

令和元年6月26日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07035

研究課題名(和文)甲状腺未分化癌に対する免疫チェックポイント阻害治療の有用性に関する検討

研究課題名(英文)The utility of immune-check point inhibitors for anaplastic thyroid cancer

研究代表者

榎本 圭佑 (ENOMOTO, KEISUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30805750

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)：甲状腺未分化癌におけるPD-L1の発現状況を免疫染色法を用い調査した。甲状腺未分化癌では、甲状腺乳頭癌、甲状腺濾胞癌、腺腫様甲状腺腫などの組織型と比較して有意にPD-L1の発現が亢進している事がわかった。

また、甲状腺未分化癌モデルとなる細胞株でのPD-L1発現状況を調査した。ウェスタンブロット法と免疫染色でそれぞれ過剰発現を確認する事ができた。このセルラインを免疫不全マウスに移植し、甲状腺未分化癌・腫瘍モデルを作成した。パラフィンブロックからのスライドを作成し、免疫染色にて過剰発現がvivoでも見られることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺未分化癌は非常に進行が早く(1年生存率30%以下)、治療方法が限られた癌種である。我々は本研究を通して甲状腺未分化癌においてPD-L1の過剰発現が見られることを見出した。このPD-L1過剰発現した腫瘍は、PD-1抗体(Nibormabなど)を用いた治療が可能となる可能性がある。甲状腺癌を対象としたPD-1抗体の臨床試験を行う前に、モデルマウスでも効果が見られるかを検証する必要があり、本研究はその前段階のモデルマウスを作成し、PD-L1の過剰発現を確かめた。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the expression of PD-L1 in human anaplastic thyroid cancer (ATC) by immuno-histochemically (IHC). The PD-L1 expression ratio in human ATC was higher than that of papillary thyroid cancer, follicular thyroid cancer, and adenomatous goiter.

Second, we evaluate the expression of PD-L1 in ATC human cell lines. Western blotting and IHC showed the over-expression of PD-L1 in ATC human cell lines. Then we have made the xenograft ATC model using these cells. The tissue from xenograft ATC model also showed PD-L1 over-expression.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：甲状腺未分化癌 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

PD-1 (programmed cell death-1)阻害薬を中心とした免疫チェックポイント阻害治療は、悪性黒色腫、腎癌、肺癌さらには頭頸部癌で臨床使用され、これまで予後不良であった悪性腫瘍の長期予後の改善が期待されている。一方、過去に甲状腺癌に対して免疫チェックポイント阻害治療の有用性を評価した報告はない。我々は、MYC 蛋白が甲状腺未分化癌の患者において亢進していることを見出し¹、MYC の翻訳ターゲットの一つである PD-L1 (programed cell death-ligand 1)も過剰発現していることを予想している^{2, 3}。そのため、甲状腺癌においても PD-L1 の過剰発現により腫瘍細胞が抗腫瘍免疫応答から逃れ、免疫チェックポイント阻害により抗腫瘍免疫応答を介した治療が奏功すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、予後が極めて不良である甲状腺未分化癌に焦点を当て、免疫チェックポイント阻害治療が有効である可能性を示すことを目的とする。甲状腺未分化癌における免疫チェックポイント関連タンパクの発現を RNA から蛋白レベルで検討し、免疫チェックポイント阻害剤が甲状腺未分化癌の進行を抑制する可能性を明らかにしたい。

3. 研究の方法

甲状腺未分化癌に対する免疫チェックポイント阻害治療の可能性について、甲状腺未分化癌臨床例における免疫関連膜タンパク (PD-L1) の発現と臨床像の比較検討、甲状腺未分化癌細胞株を用いた免疫関連膜タンパクの発現誘導の検討、甲状腺未分化癌・in vivo モデルによる免疫チェックポイント阻害治療の有用性の検討を行った。

甲状腺未分化癌臨床例における免疫関連膜タンパク (PD-L1 など) の発現と臨床像を比較検討した。対象は共同研究先病院にて治療を行った甲状腺癌症例。保存されているパラフィン包埋臨床検体を用いスライド切片を作成し、免疫組織染色法により PD-L1 の免疫関連膜タンパクの発現評価をおこなった。臨床情報と免疫関連タンパクの発現を比較し、臨床的悪性度との関連性について評価した。免疫染色は本学の全自動染色機 (ベンタナ) を用い、一次抗体はセルシグナリング社より購入した (#13684)。

甲状腺未分化癌細胞株を用いた免疫関連膜タンパクの発現誘導の検討した。甲状腺未分化癌細胞株: 8305C, 8505C, ASH3, KMH2, OCUT-1C, OCUT-1F, OCUT-2, OCUT-4, OCUT-6 を用いウェスタンブロット法で PD-L1 のタンパクを定量した。(OCUT-1C, OCUT-1F, OCUT-2, OCUT-4, OCUT-6 株は、共同研究者大阪市立大学乳腺内分泌外科学 小野田尚佳先生より譲渡)

セルラインを溶解液で全タンパク抽出し、SDS-Page ののち、Sharp Directblot 電気泳動と転写を行った。iBind (Thermo) を用い、上記の一次抗体と Rabbit IgG の二次抗体にてウェスタンブロットを施行した。

甲状腺未分化癌・in vivo モデルによる免疫チェックポイント阻害治療の有用性の検討。

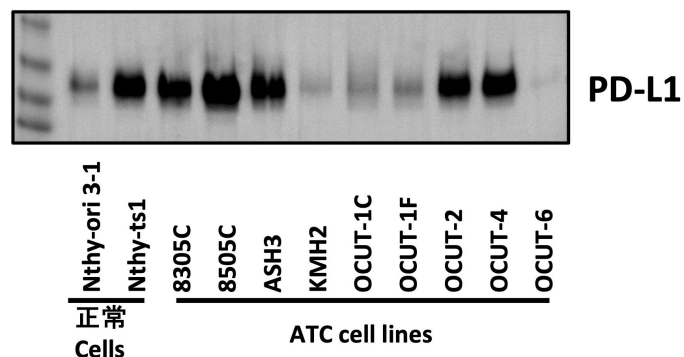
本研究に際し、動物実験倫理委員会にて審議ののち、倫理委員会に則った安楽死基準に達するか、観察期間を終了したマウスより腫瘍片を摘出し解析した。組織片を採取し、組織中の PD-L1 の状況を免疫染色、ウェスタンブロットにより評価を行った。

4. 研究成果

甲状腺未分化癌における PD-L1 の発現状況を、免疫染色法を用い調査した。甲状腺未分化癌では、甲状腺乳頭癌、甲状腺濾胞癌、腺腫様甲状腺腫などの組織型と比較して有意に PD-L1 の発現が亢進している事がわかった。一方、甲状腺乳頭癌、濾胞癌、コントロールの腺腫様甲状腺腫では発現率に変化は認めなかった。

続いて甲状腺未分化癌モデルとなる細胞株での PD-L1 発現状況を調査した。ウェスタンブロット法 (図) と免疫染色でそれぞれ過剰発現を確認する事ができた。免疫染色による定量評価では甲状腺正常セルラインと比較して、8305C、8505C、ASH3、OCUT-2、OCUT-4 のセルラインで PD-L1 の過剰発現を認めた。8505C 甲状腺未分化癌セルラインを用い、免疫不全マウスに移植し、甲状腺未分化癌・腫瘍モデルを作成した。パラフィンブロックからのスライドを作成し、免疫染色にて過剰発現が vivo でも見られることを証明した。

偶然にもマウス移植モデルより採取した組織を、固定までの時間がかかると PD-L1 が強く発



現として検出されることがわかった。このことより、臨床における PD-L1 の検出と標本固定が密接に関連していることが証明された。現在これらの解析結果をまとめている途中である。

(引用文献)

1; Enomoto K, Zhu X, Park S, Zhao L, Zhu YJ, Willingham MC, Qi J, Copland JA, Meltzer P, Cheng SY. Targeting MYC as a Therapeutic Intervention for Anaplastic Thyroid Cancer. J Clin Endocrinol Metab. 2017;102:2268-2280.

2; Hogg SJ, Vervoort SJ, Deswal S, Ott CJ, Li J, Cluse LA, Beavis PA, Darcy PK, Martin BP, Spencer A, Traunbauer AK, Sadovnik I, Bauer K, Valent P, Bradner JE, Zuber J, Shortt J, Johnstone RW. BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1. Cell Rep. 2017;18:2162-2174.

3; Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gütgemann I, Eilers M, Felsher DW. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. Science. 2016;352:227-31.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

； 甲状腺がん と PD-L1、第 12 回和歌山耳鼻咽喉科・頭頸部外科 臨床懇話会

； 甲状腺未分化癌に対するアミノ酸トランスポーターを利用した分子標的治療、第 61 回日本甲状腺学会学術集会

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。