

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10355

研究課題名(和文) 口腔がん細胞株におけるPD-L1制御因子の検索

研究課題名(英文) Search for PD-L1 regulation factors in oral cancer cell lines

研究代表者

加藤 恵三 (Kato, Keizo)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40397336

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)：HSC-2細胞とHO-1-u-1細胞においてPD-L1陽性率およびCD44陽性率をMean Fluorescent Intensity (MFI) で検討した。nivolumabを応用したHSC-2細胞ではPD-L1とCD44陽性率に有意差は見られなかったが、濃度の上昇に伴いCD44の有意な減少が見られた。HO-1-u-1細胞ではPD-L1陽性細胞はほとんど検出されなかったが200 µg/mLでは、CD44陽性細胞およびMFIが有意に減少していた。試験結果から、nivolumabは口腔扁平上皮癌細胞のPD-L1発現に対して効果が少ないが、CD44に対して発現抑制効果を持つことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮がん細胞株においてニボルマブとPD-L1、CD44との関連について検討した結果、HSC-2細胞ではPD-L1とCD44陽性率に有意差は見られなかったが、濃度の上昇に伴いCD44の有意な減少が見られた。また、HO-1-u-1細胞ではPD-L1陽性細胞はほとんど検出されなかったが200 µg/mLでは、CD44陽性細胞およびMFIが有意に減少していた。これらの結果からニボルマブの口腔がんに対する作用機序を明らかにすることができた。今後ニボルマブを含む分子標的薬の適切な使用方法、あるいは他薬剤との相互作用などをさらに検討することで、口腔がん治療の根治を目指す一助になるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：PD-L1 positive rate and CD44 positive rate were examined by Mean Fluorescent Intensity (MFI) in HSC-2 cells and HO-1-u-1 cells.

In the examination by nivolumab, there was no significant difference in PD-L1 and CD44 positive rates in HSC-2 cells, but a significant decrease in CD44 was observed with increasing concentration. Almost no PD-L1-positive cells were detected in HO-1-u-1 cells, but at 200 µg / mL, CD44-positive cells and MFI were significantly reduced.

From our results, it was shown that nivolumab has a small effect on PD-L1 expression in oral squamous cell carcinoma cells, but nivolumab has an expression inhibitory effect on CD44.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん ニボルマブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤・転移においてがん幹細胞の関与が重要な役割を果たすことが明らかになっている。口腔がんのがん幹細胞はCD44+細胞が候補としてあげられ、上皮間葉移行(EMT)による浸潤・転移の促進も明らかにされている。一方、肺扁平上皮癌においてCD44+細胞とPDL1の発現は相関していることが示唆されている。また、肺扁平上皮癌においてPD-L1の発現を検討した結果、PD-L1強発現群に再発がみられ予後因子としての可能性が示唆されている。

これまでPD-L1の発現についてメチル化との関わりが多くの領域で報告されており、口腔領域でも関連があることが予想される。PD-L1については周知の通りがん治療の新治療としてヒト型抗ヒトPD-1モノクローナル抗体(nivolumab)が商品化され注目されているが、このnivolumabも万能ではなく、他の制御因子との関連を明らかにすることは重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

これまで口腔がん細胞株においてCD44+細胞に代表されるがん幹細胞とEMT、さらにはそれらを制御する因子の関連を詳細に検討した研究はなされていない。本研究によりがん幹細胞とEMTとの関連性を明確にすることにより、がん幹細胞仮説に新たな知見を与えることになるとと思われる。

さらに、がん幹細胞を長期的に継代培養し、腫瘍細胞の発育速度や形態変化、さらには抗がん剤・分子標的薬の治療効果も確認できると考えられ、治療の新規標的分子の発見にも繋がり今後の新たな予防策・治療法、個々の患者に応じたいわゆるオーダーメイド治療への道も拓くと考えられる。

### 3. 研究の方法

細胞は培地を用いて T-75 フラスコに起眠し、必要細胞数になるまで CO2 インキュベーター (37 °C、5% CO2、湿潤) で培養した。0.25% Trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離、培地で中和、遠心後、新たな培地に懸濁して 6 ウェル plate に 60 万細胞/ウェルで播種し、CO2 インキュベーターで培養した。

翌日、群構成欄記載の Nivolumab 添加培地に交換し、CO2 インキュベーターで 24 時間インキュベートして被験物質処理した。

処理後、抗 PD-L1 抗体、抗 CD44 抗体、アイソタイプコントロール抗体染色を行い、FACS 解析を行った。0.25% Trypsin EDTA で細胞を剥離し、400xg で遠心して上清を除去し、DPBS(4 °C) で 2 回遠心・洗浄した後、DPBS 100 μL に懸濁し、Human BD Fc Block を 5 μL 添加して 10 分氷上でブロッキングした。次に、抗体および死細胞除去試薬 (LIVE/DEAD red) を所定の容量添加し、30 分間氷上で染色した。DPBS (室温) で 3 回遠心・洗浄した後、2% FBS 添加 DPBS 200 μL に懸濁し、CytoFLEX S (Beckman Coulter) を用いて FCM 解析を行い、CytExpert Version 2.4.0.28 を用いてデータ解析を行った。FSC-SSC プロットから細胞領域をゲートし、single cell を抽出後、死細胞を除去し、PD-L1 あるいは CD44 陽性率および PD-L1 および CD44 蛍光強度に対する MFI (Mean Fluorescent Intensity) 算出した。

Dunnett's test により比較試験群間 (非添加コントロール vs nivolumab 処理群) の有意差検定を行った。両側検定を行い、 $P < 0.05$  を有意差有とした。

#### 4. 研究成果

HSC-2 の生細胞における PD-L1 および CD44 に対する蛍光強度ヒストグラムを図 1 に示す。アイソタイプコントロール (Iso Ctrl) に対する蛍光強度との比較から算出した PD-L1 陽性率および CD44 陽性率を図 2 および表 1、そして PD-L1 および CD44 の蛍光強度に対する MFI を図 3 および表 2 に示す。同様に、HSC-2 の生細胞における PD-L1 および CD44 に対する蛍光強度ヒストグラムを図 4 に、アイソタイプコントロール (Iso Ctrl) に対する蛍光強度との比較から算出した PD-L1 陽性率および CD44 陽性率を図 5 および表 3、そして PD-L1 および CD44 の蛍光強度に対する MFI を図 6 および表 4 に示す。Ho-1-u-1 細胞では、PD-L1 および CD44 陽性率は nivolumab 処理による有意な差は見られなかった。一方で、nivolumab 処理濃度の上昇に伴い CD44 の MFI では有意な減少が見られた。H0-1-u-1 細胞では、PD-L1 陽性細胞はほとんど検出されなかった。200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nivolumab 処理条件において、CD44 陽性細胞および MFI が有意に減少していた。

試験結果から、nivolumab は口腔扁平上皮癌細胞の PD-L1 発現に対しては効果が見られないが、CD44 に対しては発現抑制効果を持つことが示された。

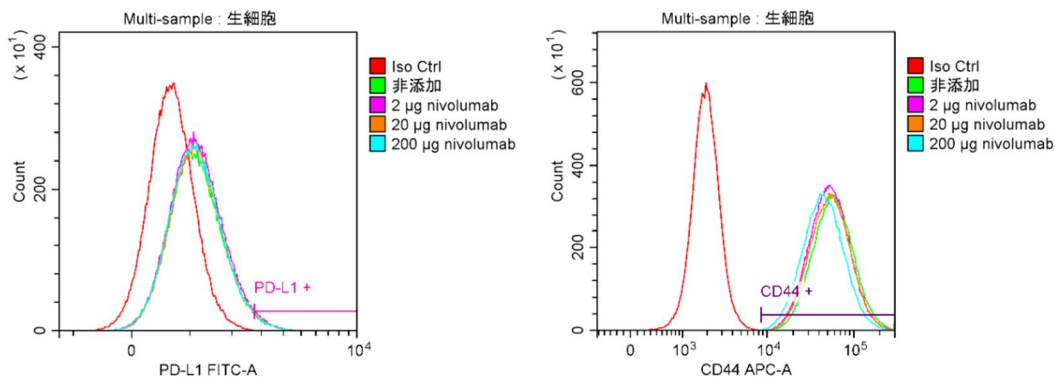


図1. HSC-2、PD-L1およびCD44の蛍光強度ヒストグラム

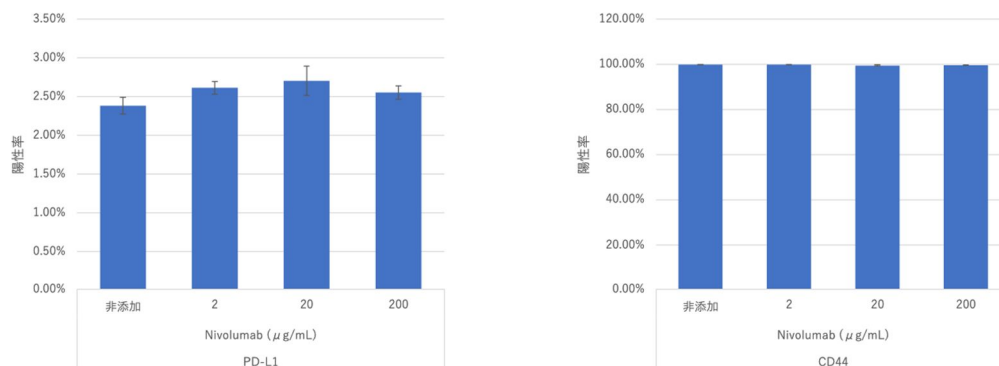


図2. HSC-2、生細胞におけるPD-L1およびCD44の陽性率

N=3, Bar=Mean  $\pm$  SE

Dunnett's test \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

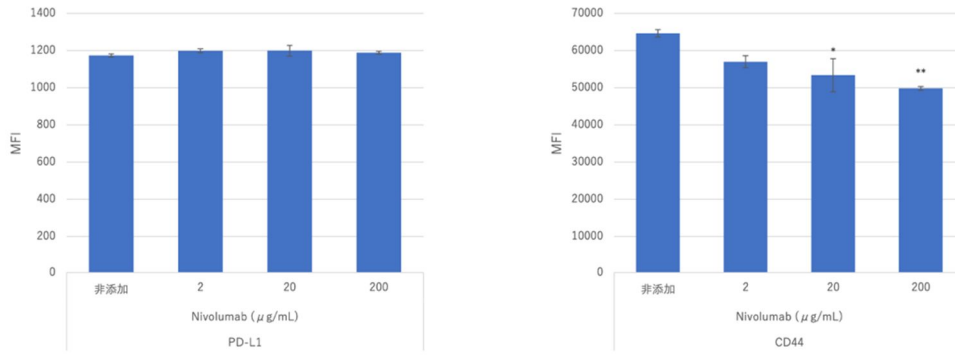


図3. HSC-2、生細胞におけるPD-L1およびCD44に対するMFI

N=3, Bar=Mean±SE

Dunnnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

表1. HSC-2、生細胞におけるPD-L1およびCD44の陽性率

細胞 表面抗原	HSC-2							
	PD-L1				CD44			
	Nivolumab (µg/mL)				Nivolumab (µg/mL)			
Nivolumab (µg/mL)	非添加	2	20	200	非添加	2	20	200
陽性率	2.46%	2.64%	2.51%	2.40%	99.84%	99.87%	99.85%	99.74%
	2.17%	2.46%	2.52%	2.56%	99.88%	99.85%	98.82%	99.70%
	2.52%	2.74%	3.08%	2.70%	99.87%	99.83%	99.80%	99.38%
Mean	2.38%	2.61%	2.70%	2.55%	99.86%	99.85%	99.49%	99.61%
SE	0.11%	0.08%	0.19%	0.09%	0.01%	0.01%	0.34%	0.11%
Dunnnett's test	vs	0.4576	0.2337	0.6624	vs	0.9999	0.3679	0.6289

Dunnnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

表2. HSC-2、生細胞におけるPD-L1およびCD44に対するMFI

細胞 表面抗原	HSC-2							
	PD-L1				CD44			
	Nivolumab (µg/mL)				Nivolumab (µg/mL)			
Nivolumab (µg/mL)	非添加	2	20	200	非添加	2	20	200
MFI	1174.9	1195.7	1188.8	1177	65214	59202.1	60435.3	50825.1
	1157.6	1181.8	1154.7	1204.1	65940.6	57854.7	45185	49116.6
	1188.5	1218.2	1254.3	1184.2	62693	53831.1	54537	49444.4
Mean	1173.6667	1198.5667	1199.2667	1188.4333	64615.867	56962.633	53385.767	49795.367
SE	8.9413521	10.605083	29.224438	8.1043884	984.0476	1613.3555	4439.8542	523.49029
Dunnnett's test	vs	0.6089	0.5905	0.8656	vs	0.1309	0.0281	0.0065

Dunnnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

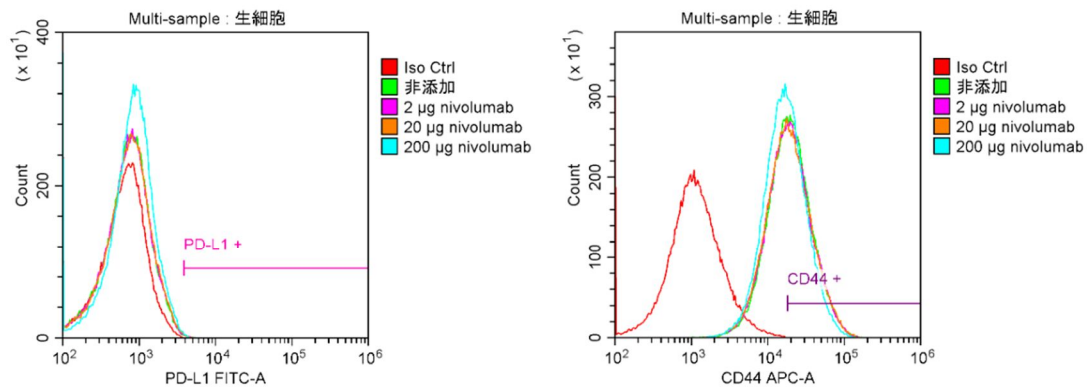


図4. HO-1-u-1、PD-L1およびCD44の蛍光強度ヒストグラム

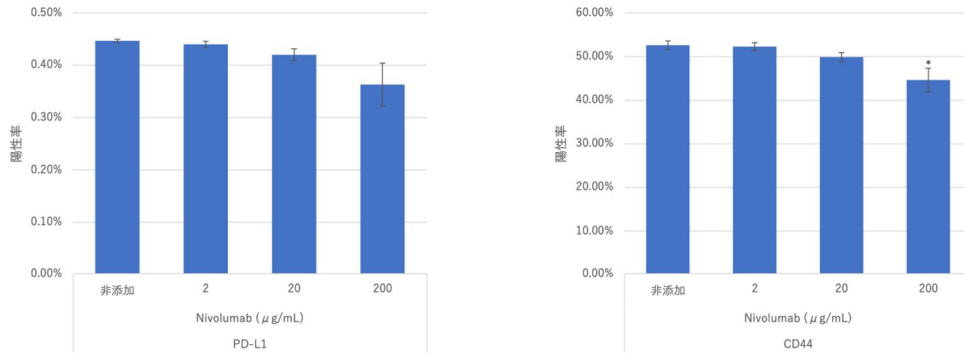


図5. HO-1-u-1、生細胞におけるPD-L1およびCD44の陽性率

N=3, Bar=Mean ± SE

Dunnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

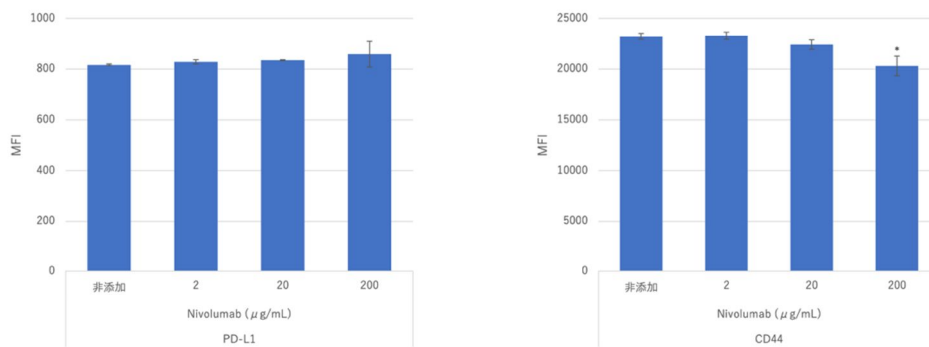


図6. HO-1-u-1、生細胞におけるPD-L1およびCD44に対するMFI

N=3, Bar=Mean ± SE

Dunnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

表3. HO-1-u-1、生細胞におけるPD-L1およびCD44の陽性率

細胞 表面抗原	HO-1-u-1							
	PD-L1				CD44			
	Nivolumab (µg/mL)				Nivolumab (µg/mL)			
Nivolumab (µg/mL)	非添加	2	20	200	非添加	2	20	200
陽性率	0.45%	0.44%	0.44%	0.35%	52.87%	51.67%	50.83%	44.71%
	0.44%	0.43%	0.42%	0.44%	54.15%	54.05%	50.97%	49.27%
	0.45%	0.45%	0.40%	0.30%	50.80%	51.12%	47.79%	39.83%
Mean	0.45%	0.44%	0.42%	0.36%	52.61%	52.28%	49.86%	44.60%
SE	0.00%	0.01%	0.01%	0.04%	0.98%	0.90%	1.04%	2.73%
Dunnett's test	vs	0.9922	0.7218	0.0619	vs	0.9977	0.5153	0.0193
								*

Dunnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

表4. HO-1-u-1、生細胞におけるPD-L1およびCD44に対するMFI

細胞 表面抗原	HO-1-u-1							
	PD-L1				CD44			
	Nivolumab (µg/mL)				Nivolumab (µg/mL)			
Nivolumab (µg/mL)	非添加	2	20	200	非添加	2	20	200
MFI	822.1	822.7	833.3	925.9	23297.4	22998.2	23033	20207.6
	811.3	820.3	839.2	893.1	23660.8	23960.9	22778.9	22068.9
	818.6	845.7	835.2	761	22741.5	22934.1	21495.1	18718.4
Mean	817.33333	829.56667	835.9	860	23233.233	23297.733	22435.667	20331.633
SE	3.1813694	8.0963641	1.7387735	50.397454	267.31139	332.09924	475.96952	969.19223
Dunnett's test	vs	0.9730	0.9175	0.5339	vs	0.9996	0.6616	0.0192
								*

Dunnett's test \*: p<0.05, \*\*: p<0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	原 明  (Hara Akira)  (10242728)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授   (13701)	
研究分担者	武内 勝章  (Bunai Katsuaki)  (30601091)	岐阜大学・大学院医学系研究科・助教   (13701)	
研究分担者	柴田 敏之  (Shibata Toshiyuki)  (50226172)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授   (13701)	
研究分担者	富田 弘之  (Tomita Hiroyuki)  (50509510)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授   (13701)	

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