

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09724

研究課題名(和文) 頭頸部癌に対する免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarkers to select the immune checkpoint inhibitor-responder in head and neck cancer

研究代表者

熊井 琢美 (Kumai, Takumi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00596306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌における免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー探索を、患者由来の末梢血単核球や血清を用いて多角的に行った。末梢血単核球を特定のエピトープペプチドで刺激した結果、免疫チェックポイント阻害薬に反応する群では頭頸部癌関連抗原由来ペプチドへのTh1応答が有意に増強することが見出された。また複数の血清学的因子が免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとなることを見出した。さらに血清のサイトカイン/ケモカインアレイを行ったところ、複数の液性因子が治療反応性と相関することが明らかとなった。これらの因子は奏功群において有意に発現が増強しており、バイオマーカーとして有望と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果により、どのような頭頸部癌を有している患者が免疫療法(免疫チェックポイント阻害薬)の恩恵を得られるかが明らかとなった。この結果を生かすことで、免疫療法が有効な患者には免疫療法の遂行を、無効な患者には別の治療法の選択を迅速に提供するプレジジョンメディスンが可能となる。さらに、同定した因子の一部は新規治療法の標的として有用と考えた。本研究により、免疫チェックポイント阻害薬が無効な患者に、全く異なる機序の新たな免疫療法を提供できるビジョンが示された。

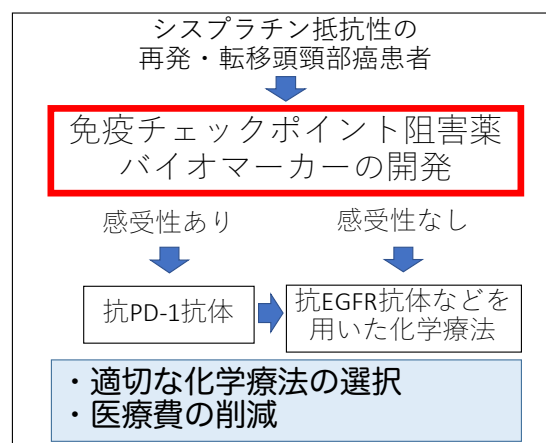
研究成果の概要(英文)：In this study, we have elucidated the biomarkers to select the responder to immune checkpoint inhibitors (ICI) in head and neck cancer. Using patient-derived peripheral mononuclear cells, we found that head and neck cancer-related epitope peptides could stimulate T cells only in ICI-responders. These T cells could directly kill head and neck cancer cells in an HLA-dependent manner. Next, we evaluated the biomarkers in the serum of ICI-treated HNSCC patients. Several factors including lymphocyte percentages and nutrition factors were related to ICI responses. Using a cytokine/chemokine array, soluble factors were significantly correlated to the ICI responses.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は全悪性腫瘍のうち6番目に多い癌腫であり、毎年35万人以上の患者が本疾患により不幸な転帰を辿っている。近年、従来の治療法である手術と化学放射線療法に加えて分子標的薬の臨床応用が開始され、治療の選択肢は広がりを見せている。新規治療法の一つである免疫チェックポイント阻害薬はこれまでの抗癌剤と異なる作用機序を有しており、代表的な薬剤である抗PD-1抗体はT細胞のブレーキとなっているPD-1と腫瘍や腫瘍関連マクロファージなどに発現しているPD-L1の結合を阻害することで、抗腫瘍T細胞を活性化させて抗腫瘍応答を惹起する。2016年にFerrisらがプラチナ製剤抵抗性の再発もしくは遠隔転移を有する頭頸部癌に対して抗PD-1抗体の有効性を示したことから、本邦においてもその臨床応用が開始されている。抗PD-1抗体の臨床応用が始まり、頭頸部癌患者および治療に携わる医療者は複数の重大な問題に直面している。①抗PD-1抗体は薬価が高く、また治療に反応しなくなるまで2週間毎の投与を継続するため、**患者および国庫の経済的負担が大きい**。②大きな期待を背負って臨床に導入された抗PD-1抗体であるが、**その効果は2割以下の頭頸部癌患者にしか認められない** (Ferris et al, 2016、頭頸部癌学会, 2018)。また、治療反応例であっても一時的に腫瘍が増大するpseudo-progressionを認めるため、腫瘍の増大に関わらず一定期間治療を継続する必要があり、抗EGFR抗体などの他の治療選択肢への切り替えが遅れる場合がある。一方で抗PD-1抗体が化学療法より有効であったとする報告もあり、治療感受性のある患者の選択が必須である。これまで頭頸部癌における免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーは確立されておらず、他癌腫において報告されている腫瘍のPD-L1発現などのバイオマーカーは偽陰性が多いといった問題点があるため汎用性が低い。そのため、頭頸部癌に対する免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー開発は喫緊の課題と考えられた。



### 2. 研究の目的

本研究は、頭頸部癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用を見据えたバイオマーカー開発を目的とした。具体的には、

(1) マウスを用いて、腫瘍および腫瘍抗原由来のペプチドを認識するT細胞の有無と抗PD-1抗体による治療応答との相関を検討した。

(2) 抗PD-1抗体で治療する頭頸部癌患者の末梢血から腫瘍抗原由来のペプチドに反応するT細胞を同定し、抗PD-1抗体の治療効果との相関・バイオマーカーとしての有用性を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 頭頸部癌 In vivo モデルにおける腫瘍抗原ペプチドの同定

ヒト頭頸部癌と異なり、マウス頭頸部癌における腫瘍関連抗原エピトープは未だ明らかとなっていなかった。これまでヒトで報告されている頭頸部癌の腫瘍抗原 (EGFR や

c-Met など) のマウスアナログが MOC1 に発現しているかを Western blotting やフローサイトメトリーで確認し、同腫瘍抗原からマウス MHC に結合可能なエピトープを IMMUNE EPITOPE を用いて検索した。さらに、同定したエピトープペプチドを poly IC とともにマウスに接種して、ペプチドの抗原性を T 細胞による IFN- $\gamma$  や IL-2 の産生で検討した。

#### **(2) 頭頸部癌 In vivo モデルにおけるペプチド反応性 T 細胞と免疫チェックポイント阻害薬の治療反応性の検討**

MOC1 を接種した B6 マウス末梢血におけるペプチド反応性 T 細胞の有無を IFN- $\gamma$  ELISA で確認し、抗マウス PD-1 抗体の治療効果との相関を検討した。ペプチド反応性 T 細胞を認めなかった場合は、In vitro でペプチド反応性 T 細胞を樹立して経尾静脈移植することで、T 細胞と抗マウス PD-1 抗体の治療効果との相関を検討した。

#### **(3) 抗 PD-1 抗体を投与した頭頸部癌患者の腫瘍抗原反応性 T 細胞と抗 PD-1 抗体の治療効果**

抗 PD-1 抗体で治療予定の頭頸部癌患者から採血して Ficoll Paque で末梢血単核球を分離し、頭頸部癌関連ペプチドで 2 週間刺激した。ペプチド刺激後の上清中に含まれるサイトカイン (IFN- $\gamma$  や IL-2) を ELISA で測定し、得られたデータと臨床所見を比較することで、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

#### **(4) 血清中の液性因子の免疫チェックポイント阻害薬バイオマーカーとしての有用性**

頭頸部癌患者の T 細胞分離時に血清を保存し、サイトカインなどの液性因子がバイオマーカーとして有効かサイトカイン・ケモカインアレイなどを用いて検討した。

### **4. 研究成果**

ヒト頭頸部癌と異なり、マウス頭頸部癌における腫瘍関連抗原エピトープは明らかとなっていなかったため、これまでヒトで報告されている頭頸部癌の腫瘍抗原のマウスアナログがマウス頭頸部癌に発現していることを Western blotting やフローサイトメトリーで検索し、発現を同定した。次に、同腫瘍抗原からマウス MHC に結合可能なエピトープを IMMUNE EPITOPE を用いて検索し、候補エピトープの同定・作成を行った。同定したエピトープペプチドを poly IC とともにマウスに接種し、サイトカイン産生を T 細胞の細胞内染色で確認した。以上より、マウス頭頸部癌モデルにおいても免疫反応を惹起しうる腫瘍抗原由来のエピトープペプチドを同定し、実際に In vivo において T 細胞応答を惹起できることを明らかとした。

次に、頭頸部癌における免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー探索を、患者由来の末梢血単核球や血清を用いて多角的に行ってきた。末梢血単核球を特定のエピトープペプチドで刺激した結果、免疫チェックポイント阻害薬に反応する群では頭頸部癌関連抗原由来ペプチドへの Th1 応答が有意に増強することが見出された。同定した頭頸部癌関連抗原由来ペプチドで刺激した T 細胞は、HLA 拘束性に直接頭頸部細胞癌細胞株を認識し、同時に殺傷することも明らかとなった。患者由来の末梢血単核球上に発現している PD-1 などの免疫関連分子の発現を解析したところ、多くの免疫チェックポイントは治療反応性との関連は認めなかった。

また、血清学的検討では、リンパ球や好中球、総蛋白質などの栄養マーカーと治療反応性との関連を解析し、複数の血清学的因子が免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとなることを見出した。網羅的な解析を行うため、血清のサイトカイン/ケモカインアレイを行ったところ、複数の液性因子が治療反応性と相関することが明らかとなった。これらの

因子は奏功群において有意に発現が増強しており、バイオマーカーとして有望と考えられた。さらに、同定された因子を標的とした免疫治療法を確立すべく、同定された因子に特異的な T 細胞クローンを樹立した。これらの T 細胞クローンは頭頸部細胞癌細胞株を直接殺傷可能であり、今回同定した新規因子はバイオマーカーとしてだけでなく、新規治療標的としても有効な可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0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 Komatsuda Hiroki, Wakisaka Risa, Kono Michihisa, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Yamaki Hidekiyo, Sato Ryosuke, Nagato Toshihiro, Ohkuri Takayuki, Kosaka Akemi, Ohara Kenzo, Takahara Miki, Katada Akihiro, Kobayashi Hiroya	4. 巻 114
2. 論文標題 Mitogen activated protein kinase inhibition augments the T cell response against H0XB7 expressing tumor through human leukocyte antigen upregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 399 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15619	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kono Michihisa, Yamaki Hidekiyo, Komatsuda Hiroki, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Wakisaka Risa, Sato Ryosuke, Ohara Kenzo, Kishibe Kan, Takahara Miki, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 18
2. 論文標題 IL-2 complex recovers steroid-induced inhibition in immunochemotherapy for head and neck cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101358 ~ 101358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2022.101358	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kumai Takumi, Yamaki Hidekiyo, Kono Michihisa, Hayashi Ryusuke, Wakisaka Risa, Komatsuda Hiroki	4. 巻 10
2. 論文標題 Antitumor Peptide-Based Vaccine in the Limelight	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 70 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines10010070	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kono Michihisa, Komatsuda Hiroki, Yamaki Hidekiyo, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Wakisaka Risa, Nagato Toshihiro, Ohkuri Takayuki, Kosaka Akemi, Ohara Kenzo, Kishibe Kan, Takahara Miki, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Kobayashi Hiroya, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunomodulation via FGFR inhibition augments FGFR1 targeting T-cell based antitumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 OncoImmunology	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) 10.1080/2162402X.2021.2021619	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kumai Takumi, Komatsuda Hiroki, Wakisaka Risa, Yamaki Hidekiyo, Kono Michihisa, Hayashi Ryusuke, Kishibe Kan, Takahara Miki, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 47
2. 論文標題 Concurrent chemoradiotherapy with cisplatin and docetaxel for head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 228 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/coa.13876	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kono Michihisa, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Yamaki Hidekiyo, Komatsuda Hiroki, Wakisaka Risa, Nagato Toshihiro, Ohkuri Takayuki, Kosaka Akemi, Ohara Kenzo, Kishibe Kan, Takahara Miki, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Celis Esteban, Kobayashi Hiroya, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Interruption of MDM2 signaling augments MDM2-targeted T cell-based antitumor immunotherapy through antigen-presenting machinery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 3421 ~ 3434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-02940-5	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kono Michihisa, Wakisaka Risa, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Komatsuda Hiroki, Sato Ryosuke, Abe Yasushi, Yamaki Hidekiyo, Takahara Miki, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 43
2. 論文標題 Effects of early nutritional intervention by a nutritional support team for patients with head and neck cancer undergoing chemoradiotherapy or radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 514 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26502	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sato Ryosuke, Kumai Takumi, Ishida Yoshiya, Yuasa Ryota, Kubota Akinobu, Wakisaka Risa, Komatsuda Hiroki, Yamaki Hidekiyo, Wada Tetsuji, Harabuchi Yasuaki	4. 巻 7
2. 論文標題 The efficacy of PD 1 inhibitors in patients with salivary gland carcinoma: A retrospective observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1808 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.863	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊井琢美
2. 発表標題 ペプチドを用いた免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー探索
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊井琢美
2. 発表標題 Peptide-reactive T cell response as a novel biomarker in head and neck cancer patients treated with anti-PD-1 antibody
3. 学会等名 日本癌学会
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
研究分担者	原 淵 保明  (Harabuchi Yasuaki)  (80208686)	旭川医科大学・医学部・名誉教授   (10107)	
研究分担者	小林 博也  (Kobayashi Hiroya)  (90280867)	旭川医科大学・医学部・教授   (10107)	

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
---------	---------