

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18664

研究課題名（和文）高浸潤口腔癌微小環境での免疫寛容調節機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory Mechanisms of Immune Tolerance in the Highly Invasive Oral Cancer Microenvironment

研究代表者

平井 真理子（Hirai, Mariko）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・客員研究員

研究者番号：40802830

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）：口腔扁平上皮癌細胞をEMTにより4D型高浸潤口腔癌細胞へ誘導した。この培養細胞でのMMP発現の変化を解析し、EMTの誘導で発現低下するMMPを決定した。MMPとPD-L1を安定発現するHEK293細胞の培養上清中に含まれる細胞膜から切断されて遊離したPD-L1を調べ、PD-L1切断活性をもつMMPを特定した。分泌型PD-L1の発現ベクターを作製しPD-L1リコンビナントタンパクを精製した。精製したPD-L1をリコンビナントMMPとインキュベートし、PD-L1に分解活性をもつMMPを同定した。数種類の培養口腔癌細胞に既存の抗がん剤を添加し、MMPの発現を上昇させる抗がん剤を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高転移性高浸潤型の口腔扁平上皮癌の浸潤先端部では、僅か数個の癌細胞が周囲微小環境で免疫寛容を成立させ腫瘍免疫から逃れ生存している。よって、高転移性高浸潤口腔癌は予後不良で根本的な治療が困難である。近年、癌免疫療法が注目され、高転移性高浸潤型口腔癌でもニボルマブ（抗PD-1抗体）の持続的な効果が示されているが有効である患者は一部に限定される。本研究結果は、効果を予測するマーカーの開発や、ニボルマブ不応や耐性となった後の治療体系の確立に貢献し、高転移性高浸潤口腔癌の浸潤先端部微小環境での免疫寛容調節機構の解明に重要な情報を提供する。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma cells were induced into type 4D highly invasive oral cancer cells by EMT. We analyzed changes in MMP expression in these cultured cells to determine which MMPs were down-regulated by EMT induction and identified MMPs with PD-L1 cleavage activity by examining PD-L1 cleaved from the plasma membrane in the culture supernatant of HEK293 cells, which stably express MMPs and PD-L1. An expression vector for secreted PD-L1 was generated and PD-L1 recombinant protein was purified. The purified PD-L1 was incubated with recombinant MMPs to identify MMPs with PD-L1-degrading activity. Existing anticancer agents were added to several types of cultured oral cancer cells to determine which anticancer agents upregulate MMP expression.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、口腔扁平上皮癌の浸潤様式を 1、2、3、4C、4D 型の 5 段階に分類し、それぞれの段階の癌の性質を調べてきた。そのなかで、最も高浸潤性である 4D 型(以下 4D 型高浸潤口腔癌)は高転移性で化学療法や放射線療法への耐性を獲得しており、再発の頻度も高く 5 年生存率が最も低いことを報告してきた。さらに申請者の教室では、セツキシマブの標的である EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)の発現が 4D 型高浸潤口腔癌細胞で低く、そのためにセツキシマブへの感受性が低いことを明らかにした(Oncology Letters, 11: 201, 2016)。さらに上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)関連遺伝子の発現が 4D 型高浸潤口腔癌細胞で増加し、EMT が EGFR 発現低下と関連することを明らかにした(Oncology Letters, 11: 201, 2016)。これに対し申請者は 4D 型高浸潤口腔癌細胞を抗乳癌治療薬のエリブリンで処理すると間葉上皮移行(Mesenchymal-Epithelial Transition; MET)が誘導され、さらに EGFR の発現亢進が誘導されセツキシマブへの感受性が高まることを明らかにした(Oncology Reports, 2016, 36; 3139-3144.)。これらの結果より分子標的薬耐性獲得や 4D 型高浸潤様式への移行に EMT が関わる可能性が考えられた。

近年、癌免疫療法は外科手術・化学療法・放射線治療の三大標準治療に続く第四の治療法として注目されている。免疫抑制受容体 PD-1(programmed cell death 1)は活性化した T 細胞に発現して、アポトーシスを誘導し T 細胞の機能を抑制する。多くの癌細胞は PD-1 リガンド(PD-L1、PD-L2)を発現し、T 細胞の機能を抑制するシグナルを送ることで宿主の免疫監視機構から逃れている。4D 型高浸潤口腔癌において、少ない数の癌細胞の集団でありながら免疫担当細胞の攻撃から逃避し生存するためには、腫瘍周囲に免疫抑制性の微小環境を構築することが必要である。申請者は、ヒト 4D 型高浸潤口腔癌組織での PD-L1 の発現は癌細胞で低下しているが、腫瘍細胞周囲の間質細胞で発現が亢進していることを報告した(Int J Oncol, 2017, 50: 41-48.)。さらに、in vitro で癌細胞での PD-L1 の発現低下や、樹状細胞などの腫瘍周囲細胞での発現亢進に EMT が関わることを示した(Int J Oncol, 2017, 50: 41-48.)。これらの結果は、高浸潤口腔癌微小環境での免疫寛容に EMT が関わる可能性を示唆している。

一方、組織内微小環境を構成する細胞外マトリックスやそれと結合する EMT に関連する生理活性物質の代謝には MMP (Matrix Metalloproteinase) ファミリーが中心的役割を果たしている。これまでに一群の MMP が、頭頸部癌、甲状腺癌、胃癌、乳癌で高発現していることが報告され、MMP の高い細胞外マトリックス分解能から、癌浸潤・転移治療の最適の標的であると考えてきた。しかしながら、理論的には有効と思われた MMP インヒビターは臨床治験で明らかな治療効果を示さなかった。臨床治験に用いたインヒビターの中にはプラセボと比較して生存率がかって悪化した症例や、癌の進行や肝転移を促進した例もあった(Nat Rev Cancer, 7: 800, 2007)。臨床治験は図らずも一部の MMP の腫瘍抑制効果を示唆する結果となった。実際に後の検証で、これらの MMP ノックアウトマウスに移植した扁平上皮癌は、大きさは縮小したが未分化癌細胞が増え悪性度が増大していた(Nat Rev Cancer, 7: 800, 2007)。

最近他の研究室から、EMT により誘導される癌関連線維芽細胞で発現している一部の MMP が PD-L1 に対する分解活性をもち、それにより T 細胞の免疫寛容を抑制することが報告された(Oncimmunology, 5;e1091146, 2016)。この報告から、MMP インヒビターの臨床治験で癌の悪性化が亢進したのは、PD-L1 の分解が阻害され、免疫寛容が促進されたことが原因である可能性が示唆された。この結果から、EMT による 4D 型高浸潤口腔癌への移行の際、PD-L1 分解活性をもつ MMP が発現低下し、免疫寛容が促進されている可能性が考えられることから本研究で明らかにする。

2. 研究の目的

一般的に癌細胞は腫瘍免疫により大部分が死滅するが、悪性度の高い癌細胞は様々な環境で免疫寛容を成立させ生存している。高転移性高浸潤型の口腔扁平上皮癌の浸潤先端部では、僅か数個の癌細胞が周囲微小環境で免疫寛容を成立させ腫瘍免疫から逃れ生存している。画像や手術中に、この少数個の癌細胞を検出することは極めて困難なため、腫瘍切除範囲の設定を誤り、再発の可能性が高まる。よって、高転移性高浸潤口腔癌は予後不良で根本的な治療が困難である。近年、癌免疫療法が注目され、高転移性高浸潤型口腔癌でもニボルマブ(抗 PD-1 抗体)の持続的な効果が示されている。しかし、有効である患者は一部に限定されることから、効果を予測するマーカーの開発や、ニボルマブ不応や耐性となった後の治療体系の確立が課題となっている。これらの課題の解決のため、本研究は高転移性高浸潤口腔癌の浸潤先端部微小環境での免疫寛容調節機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

以上の研究背景から本研究は以下の 4 研究項目のもとに、EMT が誘導する 4D 型高浸潤口腔癌の形成過程で発現低下する MMP を調べる。さらに、PD-L1 を分解する MMP を特定し、既存の抗がん剤のなかからこの MMP 発現を上昇させるものを同定し、in vivo で免疫寛容抑制効果を検討する。

- (1) EMT が誘導する 4D 型高浸潤口腔癌の形成過程で発現低下する MMP の特定
- (2) EMT の誘導により 4D 型高浸潤口腔癌で発現低下する MMP の PD-L1 分解活性の検討
- (3) PD-L1 の MMP による切断活性の検討
- (4) PD-L1 の分解活性を持つ MMP を発現上昇させる抗がん剤の検討

4. 研究成果

申請者のこれまでの報告で OSC-20 細胞が低浸潤性で上皮系細胞の性質をもつことが明らかになっている。令和 2 年度は、この細胞培養液に TGF- β を添加し、EMT により 4D 型高浸潤口腔癌細胞へ誘導した。同様に、ヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF 細胞)を EMT の誘導により、癌関連線維芽細胞へ移行させた。現在まで MMP はヒトで 23 種類同定されており、これらの培養細胞での MMP 発現を解析し、EMT の誘導で発現低下する MMP を決定した。さらに、遺伝子導入効率の高い HEK293 細胞に、上記の実験で特定された MMP と PD-L1 のタンパク発現ベクターを共導入し、それぞれのタンパクを恒常的に発現する安定発現細胞株を作製した。つぎに、MMP と PD-L1 を安定発現する HEK293 細胞の培養上清中に含まれる、細胞膜から切断されて遊離した PD-L1 を、Western blot 法にて調べた。空ベクターを導入した HEK293 細胞と比較し、PD-L1 の遊離が亢進している MMP 安定発現株を調べ、PD-L1 切断活性をもつ MMP を特定した。また、膜結合部位を欠失し、C 末端に 6xHis タグを付加した分泌型 PD-L1 の発現ベクターを作製した。HEK293 細胞にこの PD-L1 発現ベクターを導入し安定発現株を作製した。分泌された PD-L1 は His タグカラムで精製した。精製した PD-L1 をリコンビナント MMP とインキュベートし、切断断片を SDS-PAGE で解析し、PD-L1 に分解活性をもつ MMP を同定した。数種類の培養口腔癌細胞に既存の抗がん剤を添加し、上記で同定した MMP の発現を上昇させる抗がん剤をスクリーニングした。これらの抗がん剤を添加した際、PD-L1 の分解が亢進するかを検討した。

令和 3 年度は客員研究員として琉球大学にて当初の計画にある口腔癌細胞を免疫不全マウスの舌に移植して作製する口腔癌浸潤転移モデルを用いて、スクリーニングした抗がん剤を投与し、治療薬として有効な候補薬剤を選定する予定であったが、新型コロナウイルス感染症の拡大にて予定していた実験は行えなかった。令和 3 年度予算は動物実験開始のための試薬や細胞等の準備に一部使用したが実際には動物実験は行えなかったため残りの予算は返還した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------