

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592589

研究課題名(和文) 頭頸部癌による腫瘍免疫抑制機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Study of immunosuppressive mechanism in head and neck cancer and development of novel treatment

研究代表者

櫻井 大樹 (Sakurai, Daiju)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10375636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌細胞の誘導する骨髄性抑制細胞(MDSC)は免疫システムを抑制し、治療抵抗性に関連する因子と考えられている。頭頸部癌患者におけるMDSCの免疫抑制への影響と機序の解明を行った。顆粒球系MDSCはT細胞の活性化を抑制するが、NKT細胞の活性化には影響しなかった。細胞培養液に過酸化水素を添加するとT細胞は濃度依存的に細胞死が増加するのに対し、NKT細胞の影響は限定的であった。NKT細胞は過酸化水素に耐性であることから顆粒球系MDSCに対する感受性の違いを説明する機序として示唆された。また腫瘍組織の網羅的発現解析から、5つの候補microRNAがMDSCの増加との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that cancer cells induced myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and suppressed anti-tumor immunity. In this study, we examined immune suppression in patients with head and neck cancer and tried to elucidate the underlying mechanism. Peripheral blood cells (PBCs) were obtained from patients with head and neck cancer and MDSCs were analyzed by flow cytometry. Granulocytic MDSC (G-MDSC) was accumulated in peripheral blood. There was no correlation between the percentage of G-MDSC and NKT cells. G-MDSC was depleted from PBCs and the proliferation of NKT cells upon alpha-Galactylceramide stimulation was analyzed. Activation of NKT cells was not affected with or without G-MDSC. And, we examined the sensitivity to hydrogen peroxide (H2O2). Although T cell-death was elevated depend on H2O2 concentration, the effect on NKT cells was limited. NKT cells were resistant to H2O2, this result could explain the differential sensitivity to G-MDSC between T cells and NKT cells.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部癌 腫瘍免疫 骨髄性抑制細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄性抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells ; MDSC)は、癌細胞により誘導され、免疫システムを制御する細胞であることが明らかとなり近年注目されている。癌細胞は体内で MDSC を誘導増殖させ、さまざまなリンパ球機能に影響を与え、癌細胞に対する抗腫瘍免疫応答を抑制するというメカニズムが解明されてきている。近年、乳癌・膵癌・胃癌などでの研究より、MDSC が末梢血中に増加している症例では、予後が不良であることが報告されており、臨床的に非常に重要な細胞であると考えられている。MDSC は T 細胞にアポトーシスを誘導するとともに癌細胞表面の抗原認識を阻止し、その結果、癌細胞は T 細胞からの攻撃を逃れ排除を免れていると考えられている。このことは、癌患者における T 細胞トレランスは反転できる可能性があり、抑制された免疫システムを回復させる治療の開発の可能性を示している。

(2) 発癌モデルマウスによる研究では、癌の外科的切除により MDSC が減少すること、また癌患者より採取した末梢血から、抗体を用いて MDSC を排除すると、T 細胞の機能が回復したことが報告されている。また悪性黒色腫患者において、前処置として薬剤による骨髄抑制を行うと細胞免疫治療が劇的に効果を挙げることが報告されており、制御性 T 細胞など免疫抑制性のリンパ球の減少とともに、MDSC の減少も良好な治療効果に関与している可能性が考えられる。MDSC による免疫システムの抑制は、癌が腫瘍免疫から逃避するための重要な手段の一つと考えられ、MDSC の制御は、癌治療の成績を向上させる可能性を持つものと期待される。

(3) 頭頸部扁平上皮癌は進行すると制御が難しく、遠隔転移をきたすと完治は非常に困難である。手術・放射線・化学療法の3者を行っても治療成績はいまだ満足のものではなく、第4の治療法として期待された免疫治療も効果は限定的であり、これまで標準治療としては確立されていない。頭頸部扁平上皮癌において免疫治療が効果を発揮できない原因として、腫瘍免疫の低下が重要な因子であると考えられている。腫瘍免疫の低下には MDSC の関与が示唆され、これまで頭頸部扁平上皮癌患者では病期の進行とともに、MDSC が末梢血中に増加していることが報告されている。しかし頭頸部癌患者における MDSC の関与や、免疫抑制のメカニズムについての研究報告はこれまで少なく、とくに臨床経過・予後との関連についてはこれまで明らかとなっていない。

(4) 近年、蛋白をコードせず種々の遺伝子発現調節に関わる機能性 RNA である microRNA (miRNA) が注目されている。

miRNA はメッセンジャーRNA を阻害することで遺伝子の発現を制御し、癌から発生・分化に至るまで重要な生物学的役割を果たしていることが分かってきた。これまで MDSC に関与する miRNA の報告はほとんどなく、本研究は頭頸部癌における MDSC の増殖と腫瘍免疫抑制に関与する miRNA を検索・同定することを目的としている。頭頸部癌による MDSC の増殖と腫瘍免疫抑制分子メカニズムを解明し、腫瘍免疫抑制の回復・賦活により予後を改善させる治療法への発展を目指す。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌の治療は、これまで手術・放射線・化学療法の3者により行われているが、進行症例では再発・転移をきたすことが多く予後は不良である。さらなる治療成績の向上には新たな治療の開発が急務と考えられる。近年、癌細胞は MDSC を誘導し免疫システムを抑制することで、免疫系から逃れて増殖しやすい環境を構築していることが明らかになり、このことは、治療への抵抗性や、免疫治療が有効に効果を発揮できない原因として重要なものと考えられている。本研究は頭頸部癌における MDSC による腫瘍免疫の抑制機構の解明と、関与する microRNA を同定し、腫瘍免疫を賦活させる新規治療法開発への発展を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究は千葉大学倫理委員会の承認を得て行われた。千葉大学医学部附属病院、耳鼻咽喉・頭頸部外科に入院中もしくは外来受診された頭頸部腫瘍患者から、本研究に参加する被験者に対し研究の説明と同意取得を行った。手術、放射線、化学療法など標準治療前、および治療後に末梢血採血を行い、ファイコールにて単核球分画を分離採取し、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞の各リンパ球および、顆粒球系骨髄性抑制細胞 (granulocytic MDSC:G-MDSC) および単核球系骨髄性抑制細胞 (monocytic MDSC:M-MDSC) のプロファイルおよびその比率、変動について蛍光標識抗体を用いフローサイトメトリーにて解析を行った。MDSC のサブタイプの同定として、M-MDSC : HLA-DR(low/-) CD14+ , G-MDSC : HLA-DR(-)Lineage(CD,19,56)(-) CD14(-) CD15(+) を解析した。

(2) CD15 陽性細胞の除去と細胞増殖実験のために、末梢血単核球分画 (PBMC) を CFSE にてラベルしたのち、CD15 magnetic beads を用い CD15+ 細胞を除去した。T 細胞の増殖実験において、CD15+ 細胞を除いた PBMC と除去しない PBMC を準備し、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体で刺激し、48 時間後に CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の細胞分裂を CFSE の蛍光強度を元にフローサイ

トメトリーにて解析した。

また、通常、NKT 細胞は末梢血中に少数しか存在しないが、これまでの我々の検討では頭頸部癌患者において明らかな減少は認められていない。今回検討した頭頸部扁平上皮癌患者においても、健常者と比較し、その数の減少は認めていなかった。NKT 細胞の増殖実験においては、CD15+細胞を除いたPBMC と除去しないPBMC に、NKT 細胞の特異的リガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) と IL-2 を加え 1 週間培養したのち、NKT 細胞の比率をフローサイトメトリーにて解析した。同時に、NKT 細胞からの IFN $\gamma$  産生については、ELISA 法を用いて比較検討した。

(3) G-MDSC が産生し免疫抑制に関与することが示唆される活性酸素種の一つである過酸化水素( $H_2O_2$ )について、T 細胞と NKT 細胞の  $H_2O_2$  に対する感受性の違いを調べるために、PBMC に  $\alpha$ -GalCer を加え 1 週間培養増殖させた NKT 細胞と、IL-2 を加え培養増殖させた T 細胞に、0, 12.5, 25, 37.5, 50  $\mu$ M の濃度にて  $H_2O_2$  を加え、24 時間培養後に死細胞の割合を Annexin V を用いてフローサイトメトリーにて解析を行った。

(4) 手術を先行治療とする頭頸部扁平上皮癌患者において、術前に採血を施行し、末梢血中の G-MDSC の比率を、蛍光標識抗体を用いフローサイトメトリーにて解析した。その解析より、末梢血中の G-MDSC が 1% 以上増加する群と 1% 未満の非増加群の 2 群に分けた。また手術により切除された検体より癌部を切り出し、癌部より抽出した RNA を用い、miRNA の網羅的な発現解析を行った。G-MDSC の増加群と非増加群の 2 群における癌組織内の miRNA の発現の比較から、差異の大きい候補 miRNA を選択した。

#### 4. 研究成果

(1) MDSC のサブタイプについて、HLA-DR(low/-) CD14+細胞を M-MDSC として、HLA-DR(-) Lineage (CD3,19,56)(-) CD14(-) CD15(+) 細胞を G-MDSC として解析した。健常者および甲状腺癌患者と比較し、G-MDSC および M-MDSC ともに頭頸部扁平上皮癌でのみ有意な増加を認めた。M-MDSC は末梢血の T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞との相関を認めなかった。G-MDSC は B 細胞、NK 細胞との相関を認めなかったが、末梢血 T 細胞とのみ有意な逆相関を認め、T 細胞の抑制に関与することが示唆された。一方、NKT 細胞に対しては有意な相関を認めなかった。また G-MDSC と M-MDSC との間に関係を認めず、それぞれの MDSC サブタイプの増加には関連がなく、異なる因子により増加が促進されていることが示唆された。頭頸部扁平上皮癌患者の

stage と MDSC の割合の関連について解析をおこなうと、stage 3, 4 症例は stage 1, 2 症例に比較し G-MDSC が有意に高値であった。

頭頸部扁平上皮がん患者 5 名について放射線療法、化学療法、手術療法といった標準治療前と、標準治療終了後 1 ヶ月の G-MDSC を比較したところ、治療終了後に有意な低下を認めた。

(2) 頭頸部癌患者の末梢血リンパ球分画より抗 CD15 抗体 + 磁気ビーズを用いて G-MDSC を除去したものと、除去しないものについて、 $\alpha$  ガラクトシルセラミドの刺激による NKT 細胞の増殖活性、IFN $\gamma$  産生を比較すると、NKT 細胞の増殖、IFN $\gamma$  産生量ともに変化は認められなかった。この結果より NKT 細胞の活性化は G-MDSC に耐性であることが示唆された。

(3) T 細胞および NKT 細胞の培養液に  $H_2O_2$  を添加すると T 細胞は濃度依存的に細胞死が増加するのに対し、 $H_2O_2$  の濃度が上昇しても NKT 細胞は細胞死が少なく、T 細胞と比較し有意に低かった。NKT 細胞は  $H_2O_2$  に耐性であり、G-MDSC に対する感受性の違いを説明する機序と示唆された。

これまで MDSC と NKT 細胞の関係についての報告は少なく、MDSC による NKT 細胞活性化への影響は不明であった。NKT 細胞の増殖に対し、CD15+ 細胞 (G-MDSC) の有無による抑制的な影響の差は認められず、NKT 細胞は G-MDSC に対し抵抗性を有することが示唆された。G-MDSC の放出する主要な抑制因子とされる  $H_2O_2$  の添加に対し、NKT 細胞は T 細胞に比べ細胞死の割合が有意に少ないことから  $H_2O_2$  に対する耐性が高いことが示され、G-MDSC に対する耐性機序の一つとして示唆される結果であった。

(4) 頭頸部扁平上皮癌患者の G-MDSC の増加群と非増加群の 2 群に分けた手術検体の miRNA の網羅的な発現解析から、発現に有意差のある候補 miRNA を 5 つ選択した。PCR による検証では末梢血の血清中には選択された 5 つの miRNA の発現は認めなかったが、腫瘍内に発現する 5 つの miRNA は MDSC の増殖との関連が示唆された。

(5) 今回の検討から、MDSC による末梢免疫系への影響の一端が解明され、とくに T 細胞に対する抑制作用と、NKT 細胞の MDSC に対する耐性の存在が示唆された。MDSC は腫瘍局所に浸潤し局所の免疫抑制にも関与する可能性が報告されているが、末梢血から簡便に MDSC を評価することで治療効果の評価や予後予測にもつながる可能性がある。さらに本研究から  $\alpha$ -GalCer によ

り NKT 細胞免疫系を利用した免疫療法は MDSC に耐性である可能性が示唆されたが、さらに抑制された T 細胞免疫を賦活させるための MDSC をターゲットとした治療を組み合わせることで、抗腫瘍免疫を広く賦活させ、患者の予後や QOL を向上させる治療法への発展が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

櫻井大樹、堀中敦史、花澤豊行、岡本美孝、頭頸部癌患者で誘導される MDSC による免疫系への影響、第 38 回日本頭頸部癌学会、東京ファッションタウンビル(東京都江東区)、2014 年 6 月 13 日

櫻井大樹、岡本美孝、MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS ATTENUATE ANTI-TUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH HEAD AND NECK CANCER, 20th international Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (IFOS 2013), COEX Convention and Exhibition Center (韓国、ソウル),2013 年 6 月 1 日

櫻井大樹、堀中敦史、野畑二次郎、藤川陽、國井直樹、花澤豊行、岡本美孝、頭頸部癌における骨髄系免疫細胞 MDSC の検討、第 114 回日本耳鼻咽喉科学術総会・学術講演会、ロイトン札幌(北海道札幌市)、2013 年 5 月 18 日

櫻井大樹、頭頸部癌に対する NKT 細胞免疫系を標的とした免疫療法の開発、第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会、シンポジウム、東京ドームホテル(東京都文京区)、2012 年 7 月 7 日

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 大樹 (SAKURAI, Daiju)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10375636