

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19201

研究課題名（和文）口腔癌由来エクソソームに発現されるPD-L1の抗腫瘍免疫に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effects of OSCC cells-derived exosomal PD-L1 on anti-tumor immunity

研究代表者

仙頭 慎哉（Sento, Shinya）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：30635264

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）：がん細胞は、免疫チェックポイント分子であるPD-1のリガンド：PD-L1を発現することにより免疫監視から逃れることができる。近年、PD-1経路阻害薬の有効性が証明され、再発または遠隔転移を有する頭頸部がんも適応となっているが、奏効率は低い。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌細胞に発現されているPD-L1のintrinsicな作用を検討した。その結果、PD-L1はPD-1との相互作用非依存的に癌細胞の増殖・遊走・浸潤能および抗がん剤抵抗性を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌においてPD-L1はintrinsicに作用し、癌細胞の悪性形質の維持・促進に作用することが明らかとなった。このことは、現行のPD-1/PD-L1のinteractionを標的とする抗PD-1抗体薬、抗PD-L1抗体薬といったPD-1経路阻害薬に加え、癌細胞に発現するPD-L1そのものを標的とする治療薬の開発、応用の必要性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Tumor cells can escape immune surveillance by expressing PD-L1, a ligand of immune checkpoint molecule PD-1. Although the PD-1/PD-L1 pathway inhibitors have been applied for patients with recurrent or metastatic oral squamous cell carcinoma recently, but the response rate is low. Therefore, we investigated the intrinsic roles of PD-L1 expressed in oral squamous cell carcinoma cells. As a result, it was clarified that PD-L1 promotes the proliferation, migration, invasion, and chemoresistance of OSCC cells.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌 PD-L1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

PD-L1 は樹状細胞や B/T 細胞に発現され、活性化 T 細胞に発現する受容体である PD-1 に結合することにより T 細胞の過剰な活性化を抑制し自己免疫制御を行っている。腫瘍組織では、がん細胞は自身の遺伝子異常や腫瘍浸潤細胞が産生する IFN- $\gamma$  などにより PD-L1 を高発現し、T 細胞の活性化を抑制することで免疫回避が生じている。さらに、PD-L1 は上記の extrinsic な作用以外に intrinsic な作用も有し、上皮間葉移行、転移、治療抵抗性、がん幹細胞形質の獲得などに関与することが明らかとなっている。

近年、PD-1 と PD-L1 との結合を阻害することにより、がん細胞により不応答となっていた抗原特異的 T 細胞の機能を回復・活性化させ、抗腫瘍効果を示す PD-1 経路阻害薬 (抗 PD-1 抗体薬; ニボルマブ、ペムブロリズマブ、抗 PD-L1 抗体薬; アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブなど) が開発され、様々ながんの治療に用いられるようになってきている。しかし、PD-1 経路阻害薬の奏効率は 10-30% と決して高くないことや、高額な薬価、免疫関連副作用、投与後のがんの増悪、後治療への影響など解決すべき問題が多数生じている。従って、有効性や副作用を予測できるバイオマーカーによる患者選択や PD-1 経路阻害薬の奏効率をさらに上乘せできる最適な併用療法の検討、免疫関連副作用の管理などが求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では口腔扁平上皮癌細胞に発現される PD-L1 の悪性形質獲得における intrinsic な作用を明らかにするとともに、抗がん剤、EGFR 標的薬、PD-1 経路阻害剤といった口腔扁平上皮癌治療薬ならびに低酸素環境が PD-L1 の発現に及ぼす影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞、健常人歯肉より分離した口腔粘膜上皮細胞および株化口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞における PD-L1 の発現検討

不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞 (RT-7)、健常人歯肉より分離した口腔粘膜上皮細胞ならびに株化 OSC 細胞 (SAS、HSC-2、-3、-4、OSC-2、-4、-5、-6、H103、T3M-1 clone2、Has-89、COH9-22、HO-N-1、HO-U-1、KOSC2 cl3-43、KON、SAT) を培養した後、total cell lysate を回収し、PD-L1 の発現についてウェスタンブロッティングを行った。

口腔扁平上皮癌細胞に発現される PD-L1 による口腔癌の免疫回避機構と悪性形質獲得への影響

PD-L1 高発現 OSC 細胞株の SAS および HSC-3 に PD-L1-siRNA をトランスフェクションした後、各細胞の増殖・遊走および浸潤能に及ぼす影響をそれぞれ CCK-8 assay、Wound healing assay および Invasion assay にて検討した。さらに、抗がん剤感受性に及ぼす影響について、5-FU あるいは CDDP で処理し、増殖、アポトーシスおよび細胞周期に及ぼす影響をそれぞれ CCK-8 アッセイ、Annexin-V 染色および PI 染色によるフローサイトメトリー法を用いて検討した。

口腔扁平上皮癌治療薬および低酸素環境の PD-L1 の発現への影響

PD-L1 高発現 OSC 細胞株: SAS および HSC-3、PD-L1 低発現 OSC 細胞株: KOSC2 cl3-43、KON を抗がん剤 (5-FU、CDDP、DOX、PTX)、EGFR 標的薬 (セツキシマブ、エルロチニブ)、PD-1 経路阻害剤 (ニボルマブ、デュルバルマブ) で処理し、24 時間後に TCL を回収し、PD-L1 の発現についてウェスタンブロッティングを行った。低酸素環境の影響については、1% O<sub>2</sub> 濃度

の低酸素インキュベーターで 24 時間培養し、正常酸素濃度(20% O<sub>2</sub>)における PD-L1 の発現との比較検討を行った。

#### 4 . 研究成果

不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞、健常人歯肉より分離した口腔粘膜上皮細胞および株化口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞における PD-L1 の発現検討

不死化ヒト口腔粘膜上皮細胞(RT-7)、健常人歯肉より分離した口腔粘膜上皮細胞では PD-L1 の発現はほとんど認められなかったのに対し、株化 OSC 細胞では検討した 17 株のうち、8 株で高発現、6 株で中程度の発現が認められ、3 株では発現が認められなかった。

口腔扁平上皮癌細胞に発現される PD-L1 による口腔癌の免疫回避機構と悪性形質獲得への影響

PD-L1 高発現 OSC 細胞株の SAS および HSC-3 に PD-L1-siRNA を導入すると、増殖能が低下するとともに、細胞周期においては G0/G1 arrest の誘導が認められるとともに、細胞増殖に関わる ERK、AKT、STAT3 のリン酸化レベルが低下した。また、PD-L1 ノックダウンにより、遊走能、マトリゲルへの浸潤能も低下し、上皮間葉移行に関わる蛋白発現の影響を検討したところ、間葉系マーカーの N-cadherin、Vimentin の発現が低下した。また、抗がん剤感受性への影響について検討した結果、PD-L1 ノックダウンにより抗がん剤に対する感受性は増強した。

口腔扁平上皮癌治療薬の PD-L1 の発現への影響

検討したすべての OSC 細胞株で、4 種類の抗がん剤 (5-FU、CDDP、DOX、PTX) のうち、5-FU および CDDP 処理により PD-L1 の発現が亢進した。一方、EGFR 標的薬 (セツキシマブ、エルロチニブ) は PD-L1 の発現を抑制した。さらに、PD-1 経路阻害剤 (ニボルマブ、デュルバルマブ) 処理は、PD-L1 の発現には影響しなかった。また、正常酸素濃度と比較して、低酸素濃度条件下では PD-L1 の発現が亢進した。

以上の結果より、低酸素微小環境において OSC 細胞の多くは PD-L1 を高発現しており、発現された PD-L1 は OSC 細胞の悪性形質の維持・促進に作用していることが示唆された。また、一部の OSC 治療薬は OSC 細胞に PD-L1 の発現を誘導することにより、治療抵抗性を獲得させる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Naoya Kitamura, Shinya Sento, Yasumasa Yoshizawa, Eri Sasabe, Yasusei Kudo, Tetsuya Yamamoto	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Current trends and future prospects of molecular targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22010240.	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 Shinya Sento, Yasusei Kudo, Kenji Hibiya, Naozumi Ishimaru, Eri Sasabe, Naoya Kitamura, Tetsuya Yamamoto.	4. 巻 32(4)
2. 論文標題 Hyalinizing clear cell carcinoma of the anterior lingual salivary gland: A case report and review of the literature.	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 267-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2020.03.002	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 Naoya Kitamura, Shinya Sento, Eri Sasabe, Katsuhito Kiyasu, Kosuke Nakaji, Masanori Daibata, Tetsuya Yamamoto	4. 巻 15(4)
2. 論文標題 Vertebral fracture and splenomegaly in a head and neck cancer producing granulocyte colony-stimulating factor: A case report of systemic complications associated with a cytokine-producing solid tumor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2364.	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 Eri Sasabe, Ayumi Tomomura, Hangyu Liu, Shinya Sento, Naoya Kitamura, Tetsuya Yamamoto.	4. 巻 113(2)
2. 論文標題 Epidermal growth factor/epidermal growth factor receptor signaling blockage inhibits tumor cell-derived exosome uptake by oral squamous cell carcinoma through micropinocytosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 609-621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15225	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasumasa Yoshizawa, Shinya Sento, Riki Tomita, Kei Nakatani, Eri Sasabe, Naoya Kitamura, Tetsuya Yamamoto
2. 発表標題 Two cases of meningitis caused by medication-related osteonecrosis of the jaw.
3. 学会等名 The 60th Congress of Korea Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasabe E, Sento S, Tomita R, Yamamoto T
2. 発表標題 Senescence-associated Secretory Phenotype is involved in Cisplatin-resistant of Ora Cancer
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仙頭慎哉、工藤保誠、日比谷健司、石丸直澄、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 EWSR1-ATF1融合遺伝子が同定された硝子化明細胞癌の1例
3. 学会等名 第67回 NPO法人日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仙頭慎哉、富田理生、中谷貴恵、四道玲奈、山脇悠、青嶋美紀、笹部衣里、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔顔面領域に発生した転移性腫瘍7例についての臨床的検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仙頭慎哉、中谷貴恵、富田理生、吉澤泰昌、笹部衣里、北村直也、藤原キミ、杉本健樹、山本哲也
2. 発表標題 がん遺伝子パネル検査を施行した再発・転移進行口腔扁平上皮癌の2例
3. 学会等名 第49回（公社）口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2021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