

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09599

研究課題名（和文）頭頸部癌におけるMHCクラス II インバリアント鎖CD74の機能解析と新規治療法開発

研究課題名（英文）Functional analysis of CD74 as a therapeutic target for head and neck malignancies

研究代表者

長門 利純（NAGATO, Toshihiro）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80431419

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）：各種頭頸部悪性腫瘍細胞株を用いた解析から、上咽頭癌（NPC）と節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型（ENKL）細胞株の細胞表面にCD74が発現していることが明らかとなった。NPCとENKL患者組織を用いた検討では腫瘍細胞にCD74の発現を認め、NPCにおけるCD74発現はEBウイルス感染と関連があった。また、NPCとENKLの細胞株培養上清および患者血清にマクロファージ遊走阻止因子（MIF）の発現を認め、患者血清の値は健常人と比較して有意に高かった。以上より、NPCとENKLにおいて、CD74-MIF経路が腫瘍増殖や浸潤に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞株と患者組織を用いた詳細な検討により、CD74-MIF経路がNPCやENKLの新しい治療標的となる可能性が明らかとなった。また、症例を増やした更なる検討が必要ではあるが、NPCとENKL患者血清中のMIFがバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞のCD74発現とEBウイルス感染に関連が示されたことから、CD74-MIF経路がNPCやENKL以外のEBウイルス関連腫瘍に対しても治療標的となる可能性があり、癌研究・治療全体への学術的・社会的貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We detected that CD74 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) was expressed on the surface and in the culture supernatant, respectively, of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type (ENKL) cell lines. In addition, CD74 was expressed by tumor cells in biopsy samples from NPC and ENKL patients. Positive expression of CD74 by NPC cells was significantly correlated with Epstein-Barr virus infection. Furthermore, MIF was present in sera of NPC and ENKL patients at higher levels as compared to healthy individuals. These results suggest that the CD74-MIF pathway may be an important factor in the development of NPC and ENKL.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学、病理学

キーワード：CD74 MHCクラス II MIF 頭頸部癌 免疫療法 抗体療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MHCクラスII (MHC-II) に会合するインバリアント鎖である CD74 は、抗原提示細胞において MHC-II の細胞内輸送や同分子への内在性抗原ペプチドの結合阻止といった重要な役割を担っているが、腫瘍細胞における MHC-II 発現との関わりはほとんどわかっていない。さらに、ある種の悪性腫瘍では、CD74 が細胞表面に発現することで受容体として機能し、腫瘍の増殖・進展に寄与することが報告されているが、頭頸部悪性腫瘍では詳細に検討されておらず、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を含めた腫瘍微小環境への影響も不明である。仮に頭頸部悪性腫瘍で CD74 が高発現していれば、MHC-II 発現の制御や腫瘍微小環境の形成に関連している可能性があり、詳細に検討することで MHC-II を発現する腫瘍細胞に対して細胞障害性を発揮する CD4 陽性ヘルパーT 細胞 (HTL) を利用した新規免疫療法の開発や既存の免疫療法の増強に応用できると考える。また、細胞表面に発現し、かつ細胞増殖に関与するならば、新規の抗体療法や分子標的治療の標的となる可能性も秘めている。CD74 が多様な機能を発揮して免疫系の修飾や腫瘍細胞の増殖・進展に影響を及ぼすのであれば、その機能解明は新たな治療法に直結する可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫などの頭頸部悪性腫瘍細胞株および臨床検体において CD74 の発現を検討する。

(2) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫などの頭頸部悪性腫瘍細胞株および臨床検体において CD74 のリガンドであるマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) の発現を検討する。

(3) CD74-MIF 経路が腫瘍細胞の増殖・進展に果たす機能的役割を解明するとともに、治療標的となり得るかを明らかにする。

(4) 腫瘍細胞において CD74 が MHC-II を含めた免疫関連分子の発現に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫などの頭頸部悪性腫瘍細胞株における細胞表面の CD74 の発現をフローサイトメトリーで解析する。

(2) 頭頸部悪性腫瘍細胞株の培養上清中の MIF 値を ELISA にて測定する。

(3) 頭頸部悪性腫瘍患者の生検・手術組織材料を用いて、免疫組織化学染色により腫瘍細胞の CD74 発現を検討する。また、年齢、性別、病期、ウイルス感染の有無といった各種臨床関連因子と CD74 発現の関連を統計学的に明らかにする。

(4) 頭頸部悪性腫瘍患者血清と健常人血清を用いて MIF 値を ELISA にて測定・比較する。さらに、患者の各種臨床関連因子と血清 MIF 値の関連を統計学的に明らかにする。

(5) 免疫不全マウスにヒト頭頸部悪性腫瘍細胞株を皮下移植して xenograft モデルを作製するとともに、皮下腫瘍におけるヒト CD74 の発現およびマウス血清中におけるヒト MIF の発現を解析する。また、CD74 に対するヒト化抗体を投与して抗腫瘍効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫を含む各種頭頸部悪性腫瘍細胞株を国内外の細胞バンクから購入、または学内外の研究者から可能な限り分与して頂き、細胞表面における CD74 の発現を解析した。また、ウイルス感染と CD74 発現の関連を検討するために、Epstein-Barr (EB) ウイルスまたはヒトパピローマウイルス陽性の頭頸部悪性腫瘍細胞株も入手して、解析に含めた。さらに、頭頸部悪性腫瘍とそれ以外の悪性腫瘍における CD74 の発現の違いを明らかにする目的で、肺癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌の細胞株における CD74 発現もあわせて解析した。その結果、上咽頭癌 (NPC) と節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型 (ENKL) の細胞株において、細胞表面上に CD74 が強く発現していることが明らかとなった。

(2) NPC 細胞株で CD74 の発現を認めたことから、NPC 患者生検組織における CD74 の発現を検討したところ、76%の患者で腫瘍細胞に高い発現を認めた。また、CD74 の発現と各種臨床因子との関連を統計学的に解析したところ、EB ウイルス感染と有意な相関が認められた。

ENKL 患者生検組織においても CD74 の発現を検討したところ、蛍光二重染色にて CD56 陽性の腫瘍細胞に CD74 が発現していることが明らかとなった。

(3) MIF と細胞表面上の CD74 の結合により腫瘍細胞の増殖能および浸潤能が亢進するとの報告があるため、NPC と ENKL の細胞株培養上清中の MIF 値を測定した。その結果、NPC と ENKL の細胞株培養上清中に MIF の発現を認め、その値は時間経過とともに増加した。以上より、NPC および ENKL 細胞株が MIF を産生していることが明らかとなった。

(4) NPC と ENKL の患者血清および健常人血清を用いて MIF 値を測定した。その結果、NPC と ENKL の患者血清中に MIF の発現を認めるとともに、健常人と比較して有意に高値を示した。

(5) CD74 陽性 NPC 細胞株を免疫不全マウスである SCID マウスに皮下移植して異種移植モデルを作製した。皮下に形成された腫瘍におけるヒト CD74 発現を検討したところ、腫瘍細胞に発現を認めた。

また、CD74 陽性 ENKL 細胞株を免疫不全マウスである NOG マウスに皮下移植して異種移植モデルを作製した。皮下に形成された腫瘍におけるヒト CD74 発現を検討したところ、腫瘍細胞に発現を認めた。

さらに、上記のマウスから血液を採取して血清中のヒト MIF の発現を調べた。その結果、NPC および ENKL の異種移植モデルにおいて、血清中にヒト MIF の発現を認めた。また、血清ヒト MIF 値と皮下腫瘍の大きさとの間に正の相関を認めた。

(6) 過去の報告において、CD74 が CD70 の細胞内輸送に関与する可能性が指摘されている。そのため、CD74 陽性の NPC と ENKL 細胞株における CD70 の発現を調べたところ、両細胞株の細胞表面上に CD70 の発現を認めた。また、NPC と ENKL の患者生検材料において、腫瘍細胞に CD70 の発現を認めた。さらに、NPC の腫瘍細胞における CD74 染色強度と CD70 染色強度の間には正の相関を認めた。

(7) 以上より、NPC および ENKL 細胞株が細胞表面上に CD74 を発現するとともに、MIF を産生していることが明らかとなった。また、異種移植マウスの腫瘍細胞のヒト CD74 発現と血清中のヒト MIF 発現も確認された。NPC および ENKL 患者組織の腫瘍細胞に CD74 の発現を認めるとともに、患者血清中には健常人と比較して有意に高値の MIF 発現が認められた。これらの結果から、NPC と ENKL において CD74-MIF 経路が腫瘍増殖や浸潤に何らかの重要な役割を果たしている可能性がある。さらに、CD74 が CD70 の発現や細胞内輸送にも関連している可能性がある。

今後は、CD74 や MIF に対する中和抗体や CD74 のノックダウン・アウト細胞株などを用いて、CD74-MIF 経路の役割や CD74 と CD70 の関連を詳細に解析する予定である。また、腫瘍細胞における CD74 発現と EB ウイルス感染の関連も解析する予定である。さらに、CD74 に対するヒト化抗体を異種移植マウスに投与して抗腫瘍効果を検討することで、CD74 を標的とした NPC と ENKL に対する新規治療法開発を目指した研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagato T, Komatsuda H, Hayashi R, Takahara M, Kishibe K, Yasuda S, Yajima Y, Kosaka A, Ohkuri T, Oikawa K, Harabuchi S, Kono M, Yamaki H, Wakisaka R, Hirata-Nozaki Y, Ohara K, Kumai T, Katada A, Hayashi T, Harabuchi Y, Kobayashi H	4. 巻 72
2. 論文標題 Expression of soluble CD27 in extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type: potential as a biomarker for diagnosis and CD27/CD70-targeted therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2087 ~ 2098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-023-03394-7	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 -

1. 著者名 Nagato T, Komatsuda H, Hayashi R, Takahara M, Ujiie N, Kosaka A, Ohkuri T, Oikawa K, Sato R, Wakisaka R, Kono M, Yamaki H, Ohara K, Kumai T, Kishibe K, Katada A, Hayashi T, Kobayashi H	4. 巻 115
2. 論文標題 Soluble CD27 as a predictive biomarker for intra tumoral CD70/CD27 interaction in nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1073 ~ 1084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16079	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長門利純、小松田浩樹、林 隆介、安田俊輔、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 上咽頭癌におけるCD74とMIFの発現
3. 学会等名 第112回 日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長門利純、小松田浩樹、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型における可溶性CD27の発現とバイオマーカーとしての可能性
3. 学会等名 第27回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長門利純、小松田浩樹、林 隆介、高原 幹、岸部 幹、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、河野通久、山木英聖、脇坂理紗、大原賢三、熊井琢美、片田彰博、原淵保明、小林博也
2. 発表標題 節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型における可溶性CD27の発現
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長門利純、小松田浩樹、林 隆介、高原 幹、岸部 幹、野崎 結、大原賢三、熊井琢美、片田彰博、林 達哉、原淵保明
2. 発表標題 鼻性NK/T細胞リンパ腫における可溶性CD27の発現とバイオマーカーとしての可能性
3. 学会等名 第62回 日本鼻科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------