

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861922

研究課題名(和文) ミエロイド系抑制性細胞の形質変化を利用した口腔癌に対する免疫ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Anti-tumor effect of myeloid derived suppressor cell(MDSC) in a mouse model of oral cancer

研究代表者

富原 圭(TOMIHARA, KEI)

富山大学・大学病院・講師

研究者番号：70404738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌担癌マウスを用いたミエロイド系抑制性細胞MDSCとその他の免疫抑制性細胞との相互作用についての解析では、腫瘍移植後の腫瘍組織内でMDSCが制御性T細胞(Treg)や腫瘍浸潤マクロファージ(TAM)などと同様に著しく増加していることが確認された。また、低用量の抗がん剤を投与した担癌マウスでは、腫瘍組織内では、樹状細胞上のCD80、CD86、CD40、CD54、CD83などのT細胞共刺激分子群の発現が増強し、また、腫瘍細胞表面上においても、T細胞共刺激分子やVCAM-1やP-selectinなど、免疫細胞の接着に関わる分子群の発現が増強していることも確認された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we conducted immunological study for myeloid derived suppressor cell(MDSC) in a mouse oral cancer model. We investigated whether in vivo administration of chemotherapeutic agent affected the distributions of immune cells, tumor-cell surface expression levels of immune accessory molecules and T cell immune responses in tumor-bearing mice. In vivo administration of chemotherapeutic agent induced significant oral cancer-cell apoptosis in vitro, and chemotherapy markedly attenuated established mouse tumor growth. Chemotherapy decreased the numbers of both myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and B cells in tumor-bearing mice and enhanced dendritic cell maturation. Moreover, chemotherapy upregulated tumor-cell surface expressions of several immune accessory molecules and adhesion molecules, including CD80, CD86, CD40, ICAM-1, VCAM-1, and P-selectin. Remarkably, these tumor cells augmented tumor specific T-cell responses.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 免疫抑制性細胞 抗腫瘍免疫 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

癌を含めた各種疾患において、免疫抑制性細胞であるミエロイド系抑制性細胞 (Myeloid derived suppressor cell ; 以下 MDSC) の関与は注目され、特に腫瘍免疫研究の分野では、マウスモデルを用いた実験やヒト検体を用いた解析で、これまでに多くの知見が見出されている。マウスでは、CD11b 陽性 Gr-1 陽性細胞が、ヒトでは CD11b 陽性 CD33 陽性細胞がこの MDSC に相当し、その出現頻度が、腫瘍の進展や予後に関連するとの報告がなされ、治療上のターゲットとして考えられている。申請者もこれまでに、マウス卵巣がん (ID8 細胞株) 腹水症モデルを用いた解析で、担癌マウスの腹水内では、CD11b、Gr-1 陽性細胞が、従来報告されていた MDSC と形態的、機能的に異なり、マウス卵巣癌腹水モデルから誘導される MDSC が、むしろ T 細胞の増殖を強く促進する能力を有し、共培養した CD8 陽性 T 細胞を細胞傷害性の活性化 T 細胞に誘導することを報告した。(Tomihara et al, Journal of Immunol; 2010 原著論文.)

このことは、MDSC がある環境下では、形質的にも機能的にも従来報告されている抑制性の MDSC と異なったものである可能性を証明したものであり、すなわち、免疫抑制性の MDSC も効果的に分化誘導されることによって、腫瘍免疫反応において重要な役割を果たす細胞集団になりうる可能性を示唆する結果となった。

そこで申請者はこの CD11b、Gr-1 陽性細胞集団の多様性に着目し、口腔癌マウスモデルで誘導される MDSC の機能解析を行い、最終的には、抗原提示細胞へと形質変化させることが可能かどうかを検討し、口腔癌への効果的なワクチン療法に応用することを検討している。(科学研究費、研究活動スタート支援、平成 23、24 年度採択)

しかし、担癌状態においては、腫瘍局所、

所属リンパ節のみならず末梢リンパ節や末梢血中においても、MDSC 以外に、Treg、腫瘍関連マクロファージ (Tumor associated macrophage ; 以下 TAM) などの免疫抑制性細胞集団が増加し、T 細胞免疫応答などの抑制による抗腫瘍免疫反応の抑制状態を引き起こすことが報告されている。すなわち、これらの抑制性細胞集団をターゲットとした手法を組み合わせなければ免疫ワクチン療法も有効性が乏しいとされている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究は、免疫抑制性細胞集団として知られ、担癌状態などで著しく増加することが知られている MDSC の形質変化を誘導し、口腔扁平上皮癌に対する新たな免疫学的アプローチによる治療法の開発を目的として、シンジェニックのマウス口腔扁平上皮癌モデルを用いて、口腔癌組織における MDSC の分布および機能解析と、この MDSC を効果的な抗原提示細胞へと形質変化させる手法の検討を行い、口腔癌に対する新たな免疫ワクチン療法のために応用することが可能かどうか解析を行う。

## 3. 研究の方法

C3H/HeN マウス由来の口腔扁平上皮癌 SCCVII を用いて口腔癌担癌マウスモデルを作成し、担癌マウスの腫瘍組織内、顎下リンパ節内および末梢リンパ節内での CD11b、Gr-1 陽性 MDSC、CD4、CD25、Foxp3 陽性 Treg、さらに CD11b、CD14 陽性 TAM ならびに CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞などの分布、機能解析、それぞれの細胞間での相互作用について解析を行う。また、口腔癌由来の CD11b、Gr-1 陽性細胞を用いた腫瘍特異的免疫反応の解析や、口腔癌担癌マウスに対する、成熟型 CD11b、Gr-1 陽性細胞を用いたワクチン効果などを解析する予定である。CD11b、Gr-1 陽性細胞

を用いたワクチン効果の解析においては、*in vivo* におけるある種の化学療法剤や抗体を用いた Treg の除去による併用効果を検討する。

#### 4. 研究成果

①口腔癌担癌マウスを用いたミエロイド系抑制性細胞 MDSC とその他の免疫抑制性細胞との相互作用についての解析では、腫瘍移植後の腫瘍組織内で MDSC が制御性 T 細胞 (Treg) や腫瘍浸潤マクロファージ (TAM) などと同様に著しく増加していることが確認された。

さらに注目すべきことは、腫瘍局所内に浸潤している CD4 陽性 T 細胞中の 50%以上が Treg であることがわかった。この Treg の著しい増加に比べ、MDSC が数%であったことから、腫瘍移植の 2 週目程度までは、Treg の誘導により MDSC の出現が抑制されている可能性が示唆された。また、低用量の抗がん剤を投与した担癌マウスでは、樹状細胞と癌細胞の形質変化が誘導されていることが確認されている。さらに、腫瘍局所内における CD11b 陽性細胞の細胞表面上における death receptor である DR5 (TRAIL-R2) や CD95 (Fas) の発現が増強している。一方で、Treg 細胞表面上では、death receptor に対する ligand である TRAIL や FasL の発現が増強していることが確認された。中和抗体を用いた解析で、腫瘍細胞から分離した Treg は、Fas/FasL の相互作用を介して、CD11b 陽性細胞のアポトーシスを誘導していることが確認された。担癌マウスに、低用量の抗がん剤を投与したところ、腫瘍組織内では、樹状細胞上の CD80、CD86、CD40、CD54、CD83、MHC-class I、MHC-class II などの T 細胞共刺激分子群の発現が増強していることが確認された。また、低用量の抗がん剤を投与した担癌マウスの腫瘍細胞表面上においても、T 細胞共刺激分

子や VCAM-1 や P-selectin など、免疫細胞の接着に関わる分子群の発現が増強していることも確認された。

#### 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 4 件)

1. Tomihara K, Fuse H, Heshiki W, Takei R, Zhang B, Arai N, Nakamori K, Noguchi M. Gemcitabine chemotherapy induces phenotypic alterations of tumor cells that facilitate antitumor T cell responses in a mouse model of oral cancer. *Oral Oncol.* 2014;50:457-467. 査読有
2. Noto Z, Yoshida T, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno H, Tomihara K, Arai N, Noguchi M, Nikaido T. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. *Oral Oncol.* 2013;49:787-795. 査読有
3. Tomihara K, Curriel TJ, Zhang B. Optimization of immunotherapy in elderly cancer patients. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(6):573-583. 査読有
4. Arai N, Inoue S, Tomihara K, Tsuno H, Noguchi M. In vitro synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. *Oral Dis.* 2013;19:200-205. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Tomihara K, Noguchi M. Myeloid derived suppressor cells in oral cancer. 4<sup>th</sup> International Conference and Exhibition on Pathology; 2015 Jul 13-15; New Orleans, USA.
2. Tomihara K, Arai N, Noguchi M. Chemotherapy induces phenotypic alteration of tumor cells that facilitate T cell responses in a mouse model of oral cancer. 11th Asian congress on oral and maxillofacial surgery (ACOMS); 2014 Aug 22-25; Xian China.
3. Tomihara K, Noguchi M. Chemotherapy induces phenotypic

alteration of tumor cells that facilitate T cell responses in a mouse model of oral cancer. 3<sup>rd</sup> International conference on translational medicine; 2014 Nov 3-5; Las Vegas, USA.

4 . Tomihara K, Noguchi M. CTLA 4 -mediated inhibition of osteoclast differentiation by regulatory T cells (Tregs) in oral cancer. 21th International conference on oral and maxillofacial surgery (ICOMS); 2013 October 21-24; Balcelona.

5 . Tomihara K, Noguchi M. CTLA 4 -mediated inhibitory effect on osteoclastogenesis by Tregs in oral cancer. The American Association of Immunologists AAI Annual Meeting; 2013 May 3-7; Honolulu.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

富原 圭 (TOMIHARA Kei)  
富山大学・附属病院・講師  
研究者番号：70404738