

令和元年5月9日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07016

研究課題名(和文)新規組織イメージング法を用いた頭頸部癌免疫特性の解析

研究課題名(英文)Tissue imaging-based immune profiling of head and neck cancer

研究代表者

辻川 敬裕 (TsujiKawa, Takahiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80713916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、この多重免疫染色・イメージサイトメトリー法を用いて、HPV陽性ならびに陰性中咽頭扁平上皮癌検体を解析し、癌組織中のCD8陽性T細胞、ヘルパーT細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球などの免疫細胞の細胞頻度・位置情報に基づく予後相関解析を進めた。当初の計画通り、腫瘍巣内と腫瘍周囲組織の差異、癌細胞と14種類の免疫細胞の位置関係、分布様式を調べ、予後との相関を解析した。COX比例ハザードモデルを用い、年齢、性別、HPV statusで調整した結果、腫瘍組織内のTH2リンパ球やCD66b陽性顆粒球と予後の相関が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法の原法は1978年に報告されているが(Tramu G et al. J Histochem Cytochem 1978)、様々な染色・抗体除去手順の最適化やデジタル画像解析技術の併用で、従来の方法では実現困難であった低コストでの多重染色技術を確立した。本研究を通じて、組織バイオマーカーの解析技術が進歩すれば、近年拡大している免疫療法の治療効果予測、最適化にもつながり、治療成績の向上、副作用・医療費低減に寄与しうる。

研究成果の概要(英文)：Understanding tumor and immune microenvironment facilitates development of biomarker-guided treatment optimization including immunotherapy. To further evaluate tumor-immune heterogeneity, 14 immune cell lineages were analyzed in specimens of head and neck squamous cell carcinoma in terms of the prognostic significance of immune density and distribution via multiplex immunohistochemistry and image cytometry. Cox regression analysis of cell density and distribution of the 14 immune populations revealed that CD66b+ granulocyte infiltration within tumor correlated with short overall survival, inversely correlated with tropism of polarized Th1-type cells within tumor nests versus stroma. These results demonstrate the presence of micro-regional immune complexity profiles correlating with prognosis, providing further insight into immunobiology of head and neck cancer.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 腫瘍免疫 イメージング 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌をはじめ、様々な癌種で腫瘍組織内に存在する免疫細胞の組成や性質が、癌の進展や治療抵抗性と関わることが知られてきた。申請者はこれまでに、一枚のホルマリン固定パラフィン包埋切片から12種類のエピトープを免疫組織化学で解析できる Multiplex immunohistochemistry (IHC)ならびにその画像定量化技術 image cytometry を開発し、3枚の切片から定量化可能な14種類の免疫細胞の組成や性質を統計解析することで、癌の亜分類や予後と相関する腫瘍の免疫的性質を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、中咽頭癌組織マイクロアレイにおける Multiplex IHC/Image cytometry のデータを細胞の位置情報の観点から再解析を行い、細胞分布形式と予後や HPV をふくむ腫瘍亜分類との相関を探索し、細胞数・機能性にさらに位置情報を加えた免疫的組織バイオマーカーの解析基盤を構築することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、頭頸部癌検体を用いて、これまで解析が難しかったが、Multiplex IHC/image cytometry で解析可能な、免疫細胞の組織上での分布と細胞同士の位置関係を調べ、予後や治療反応性との相関を調べることで、従来の免疫的特性解析に位置・分布に基づく追加情報を加え、免疫療法をはじめとした新規・既存治療の更なる最適化につながるバイオマーカーを探索する。

中咽頭癌組織マイクロアレイ(N=38)を解析し、組織中の全細胞の位置情報を抽出し、腫瘍細胞染色マーカーである panCK ならびに EpCAM を用いて、腫瘍巢内ないしは腫瘍周囲組織に分けて解析を行う。その中で、1)腫瘍巢内と腫瘍周囲組織の差異、2)癌細胞と14種類の免疫細胞の位置関係、3)単一種類の免疫細胞の分布様式、4)異なる2種類または3種類間での免疫細胞の位置関係について解析を行い、さらにそこでみられた傾向を、年齢、性別、HPV status を調整因子にして Cox 比例ハザードモデルにて調べ、予後との相関を解析する。

4. 研究成果

Multiplex IHC/image cytometry を用いて、HPV 陽性ならびに陰性中咽頭扁平上皮癌検体を解析し、癌組織中の CD8 陽性 T 細胞、ヘルパー T 細胞、制御性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球などの免疫細胞の細胞頻度・位置情報に基づく予後相関解析を進めた。当初の計画通り、腫瘍巢内と腫瘍周囲組織の差異、癌細胞と14種類の免疫細胞の位置関係、分布様式を調べ、予後との相関を解析した。COX 比例ハザードモデルを用い、年齢、性別、HPV status で調整した結果、腫瘍組織内の TH2 リンパ球や CD66b 陽性顆粒球と予後の相関が示された。

また、免疫細胞の位置情報を解析するデジタル画像解析手法を最適化し、PD1 陽性ヘルパー T 細胞の癌組織内分布が予後不良となることを示した。

本手法を応用し、共同研究にて甲状腺乳頭癌の組織免疫特性の解析や、悪性黒色腫免疫細胞分布や腸内微生物特性と腫瘍内免疫細胞の相関の解析などを進め、成果を報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

原著論文(査読あり)

- 1) Gopalakrishnan V, Spencer C, Nezi L, Reuben A, Andrews M, Karpinets T, Prieto P, Vicente D, Hoffman K, Wei S, Cogdill A, Zhao L, Hudgens C, Hutchinson D, Manzo T, Petaccia de Macedo M, Cotechini T, Kumar T, Chen WS, Reddy S, Szczepaniak Sloane R, Galloway-Pena J, Jiang H, Chen PL, Shpall E, Rezvani K, Alousi A, Chemaly R, Shelburne S, Vence L, Okhuysen P, Jensen V, Swennes A, McAllister F, Marcelo Riquelme Sanchez E, Zhang Y, Le Chatelier E, Zitvogel L, Pons N, Austin-Breneman J, Haydu L, Burton E, Gardner J, Sirmans E, Hu J, Lazar A, Tsujikawa T, Diab A, Tawbi H, Glitza I, Hwu WJ, Patel S, Woodman S, Amaria R, Davies M, Gershenwald J, Hwu P, Lee J, Zhang J, Coussens LM, Cooper Z, Futreal A, Daniel C, Ajami N, Petrosino J, Tetzlaff M, Sharma P, Allison J, Jenq R, Wargo J. Gut microbiome impacts response to anti PD-1 immunotherapy in melanoma patients. Science 359 (6371), 97-103. 2018.1.

- 2) Numajiri T, Morita D, Nakamura H, Tsujiko S, Yamochi R, Sowa Y, Toyoda K, Tsujikawa T, Arai A, Yasuda M, Hirano S. Using An In-House Approach to Cad/Cam Reconstruction of the Maxilla. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 76(6); 1361-1369. 2018.6.
- 3) Pennock ND, Martinson HA, Guo Q, Betts CB, Jindal S, Tsujikawa T, Coussens LM, Borges VF, Schedin PF. Ibuprofen supports macrophage differentiation, T cell recruitment, and tumor suppression in a model of postpartum breast cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6(1); 98. 2018. 12.
- 4) 森本寛基, 新井啓仁, 木下翔太, 吉村佳奈子, 光田順一, 森 大地, 竹中まり, 辻川敬裕, 平野 滋. 経鼻胃管留置が一因と考えられた放射線性喉頭壊死の1例. *頭頸部癌*. 44(3). 321-325. 2018.12.
- 5) Saung MT, Muth S, Ding D, Thomas D, Blair A, Tsujikawa T, Coussens LM, Jaffee EM, Zheng L. Targeting myeloid-inflamed tumor with anti-CSF-1R antibody expands CD137+ effector T-cells in the murine model of pancreatic cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1); 18. 2018. 12.
- 6) Lane R, Femel J, Breazeale A, Loo C, Thibault G, Kaempf A, Mori M, Tsujikawa T, Chang YH, Lund A. IFN- γ -Activated Dermal Lymphatic Vessels Inhibit Cytotoxic T cells in Melanoma and Inflamed Skin. *Journal of Experimental Medicine*, 215(12), 3057-3074. 2018. 12.
- 7) Tsujikawa T, Thibault G, Azimi V, Sivagnanam S, Banik G, Means C, Kawashima R, Clayburgh DR, Gray JW, Coussens LM, Chang YH. Robust Cell Detection and Segmentation for Image Cytometry Reveal Th17 Cell Heterogeneity. *Cytometry Part A*. 2019.2.

〔学会発表〕(計 26 件)

シンポジウム・ワークショップ・パネル

- 1) 辻川敬裕. 新規組織イメージング法を用いた頭頸部癌の免疫的バイオマーカー解析. シンポジウム U-40 頭頸部癌診療への挑戦. 第 41 回日本頭頸部癌学会. 2017 年 7 月 3 日. 京都市.
- 2) 辻川敬裕. 機械学習技術と多重免疫染色法を用いた頭頸部癌の組織免疫特性解析. ワークショップ 2 気と食 基礎研究の最前線. 第 70 回気管食道科学会総会ならびに学術総会. 2018 年 11 月 8 日. 東京.
- 3) 辻川敬裕. 頭頸部癌免疫療法における奏効・無効例の基礎的背景とバイオマーカー確立への戦略. 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2019 年 2 月 7 日. 大阪市.
- 4) Tsujikawa T, Kawaguchi T, Saburi S, Yoshimura K, Mitsuda J, Arai A, Hirano S. 12-biomarker multiplex immunohistochemistry/image cytometry reveals correlation between PD-L1 scoring and tumor-immune microenvironment profiles in head and neck cancer. *Immunological Advances in Basic Science*. Oral Session. Chinese Society for Clinical Oncology Conference on Immunotherapy - Endorsed by AACR. March 22, 2019. Shanghai, China.

学会発表:一般講演

- 1) Tsujikawa T, Chang YH, Thibault G, Azimi V, Ohmura G, Arai A, Matsui M, Nakano H, Coussens LM, Hirano S. Tissue geographical analysis of tumor-immune complexity via multiplex immunohistochemistry and image cytometry. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017 年 9 月 29 日; 横浜.
- 2) 辻川敬裕, 大村 学, 新井啓仁, 松井雅裕, 中野 宏, 平野 滋. 多重免疫染色・イメージサイトメトリーを用いた中咽頭癌における PD-L1 発現解析. 第 30 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会. 2017 年 9 月 7 日; 金沢.
- 3) 木村有佐, 辻川敬裕, 鯉田篤英, 中村高志, 石井祥代, 天谷文昌, 山崎祥子, 竹中まり, 新井啓仁, 平野 滋. 気管浸潤を伴う甲状腺癌に対し、ECMO を用いた 2 症例. 第 128 回日耳鼻京滋合同地方部会. 2017 年 12 月 16 日; 京都.
- 4) 新井啓仁, 辻川敬裕, 平野 滋. Nivolumab 投与症例の検討. 第 28 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2018 年 1 月 25 日; 宇都宮.
- 5) 辻川敬裕, Guillaume Thibault, Young Hwan Chang, Lisa M. Coussens, 新井啓仁,

- 平野 滋. 免疫細胞マッピングを用いた中咽頭癌の免疫的特性解析. 第 28 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2018 年 1 月 26 日; 宇都宮.
- 6) 木村有佐, **辻川敬裕**, 鯉田篤英, 中村高志, 新井啓仁, 松井雅裕, 中野 宏, 平野 滋. 気道確保に ECMO を要した甲状腺癌気管浸潤の 2 症例. 第 28 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2018 年 1 月 26 日; 宇都宮.
 - 7) 新井啓仁, 竹中まり, **辻川敬裕**, 杉山庸一郎, 平野 滋. オブジーボによる免疫関連副作用(irAE)が疑われた胆管炎症例. 第 129 回日耳鼻京滋合同地方部会. 2018 年 3 月 17 日; 大津.
 - 8) Tsujikawa T, Yoshimura K, Takenaka M, Arai A, Hirano S. Multiplex IHC and image cytometry revealed tumor-immune heterogeneity of head and neck cancer. International Session. 第 125 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2018 年 6 月 2 日; 横浜.
 - 9) 光田順一, 新井啓仁, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 竹中まり, **辻川敬裕**, 平野 滋. ニボルマブによる hyperprogression が疑われた耳下腺癌症例. 第 130 回日耳鼻京滋合同地方部会. 2018 年 6 月 10 日; 京都.
 - 10) 新井啓仁, 吉村佳奈子, 光田順一, 森 大地, 竹中まり, **辻川敬裕**, 平野 滋. 下咽頭癌の治療成績と ADC map の有用性. 第 42 回頭頸部癌学会. 2018 年 6 月 14 日; 東京.
 - 11) 新井啓仁, 吉村佳奈子, 光田順一, 森 大地, 竹中まり, **辻川敬裕**, 平野 滋. オブジーボ投与継続困難症例の検討 (ポスター). 第 42 回頭頸部癌学会. 2018 年 6 月 14 日; 東京.
 - 12) **辻川敬裕**, Means C, 吉村佳奈子, 光田順一, 竹中まり, 新井啓仁, Coussens LM, 平野 滋. 甲状腺乳頭癌の免疫的微小環境と病理学的組織侵襲性の検討. 第 42 回頭頸部癌学会. 2018 年 6 月 15 日; 東京.
 - 13) 森 大地, 竹中まり, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. 再発転移頭頸部癌に対するセツキシマブ, パクリタキセル併用療法の検討 (ポスター). 第 42 回頭頸部癌学会. 2018 年 6 月 15 日; 東京.
 - 14) 渡邊 翔, 鈴木 弦, 山崎秀哉, 相部則博, 増井浩二, 新井啓仁, **辻川敬裕**, 竹中まり, 平野 滋. 当院におけるセツキシマブ併用放射線療法の治療成績 (ポスター). 第 42 回頭頸部癌学会. 2018 年 6 月 15 日; 東京.
 - 15) Tsujikawa T, Coussens LM, Gray JW, Chang YH. Sparse coding-based tumor-immune characterization based on chromogenic multiplex immunohistochemistry. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 年 9 月 29 日; 大阪.
 - 16) 吉澤宏一, 吉村佳奈子, 小澤聡美, 佐分利純代, 田浦善裕, 富田晃正, 宮地 充, 柳井茂希, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. 急速増大を来した巨大乳児線維肉腫例. 第 131 回日耳鼻京滋合同地方部会. 2018 年 12 月 1 日; 京都.
 - 17) 新井啓仁, 吉村佳奈子, 佐分利純代, **辻川敬裕**, 平野 滋. Stage I/II 舌癌に対する予防的頸部郭清術の是非について - JCOG1601 試験 -. 2018 年 6 月 10 日; 京都.
 - 18) **辻川敬裕**, Casey Means, 吉村佳奈子, 光田順一, 竹中まり, 新井啓仁, Lisa M. Coussens, 平野 滋. 甲状腺乳頭癌 BRAF V600E 変異と免疫的微小環境の検討. 第 29 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2019 年 1 月 24 日; 金沢.
 - 19) 佐分利純代, 吉村佳奈子, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. 喉頭温存が可能であった喉頭軟骨肉腫の一例頭頸部外科. 第 29 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2019 年 1 月 25 日; 金沢.
 - 20) 吉澤宏一, 吉村佳奈子, 小澤聡美, 佐分利純代, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. 血管腫と鑑別を要した巨大乳児線維肉腫の一例. 第 29 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2019 年 1 月 25 日; 金沢.
 - 21) 吉村佳奈子, 佐分利純代, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. Ipilimumab 投与後に重篤な皮膚障害を来した鼻副鼻腔悪性黒色腫の一例. 第 29 回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会. 2019 年 1 月 25 日; 金沢.
 - 22) 吉澤宏一, 高畠怜奈, 吉村佳奈子, 光田順一, 佐分利純代, 橋本慶子, 竹中まり, **辻川敬裕**, 新井啓仁, 平野 滋. 下咽頭癌経口切除後に嚥下機能改善手術を行った 1 例. 第 132 回日耳鼻京滋合同地方部会. 2019 年 3 月 16 日; 大津市.

〔その他〕

ホームページ等

京都府立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 腫瘍研究グループ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/ent/research.html#3>

受賞

辻川敬裕. 第 28 回京都府立医科大学学友会青蓮賞. 授賞式：2018 年 3 月 2 日；京都 .

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

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。