

令和元年6月11日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11720

研究課題名(和文) 老齢マウス口腔癌モデルを用いたミエロイド系抑制性細胞の治療標的化に関する研究

研究課題名(英文) Targeting strategy against myeloid suppressor cells in mouse model of aged oral cancer

研究代表者

富原 圭 (Tomihara, Kei)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：70404738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、免疫老化現象を背景とした癌免疫逃避機構の解明とその制御機構について、ミエロイド系抑制性細胞(MDSC)に着目した解析を行った。その結果、末梢血、脾臓、腫瘍組織などの各部位においてMDSCが著しく集簇し、形質的にも機能的にも異なっていることを明らかとした。特に、腫瘍由来のMDSCは、PD-L1の発現が増強し、PD-L1がT細胞に対する免疫抑制能にとって重要であることが明らかとした。また、老齢マウスでは、このMDSCの割合が若年マウスに比べて有意に高いことも明らかとなった。これらの結果は、特に老齢の担癌宿主におけるMDSCの標的化が、より効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、口腔扁平上皮癌における免疫老化を背景とした免疫抑制機序の一端を、MDSCの形質や機能の観点から解明することができれば、その標的化による新たな免疫療法の開発の一助と考えられる。また、MDSCの標的化分子の候補として免疫チェックポイント分子の発現が示唆されることから、免疫チェックポイント分子阻害薬に対する治療抵抗性の機序の解明と、その効果を最大限に引き出す新規治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We showed that myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are elevated in the peripheral blood, spleen, and tumor of mice with oral squamous cell carcinoma. In particular, MDSCs in tumors expressed PD-L1 more abundantly than those in other tissues. Accordingly, MDSCs from tumors, but not from the spleen, suppressed T cell proliferation in vitro. The results suggest that tumor-derived or immune factors result in the accumulation of phenotypically and functionally diverse populations of MDSCs in mice with oral squamous cell carcinoma. The proportion of MDSCs was significantly increased in aged oral cancer-bearing mice. The data also indicate that PD-L1 expression in MDSCs contributes to immune suppression, implying that targeting both myeloid-derived suppressor cells and PD-L1 would be an effective immunotherapeutic strategy against oral cancer.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔癌 免疫抑制 免疫老化 MDSC PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は近年増加傾向にあるが、集学的治療の発展によって、その治療成績は著しく改善している。しかし、口腔癌はその発生部位の解剖学的特徴から、外科治療においては口腔機能が大きく損なわれることもしばしばで、患者の QOL の面から、口腔の機能温存に資する新規治療法が求められる。昨今、免疫チェックポイント分子を標的とした免疫療法の登場は、切除不能進行癌や再発癌に対して、当初期待した以上の優れた臨床的効果を示すこともあり、さらに期待が高まっている。しかし、これらの癌免疫療法の問題点は、その効果が一部の患者において限定的に認められることであり、不応性の機序の解明によってより有効な治療戦略の開発が求められる。また、癌の発生の多くは高齢者であり、免疫療法の開発においては、免疫学的老化機序の理解も必要である。そこで本研究は、口腔癌に対する有効な免疫療法の開発を目的とし、老齢の担癌宿主で増加する骨髄由来免疫抑制性細胞の特性解析により、新たな免疫療法の開発を目的とした基礎的研究である。

担癌宿主では、様々な機序により免疫が抑制状態にある。なかでも、免疫抑制性細胞の骨髄由来抑制性細胞 (Myeloid derived suppressor cell:以下 MDSC) は、腫瘍局所のみならず様々な臓器で増加し、担癌宿主における抗腫瘍免疫応答の抑制に強く影響していることが示唆されている。(Tomihara et al, *Journal of Immunol*; 2010 原著論文)

申請者は、科学研究費助成事業(研究活動スタート支援・H23～24年度、若手B・H25～27年度、基盤C・H28～30年度)の継続的支援を得て、口腔癌の免疫抑制機序とその治療標的化の可能性について究明してきた。そこで現在、もっとも注目していることは、老齢の担癌宿主における MDSC の免疫抑制機序と免疫チェックポイント分子阻害による標的化の可能性である。

免疫チェックポイント分子とは、抗原提示細胞と T 細胞との相互作用において抑制的に働く分子群の総称で、T 細胞上に発現する PD-1、CTLA-4 と、PD-1 のリガンドとして働く PD-L1 であり、それらの分子間による相互作用が、T 細胞免疫応答の抑制に強く影響していることが知られている。申請者らはこれまで、口腔癌マウスの腫瘍組織で著しく集簇する MDSC が、この免疫チェックポイント分子の一つである PD-L1 の発現増強により、強い免疫抑制機能を有することを明らかとした。(Tomihara et al. *Oral Oncol* ; 2016 原著論文)

しかし、この MDSC の担癌宿主における免疫抑制細胞としての形質や機能については、申請者のこれまでの研究成果を含め、様々な研究成果によって、その役割が明らかとなつてはいるものの、

免疫チェックポイント分子阻害の効果やその抵抗性の機序において、MDSC がどのように影響しているかについての報告はない。さらに、癌の発生や進展において、重要な役割を果たすことが示唆されている免疫学的老化において、MDSC を介した免疫抑制機序がどのように変化するか、またどのように癌の発生や進展に関連するかについては未だに不明である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌担癌宿主における MDSC の標的化による有効な免疫療法の開発を目的として、老齢の口腔癌担癌マウスを用いて、免疫老化と MDSC の関連、その免疫抑制機序と標的化の検討を行うこととした。先述の免疫チェックポイント阻害薬は、担癌宿主における免疫抑制機序を標的化することによって、その高い抗腫瘍効果を示すことが既に明らかとなつてきている。しかし、免疫チェックポイント分子阻害が宿主の免疫抑制を標的とした治療薬ではあるにも関わらず、宿主の免疫抑制に強く関連している MDSC が、その免疫チェックポイント阻害薬の反応とどのように関連しているか不明である。そこで、本研究では、特に老齢の担癌宿主における免疫チェックポイント分子阻害の反応において大きなかぎを握る存在として MDSC に形質や機

能に着目している。

また、さらに重要な点として、加齢変化に伴う MDSC の形質や機能面での変化と担癌宿主における免疫抑制への関与の解明である。

特に免疫老化が、MDSCの形質や機能にどのような修飾効果を及ぼしているか、また、どのように免疫チェックポイント分子阻害の反応と関連しているかという点について明らかとし、より効果的な癌免疫療法の開発へと繋げたい。

3 . 研究の方法

担癌宿主における MDSC の免疫抑制機能が免疫老化によってどのように変化するか？また、免疫チェックポイント阻害薬は、老齡担癌宿主における MDSC を介した免疫抑制機能を効果的に標的化することが可能かどうか？

上記の内容を明らかにするため、本研究では、C3H/HeN マウス由来の口腔扁平上皮癌 NR-S1K 細胞と老齡の同マウスを用い老齡口腔癌モデルを作製し、以下の内容について3年計画で検証を予定している。

1 . 老齡担癌宿主における MDSC の形質や機能の特性を検証し、その標的化を探る。

17 月齡の老齡 NR-S1K 担癌マウスとコントロールとして8週齡の若年担癌マウスより腫瘍組織、脾臓、リンパ節、末梢血を採取し、それぞれの臓器における MDSC のマーカーである CD11b、Gr-1 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析する。さらに、それらの細胞における下記の項目を比較検討し、老齡宿主の MDSC の特異性について評価する。

CD80、CD86、CD40、CD54、F4/80、CD73、CD39、MHC-ClassI、MHC-ClassII、CD124、CD115、PD-L1、PD-L2などの表面抗原の発現を解析する。

ROS、NO、Arginase I、VEGF、MMP9、S100Aなど、免疫抑制機能に重要な因子についてその発現レベルを細胞内染色により解析する

MDSCをセルソーティングで分離し、in vitroのT細胞増殖試験を用いた機能解析によって、免疫抑制機能について評価する。

2 . MDSC の標的化治療と免疫チェックポイント分子阻害の併用効果を治療実験で検証する。

担癌宿主からのMDSCの選択的アポトーシス誘導と分化誘導の検証

研究代表者のこれまでの先行研究において、低用量ゲムシタピン投与が、口腔癌担癌マウスの腫瘍組織から、MDSCを選択的に除去することを明らかとした。(Tomihara et al. Oral Oncol ; 2014)

また、口腔癌マウス由来のMDSCでは、PD-L1の発現が増強し、この発現増強したPD-L1がMDSCのT細胞免疫抑制機能にとって重要な役割を果たしていることを明らかとした。(Fuse et al, Oral Oncol ; 2016)

そこで、これまでにMDSCに対する選択的な除去効果が報告されているその他の化学療法剤である5FU、ドセタキセルなどを含め、最もMDSCの選択的除去が有効な薬剤を検討する。また、全トランス型レチノイン酸 (All-trans retinoic acid ; ATRA)は、MDSCの分化誘導の可能性が示唆されている。老齡口腔癌マウスにATRAを投与し、先述のごとく 各種表面抗原の発現、免疫抑制関連因子の解析、ソーティング後、in vitro suppression assayによる機能解析により免疫抑制能の解除について、免疫組織科学的に免疫細胞の分布、表面抗原の発現を評価する。

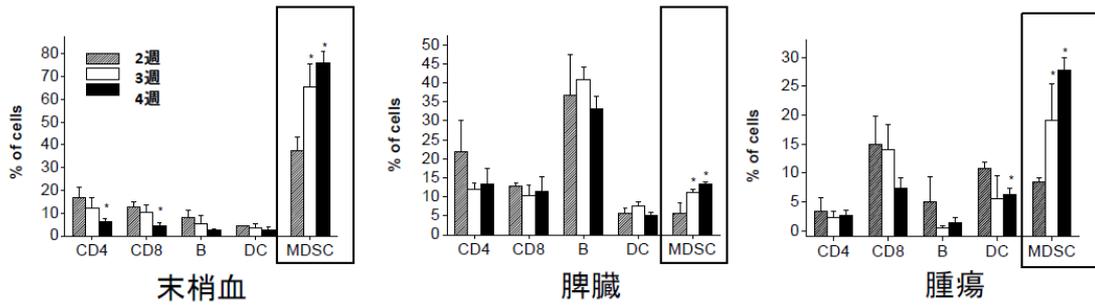
② 抗PD-1抗体による免疫チェックポイント分子阻害との併用効果の検証

上記 で、老齡担癌宿主におけるもっとも有効な治療薬を検証し、さらに各種免疫チェックポ

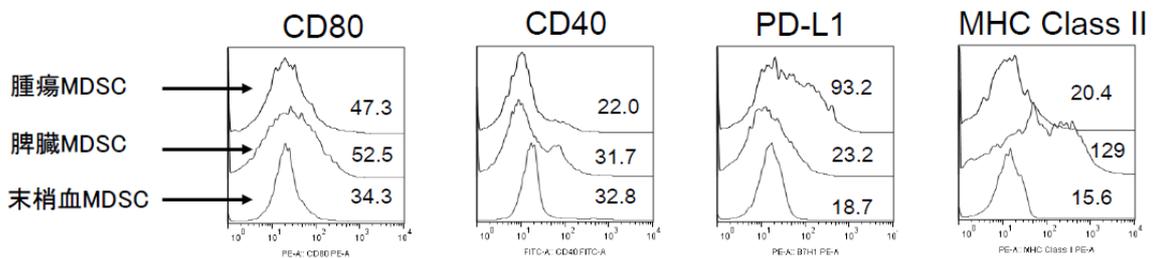
イント阻害薬との併用効果について検証する。以下にその概要を示す。

4. 研究成果

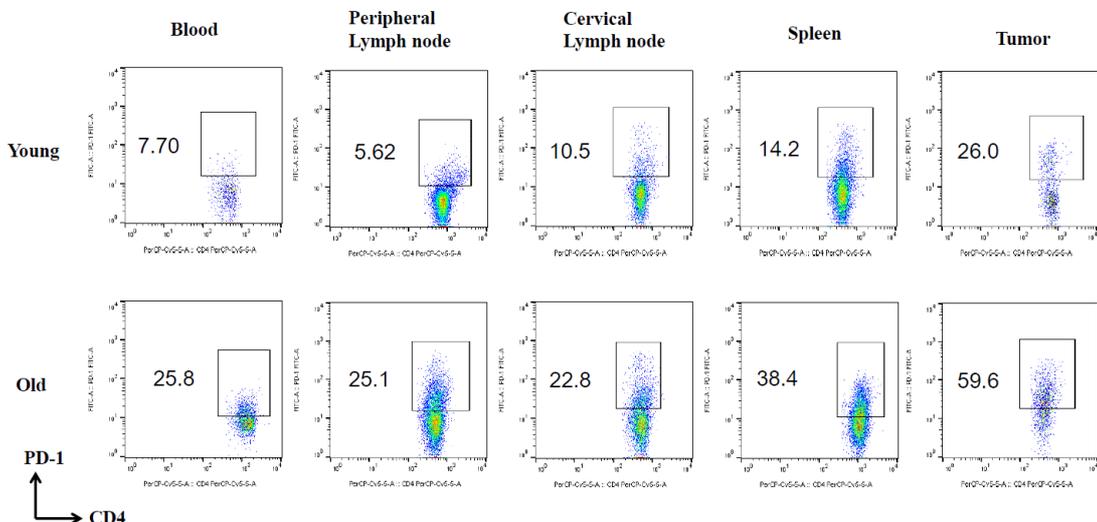
本研究においては、口腔癌担癌宿主の腫瘍局所や末梢組織において MDSC が顕著に増加していることが明らかとなった。

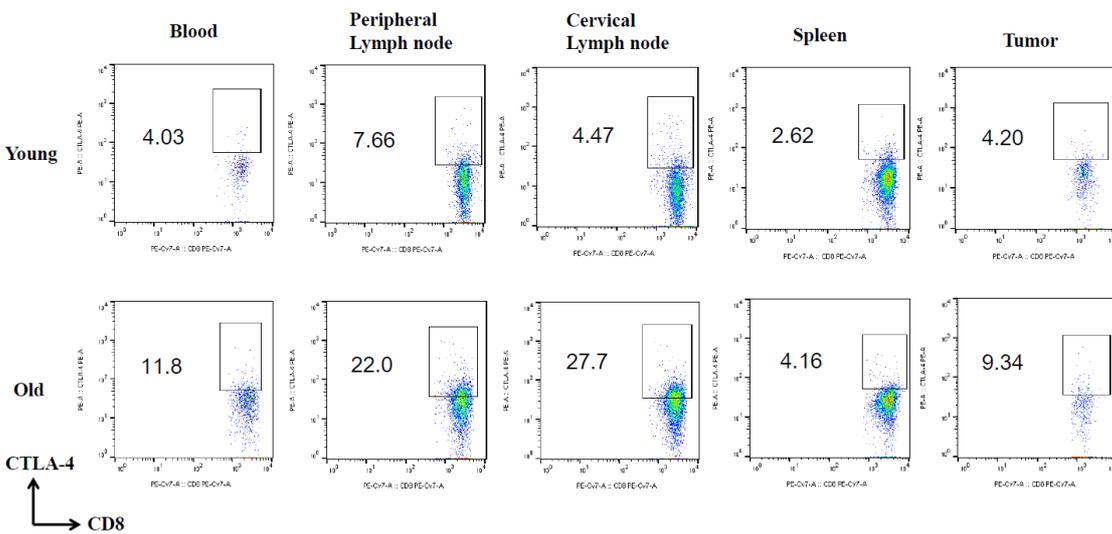
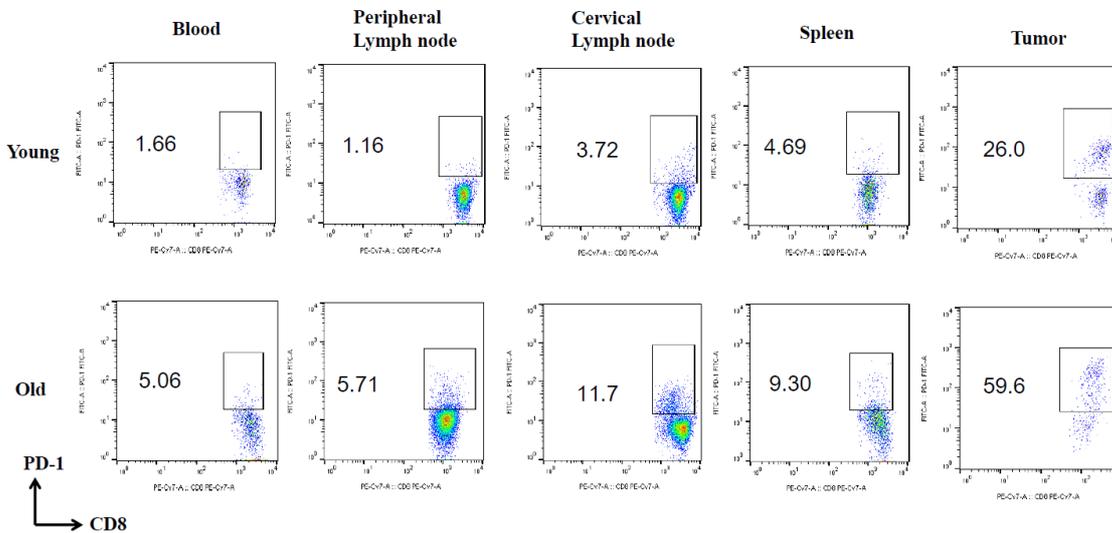
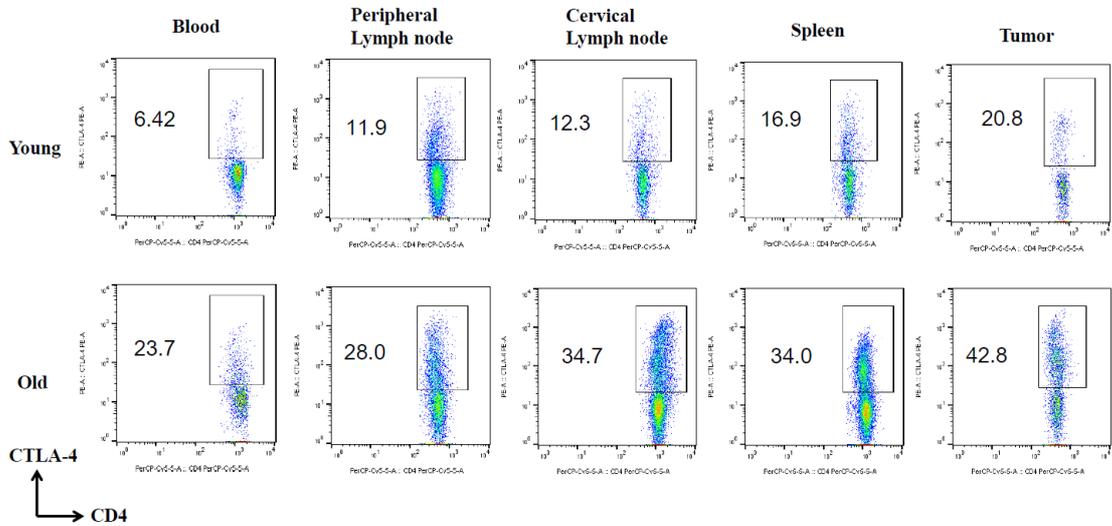


そこで、このMDSCが口腔癌担癌宿主の免疫抑制において重要な役割をはたしていること、しかしながら、腫瘍組織、脾臓、末梢血、リンパ節などの各臓器で、形質や機能が異なっていることから、その標的化には、担癌宿主におけるMDSCの多様性の解明が重要であるという観点から研究が計画された。そして、その論拠の裏付けとなる様々な結果を見出してきた。



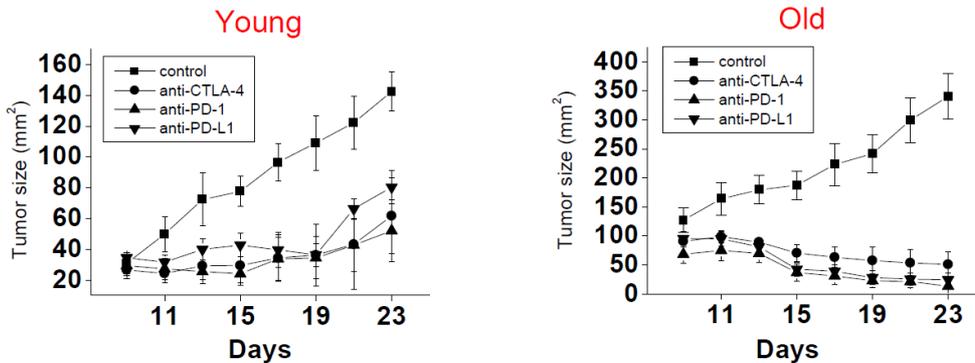
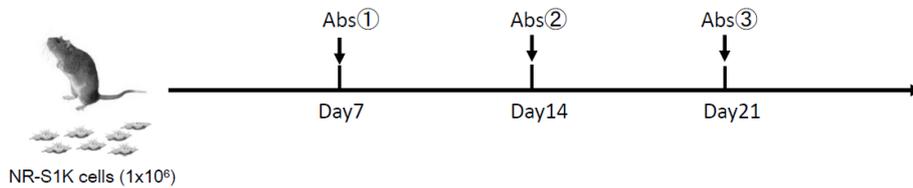
図に示すように、腫瘍由来のMDSCの免疫抑制機能においては、免疫チェックポイント分子のPD-L1の発現増強が影響していることが示唆された。また特に、老齢の口腔癌マウスモデルではMDSCや制御性T細胞 (Treg) が増加とT細胞上の免疫チェックポイント分子の発現が増強していることも明らかとなった。すなわち、老齢担癌宿主では特に免疫抑制機序の解除なくして有効な抗腫瘍免疫応答の誘導が困難な状況と考えられる。以下には、末梢血 (Blood)、末梢リンパ節 (Peripheral lymph node)、頸部リンパ節 (Cervical lymph node)、脾臓 (Spleen)、腫瘍 (Tumor) におけるCD4、CD8陽性T細胞上でのPD-1およびCTLA-4の発現を示したものである。





このように、老齢口腔癌宿主では、若年の宿主に比べて各臓器におけるCD4、CD8T細胞いずれにおいても、PD-1およびCTLA-4の発現が高いことが明らかとなった。

そこで、次に、各種免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果について、若年の口腔癌マウスと老齢の口腔癌マウスにおいて比較検討した。



抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD-L1抗体 of 全てにおいて、若年の口腔癌マウスに比べて、老齡の口腔癌マウスでの効果が顕著に優れていることが明らかとなった。

以上、本研究により、口腔扁平上皮癌における免疫老化を背景とした免疫抑制機序の一端を、MDSCの形質や機能の観点から解明することができれば、その標的化による新たな免疫療法の開発の一助と考えられる。また、MDSCの標的化分子の候補として免疫チェックポイント分子の発現が示唆されることから、免疫チェックポイント分子阻害薬に対する治療抵抗性の機序の解明と、その効果を最大限に引き出す新規治療法の開発に繋がることを期待される。

6 . 研究組織

(1)研究分担者

山崎 学 (YAMAZAKI, Manabu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：1 0 5 4 7 5 1 6

野口 誠 (NOGUCHI, Makoto)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：5 0 2 0 8 3 2 8

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。