

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293412

研究課題名(和文) 宿主免疫評価に基づいた口腔癌分子標的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Molecular immunotherapy for oral cancer based on the host immunity diagnosis.

研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa, Hiroyuki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20127905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌治療において免疫療法はある程度、確立された治療として認知されてきた。しかしながら、免疫を評価するバイオマーカーは確立されていない。今回、われわれは、患者の局所免疫状態のマーカーとして、IL-6 と IL-8 を同定した。IL-6 は、血管新生および予後との相関が認められ、IL-8 は予後と局所における CD163 陽性の M2 マクロファージとの相関が示された。これらのデータは、口腔癌に対する個別化免疫化学療法の開発につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently immunotherapy are promising cancer therapy. However, the biomarker evaluating immunological condition is not established. In the present study, We have identified IL-6 and 8 as a critical biomarker in oral cancer. We showed that the serum IL-6 level tended to negatively correlate with favorable outcome. And IL-6 has important roles in cancer progression via angiogenesis. IL-8 may be involved in poor clinical outcomes via generation of CD163-positive M2 macrophages. These findings obtained from this study lead to development of personalized immunochemotherapy for oral cancer patients.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 免疫療法 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

癌治療はこれまで国際対がん連合 (UICC) の定めた TNM ステージを指標とした stage 分類にもとづき様々な臨床試験が生まれ、標準治療が確立されてきた。しかし、早期癌とされ根治的外科処置が適切に施行された口腔癌症例で、約 20-30% の再発、転移症例が認められ予後不良群が存在する。また、進行癌や再発切除不能症例および遠隔転移症例に対しては十分な治療法がない。そこで、TNM が癌の形態の特徴のみを指標としていることに対して、患者予後における、癌に対する生体側の反応、特に癌免疫の因子を考慮すべきである。実際、Galon らは、生存率等に関連する因子として CD8+ T 細胞や CD45RO+ T 細胞の有用性を報告し、いわゆる immune score の概念を提唱している (J. Transl. Med., 10:1, 2012)。また、近年、癌細胞に対する免疫監視機構や逃避機構の解明のみならず、浸潤、増殖や血管新生の促進等をはじめとする免疫による癌進展促進機構も明らかにされている。腫瘍抗原ワクチン、養子免疫療法や抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体などの免疫療法が FDA でも認証され腫瘍免疫学と癌免疫療法の重要性が見直されている。特に、既存の化学療法剤や分子標的薬剤が担癌状態に由来する免疫抑制状態、がん進展促進環境を制御することが証明されており、今後の口腔癌免疫複合化学療法にとって非常に有用であると考えられる (Ko HJ et al, Cancer Res, 67:7477-86, 2007, Ramakrishnan R et al, J Clin Invest, 120:1111-24, 2010 等)。われわれの施設においても、2010 年より癌免疫療法、特に樹状細胞ワクチンを用いた治療法に着目しその有用性について検討を行ってきた (口腔がん術後補助療法における自己がん組織を用いた樹状細胞ワクチンの有用性に関する検討：愛大医病倫 1003014 号、口腔がん術後補助療法における人工抗原 MUC1 を用いた

樹状細胞ワクチンの有用性に関する検討：愛大医病倫 1203011 号)。現在、ヒト T 細胞認識腫瘍抗原の同定やテトラマーアッセイなどの免疫測定技術の進歩に伴い、抗腫瘍 T 細胞の局在、量的評価、また、免疫応答やサイトカイン産生能および細胞障害能等の測定による質的評価が可能となり腫瘍免疫学の発展は目を見張るものがある。さらに、近年、癌細胞の全エクソンシーケンスにより個々の患者毎に突然変異部位が異なることが報告されており、抗腫瘍免疫応答は、これらの個別変異に対する免疫応答である場合も多いと考えられているが詳細は不明である。

2. 研究の目的

患者にとって有効な免疫治療を提供するために、各症例における全身のおよび局所的な免疫抑制状態や、腫瘍組織微小環境内における癌免疫逃避機構の解析などのいわゆる、宿主の免疫学的な個性 (網羅的分子解析) を把握することを目的とする。つまり、免疫療法の効果が期待できるバイオマーカーの同定と、新たな治療標的分子の同定を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

全身的免疫評価に関する検討：健常人ならびに患者血清 (responder, non-responder) を用いて multi-ELISA の手法にて抗腫瘍免疫活性の促進あるいは抑制に働く各種サイトカイン、ケモカイン (IL4, IL6, IL7, IL8(CXCL8), IL10, IL-12, IL15, IL17, IL18, IL23, IFN γ , TGF β , TNF α , VEGF, SDF1(CXCL12), IP10, MCP1(CCL2), CCL17, CCL20, CCL22, CXCL5) を検索する。また、これらのサイトカイン、ケモカインについて健常人と癌患者間、responder と non-responder 間、における発現プロファイルを比較検討する。臨床効果判定は、RECIST に基づいた腫瘍縮小効果判定、再発あるいは後発転移の有無、生存率を評価することによ

り行なう。

局所的免疫評価に関する検討：絞り込んだ分子を含め、患者の生検または、手術標本のパラフィン切片を用いて癌微小環境における免疫状態を検討する。免疫組織化学染色にて、浸潤してきている免疫細胞の表面マーカー (CD3, CD4, CD8, CD27, CD45RA, CD45RO, CD56, CD68, CD163, CD204, CD206, FOXP3, HLA-A,B,C, HLA-DR, TCR 等) およびケモカイン受容体 (CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 等) を検索する。ケモカイン受容体や HLA は腫瘍細胞についても検討する。さらに、がん幹細胞に関連する分子群 (CD44, CD133, ABC-G2, SOX2 等) 上皮間葉転換 (EMT) (snail, slug, twist, E-cadherin, vimentin 等) や、シグナル伝達に重要な分子 (pERK, pART, PTEN, p53 等)、さらに免疫抑制分子として近年注目されてきた PD-1/PD-L1, CTLA4 分子等の発現も確認する。

以上の実験結果より、癌患者の免疫抑制状態、がん進展促進環境の構築に重要な役割をはたす、遺伝子、サイトカイン、ケモカインなどの蛋白および miRNA が推定される。これらの分子は、本研究により口腔癌患者において何らかの発現異常が認められたものであり、口腔癌患者の免疫抑制状態およびがん進展促進環境におけるバイオマーカーや免疫環境を改善する分子であり、臨床応用可能な分子であると考えられる。同分子が腫瘍細胞、免疫担当細胞に及ぼす影響を続いて、in vitro ならびに in vivo 実験系にて確認し、臨床応用に必要なエビデンスを得る。すなわち、口腔癌各種細胞株を用いて、同分子の強制発現、発現抑制、または、サイトカイン・ケモカインにおいては、リコンビナント蛋白や中和抗体等を用いて、増殖、浸潤転移に及ぼす影響を、WST-8 assay、invasion assay、migration assay にて、また、EMT 関連マーカーや先述した免疫抑制環境やがん進展促

進環境に影響を及ぼすと考えられる、免疫抑制分子の発現、免疫抑制因子の産生に関して PCR 法、western blotting 法、ELISA 法、細胞免疫染色法にて評価を行い、腫瘍細胞株に与える影響について詳細に評価する。

4. 研究成果

宿主免疫評価およびバイオマーカーの探索として、multi-ELISA の手法にて抗腫瘍免疫活性の促進あるいは、抑制に働く各種サイトカイン、ケモカインを行った。当科にて 2006 年から 2013 年の間に、口腔扁平上皮癌と診断された新鮮症例 55 例 (stage1/2 26 症例、stage3/4 29 症例) を対象とし、術前血清を用いた multiplex suspension array 法を用いたスクリーニングおよび生化学的検査による検討を行った。multiplex suspension array 法においては、Interleukin (IL)-2, 4, 6, 8, 10, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interferon (IFN)- γ , Tumor necrosis factor (TNF)- α を対象とした。解析は、Kaplan-Meier 法、Log-rank test、T-test および Fisher の正確検定にて、予後および各種因子との相関を検討した。

予後との相関では、IL-6 および IL-8 のみ早期癌患者において、disease free survival との相関が認められた ($P < 0.05$)。各因子間においては、IL-6/IL-8 間 ($P < 0.001$)、IL-6/TNF 間 ($P < 0.001$)、IL-8/TNF 間 ($P = 0.012$) に相関が認められた。また、IL-6 は CRP ($P = 0.004$) および ALB ($P = 0.029$) とそれぞれ正および負の相関が認められた。続いて、腫瘍微小環境下における IL-8 発現および腫瘍免疫抑制に関与している CD163⁺ M2 マクロファージの浸潤様式を免疫組織化学染色にて評価した。その結果、腫瘍微小環境下における IL-8 の分泌と CD163⁺ M2 マクロファージの腫瘍周囲への浸潤度には正の相関が認められ、またそれぞれ

が独立して予後不良予測因子となることが認められた。次いで IL-8 による CD163⁺ M2 マクロファージへの分化誘導の確認を *in vitro* にて行った。IL-8 刺激群には無刺激群と比較して、有意に CD163⁺ 細胞数が増加しており、IL-8 によりさらに CD163⁺ M2 マクロファージへの分化誘導が促進されていることが示唆された。以上の結果より、早期癌においては血清中の IL-8 濃度が腫瘍微小環境下を反映しており、また IL-8 の発現強度、CD163⁺ M2 マクロファージの浸潤度が予後予測バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。IL-6 に関しては、術前血清 IL-6 と腫瘍間質の IL-6 発現には強い相関が認められた ($P < 0.001$)。さらに CD34 陽性細胞数と血清 IL-6 値にも相関が認められた ($P < 0.001$)。また、腫瘍部線維芽細胞は、正常部線維芽細胞と比較し、VEGF-A の高発現が認められ、血管新生との関連が示唆された。また、*in vivo* においては、IL-6 シグナルの阻害により腫瘍増殖の抑制が認められた ($P < 0.05$)。これらの結果より、IL-6 は腫瘍血管における重要な役割を果たしており、治療標的としての重要性も示唆された。以上のことよりこれらの分子は、宿主免疫状態を反映するバイオマーカーと成りえる可能性と、治療標的分子としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Hiroyuki Goda, Masato Okamoto, Koh-ichi Nakashiro, Satoshi Hino, Ryuichi Murase, Hiroyuki Hamakawa. Prognostic impact of preoperative serum interleukin-6 levels in early stage oral squamous cell carcinoma patients strictly defined by sentinel

node biopsy. *Oncology letters*, in press, 2016 査読有

2. Fujita Yohei, Masato Okamoto, Hiroyuki Goda, Tomoyuki Tano, Koh-ichi Nakashiro, Atsuro Sugita, Tomonobu Fujita, Shigeo Koido, Sadamu Homma, Yutaka Kawakami, Hiroyuki Hamakawa. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0110378.
3. Tomoyuki Tano, Masato Okamoto, Shin Kan, Takashi Bando, Hiroyuki Goda, Koh-ichi Nakashiro, Shigetaka Shimodaira, Shigeo Koido, Sadamu Homma, Tomonobu Fujita, Mitsunobu Sato, Naomi Yamashita, Hiroyuki Hamakawa, Yutaka Kawakami. Immunochimoradiotherapy for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: Augmentation OK-432-Induced Helper T Cell 1 Response by 5-FU and X-ray Irradiation. *Neoplasia*. 2013 査読有
4. [学会発表](計 5 件)
 1. Hiroyuki Goda, Masato Okamoto, Koh-ichi Nakashiro, Norihiko Tokuzen, Hiroyuki Hamakawa. Anti interleukin-6 receptor antibody suppressed oral squamous cell carcinoma by inhibiting tumor-stroma interaction. *ESMO in Asia*, 2016 年 12 月 20 日, Suntec city, Singapore.
 2. 合田啓之、岡本正人、徳善紀彦、中城公二、浜川裕之 口腔扁平上皮癌における腫瘍関連線維芽細胞の臨床的意義 第 53 回日本癌治療学会学術集会 2015 年 10 月 29 日、京都国際会議場、京都市、京

都府

3. 口腔扁平上皮癌における CD20 陽性 B リンパ球浸潤の意義 藤田陽平、中城公一、合田啓之、浜川裕之 第 62 回日本口腔科学会中国四国地方部会 2014 年 10 月 25 日、徳島大学歯学部 4 階大講義室、徳島市、徳島県
4. 合田啓之、中城公一、藤田陽平、浜川裕之 cN0 口腔癌症例における術前血清 IL-6 値と血管新生における臨床的意義 2014 年 10 月 18 日、幕張メッセ、千葉市、千葉県
5. Hiroyuki Goda, Masato Okamoto, Koh-ichi Nakashiro, Tomoyuki Tano, Yohei Fujita, Hiroyuki Hamakawa. Clinical implication of interleukin-6 and angiogenesis in cN0 oral cancer strictly defined by sentinel node biopsy. 96th American Association of Oral and Maxillofacial Surgery Annual Meeting 2014 年 9 月 11 日、Honolulu, HI, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa Hiroyuki)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 20127905

(2) 研究分担者

中城 公一 (Nakashiro Koh-ichi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90314880

合田 啓之 (Goda Hiroyuki)
愛媛大学・医学部付属病院・講師
研究者番号 : 00464371

(3) 連携研究者

岡本 正人 (Okamoto Masato)
北里大学・薬学部・特任教授
研究者番号 : 10243718