

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K18959  
研究課題名(和文) 口腔癌の免疫抑制メカニズムの解析と、ニボルマブ有効症例のスクリーニングへの応用  
  
研究課題名(英文) Analysis of the immunosuppressive mechanism of oral cancer to identify the patients who respond to nivolumab  
  
研究代表者  
西井 直人(Nishii, Naoto)  
  
東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教  
  
研究者番号：40836285  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニボルマブを使用した口腔癌患者について、免疫プロファイルと治療効果の関係を解析したところ、癌細胞と免疫細胞のPD-L1発現率を表すCPSは概ね治療効果を反映していたが、完全奏効症例のうち1例はCPS0であり、CD8T細胞の浸潤も全く認めず、免疫プロファイルが治療効果を反映していない症例であった。この症例について、他のバイオマーカーとして研究されている遺伝子変異プロファイル、および末梢血中の好中球リンパ球比率NLRを測定した結果、遺伝子変異プロファイルは治療効果を反映していなかったが、NLRの治療経過に伴う推移は治療効果を反映しており、多角的なバイオマーカーの必要性が示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ニボルマブ治療の奏効率が他の癌腫より低いと言われる口腔癌において、癌周囲の免疫プロファイルから治療効果を予測するバイオマーカーを発見することを目的に、免疫プロファイルと治療効果の関係を解析した。その結果、免疫プロファイルだけでは治療効果を正確に予測することは困難であり、遺伝子変異プロファイルや末梢血中の好中球リンパ球比率等、複数のバイオマーカーを組み合わせて総合的に評価することが必要であることが示唆された。今後のバイオマーカー研究には、多因子を包括的に評価することが重要であることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)： We analyzed correlations of treatment efficacy of nivolumab with PD-L1 expression in the tumor microenvironment by immunohistochemistry, gene mutation profile of tumor, and neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) in peripheral blood of oral cancer patients. Two patients showed complete response (CR), while five showed no therapeutic effect. PD-L1 expression was correlated with treatment efficacy in most patients, but PD-L1 expression was absent in one patient with CR. Gene mutation analysis of tumor cells did not contribute to prediction of the treatment effect in the patient, either. Pre-treatment NLR was not correlated with treatment outcome, but NLR in responders declined gradually to < 4 after the third nivolumab treatment; this markedly differed from the findings in non-responders, who exhibited increased NLR during therapy. NLR changes reflect the early treatment response in OSCC patients treated with nivolumab.

研究分野： 口腔癌

キーワード： 口腔癌 癌免疫プロファイル 免疫チェックポイント阻害剤 ニボルマブ 遺伝子変異プロファイル 好中球リンパ球比率 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

癌周囲には、癌細胞を排除する「正の免疫」と癌の排除を抑制する「負の免疫」が存在する。本来、細胞が癌化すると「正の免疫」によって癌細胞は排除されるのだが、免疫細胞の攻撃から逃れてより抵抗性のある癌細胞が生き残ると、免疫細胞と癌細胞の平衡状態を経て、臨床で見られる癌へと成長する。つまり臨床で見られる癌では、抑制性の細胞や分子といった負の免疫が優位になっており、免疫細胞が癌細胞を効果的に排除できなくなっているのである。正の免疫としては CD8T 細胞、NK 細胞、マクロファージがあげられ、負の免疫の構成要素としては制御性 T 細胞 (Treg)、骨髄由来抑制細胞 (MDSC)、腫瘍関連マクロファージ (TAM) といった細胞と、抑制性の細胞表面分子である免疫チェックポイントが挙げられる。近年、癌微小環境に働く強力な負の免疫を解除することにより、癌細胞の排除を効果的に行うという方法が開発された。それが現在最も注目を集めている「免疫チェックポイント阻害療法」である。免疫チェックポイントとは、T 細胞の過度な活性化を抑制する細胞表面分子であるが、癌周囲では強力な負の免疫作用を持っている。代表的な分子として本庶佑らが発見した PD-1 があげられるが、この阻害抗体ニボルマブはメラノーマをはじめ多くの進行癌で画期的な治療成果をあげ臨床応用に至った (David R et al. 2012 New England Journal of Medicine)。現在はメラノーマだけでなく、肺癌、腎癌、頭頸部扁平上皮癌等における有効性が臨床試験で確認され、適応が拡大している。ニボルマブが有効であった例を見ると夢の薬のように感じるが、具体的な適応基準を設けずに汎用することは、特に口腔癌において無視できない問題をはらんでいる。ニボルマブはメラノーマにおいて、約 30%の患者に有効であったが、口腔癌における治療成績はその約半分であると報告されている (M.L. Gillison et al. 2016 New England Journal of Medicine)。ニボルマブの使用において種々の有害事象の発生が懸念されることや、1 回の使用料が約 40 万円と高価であることを考慮しても、治療応答性の低い口腔癌に対してニボルマブを汎用すべきではない。治療開始前に感受性の高い患者を選別するスクリーニングが必要であると考えられる。

ニボルマブに応答するかどうかは、癌周囲に治療の標的となる細胞や分子がどの程度浸潤・発現しているかが鍵になっていると考えられる。ニボルマブは癌細胞による CD8T 細胞の機能抑制を解除する効果があるが、癌周囲に CD8T 細胞が存在しなければ効果を発揮することができない。また、癌細胞上に PD-1 のリガンドとなる PD-L1 の発現が低い場合、PD-1/PD-L1 経路の解除を目指した治療は有効でないことが容易に想像できる。また、口腔癌では Treg や MDSC など負の免疫細胞の集積が多いことも報告されている。つまり、臨床で見られる癌は患者によって異なる強力な免疫抑制メカニズムを備えており、その主体が PD-1/PD-L1 でない場合、ニボルマブへの感受性が低いと考えられた。

## 2. 研究の目的

口腔癌における免疫抑制メカニズムを解明し、ニボルマブ適応の具体的基準を定めるためには、一つの細胞や分子に着目するのではなく、正の免疫と負の免疫の両面から個々の癌における免疫学的プロファイルを多角的に把握する必要がある。本研究では、①口腔癌周囲の免疫プロファイルを解析し、個々の癌における免疫抑制メカニズムを評価する系を確立すること②それを利用してニボルマブに反応する患者をスクリーニングする基準を作成すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

当初、東京医科歯科大学顎口腔腫瘍外科学分野で加療した口腔癌患者に対し、分子免疫学分野との共同研究によって、多重免疫染色による免疫プロファイル解析を実施する予定であった。しかし、研究者が山梨県立中央病院に異動になったこと、新型コロナウイルス蔓延のため、東京医科歯科大学との共同研究が困難になったことにより、研究計画の変更を余儀なくされた。

そこで、山梨県立中央病院口腔外科でニボルマブを使用した 7 人の患者について、直近の再発腫瘍からの生検サンプルあるいは手術標本を用いて、連続切片を作成し、CD8、Foxp3、PD-L1 を単染色による免疫染色を施行し、癌周囲の免疫プロファイルを解析した。また、免疫プロファイル以外にバイオマーカーとして研究されている、癌自体の遺伝子変異プロファイル、および血液中の好中球リンパ球比率 (Neutrophil to lymphocyte ratio: NLR) についても測定し、治療効果との相関を検討した。

当初予定していた多重免疫染色による口腔癌の免疫プロファイル解析については、分子免疫学分野で行われ、研究者も一部協力した。

## 4. 研究成果

山梨県立中央病院口腔外科でニボルマブを使用した 7 例のうち、2 例は完全奏効 (CR)、5 例は病状進行 (PD) であった (図 1)。そのうち、再発病変の生検が行われたのは、CR2 例、PD3 例の計 5 例であった。癌細胞と免疫細胞の PD-L1 発現率を表す CPS を算出すると、PD 群は全て CPS20 未満と低値で有り、CR のうち 1 例 (症例 1) は CPS20 以上と高値であった。CPS がニボルマブ奏

効率を反映すると思われたが、CRのうちもう1例(症例2)はCPS0であり、CD8T細胞の浸潤も全く認めない症例であった(図2)。免疫プロファイルからはニボルマブが奏効しないと考えられる症例2について、治療効果を反映するバイオマーカーが存在したかを調べるために、whole exome sequenceを行い、遺伝子変異プロファイル解析した。その結果、マイクロサテライト安定、かつ遺伝子変異量(TMB)も低値であり、ニボルマブが奏効しやすい遺伝子変異プロファイルでは無いことが分かった。最後に、末梢血中のNLRを測定した。NLR低値、すなわちリンパ球の比率が高いとニボルマブ奏効率が高いと言われているが、CR群症例2は治療開始前から治療経過中も常にNLRが低値で有り、治療効果を反映していた。さらに、全症例のNLRと治療効果を比較すると、治療開始前のNLRは治療効果を反映していない症例が多いが、治療経過中に奏効群はNLRが低下し、逆に非奏効群ではNLRが上昇する傾向に有り、カットオフ値を4として、ニボルマブ投与3回目以降、奏効群はNLR4以下、非奏効群はNLR4以上に保たれていることが分かった(図3)。当初の目的であった、免疫プロファイルからニボルマブ治療効果を予測する評価系の樹立は達成できなかったが、免疫プロファイルだけでは正しくニボルマブ治療効果を予測することは困難で有り、遺伝子変異プロファイルやNLRを総合的に加味して治療効果を予測することが重要であることを示唆する結果を得ることができた。

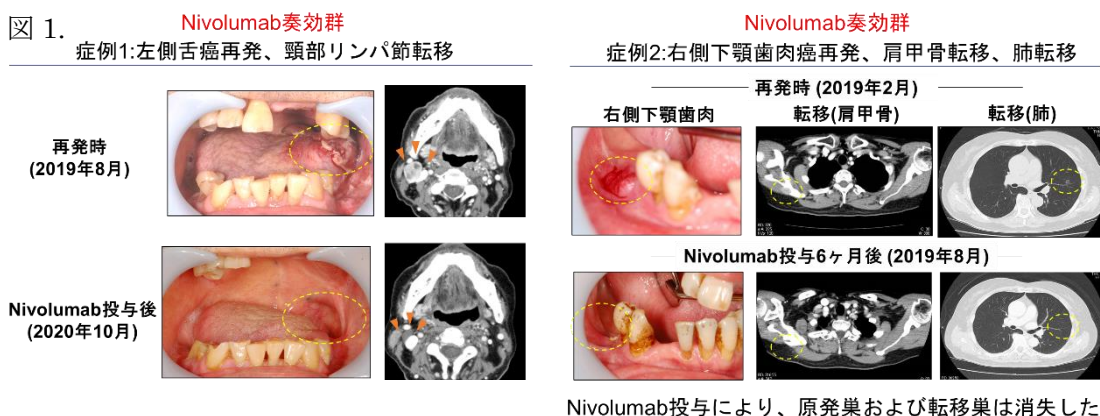
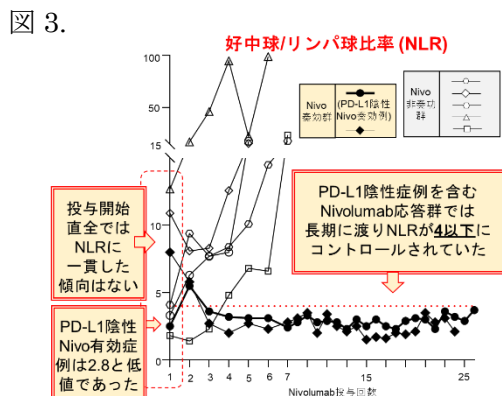
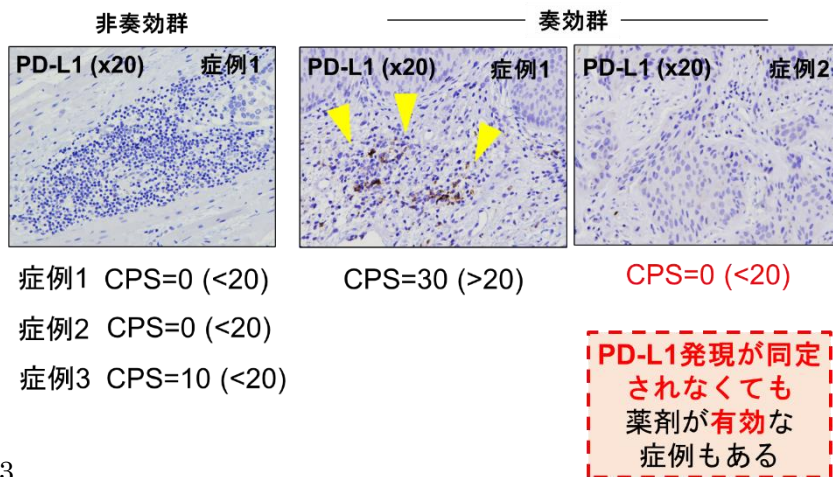


図2. Nivolumab使用時、対象病変の生検がなされた5例(奏効群:2例、非奏効群:3例)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nishii Naoto, Shimamoto Hiroaki, Ohsako Toshimitsu, Yokokawa Misaki, Sato Yuriko, Ohata Yae, Kayamori Kou, Ikeda Tohru, Harada Hiroyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Renal cell carcinoma metastasis to the maxillary bone successfully treated with surgery after vascular embolization: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-020-02522-6	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 -

1. 著者名 NISHII NAOTO, HIROTSU YOSUKE, KOIDA NAMI, TAKAHASHI YUKINOBU, TAKAGAWA YUKI, AMEMIYA KENJI, OYAMA TOSHIO, MOCHIZUKI HITOSHI, FURUSAWA-NISHII EMI, HARADA HIROYUKI, OMATA MASAO	4. 巻 41
2. 論文標題 Discrepancy Between Clinical Diagnosis and Whole-exome Sequencing-based Clonality Analysis of Synchronous Multiple Oral Cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14859	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西井直人、高川祐樹、高橋幸伸、小井田奈美、原田浩之
2. 発表標題 PD-1阻害抗体：Nivolumab投与効果を予測する新規評価系樹立の取り組み
3. 学会等名 口腔外科学会 関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井直人、高川祐樹、高橋幸伸、小井田奈美、原田浩之
2. 発表標題 同時性口腔多発癌における全エクソーム解析によるClonality分析
3. 学会等名 日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西井直人、高川祐樹、高橋幸伸、小井田奈美、原田浩之
2. 発表標題 PD-1阻害抗体：Nivolumab投与効果を予測する新規評価系樹立の取り組み
3. 学会等名 日本口腔外科学会関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西井直人、島本裕彰、横川美咲、佐藤百合子、佐藤 潔、大畑 八重、栢森 高、池田 通、原田浩之
2. 発表標題 上顎に転移した腎細胞癌の1例
3. 学会等名 頭頸部癌学会
4. 発表年 2019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