現とその相関性について検討した。また、患者の血液データを用いてリンパ球および単球の値を調べ免疫組織学的検討結果との相関性について検討した。培養細胞を用いた研究では、口腔癌由来培養細胞株の **HSC3**、**OSC19**、**SCC25** を用いて検討を行った。**FACSscan** を用いてそれらの細胞における **PD-L1** および **PD-L2** の発現状況を検討し、各細胞の増殖能と **MMP2** および **MMP9** の発現について、各種のアッセイを用いて検討を行った。さらに、**PD-L1** および **PD-L2** に対する抗体を用いて、各細胞におけるそれらのブロックを行い、細胞増殖能および **MMP2** と **MMP9** の発現の変化について検討した。ブロックを行った実験系に対し、**CDDP** を添加し同様の実験を行った。

4．研究成果

口腔癌症例としては、組織学的に扁平上皮癌で臨床的には舌癌症例を用いたが、**PD-L1** は **79.6%** に、**PD-L2** は **71.4%**、**PD-1** は **34.2%** に発現がみられた。

それらの結果をもとに臨床的ならびに病理組織学的因子との関連について検討したところ、**PD-L1** の発現している症例と **YK** 分類との間に相関性が認められた。また、生存率との関係では、**PD-L1** および **PD-L2** の両方が発現している症例群では、発現の無い群に比較して有意に予後が悪い結果であった。

PD-1 の発現は、**PD-L1** の発現とある程度の関連性は認められたものの、**PD-L2** の発現との相関性は認められなかった。また、**CD8** および **CD14** との相関性は認めず、血中のリ

ンパ球および単球との相関性も認められなかった。

免疫組織学的検討では、**PD-L1** および **PD-L2** の両方が発現している症例群では、両者の発現のない症例群に比べて、**MIB1**、**MMP2**、**MMP9** に関して有意に高い相関性が認められた。その他の因子の発現に関しては、有意差はないものの、**PD-L1** および **PD-L2** の両方が発現している症例群では、両者の発現のない症例群に比べて、高い傾向を示していた。

培養細胞を用いた実験では、**HSC3** では **PD-L1** および **PD-L2** の両方が発現しており、**OSC19** では **PD-L1** のみが発現していた。**SCC25** では **PD-L1** および **PD-L2** のどちらも発現していなかった。**PD-L1** 抗体および **PD-L2** 抗体を用いて実験を行ったところ、**Counting Kit-8** を用いた細胞増殖能研究では **HSC 3** では有意にその増殖能が抑制された。また、**MMP2** および **MMP9** の発現に関する研究でも、抗体を用いた実験群で **HSC 3** 細胞はその発現が抑制されていた。

CDDP を添加した細胞において、上記と同様に抗体を用いて検討を行ったが、**PD-L1** と **PD-L2** の両方を発現している細胞をブロックした場合に、低用量の **CDDP** において、効果が増幅する傾向があったが、有意差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 KOHEI FURUKAWA, GORO KAWASAKI , TAKAKO YOSHIDA and MASAHIRO UMEDA	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinicopathological and Prognostic Analysis of PD-L1 and PD-L2 Expression in Surgically Resected Primary Tongue Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 101-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12393	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川浩平、川崎五郎、梅田正博
2. 発表標題 口腔癌におけるPD-L1およびPD-L2の発現と意義
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
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
---------	---------