

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861709

研究課題名(和文) 化学療法剤と免疫療法を併用した口腔癌に対する新たな免疫化学療法の開発

研究課題名(英文) Gemcitabine Chemotherapy Induces Phenotypic Alterations of Tumor Cells That Facilitate Antitumor T cell Responses in a Mouse Model of Oral Cancer

研究代表者

今上 修一 (Imaue, Shuichi)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：80456392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SCC7マウス口腔癌モデルを用い、ゲムシタピンの低用量投与を行った。担癌マウスの腫瘍はコントロールと比べて有意に増殖が抑制され、腫瘍細胞のアポトーシスが增強していた。摘出した担癌マウスの各種臓器の免疫細胞分布を解析したところ、腫瘍局所では、ゲムシタピンの投与によってMDSCとB細胞が有意に減少していた。腫瘍組織内では、樹状細胞上のCD80、CD86などT細胞共刺激分子群の発現が增強していることが確認された。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增強していた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the antitumor effects of GEM using a mouse oral cancer model using immunological analyses. We examined apoptotic cell death of tumor cells with GEM treatment both in vitro and in vivo. We investigated whether in vivo administration of GEM affected the distributions of immune cells, tumor-cell surface expression levels of immune accessory molecules and T cell immune responses in tumor-bearing mice. GEM induced significant oral cancer-cell apoptosis, and in vivo GEM administration markedly attenuated established mouse tumor growth. In vivo GEM administration decreased the numbers of both myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and B cells in tumor-bearing mice. Moreover, GEM treatment upregulated tumor-cell surface expressions of several immune accessory molecules and adhesion molecules, including CD80, CD86, VCAM-1, and P-selectin.

研究分野：口腔がん

キーワード：免疫化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、口腔癌に対する化学療法剤ゲムシタピンと免疫療法を併用した新たな化学療法の開発を目的とし、口腔癌組織内におけるミエロイド系抑制性細胞および制御性T細胞などの免疫抑制性細胞をターゲットとしたゲムシタピンの効果と、各種インターフェロン等の免疫補助因子の併用効果を、シンジェニックのマウス口腔癌モデルを用いて基礎的に解析するものである。化学療法剤の最も重要な効果は、癌細胞の細胞周期やアポトーシスのシグナルに直接働きかけることで癌細胞を死滅させることであるが、宿主の免疫系に対しても様々な影響が及ぼされるために、抗腫瘍効果と表裏に有害事象の発生が問題となる。化学療法に併用して、宿主の免疫系を賦活することを目的に、これまでも、OK-432やPSKなどの免疫補助薬と化学療法剤との併用療法などが報告されている。免疫補助薬には、腫瘍細胞に直接的に作用して、腫瘍細胞の増殖を抑制させる効果や、化学療法により低下した宿主の免疫能を回復させる効果や、エフェクター細胞や抗原提示細胞を活性化し、宿主の抗腫瘍免疫応答を刺激する働きを期待するものである。しかし、免疫学の理解がさらに進むにつれ、担癌状態においては、これらのエフェクター細胞や抗原提示細胞が十分に機能を発揮できない状態にあることが理解され、その原因の一つが、制御性T細胞(Regulatory T cell; 以下Treg)や最近特に注目されている未成熟ミエロイド系抑制細胞(Myeloid derived suppressor cell; 以下MDSC)などの抑制性細胞であり、癌細胞の増殖とともに腫瘍組織内で著しく数を増し、エフェクター細胞や抗原提示細胞を強く抑制し、腫瘍の伸展に大きく影響しているとされている。近年、宿主の免疫系に対

して極めて副作用が少なく、かつ高い抗腫瘍効果が期待できる化学療法剤としてゲムシタピンが注目されている。マウスの肺癌皮下移植モデルを用いた研究で、ゲムシタピン投与により、脾臓内でMDSCのみが有意に減少し、T細胞やNK細胞などのエフェクター細胞の数は影響を受けないことを発表し、同剤の免疫学的な観点からの有用性が強く示唆されている。

## 2. 研究の目的

現段階では、ゲムシタピンの適用が、肺癌、膵癌、卵巣癌などの一部の癌腫のみであることもあり、口腔癌を含めたその他多くの癌腫においては、免疫学的な作用を含め治療効果そのものもはっきりとしていない。

そこで本研究においては、シンジェニックのマウス口腔癌モデルを用いて、ゲムシタピンによる抗腫瘍効果の評価、担癌マウスにおけるMDSCおよびTreg等の抑制性細胞のゲムシタピンの投与による機能変化、その他の免疫系細胞に対する影響を解析する。

さらに、ゲムシタピンの抗腫瘍効果を高めることを目的として、各種インターフェロン(IFN)や全トランス型レチノイン酸(ATRA)などの免疫補助因子との併用効果を解析する。これらの免疫補助因子は、様々な癌細胞において化学療法剤などによるアポトーシスの誘導を増強することが知られている。さらに、各種インターフェロンはT細胞やNK細胞などの活性化因子として、またATRAはMDSCなどを成熟型の非免疫抑制性細胞へ分化させる分化誘導剤としての効果も知られており、これらの免疫補助因子との併用は、ゲムシタピンの抗腫瘍効果において、細胞生物学的な修飾効果のみならず、免疫学的な修飾効果も期待することができると考えられる。申請者らは、すでにSCC7細胞を用いたマウス口腔癌モデルの作製を行っている。

### 3. 研究の方法

本研究では、シンジェニックのマウス口腔癌モデルを作製し、ゲムシタピン投与による腫瘍組織内、顎下リンパ節および末梢血中における免疫抑制性細胞に焦点を当てた免疫学的解析を行う。また、ゲムシタピンと各種免疫補助因子との併用療法の効果を確認するために、マウス口腔癌モデルを用いた治療実験を行い、その併用効果を評価する。

1. マウス口腔扁平上皮癌モデルを用いた化学療法剤の投与による MDSC および Treg の発現変化の解析 (マウス口腔扁平上皮癌 SCC7 細胞株を口腔内移植した担癌マウスに経静脈的にゲムシタピンを投与し、これらのマウスから腫瘍組織、顎下リンパ節、脾臓、末梢血をそれぞれ採取して別々に細胞を回収し、MDSC (CD11b、Gr-1 陽性細胞) および他の免疫系細胞として CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD19、B220 陽性 B 細胞、F4/80 陽性マクロファージ、CD11c 陽性樹状細胞、NK1.1 陽性 NK 細胞、CD4、CD25、Foxp3 陽性 Treg 等の分布、各種表面抗原等をフローサイトメトリーにて解析する。)

2. マウス口腔扁平上皮癌モデルを用いた化学療法剤の投与による MDSC および Treg の機能変化の解析 (担癌マウスにおける MDSC および Treg の機能を解析するため、申請者は、in vitro での T 細胞抑制試験を行う。)

3. ゲムシタピンに対する各種インターフェロンおよび ATRA の併用効果に関する in vitro での解析

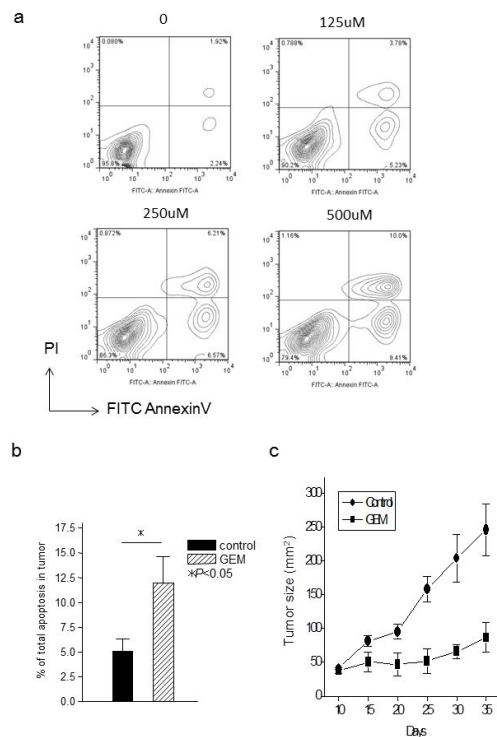
4. マウス口腔癌モデルを用いた、ゲムシタピンと各種インターフェロンおよび ATRA との併用効果の評価 (マウス口腔癌細胞株 SCC7 を用いて口腔癌担癌マウスに対して、ゲムシタピン単独、ゲムシタピン + IFN 前投与、ゲムシタピン + IFN 前投与、ゲム

シタピン + IFN 前投与、ゲムシタピン + ATRA 前投与のグループに分類し治療実験を行う。)

### 4. 研究成果

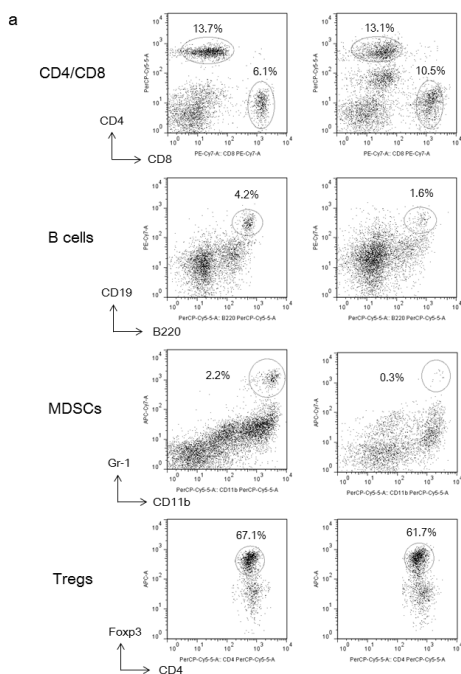
本研究では、SCC7 マウス口腔癌モデルを用いて、ゲムシタピンの低用量の投与を行ったところ、担癌マウスの腫瘍は、コントロールと比べて有意に増殖が抑制され、また腫瘍細胞のアポトーシスが增強していることも確認された。

Figure 1



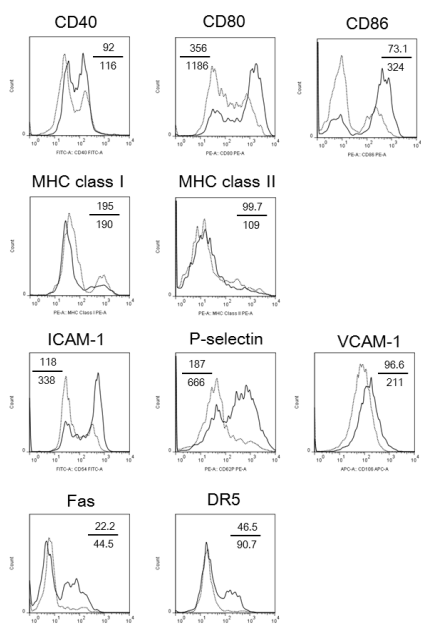
さらに、担癌マウスの各種臓器を摘出し、免疫細胞の分布について解析したところ、腫瘍局所では、ゲムシタピンの投与によって、MDSC と B 細胞が有意に減少することが確認された。一方で、T 細胞や制御性 T 細胞 (Treg) は有意な変化が認められなかった。

Figure 2



また、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。

Figure 3



## 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 1 件)

Imaue S, Tomihara K, Takei R, Inoue S, Tuno H, Oura T, Tomizawa G, Nomura K, Arai N, Noguchi M.; Induction chemotherapy using intra-arterial cisplatin plus systemic TS-1 for locally advanced resectable oral cancer: Preliminary experience in a single institute. J Oral and Maxillofac Surg, Med Pathol, 27(1):6-10, 2015, 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

Imaue S, Tomihara K, Takei R, Inoue S, Tuno H, Oura T, Tomizawa G, Nomura K, Arai N, Noguchi M.; Induction chemotherapy using intra-arterial cisplatin plus systemic TS-1 for locally advanced resectable oral cancer: Preliminary experience in a single institute. J Oral and Maxillofac Surg, Med Pathol, 27(1):6-10, 2015, 査読あり

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今上修一 (IMAUE, Shuichi)

富山大学大学院医学薬学研究部

歯科口腔外科学講座・助教

研究者番号: 80456392

### (2) 研究分担者

研究者番号:

### (3) 連携研究者

研究者番号: