

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24088

研究課題名（和文）口腔癌に対するがん浸潤ミエロイド系細胞を標的とした複合免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of combined immunotherapy targeting tumor-infiltrating myeloid cells for oral cancer

研究代表者

立浪 秀剛 (Tachinami, Hidetake)

富山大学・附属病院・医員

研究者番号：30850268

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：免疫不全口腔癌マウスモデルを用いることでミエロイド系細胞を焦点に、その機能を探ることを可能とした。T細胞が存在しない場合、ミエロイド系細胞が癌増大に影響しない現象を発見した。さらに、自然免疫に関わるTRL3アゴニストは、ミエロイド系細胞は性質変化をもたらす癌増大を抑制した。現在、これらの現象を探究している。臨床的には、PD-1免疫チェックポイント阻害剤投与患者の治療効果と好中球・リンパ球比との関連が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制性の骨髄系細胞はT細胞存在下でその抑制効果を示す可能性が示された。以上から、引き続き同抑制性細胞の制御あるいは性質変換（TLR3）についての研究を継続しつつT細胞のアップレギュレーション可能な試薬の探求を図ることは、担癌患者の治療選択肢に大きく影響すると考えている。臨床的には、PD-1免疫チェックポイント阻害剤投与患者の治療効果と好中球・リンパ球比との関連が示された。

研究成果の概要（英文）：In the absence of T cells, myeloid lineage cells have been found to have no effect on cancer growth. T cells do not affect tumor growth in the absence of T cells. Furthermore, TRL3 agonists suppressed tumor growth by altering the properties of myeloid cells. We are currently exploring these phenomena. Clinically, the results showed an association between treatment response and neutrophil/lymphocyte ratio in patients treated with PD-1 immune checkpoint inhibitors.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 腫瘍免疫 免疫チェックポイント阻害剤 骨髄抑制性細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、PD-1免疫チェックポイント阻害剤の効果を左右する存在として、担癌宿主で増加する2種類のがん浸潤ミエロイド系細胞(マクロファージ系細胞と顆粒球系細胞)に着目している。それは、PD-1免疫チェックポイント阻害剤は、宿主の免疫抑制を標的とした治療であるが、前述した2種類のみエロイド系細胞に対して、どのように影響するかについては今もなお不明なためである。これらを明らかにすることで、効率的な複合免疫療法の開発に繋がるものと考えている。さらに、口腔癌臨床で使用可能な薬剤を考慮したPD-1免疫チェックポイント阻害併用療法についても検討したいと考えている。

1. 2種類のみエロイド系細胞が腫瘍増大と共にがん微小環境に浸潤する理由を探る
2. 2種類のみエロイド系細胞の成熟過程で機能分子発現がどのように変化するか比較する
3. 2種類のみエロイド系細胞がエフェクターT細胞の機能に影響するか検討する
4. ミエロイド系細胞阻害戦略：ヒト口腔癌で適応可能なミエロイド系細胞の除去効果のある5-FUを低濃度で前投与しPD-1免疫チェックポイント阻害剤の投与効果を検討する
5. ミエロイド系細胞の形質変換戦略：ミエロイド系細胞の分化誘導の可能性が示唆されている抗コロニー刺激因子-1 受容体 (CSF1R) 抗体とPD-1免疫チェックポイント阻害剤の併用投与効果を検討する。

1-3に関しては、SCID口腔癌マウスモデルを用いることでミエロイド系細胞を焦点に、その機能を探ることを可能とした。T細胞が存在しない場合、ミエロイド系細胞が癌増大に影響しない現象を発見した。さらに、TRL3アゴニストは、ミエロイド系細胞は性質変化をもたらす癌増大を抑制した。現在、これらの現象を探究している。したがって、4・5は当初の予定から除外し研究を進めている。コロナ渦の影響もあり基礎実験は順調には進まなかったが臨床検体の解析結果から思わぬ発見を認めることとなる。既知のことではあるが、本邦においては2017年に頭頸部癌に対するニボルマブの適応が拡大され、その優れた抗腫瘍効果は、再発・遠隔転移を有する進行口腔癌の予後改善に大きく寄与するところとなった。しかし、その効果は限定的で、全体的な奏功率は低く、ニボルマブの効果予測が課題となっている。

### 2. 研究の目的

近年、ニボルマブの効果予測における好中球数・リンパ球数比 (Neutrophil to lymphocyte Ratio: 以下 NLR) の有用性が示唆されている。本研究では、口腔扁平上皮癌に対するニボルマブの効果とNLRの関連について自験例をもとに解析した。

### 3. 研究の方法

2017年12月から2019年12月に富山大学附属病院顎口腔外科・特殊歯科で再発・転移口腔扁平上皮癌と診断されニボルマブの投与を行った13例を対象とし、ニボルマブの治療効果と、評価項目としての患者背景因子および血液検査因子との関連について後ろ向きに検討した。治療効果の判定は、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)<sup>2)</sup>に準拠し、complete response (CR), partial response (PR) を奏功群, stable disease (SD), progressive disease (PD)を非奏功群として2群に分類した。患者背景因子として年齢(65未満, 65歳以上に分類), 性別, 原発部位, 初診時の臨床病期, 標的病変, 組織学的分化度, Performance Status (PS), 血液検査因子として、ニボルマブ投与前後の好中球数, リンパ球数およびNLRを評価し、ニボルマブの効果との関連について統計学的に解析した。さらに、ニボルマブ非奏功群患者に対するパクリタキセルとセツキシマブを用いた救済化学療法の効果とNLRとの関連も検討した。なお、ニボルマブの評価における採血ポイントはニボルマブ初回投与日と同剤の最良効果判定時とした。

統計処理はGraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)を用いて各評価項目における中央値(四分位値)を計算するとともに, Mann-Whitney検定またはKruskal-Wallis検定を用い有意差検定を行った。全生存率はニボルマブ投与前後のNLR高値群とNLR低値群間でKaplan-Meier法およびLog-rank検定を用いて比較した。p < 0.05 を有意差ありと判定した。

#### 4. 研究成果

ニボルマブの臨床効果は, CR 5例, SD 1例, PD 7例であり, 奏効率は38.4%, 病勢制御率は46.1%であった。ニボルマブ開始後の生存期間の中央値(四分位範囲)は, 現在生存中の8例を含めて80週(48~128)であった。また, ニボルマブ非奏功群患者の5例に対して救済化学療法を適応した。

##### 1. ニボルマブの効果と患者背景因子との関連

対象患者は, 男性が7名, 女性が6名, 年齢は44歳から84歳で, 中央値は64.0歳であった。内訳は, 65歳未満8例, 65歳以上5例であった。PS0が9例, PS1が3例, PS3が1例であった。原発部位は, 下顎歯肉が5例, 上顎歯肉が3例, 舌が4例, 口底が1例であった。初診時の臨床病期は, Stage が1例, Stage が3例, Stage が2例, Stage が7例であった。標的病変は, 局所再発病変が6例, 遠隔転移が7例であった。組織学的分化度は, 高分化4例, 中分化8例, 低分化1例であった。それぞれの患者背景因子とニボルマブの効果との間に統計学的な有意差は認めなかった(表1, 2)。

##### 2. ニボルマブの効果とNLRの関連

###### 1) ニボルマブ投与前の好中球数, リンパ球数およびNLR

ニボルマブ投与前の末梢血好中球数の中央値(四分位範囲)は, 奏功群で4050.0(2230.0~8480.0), 非奏功群で4355.0(3837.0~5745.0)であった。末梢血リンパ球数の中央値(四分位範囲)は, 奏功群で980.0(610.0~1490.0), 非奏功群で745.0(610.0~1490.0)であった。NLRは好中球数/リンパ球数で算出し, その中央値(四分位範囲)は, 奏功群で4.1(3.7~4.3), 非奏功群で5.6(3.2~9.2)であった。ニボルマブ投与前のこれらの血液検査因子とニボルマブの効果との間に統計学的な有意差は認めなかった(図1)。

###### 2) ニボルマブ投与後の好中球数, リンパ球数およびNLR

ニボルマブ投与後の効果判定時における, 末梢血好中球数の中央値(四分位範囲)は, 奏功群で2610.0(2310.0~3310.0), 非奏功群で6250.0(4812.0~8565.0)と非奏功群で有意に高値であった。末梢血リンパ球数の中央値(四分位範囲)は, 奏功群で850.0(760.0~930.0), 非奏功群で770.0(550.0~927.0)であった。NLRの中央値(四分位範囲)は, 奏功群で3.3(3.0~3.9), 非奏功群で9.4(5.3~17.9)であり, 非奏功群で有意に高値であった(図2)。

###### 3) ニボルマブ投与前後におけるNLRの増加率

ニボルマブ奏功群に比して非奏功群ではニボルマブ投与後のNLRが上昇傾向を認めたことから, 奏功群と非奏功群におけるニボルマブ投与前後におけるNLRの増加率を検討した。その結果, ニボルマブ非奏功群では奏功群に比べてNLRの増加率が有意に上昇していた(図3, 表3)。

#### 4) ニボルマブ投与患者の全生存率

過去の報告<sup>3)</sup>をもとに、NLRのカットオフ値を5に設定し、5以上を高値群、5未満を低値群としてニボルマブ投与前後のNLRと全生存率を解析した。その結果、ニボルマブ投与前のNLRでは、高値群と低値群で全生存率に統計学的に有意差を認めなかった(図4)。しかし、ニボルマブ投与後のNLRでは、高値群において低値群と比べて有意に全生存率の低下を認めた(図5)。

#### 5) ニボルマブ非奏功例に対する救済化学療法効果とNLRとの関連

ニボルマブ非奏功の5例に対してパクリタキセル+セツキシマブ(PTX+Cmab療法)による救済化学療法を行った。その結果、救済化学療法による効果は、CR 2例、SD 1例、PD 2例で、奏効率は40.0%、病勢制御率は60.0%であった。病勢制御が可能であった症例(CR, PR, SD)では、NLRは低下または横ばいに推移したものの、PDとなった2例においては、救済化学療法開始直前のNLRが29.4と13と著しく高値であり、PTX+Cmabの投与後に前者は5.1と後者は10.7にいったんは低下した。しかし、病変の増大とともにいずれの症例も再びNLRは上昇へと転じ予後不良の転機をたどった(図6)。

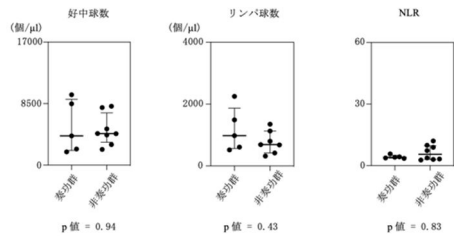


図1 ニボルマブの効果とニボルマブ投与前の血液検査因子との関連

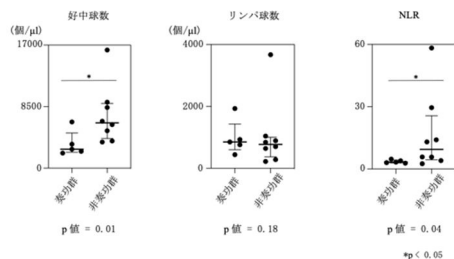


図2 ニボルマブの効果とニボルマブ投与後の血液検査因子との関連

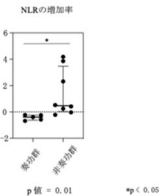


図3 ニボルマブ投与前後におけるNLRの増加率  
ニボルマブ投与前後のNLRは、ニボルマブ非奏効群では統計学的に有意に上昇していた。

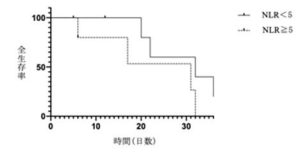


図4 ニボルマブ投与前のNLRによる全生存率の比較 (Kaplan-Meier 曲線)  
群間の全生存率に、統計学的に有意は認められなかった (p = 0.15, log-rank検定)。

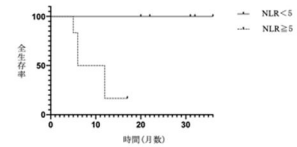


図5 ニボルマブ投与後のNLRによる全生存率の比較 (Kaplan-Meier 曲線)  
NLR高値群において低値群と比べて有意に全生存率の低下を認めた (p = 0.02, log-rank検定)。

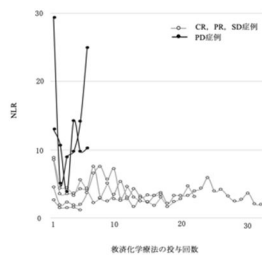


図6 ニボルマブ非奏効例に対する救済化学療法効果とNLRとの関連

表1 患者背景

症例	性別	年齢	PS	原発部位	初診時の臨床病期	転移病変	組織学的分化度	ニボルマブ効果判定	救済化学療法効果判定
1	男性	84	0	舌癌	否	局所再発	中分化	PD	-
2	男性	62	0	上顎歯肉癌	IV	局所再発	中分化	PD	-
3	女性	64	0	下顎歯肉癌	IV	局所再発	中分化	CR	-
4	男性	44	0	舌癌	II	遠隔転移	中分化	PD	CR
5	男性	51	0	舌癌	IV	局所再発	高分化	CR	-
6	女性	77	0	上顎歯肉癌	I	局所再発	中分化	CR	-
7	女性	64	0	上顎歯肉癌	IV	遠隔転移	中分化	PD	PD
8	男性	59	0	下顎歯肉癌	IV	遠隔転移	中分化	PD	PD
9	女性	80	1	下顎歯肉癌	IV	局所再発	高分化	SD	-
10	男性	64	3	下顎歯肉癌	II	遠隔転移	高分化	PD	-
11	男性	60	0	口底癌	II	遠隔転移	低分化	CR	-
12	女性	79	1	下顎歯肉癌	III	遠隔転移	高分化	CR	-
13	女性	67	1	舌癌	III	遠隔転移	中分化	PD	CR

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Tachinami Hidetake, Nishii Naoto, Xia Yulong, Kashima Yoshihisa, Ohno Tatsukuni, Nagai Shigenori, Li Lixin, Lau Walter, Tomihara Kei, Noguchi Makoto, Azuma Miyuki	4. 巻 91
2. 論文標題 Differences of tumor-recruiting myeloid cells in murine squamous cell carcinoma influence the efficacy of immunotherapy combined with a TLR7 agonist and PD-L1 blockade	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oraloncology.2019.02.014	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立浪秀剛, 西井 直人, 加島 義久, 富原 圭, 野口 誠, 東 みゆき
2. 発表標題 腫瘍に集積するミエロイド系細胞の違いはPD-L1阻害剤との併用免疫療法効果に影響を与える
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立浪秀剛, 富原 圭, 石戸克尚, 池田篤司, 藤原久美子, 野口 誠
2. 発表標題 口腔癌におけるnivolumab投与による好中球数/リンパ球数比の変化
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Azuma M, Tachinami H, Nishii N, Xia Y, Kashima Y, Nagai S, Li L, Tomihara K, Noguchi M
2. 発表標題 Differences of tumor-recruiting myeloid cells in murine squamous cell carcinoma influence the efficacy of immunotherapy combined with a TLR agonist and PD-L1 blockade
3. 学会等名 17th Congress of the International Union of Immunological Societies (IUIS)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachinami H, Tomihara K, Noguchi M
2. 発表標題 Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictable biomarker for response to nivolumab in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 78th J Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
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
---------	---------