

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19214

研究課題名(和文) 抗PD-L1抗体薬を用いた口腔癌における超選択的動脈内注入化学療法の新開発

研究課題名(英文) development of superselective intra-arterial infusion chemotherapy for oral cancer using anti-PD-L1 antibody drug

研究代表者

佐久間 要 (Sakuma, Kaname)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：70733319

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)：この研究では、マウスを使用して、少量の抗 PD-1 抗体の局所および全身投与の抗腫瘍効果、全生存期間(OS)、およびがん周辺の免疫環境を調査した。抗 PD-1 抗体は局所投与(30 mg/body)と全身投与(300 mg/body)をマウスで実験を行った。投与開始 29 日後に腫瘍縮小率と抗腫瘍効果を調べた。OS も他の各グループで比較された。結果：局所低用量群と全身群は同じ抗腫瘍効果を示し、両群とも対照群と有意差を示した。結論として抗 PD-1 抗体の低用量局所投与は、通常用量の全身投与と同じ抗腫瘍効果と OS を示し、口腔癌における低用量局所投与が有用である可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫療法は口腔がん治療の第4の柱として期待されている。しかし、1型糖尿病などの重篤な免疫関連有害事象(irAE)が報告されている。したがって、抗 PD-1 抗体を少量の動注療法で局所投与し、全身投与と同等の抗腫瘍効果が得られれば、irAE や医療費の削減につながると考えた。結果として、局所少量投与は、全身通常量投与と比較して非劣性であり、OS についても同等の結果であった。また、CD8やグランザイムを局所少量投与ではより強く腫瘍組織内に誘導している可能性があり、局所の少量投与は有用性が高い可能性が示唆された。これは、口腔癌における動注化学療法の有用性へ橋渡しになると考える。

研究成果の概要(英文)：Background/Aim: In this study, we investigated the antitumor effect of local and systemic administration of a small amount of anti-PD-1 antibody, overall survival (OS), and the immune environment around cancer using mice. The cell line was transplanted to the back of the mouse. And the anti-PD-1 antibody was locally administered in a small dose (30 mg / body) and systemically (300 mg / body). The tumor shrinkage rate and antitumor effect were examined 29 days after the start of administration. The OS was also compared in each of the other groups. Results: The local low-dose group and the systemic group had the same antitumor effect, and both groups showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) from the control group, and the OS also showed a significant prolongation. Conclusion: Local low-dose administration of anti-PD-1 antibody showed the same antitumor effect and OS as systemic normal-dose administration, suggesting that local low-dose administration in oral cancer may be useful.

研究分野：腫瘍学

キーワード：PD-1 局所投与 CD8

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、口腔癌における免疫療法は、抗 PD-1 抗体薬であるオプジーボが適応されている。この薬剤は主に腫瘍細胞を認識する T 細胞を活性化することで抗がん活性を得ている。しかし、腫瘍細胞以外を認識する T 細胞の活性化による自己免疫関連有害事象の副作用が問題視されており患者が副作用のため治療を断念することも少なくない。これは全身投与を行うことによる irAE の発症であると報告されており、容量依存性があるのではないかと考えた。そこで、PD-1 に対するリガンドの一つである Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) に着目した。免疫応答で炎症が起こると、リンパ球組織および末梢組織のさまざまな細胞が PD-L1 を発現する。一方、抗原刺激や炎症刺激により T 細胞に PD-1 が発現する。腫瘍に発現する PD-L1 は、PD-1 に結合すると T 細胞の機能を抑制し、免疫寛容を誘導する。がん細胞は PD-L1 を発現することによって、T 細胞の活性化を抑えて、宿主の免疫監視から逃れている。そこで、抗 PD-1/PD-L1 抗体によりこの免疫回避のシグナルを遮断すると T 細胞が活性化し、がんに対する免疫応答を増強する。この癌細胞に発現する PD-L1 に対して腫瘍栄養動脈に直接 PD-L1 抗体薬 (Avelumab) を少量投与することで、全身的な副作用を軽減し、治療効果を上げられないかと考えた。

### 2. 研究の目的

頭頸部癌に対する治療法としては、手術、放射線治療、薬物療法が 3 本の柱であり、進行癌に対してはこれらを組み合わせた集学的治療が行われている。また、手術回避と機能温存を目的とした逆行性超選択的動注化学放射線療法 (SSiACRT) が進行頭頸部癌に用いられており、浅側頭動脈 (STA) から腫瘍の栄養動脈へ直接少量で高濃度の抗癌剤投与が可能のため、非常に高い治療効果が得られている。しかしながら、必ず放射線療法の併用が必要なため、放射線性骨壊死や重度の粘膜炎が問題となることも少なくない。そんな中で、本邦では第 4 の柱として 2017 年に免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブが再発・転移頭頸部癌に対して承認され、治療の選択肢が広がった。この薬剤は主に腫瘍細胞を認識する T 細胞を活性化することで抗がん活性を得る。しかしながら、免疫関連有害事象 (immune related adverse events: irAEs) が大きな問題となっている (D)。irAEs は免疫チェックポイント阻害薬による免疫活性化に伴う正常細胞への過剰反応であり、自己免疫疾患に類似した有害事象である。その特徴は罹患臓器・症状・発症時期の多様性にあり、重篤な場合は副腎不全、劇症 1 型糖尿病、重症筋無力症、免疫関連心筋炎などもあり、発症時期も長いものでは免疫チェックポイント阻害薬投与 2 年後に生じたという報告もある (D)。そこで我々は、免疫チェックポイント阻害剤を局所へ超選択的に少量投与を行うことで副作用を軽減し、さらに周囲の免疫応答を強く誘発することで最大限の治療効果が得られないか、マウスを用いて基礎的に検討を行った。実験は、PD-L1 が発現していることを確認したマウス由来口腔扁平上皮癌細胞株の移植を行った担癌マウスに対して、抗 PD-1 抗体薬の局所少量投与と全身通常量投与を行った群で、抗腫瘍効果、全生存率、体重変動および摘出した腫瘍における免疫組織学的検討とリアルタイム PCR 法を用いて免疫環境変化の確認を行い、局所少量投与の有効性に関して基礎的検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### 実験材料

材料は C3H マウス頬粘膜口腔扁平上皮癌細胞株 (Sq-1979) を用いた。細胞株は、理化学研究所バイオリソース研究センター (茨城、日本) より購入したものを使用した。これらの細胞株は DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle's medium: 日本製薬) に 10% FBS (Fetal bovine serum: Life Technologies, Van Allen Way, CA, USA), 0.1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Life Technologies), 1% Penicillin-Streptomycin (Life Technologies), 0.1% ファンギゾン (Life Technologies) を加えた培養液を使用し、長径 35mm のプラスチックシャーレで 37℃、95% 湿度、5% CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベーター内で継代培養した。抗癌薬は、*In vivo plus* anti-mouse PD-1 (CD279) (Bio X Cell 社、東京) を用いた。マウスは細胞株と同系統の 5 週齢、雌、C3H/HeN マウス (Clea Japan, Tokyo, Japan) を用い、室温: 20~26℃、湿度: 40~60%、空気フィルター: HEPA、換気回数: 10~15 回/hour、風速: 15~20cm/sec、気圧: 外部に対して陽圧 5~8 mmHg<sub>0</sub>、照度: 200 lux/FL+800mm、暗明サイクル: 12 時間で飼育した。

#### 実験方法

・マウス由来口腔癌細胞株 (Sq-1979) の PD-L1 発現を flow cytometry で確認

・抗 PD-1 抗体薬の局所少量投与と全身通常量投与との抗腫瘍効果の比較

局所少量投与と腹腔内全身通常量投与の抗腫瘍効果の比較: 抗 PD-1 抗体はマウス PD-1 に対して交差反応性を示すため、正常な免疫能を有するマウスを宿主とした同系マウス腫瘍モデルで実験を行った。5 週齢雌性 C3H/HeN マウスの背部皮下に  $1 \times 10^6$  個の Sq-1979 細胞株を Hank's 液 0.5mL に希釈し、23G デルモシリンジ<sup>®</sup>にて移植を行った (H)。平均腫瘍重量 (TV) ( $1/2 \times$  長径  $\times$  短径<sup>2</sup>) が約 100~150 mm<sup>3</sup> に到達した時点でマウスを (6 匹/群) に振り分けた。各群における抗 PD-1 抗体薬の投与量は、Ajiona らの報告 (M) およびヒトにおけるニボルマブ投与時の Cmax

を参考として、抗 PD-1 抗体薬の腹腔内全身投与群には、100 µg/回の用量で 1, 5 及び 8 日に腹腔内投与とし、局所少量投与群には、背部腫瘍へ直接 23G デルモシリンジ®を用いて抗 PD-1 抗体薬を腹腔内全身投与群の 1/10 量である 10 µg/回の用量で 1, 5 及び 8 日に局所投与した。腹腔内全身投与群 (Total: 300 µg/ml), 局所少量投与群 (Total: 30 µg/ml), 局所投与 Control 群 (PBS) とした。腫瘍体積はノギスを用いて 3 日毎に TV の測定を行った。抗癌薬の抗腫瘍効果は、Geran ら (A) の方法に準じて、21 日目における対照群の相対腫瘍重量 (Control: C) と薬剤投与群の相対腫瘍重量 (Treat: T) より T/C 値を求めた。効果判定は、T/C 値 50%以下を有効として局所少量投与群と腹腔内全身投与群で抗腫瘍効果の比較を行った。さらに、投与後 29 日時点で、ソムノペンチル 200mg/kg 腹腔内投与にて犠牲死させ、移植腫瘍の増殖率の比較と背部腫瘍の摘出を行った。局所少量投与と全身投与における経時的な体重変動による副作用確認を行った。統計分析は Mann-Whitney U test (BellCurve for Excel) を用いた。なお、この研究における動物実験は、日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認 (approval no.207) のもとに行われた。

#### ・抗 PD-1 抗体薬の局所少量投与における全身通常量投与との全生存率 (OS) の比較

抗腫瘍効果の比較と同様の方法にて、5 週齢雌性 C3H/HeNjCl マウスの背部皮下に  $1 \times 10^6$  個の Sq-1979 細胞株を Hank's 液 0.5mL に希釈し、23G デルモシリンジ®にて移植を行った。平均腫瘍重量 (TV) ( $1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$ ) が約 100~150 mm<sup>3</sup> に到達した時点でマウスを (6 匹/群) に振り分けた。各群は腹腔内全身投与群 (Total: 300 µg/ml), 局所少量投与群 (Total: 30 µg/ml), 局所投与 Control 群 (PBS) とした。抗 PD-1 抗体薬の腹腔内全身投与群には、抗 PD-1 抗体薬を 100 µg/回の用量で 1, 5 及び 8 日に腹腔内投与を行った。局所少量投与群には、背部腫瘍へ直接 23G デルモシリンジ®を用いて抗 PD-1 抗体薬を 10 µg/回の用量で 1, 5 及び 8 日に局所投与した。 Kaplan-Meier 生存曲線の統計は、ログランク検定によって行った。  $p < 0.05$  の値は有意であるとみなした。星印は信頼区間を示す (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , P<0.001\*\*\*)。統計分析は、(BellCurve for Excel) を使用した。エンドポイントは、腫瘍重量が体重の 10%以上、腫瘍体積が 2000mm<sup>3</sup> を超える、腫瘍径が 20mm 以上、腫瘍の潰瘍化・壊死、歩行障害、摂水・摂餌障害としてその時点で犠牲死とした。

#### ・組織病理学的検査

摘出した各群の腫瘍を 10%ホルマリン中性緩衝液 (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) で 4 で 7 日間固定した。段階的エタノールで脱水した後、組織をキシレンに浸し、パラフィンに包埋を行った。続いて、ヘマトキシリンおよびエオシン (HE) 染色のために 5 µm の厚さの切片を調製した。

#### ・免疫組織染色

各サンプル (局所少量投与, 全身通常量投与, Control) で、PD-L1 (NBP-1-76769, NOVUS), CD8a (361 003, Synaptic Systems), Granzyme B (14-8822-80, Thermo Fisher Scientific), Perforin (ab16074, abcam) の免疫組織化学および免疫細胞化学を実施した。サンプルを光学顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE Co., LTD, Osaka, Japan) で観察した。

#### ・RT-PCR 法による Perforin および Granzyme B の遺伝子発現の確認

摘出したサンプル (局所少量投与, 全身通常量投与, Control) をバイオマッシャー® にて homogenization を行った。total RNA の抽出を ISOGEN (Nippon gene, 東京) を用いてプロトコールに従い行った。抽出した total RNA 1 µg を使用し、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) にて cDNA の合成を行い、RT-cycle (25, 10分 37, 60分 37, 60分 85, 5分 4, ) 後 Platinum PCR Super Mix (Life Technologies) と Perforin および Granzyme B プライマーを用いて、PCR cycle (denaturation 94, 30秒 annealing, 55, 30秒 extension 72, 60秒) を 35 cycle で PCR 増幅を行った。同条件下で Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を標準として PCR 増幅を行った。増幅された PCR 産物は 2%アガロースゲル (Nippon gene, 東京) で電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで可視化を行い、UV 照射ゲル撮影装置にて確認した。

#### ・real-time PCR 法による Perforin および Granzyme B の発現量の定量比較

RT-PCR 法と同様に、摘出したサンプル (局所少量投与, 全身通常量投与, Control) から ISOGEN (Nippon gene, 東京) を用いてプロトコールに従い total RNA を抽出した。real-time PCR 法は、PrimeScript RT™ reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を用いてプロトコールに従い、Perforin および Granzyme B の発現量について定量比較を行った。real-time PCR 法の結果は GAPDH 発現量により正規化、Control 群の結果と比較した変化倍率として示した。各組織を 6 回ずつ計測した。CT 法にて解析を行い、一元配置分散分析にて Perforin および Granzyme B を比較検討した。統計解析ソフトは Bell Curve を使用して行なった。

#### 4. 研究成果

##### Sq-1979 細胞株の PD-L1 発現

フローサイトメトリーより Sq-1979 細胞株における PD-L1 の発現を認めた (Fig. 1) .

##### 抗 PD-1 抗体薬による抗腫瘍効果の比較 (T/C%)

腹腔内通常量投与群は Control 群と比較して, T/C% が 44.1%と抗腫瘍効果を認めた (Fig. 2A) . さらに, 局所少量投与群も Control 群と比較して, T/C% が 38.3%であり, 腹腔内通常量投与群と比べてやや高い抗腫瘍効果を認めた (Fig. 2B) .

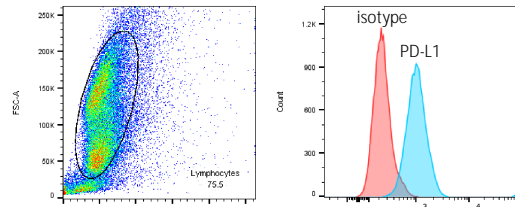


Fig. 1

##### 抗 PD-1 抗体薬の局所少量投与と腹腔内通常量投与群との腫瘍径および体重の比較

局所少量投与群と腹腔内通常量投与群は Control 群と比較して, 有意差を持って抗腫瘍効果を認めた ( $P < 0.05^*$ ) が, 局所少量投与と腹腔内通常量投与群は腫瘍径に有意差は認めなかった (Fig. 3A) . 計測を行っている期間で, 各群とも 20%以上の明らかな体重変動は認めなかった (Fig. 3B) .

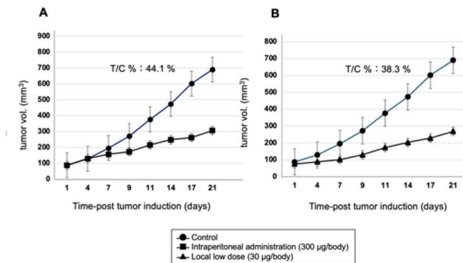


Fig. 2

##### 局所少量投与と腹腔内通常量投与群との全生存期間 (Overall Survival)

局所少量投与群と腹腔内通常量投与群は Control 群と比較して, 有意差を持って OS の延長を認め ( $P < 0.001^{***}$ ) (Fig. 4 A) , 局所少量投与群と腹腔内通常量投与群の OS に有意差は認めなかった (Fig. 4B) .

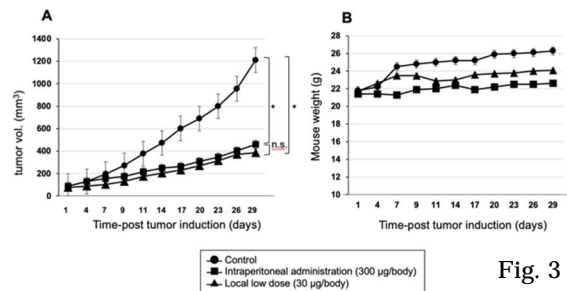


Fig. 3

##### 病理組織学的所見

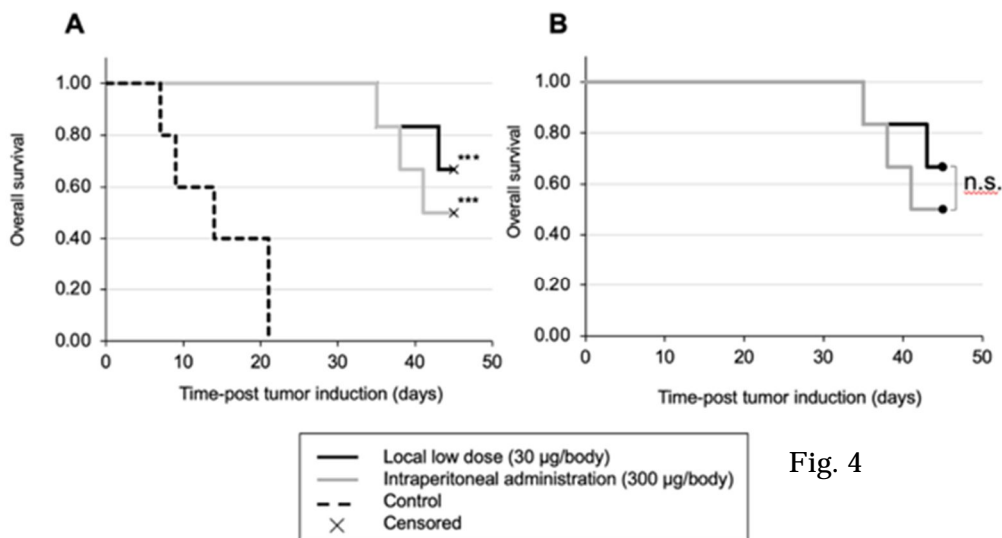
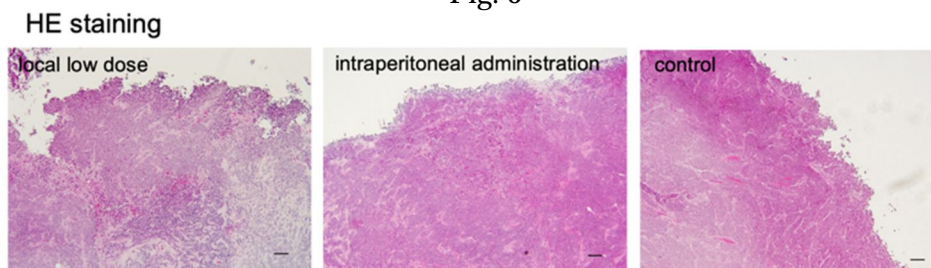


Fig. 4

局所少量投与群, 腹腔内通常量投与群, Control 群のすべてで腫瘍内に多数のリンパ球浸潤を認め, 局所少量投与群では, 腹腔内通常量投与群, Control 群より腫瘍深部でもリンパ球浸潤を認めた (Fig. 5A,B,C) .

Fig. 5





### 免疫組織学的所見

すべての群で腫瘍に 10% $\leq$ PD-L1 の発現を認め、局所少量、腹腔内および Control で明らかな相違は認めなかった (Fig. 6A)。腫瘍内と間質に CD8<sup>+</sup> T cells 浸潤を認める。局所少量、腹腔内は Control と比較して浸潤を多く認めた。局所少量投与は腹腔内通常量投与と同等の浸潤を認めた (Fig. 6B)。Perforin は、腫瘍組織内に極少量の発現を認めるが、局所少量、腹腔内および Control で明らかな相違は認めなかった (Fig. 6C)。Granzyme B は局所少量投与群、腹腔内投与群は Control と比較して腫瘍内および間質に多数の発現を認めた。局所少量投与は腹腔内通常量投与と同等の発現を認めた (Fig. 6D)。

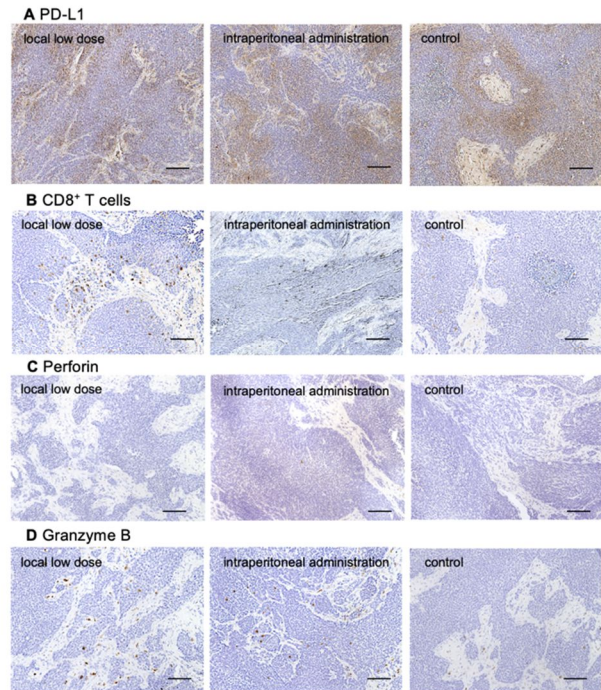


Fig. 6

### RT-PCR 法による Perforin および Granzyme B 遺伝子発現

局所少量投与群、腹腔内通常量投与群および Control すべてで Granzyme B と Perforin の発現を認めた (Fig. 7)。

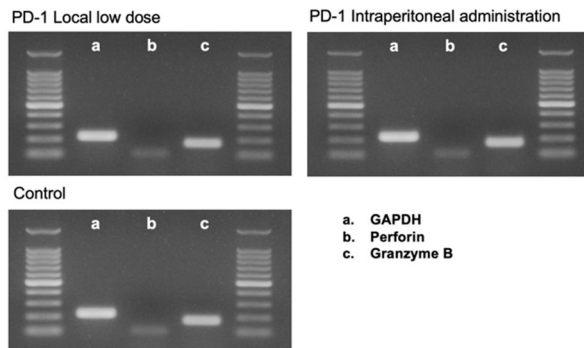


Fig. 7

### real-time PCR 法における Perforin および Granzyme B 遺伝子の定量比較

Perforin は局所少量投与群と腹腔内通常量投与群は Control 群と比較して発現量の低下を認め ( $P < 0.05^*$ ), Granzyme B は局所少量投与群と腹腔内通常量投与群は Control 群と比較して明らかに有意差をもったの高発現を認めた ( $P < 0.01^{**}$ )。また、腹腔内通常量投与群よりも局所低用量投与で高発現であった (Fig. 8)。

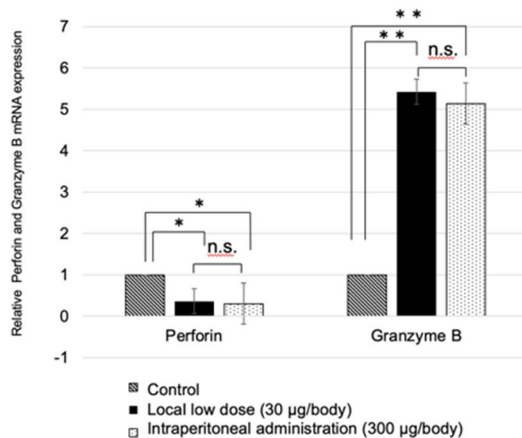


Fig. 8

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 SAKUMA KANAME, KII TOMOYUKI, TAKAHASHI HARUKA, SUZUKI SUSUMU, YOSHIKAWA KAZUHIRO, OGAWA TETSUYA, TANAKA AKIRA	4. 巻 42
2. 論文標題 An In Vivo Study of Local Administration of Low-dose Anti-PD-1 Antibody Using an Oral Cancer Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4293 ~ 4303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15929	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間 要
2. 発表標題 マウス口腔扁平上皮癌細胞株を用いた抗PD-1抗体低用量局所投与と全身投与の比較検討
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
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
---------	---------