

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03138

研究課題名(和文) 免疫プロファイリング解析による口腔癌の集学的治療法選択の提案

研究課題名(英文) Proposal of multidisciplinary approach based on immune profiling in oral cancer

研究代表者

東 みゆき (Azuma, Miyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90255654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：舌扁平上皮癌の免疫プロファイルは、非常に多様で臨床・病理分類からは推量できなかった。免疫細胞密度は、CTL-やTcon-密度と相関していたが、CTL比率とは相関しなかった。CTL/Tcon (%)は、Treg および 各種骨髄細胞サブセットと負に相関していた。CD163+ M2指標は T1再発/転移例で高かった。免疫プロファイルを免疫賦活型、境界型、免疫抑制型、免疫隔離型、免疫寛容型の5つに分類した。7割を超える症例が抑制/隔離/寛容型で、ICI投与例中賦活型は存在しなかった。T細胞上のPD-1発現はあるものの、大半が TCF-1陰性の最終疲弊 T 細胞であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬(ICI)が、再発・転移例のみならず、術前・術後アジュバント療法として使用される動きの中で、ICI療法の奏効を事前に予測する良いバイオマーカーが無いだけでなく、患者個々のがん微小環境における免疫プロファイルを簡便に検討できる手法は少ない。本研究では、どの施設でも入手可能な FFPE切片2枚でがん微小環境の免疫プロファイルの詳細な解析手法を樹立し、免疫サブタイプを分類することで、ICI治療効果の予測や有効な他剤との併用を提案している。今後の、効果的な舌癌治療選択に役立つのみならず、医療費削減にもつながる社会的意義の大きい研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Immune profiles in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) were individually highly variable and we could not predict from clinicopathological information. Immune cell-density (D) was positively correlated with T-D, CTL (C)-D, or C/Th-D, but had no correlation with CTL (%). C/Th(%) was negatively correlated with any of Treg and myeloid cell subsets. CD163+ M2 parameters were significantly higher in R/M(+) group in the T1 stage. We divided five immune subtypes; I. Immunoactive type, II. Border type, III. Immunosuppressed type, IV. Immunoisolating type, and V. Immunotolerated type. Over 70% were immune regulated subtypes (Type III, IV, V). There was no Type I in the ICI cases and most cases were immune regulated. PD-1 was moderately induced on effector T-cells, but most were TCF-1- terminally exhausted T cells. Further combinational treatments based on the immune subtypes will be helpful for successful treatment.

研究分野：口腔科学、免疫学

キーワード：口腔癌 がん免疫 がん微小環境 免疫プロファイル 免疫チェックポイント阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)の治療において、再建を含めた外科手術手技の進歩はめざましいが、再発/転移症例の治療には難渋し、治療成績も芳しくない。現在、再発/転移 (R/M)頭頸部がん抗 PD-1/PD-L1 抗体 (ニボルマブ/ペンブロリズマブ/アテロリズマブ) の免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 投与が臨床応用されるようになり、さらには、1 次治療の術前・術後アジュバント療法としての ICI 臨床試験も進行している。この動きの中で、どのような症例が PD-1/PD-L1 ICI 阻害剤単独で奏効がみられ、どのような症例で他の化学療法や他の免疫療法と併用すべきなのかを事前に把握できる手法やバイオマーカーの開発が急務となっている。また、再発/転移のリスクが高い症例を免疫学的観点から事前に把握し、術前・術後アジュバント免疫化学療法を必要とする症例を見出すことも必要となってきた。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌で最も頻度の高い舌扁平上皮癌を対象として、手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (FFPE) で、1 切片につき 6 種の抗原分子を同時検出できる高感度多重蛍光染色 (マルチプレックス免疫蛍光染色) を実施し、AI による機械学習を導入した多変量組織イメージ解析により、サブセット分類と定量化を目指し、がん微小環境の免疫プロファイリング解析を実施する。プロファイリング結果の“正と負の免疫細胞からなる免疫病態バランス”と“病理組織や臨床経過などの臨床病理”関連の 100 を超える項目をデータサイエンス技法で解析し、臨床予後および治療感受性に関わる包括的免疫指標を同定することを目的とする。また、実際の抗 PD-1/PD-L1 抗体 ICI 投与舌癌症例の免疫プロファイリングを同様に実施し、治療効果との関連因子を分析する。最終的には、現行の TNM スコアを基準とした舌癌診療ガイドラインに免疫指標を追加して、免疫療法を加味した集学的治療案を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

当該大学病院で、舌扁平上皮癌 (TSCC) の病理診断で、術前治療なしに手術療法を受け、術後 5 年の臨床経過が確認されているもの (コホート 1 研究) と TSCC 再発/転移で、ICI (ニボルマブあるいはペンブロリズマブ) 投与を受け、最低 1 年間の臨床経過追跡が可能なもの (コホート 2 研究) とする。前者は、約 100 例、後者は約 30 例を予定する。

(2) 多重蛍光染色と組織イメージ解析

多重免疫蛍光染色は、高感度のチラミッドシグナル増幅法で、パネル A (T 細胞解析用) とパネル B (ミエロイド細胞解析用) の 12 種の抗体と OPAL™ 蛍光色素 (Opal 520/540/570/620/650/690) の組み合わせおよび DAPI (核染色) からなる染色条件を設定した。染色の取り込みおよび解析は、定量組織イメージングシステム (Mantra ワークステーション / InForm ソフトウェア) を使用した。解析部位は癌進行先端部とした。免疫プロファイル解析は、DAPI 陽性細胞とサイトケラチン (CK) 陽性癌細胞分布から、腫瘍領域と間質領域にセグメント化し、各領域における、以下の 10 種の免疫細胞分画を同定した: (1) 汎白血球 (Leukocytes, Leu) (CD45⁺) (2) T 細胞 (CD45⁺CD4⁺ or CD45⁺CD8⁺) (3) CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL), (4) conventional CD4⁺ T (Tcon, CD4⁺Foxp3⁻) (5) 制御性 T 細胞 (Treg, CD4⁺Foxp3⁺) (6) 汎マクロファージ (pM) (CD45⁺CD68⁺) (7) M1-TAM (CD68⁺CD163⁻) (8) M2-TAM (CD68⁺CD163⁺) (9) 好中球 (Neu) (CD66b⁺) (10) その他 (上記以外の CD45⁺細胞)。Leu 中の TAM/M1-TAM/M2-TAM/TAN 比率、T 細胞中の CTL/Tcon/Treg 比率、さらに、セグメント領域中の細胞クラスター密度 (癌細胞密度、白血球密度、T 細胞密度)、T 細胞クラスターにおける PD-1 陽性比率と癌細胞および pM/M1/M2 における PD-L1 陽性率を加えて 54 項目の免疫指標を求めた。これに、TNM スコア、病理組織学的グレード分類などの臨床・病理学的項目を加えて解析データとした。コホート 2 研究では、上記に加えて CD8⁺ CTL における転写因子 TCF-1 発現の有無を検索し、PD-1+TCF-1+ 前駆疲 T 細胞 (precursor exhausted T cells, pTex) と PD-1+TCF-1- 最終分化疲 T 細胞 (terminally differentiated Tex, tTex) を識別するパネル C を追加した。

(3) データ解析

コホート 1 研究では、免疫指標および臨床病理学的指標との関連を統計的に解析し、クラスター分析から再発/転移に関連する指標を探索した。免疫細胞クラスター比率と数が一目で理解できるパイチャートを作成した。得られた全症例の免疫プロファイルを免疫指標から 5 つのタ

タイプに分類した。コホート2研究では、ICI投与効果と関連する項目に注目しなかったが、ICI投与例でのSD/PR例が少なかったために、非奏効例の詳細免疫プロファイル解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 術後5年経過 TSCC症例の免疫プロファイル解析結果 (コホート1研究)

2020年から2015年の6年間を対象としたが、研究条件を満たす87例について免疫プロファイル解析を実施した。汎白血球 (CD45+ Leu), 3種のT細胞サブセット (CTL/ Tcon/Treg), M1/M2/Neu ミエロイド細胞サブセットの密度 (D)、比率 (%)、分布場所は、個別に非常に多様であった。既存の臨床TNM分類や増殖パターンおよび病理 (WHO腫瘍細胞分化度, INF/YK浸潤度)分類などとの相関はなかった。Leu-Dは、T-D, CTL-DあるいはCTL+Tcon (C/Tcon)-Dと正の相関がみられたが、C/Tcon(%)やCTL(%)とは相関しなかった。C/Tcon(%)は、Treg(%), pM(5), M1(%), M2(%), Neu(%), Others(%)と負の相関がみられた。M2関連指標であるM2-D, M2(%), M2/panM(%)は、T1群がT2あるいはT3/4群と比べて有意に低値であったが、T1での術後5年以内のR/M(+)群は、R/M(-)群と比較して有意に高かった。リスク予測解析から、T1群においてはM2指標が再発/転移の危険度予測に有効であることが示された。

87例の免疫プロファイル結果をLeu-D, C/Tcon(%), CTL(%)と腫瘍境界近傍のC/Tcon分布から5つのサブタイプに分類した(図1)。I. 免疫賦活型(高Leu-Dかつ高C/Tcon(%)) II. 境界型(高Leu-Dで低CTLあるいは中等度Leu-Dで高CTL), III. 免疫抑制型(IV型を除く低-中等度Leu-D), IV. 免疫隔離型(低-中等度Leu-Dで腫瘍境界近傍のC/Tconが無い帯状領域が存在する), V. 免疫寛容型(僅かなLeu-D)。87例中、I, II, III, VI, V型は、それぞれ6.1%(14), 13.8%(12), 25.3%(22), 21.8%(19), 23.0%(20)で、70%以上が積極的なT細胞免疫応答が制御されているIII型-V型であった。

以上の結果から、TSCCの免疫プロファイルは、パーソナルに非常に多様で、臨床・病理情報からは憶測できなかった。その殆どが癌に対する積極的な免疫応答が制御されている免疫制御タイプであった。現行の臨床的TNM分類や増殖パターン、さらには切除断端、節外浸潤、リンパ管/脈管/神経浸潤などの病理結果に加えて、免疫プロファイルのサブタイプ分類は、術前・術後アジュバント療法の選択や再発/転移時の2次治療におけるICI単剤あるいは併用療法の選択に役立つと思われる。PD-1 ICI単剤で効果が期待できるのは、免疫賦活型のみで、境界型では他のICIとの併用、免疫抑制および隔離型では、がん細胞/腫瘍血管/線維芽細胞などを標的とした治療法の併用が必要と思われる。さらに、T1早期癌では、M2マクロファージ指標が再発・転移のリスク予測のバイオマーカー候補になることが示された。組織学的免疫プロファイル解析による免疫サブタイプ分類は予後予測や治療法選択に有用であると思われる。

(2) ICI投与 TSCC症例の免疫プロファイル解析結果 (コホート2研究)

最終的に21症例(T1 5例、T2 3例、T3/4 13例)のICI投与 TSCC患者を解析対象とした。うちICI単剤投与は16例(76.2%)であった。90%を超える症例においてICI投与前6ヶ月以内に化学療法や放射線治療が実施されていた。ICI投与効果は、CR 1例(4.5%), PR 2例(9.5%), SD 1例, PD 17例(80.9%)であった。4例は外科切除前に化学療法を受けていたので免疫プロファイル解析対象から除外し、17例の解析を実施した。ICI投与症例におけるM2関連指標の高値が確認できた。また、免疫サブタイプ分類では、賦活型は0例、境界型2例、抑制型5例、隔離型2例、寛容型8例で、15例(88.2%)が免疫制御サブタイプであった。ICI投与効果との関連はみられなかった。TAMにおけるPD-L1発現はかなりのレベルで認められたが、癌細胞上のPD-L1発現は数例を除いて低値(16.7±25.5%)であった。PD-1はCTLおよびTreg共に発現がみられたが、ICI投与効果が期待できるPD-1⁺CTL/PD-1⁺Treg値が高い症例も存在した。pTexとtTex CTLの解析では、その多くがICI効果が期待できないtTexであった。

再発/転移 ICI投与症例の初回手術検体の免疫プロファイルサブタイプの殆どが免疫制御サブタイプで、残念ながらPD-1 ICI単剤投与効果が期待できないものであった。初回手術時と再発/転移時のがん微小免疫環境が異なることも考えられるが本研究結果から、TSCCではICI単剤投与での効果が期待できない症例に投与が実施されているという問題点が見出された。免疫サブタイプから提案する併用療法としては、境界型に対してはipilimumab(抗CTLA-4抗体)などの他のICIとの併用、免疫抑制型では、TAMを標的とするemactuzumab(抗CSF-1抗体)やgemcitabine、あるいはTregを標的とするmogamulizumab(抗CCR4抗体)との併用、免疫隔離型では、がん微小環境を修飾できるafilibercept(VEGFR阻害剤)やbintrafusp alfa(PD-L1/TGFβR阻害剤)などの併用が望ましいと考えられた。残念ながら、免疫寛容型はICIの適応でないと考えられた。再発・転移症例におけるPD-1 ICI保健掲載はされているもののTSCCの場合は免疫サブタイプを配慮したICI治療法提案が必要であると思われる。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daroonpan Pissacha, Ouchi Ryo, Zhang Chenyang, Nagai Shigenori, Nishii Naoto, Kashima Yoshihisa, Tsushima Fumihiko, Harada Hiroyuki, Hamagaki Miwako, Ikeda Tohru, Aida Jun, Kaomongkolgit Ruchadaporn, Azuma Miyuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Personal immune profiles: Diversity and prognostic value for oral tongue squamous cell carcinoma evaluated by comprehensive immune parameter analyses with multiplex immunofluorescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 106458 ~ 106458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oraloncology.2023.106458	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14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 ダルンパン ピサッチャー, 西井 直人, 加島 義久, 濱崎 美和子, 津島 文彦, 原田 浩之, 池田 通, 東 みゆき
2. 発表標題 肉眼分類とがん浸潤様式から見た舌扁平上皮癌の免疫プロファイルの多様性
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ダルンパン ピサッチャー, 西井 直人, 津島 文彦, 原田 浩之, 東 みゆき
2. 発表標題 Comprehensive analyses between clinical outcome and immunopathological profiles in tongue SCC
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Pissacha Daroonpan, Ryo Ouchi, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Comprehensive analyses of immune profile in tumor-microenvironment of tongue squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第51回日本免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大内 陵, ダルンパン ピサッチャー, 野地 理夏, 加納 嘉人, 西井 直人, 津島 文彦, 原田 浩之, 東 みゆき
2. 発表標題 舌扁平上皮癌における PD-1 免疫チェックポイント阻害剤投与症例の免疫プロファイリング解析
3. 学会等名 第77回日本口腔科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daroonpan Pissacha, Naoto Nishii, Yoshihisa Kashima, Fumihiko Tsushima, Hiroyuki Harada, Tohru Ikeda, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Immune profiling analyses of tongue squamous cell carcinoma by multiplex immunofluorescence.
3. 学会等名 第66 回日本口腔外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 みゆき
2. 発表標題 がん微小環境の免疫評価のトランスレーショナルリサーチ
3. 学会等名 第66 回日本口腔外科学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daroonpan Pissacha, Naoto Nishii, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Quantitation of multiple immune cell subsets in tongue squamous cell carcinoma by multiplexed immunofluorescence.
3. 学会等名 第25 回日本がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daronpan Pissacha、加島 義久、濱垣 美和子、西井 直人、津島 文彦、原田 浩之、池田 通、東 みゆき
2. 発表標題 マルチプレックス免疫組織染色による舌扁平上皮癌の免疫プロファイリング解析
3. 学会等名 第75 回日本口腔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ダロンパン ピサッチャー、西井直人、加島義久、濱垣 美和子、津島 文彦、原田 浩之、池田 通、東 みゆき
2. 発表標題 肉眼分類とがん浸潤様式からみた舌扁平上皮癌の免疫プロファイルの多様性
3. 学会等名 第76 回日本口腔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大内 峻, ダロンパン ピサッチャー, 野地 理夏, 加納 嘉人, 西井 直人, 野口 誠, 濱垣 美和子, 池田 通, 原田 浩之, 東 みゆき
2. 発表標題 舌扁平上皮癌におけるPD-1 免疫チェックポイント阻害剤投与症例の免疫プロファイリング解析
3. 学会等名 第77 回日本口腔科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Pissacha Daronpan, Ryo Ouchi, Naoto Nishii, Fumihiko Tsushima, Hiroyuki Harada, Miyuki Azuma
2. 発表標題 舌扁平上皮癌のパーソナル免疫プロファイル -包括的免疫パラメーター解析と予後予測-
3. 学会等名 第82 回日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大内 峻, 蘇 郁雅, 池田 通, 原田 浩之, 東 みゆき.
2. 発表標題 舌扁平上皮癌におけるPD-1 免疫チェックポイント阻害剤投与症例の免疫プロファイリング解析
3. 学会等名 第33 回口腔内科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Su, Ryo Ouchi, Pissacha Daroonpan, Naoto Nishii, Hiroyuki Harada, Tohru Ikeda, Jun Aida, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Personal immune profiles of oral tongue squamous cell carcinoma -Part 1: Analyses of 87 cases of surgical specimens and immune subtype classification.
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ryo Ouchi, Yuya Su, Pissacha Daroonpan, Naoto Nishii, Hiroyuki Harada, Tohru Ikeda, Jun Aida, Miyuki Azuma
2. 発表標題 Personal immune profiles of oral tongue squamous cell carcinoma -Part 2: Analyses of the patients treated with PD-1 immune checkpoint inhibitors-
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Cancer Immunology and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2024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	池田 通 (Ikeda Tohru) (00211029)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	西井 直人 (Nishii Naoto) (40836285)	東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教 (12602)	
研究分担者	相田 潤 (Aida Jun) (80463777)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	津島 文彦 (Tsushima Fumihiko) (90456210)	東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・講師 (12602)	

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