

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24249081

研究課題名(和文)鼻粘膜を介したNK T細胞活性化による頭頸部癌に対するアジュバント療法の開発

研究課題名(英文)Development of adjuvant therapy for head and neck cancer by activation of NKT cells via nasal mucosa

研究代表者

岡本 美孝 (Okamoto, Yoshitaka)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：40169157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌に対する有効なアジュバント療法を開発することを目的に、natural killer T (NKT) 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (GalCer) パルス樹状細胞の鼻粘膜下投与による免疫療法に関して、頭頸部扁平上皮癌に対する有効性の科学的証明、頭頸部癌患者での免疫抑制細胞の動態、本治療法の効果を高めるための細胞傷害性T細胞の活性化等を目的にした複合免疫療法の検討、扁平上皮癌以外の癌種に対する有効性の検討を行った。その結果、一部の臨床試験が先進医療に移行した。また、頭頸部癌患者での免疫抑制細胞の増加、治療、再発との関連も明らかになった。

研究成果の概要(英文)： To develop an effective adjuvant treatment for head and neck cancer, we have conducted the following studies.

1, Scientific evaluation of the efficacy of the nasal submucosal administration of α -galactosylceramide (GalCer) pulsed antigen presenting cells (APCs) to the patients with head and neck squamous cell carcinoma, 2, Clarification of characteristics of the anti-tumor immune suppression observed in the patients with head and neck cancer, 3 Basic studies to improve the anti-tumor immune suppression in the patients with head and neck cancer, 4 Development of GalCer pulsed APCs administration in patients with non-squamous cell carcinoma of head and neck. The adjuvant treatment with the nasal submucosal administration of GalCer pulsed APCs to the patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma following the standard treatments to suppress the recurrence, has been admitted as an Advanced Treatment B recognized by the government and continues to show final results.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：NKT細胞 癌免疫療法 頭頸部癌 扁平上皮癌 悪性黒色腫 細胞障害性T細胞 アジュバント療法 先進医療

1. 研究開始当初の背景

口腔、咽頭、鼻・副鼻腔などに発生する頭頸部がんは世界では年間約 50 万人が発症し、患者数はがん全体の中で 6 位を占めている。国内での発生は全がんの 5% 前後とされているが、特に中咽頭がん、口腔がんの発生の増加が指摘されている。組織学的に多くは扁平上皮がん、治療には放射線、化学療法、手術療法が用いられている。強い副作用にも関わらず、依然として治療成績は満足出来るものではない。患者の生存率、QOL の向上には新規治療の開発が不可欠である。このような頭頸部癌患者では、ツベルクリン反応の低下など免疫抑制が強くみられることは従来から知られている。

進行癌の治療に従来から免疫細胞療法の開発が行われている。自己の免疫細胞を用いる免疫細胞療法は安全性は高いが、その有効性については十分なコンセンサスは得られていない。私達はこれまで、Natural helper T (NKT) 細胞免疫系に注目して頭頸部がんでの開発の検討を行ってきた。invariant NKT (iNKT) 細胞は、同一の細胞表面に T 細胞受容体と NK 受容体を発現し、単一の T 細胞受容体のみが存在し、MHC に関係なく、ただ 1 種類の抗原提示分子 CD1d によって活性化される。高いサイトカイン産生能を有して生体内での免疫調節に重要な働きをしていると考えられている。

2005 年以降、根治切除不能再発頭頸部扁平上皮癌患者を対象に、NKT 細胞のリガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) でパルスした末梢血抗原提示細胞を鼻粘膜下に投与する能動免疫療法の Phase 1 の安全性試験、Phase 2a 試験を実施し、安全性、抗腫瘍免疫作用を確認した。鼻粘膜下に α -GalCer パルス抗原提示細胞を投与すると効率よく頭頸部がんの所属リンパ節である頸部リンパ節に移行して NKT 細胞の活性化を誘導する。ただ、臨床試験では腫瘍縮小を認め

る症例は存在したが、消失 (CR) 症例は見られず、担癌患者の治療としては十分なものではなかった。

2. 研究の目的

免疫抑制が強く認められる頭頸部がん治療における NKT 細胞免疫系を活用した治療の開発を進めることを目的として、

(1) 頭頸部癌患者で認められる免疫抑制の実態の検討

(2) NKT 細胞への免疫抑制細胞の影響

(3) NKT 細胞免疫系を利用した頭頸部がんへのアジュバント療法の開発

(4) microRNA を用いた解析から NKT 細胞免疫系の効果予測因子の検討について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌患者の末梢血中の制御性 T 細胞 (Treg)、骨髄性免疫抑制細胞 (MDSC) をフローサイトメトリーにより測定し、年齢をマッチさせた良性腫瘍患者と比較した。Treg については CD45RA 発現から activated Treg, resting Treg に機能的に分類して検討を行った。また、治療経過と関連して継時的な検討も進めた。MDSC は免疫抑制機能を持つ骨髄由来のヘテロな細胞集団であるが、MDSC のサブセットとして、Monocytic MDSC (M-MDSC) および Granulocytic MDSC (G-MDSC) の存在が知られており、今回 MDSC のサブタイプの同定として、Monocytic MDSC: HLA-DR^{low/nega}CD14⁺、Granulocytic MDSC : HLA-DR⁻Lineage (CD3, 19, 56)⁻CD14⁻CD15⁺を解析した。

(2) 末梢血より分離した NKT 細胞を用いて、Treg、あるいは MDSC との共培養から NKT 細胞の増殖、あるいは IFN- γ 産生に及ぼす影響を検討した。CD15⁺細胞を除いた PBMC と除去しない PBMC を、抗 CD3 抗体/抗 CD28 抗体で刺激し、48 時間後に CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の細胞分裂をフローサイトメトリーにて解

析した。iNKT 細胞の増殖実験においては、CD15⁺細胞を除いたPBMCと除去しないPBMCに、 α GalCerを加え1週間培養しiNKT細胞の比率をフローサイトメトリーにて解析した。これらの免疫抑制細胞に及ぼす抗がん剤の影響についても検討を行った。

(3) ①標準治療後に完全寛解が確認された中・下咽頭扁平上皮癌4期進行症例を対象に、再発を防ぐアジュバント療法として、鼻粘膜下 α -GalCerパルス抗原提示細胞投与が有効かどうかについて、 α -GalCer非処理抗原提示細胞投与を対照として2群間ランダム化二重盲検試験を行った。主要評価項目は安全性、副次評価項目は末梢血リンパ球の免疫学的応答および無再発生存率、粗生存率とした。臨床試験期間は21日間で、約150mLの末梢血から単核球を分離し、7日間および10日間の培養ののちに 1×10^8 個の α GalCerパルス抗原提示細胞を患者の鼻粘膜下に投与した。有害事象はCTCAE ver. 3に基づいて評価した。②鼻腔悪性黒色腫患者で化学療法併用重粒子線治療を受けた症例のうち、局所再発、および遠隔転移を認めない症例を対象に、やはり同様に再発を防ぐアジュバント療法として、鼻粘膜下 α -GalCerパルス抗原提示細胞投与の有効性を検討するためにヒストリカルコントロール試験を実施した。主要評価項目、副次評価項目は頭頸部扁平上皮癌の試験と同様、臨床試験期間は63日間で、鼻粘膜投与を2クールで計4回投与した。

(4) これまで当科で再発頭頸部扁平上皮癌に対して鼻粘膜下 α -GalCerパルス抗原提示細胞投与療法を行った患者でその後手術切除を行った症例で免疫療法後の残存した腫瘍組織、並びに非がん部の組織の検討から免疫療法で発現が上昇したmicro RNAの検討を行った。研究の同意が得られた11例の検体からRNAを抽出した。Partial Response (PR) 群2例とStable Disease (SD) 群4例に群分けした。一方、対照として未治療の口

腔がん5症例の手術検体を用いた。

4. 研究成果

(1) 頭頸部がん患者(46症例)の末梢血では、年齢をマッチさせた良性腫瘍患者(26例)、あるいは甲状腺がん患者に比較して、Tregの数は全体ではCD4⁺CD25^{high}Foxp3 T細胞は差はみられなかったが、CD4⁺CD45RA⁺Foxp3^{high} activated Treg(aTreg)は有意に頭頸部がん患者で高く、病期との相関もみられた。一方、CD4⁺CD45RA⁺Foxp3^{low} resting Treg(rTreg)には差がみられなかった。一方、手術や放射線治療などの標準治療により臨床的に腫瘍が消失した症例では、このような免疫抑制細胞が減少し、健常人と差がないまで改善をみる例が多く、一方で、その後再発した症例では、再発の早期に再度aTreg数の増加がみられていた。

M-MDSC, G-MDSCについては、いずれも頭頸部扁平上皮癌で有意な上昇を認め、進行度との関連が認められた。

(2) TregのNKT細胞への影響について検討を、末梢血ナイーブCD4陽性T細胞からTGF β /IL-2存在下に抗CD3/28抗体刺激により作製したaTregと α -GalCer/IL-2刺激により作製したNKT細胞を用いて、NKT細胞の増殖、IFN- γ 産生への影響を検討したが、aTreg細胞数に依存してNKT細胞の増殖、IFN- γ 産生抑制が認められた。NKT細胞はTregの強い抑制作用を受けることが明らかになった。一方、パクリタキセルは75ng/mlの濃度でTregの増殖を抑制したが、iNKT細胞には影響がなく、かつaTregのNKT細胞抑制作用を改善した。この濃度は、ヒトでのがん治療で使用される濃度の1/100以下であり、臨床において十分検討可能な量であると考えられた。

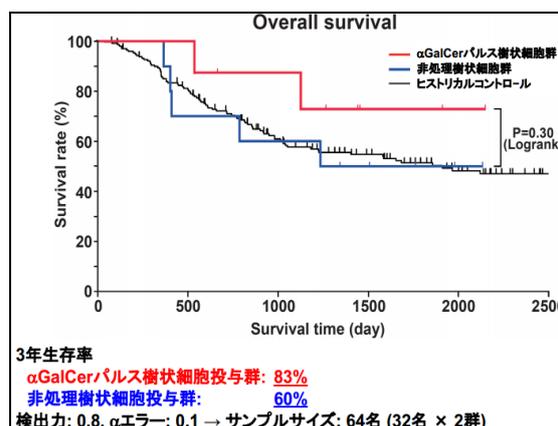
MDSCについては、特にG-MDSCとT細胞との間に有意な逆相関が認められたことから、G-MDSCのT細胞に対する影響について検討を進めた。CD15⁺細胞を除去することでT細胞増殖の回復を認めたことから、G-MDSCによ

る T 細胞の増殖抑制能が確認されたが、iNKT 細胞の増殖に対しては、CD15⁺細胞 (G-MDSC) の有無による抑制的な影響の差は認められず、iNKT 細胞は G-MDSC に対し抵抗性を有することが示唆された。G-MDSC の放出する主要な抑制因子とされる H₂O₂ の添加によるストレスに対し、iNKT 細胞は T 細胞に比べ細胞死の割合が有意に少なく H₂O₂ に対する耐性が高いことも示された。

以上から、CD45RA Foxp3^{high}Treg、G-MDSC は臨床病態を反映し、再発・転移のマーカーとなる可能性が示唆された。特に、Treg を抑制する治療と併用することで NKT 細胞免疫療法の有効性を増強させ得ると考えた。

(3) ①患者登録を進めていたところ 18 症例に治療が終了した段階で、本治療法が先進医療として認可されたため、現在も先進医療 B として継続している。そこで、先進医療認可までに実施されていた 18 例についてはキーオープンを行い解析した。

α-GarCer パルス抗原提示細胞投与群は 8 例、非処理細胞投与群は 10 例であった。2 群間に原発部位、性、年齢、前治療について差は認められなかった。3 年 overall survival は、α-GarCer パルス抗原提示細胞投与群で 83%、非処理細胞投与群で 60%で、α-GarCer パルス抗原提示細胞投与群で高い傾向がみられた。この結果から検出力 0.8、αエラー 0.1 としてサンプルサイズは 1 群 32 名必要ことが想定され、現在進めている先進医療での目標症例数とした。全身的な免疫反応への影響については、治療前後の末梢血単核球を α-GarCer で刺激し IFN-γ 再生細胞数を検討したところ増加率は有意に α-GarCer パルス抗原提示細胞投与群で高値を呈した。特に 7 割の症例で 6 倍以上の細胞数の増加が認められた。



この検討から、進行中・下咽頭癌の予後改善に関して症例数が少ないことから断定できる結果ではなかったが、忍容性と免疫誘導性については明らかにすることが可能と考えられた。有効性については、先進医療 B として多数例での検討を進めている。

②18 人の患者が登録され臨床試験を完遂した。3 年粗生存率、3 年無局所再発生存率、3 年無遠隔転移生存率はそれぞれ

87.5%, 65.6%, 76.4%であった。Grade 3 以上の副作用は認められなかった。これまでの免疫療法を併用しなかった鼻悪性黒色腫との単純な比較は出来ないが高い制御率で、特に遠隔転移の制御に期待できると考えられた。

(4) 対照症例の腫瘍部と比較して免疫細胞療法後の腫瘍検体で発現が上昇、あるいは対照症例において正常部と比較して腫瘍部で発現が上昇している 5 つの microRNA が確認され、特に miR-146b と miR-454 においては免疫細胞療法後の腫瘍部での発現と対照症例の腫瘍部の発現との間に有意差を認め、免疫細胞療法により誘導される癌遺伝子型 miRNA である可能性が示唆された。さらに、いずれの miRNA も PR 群に比べ SD 群では発現の平均値が高い傾向がみられた。これらの miRNA 発現により癌細胞が免疫細胞療法の抵抗性を獲得する可能性が示唆される結果であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

①Horinaka A, Sakurai D, Ihara F, Makita Y, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T,

Okamoto Y. Invariant NKT cells are resistant to circulating CD15+ myeloid-derived suppressor cells in patients with head and neck cancer. *Cancer Sci.* 査読有, 2016, 107(3):207-16. doi: 10.1111/cas.12866.

② Fujii S, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front Immunol.* 査読有, 2013, 2:4:409. doi:10.3389/fimmu.2013.00409.

[学会発表] (計 29 件)

① Ihara F, Sakurai D, Kunii N, Motohashi S, Okamoto Y. The functional subsets of regulatory T cells correlate with clinical outcome. 第45回日本免疫学会(沖縄コンベンションセンター・沖縄県宜野湾市)2016. 6. 4

② Kunii N, Makita Y, Ihara F, Sakurai D, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y. A randomized double-blind phase II trial evaluating adjuvant therapy for advanced oro- and hypo-pharyngeal cancer using the injection of alpha-GalCer-loaded DCs into the nasal submucosa. 第20回日本がん免疫学会総会(大阪国際交流センター・大阪府大阪市)2016. 7. 27-29

③ Ihara F, Sakurai D, Motohashi S, Kunii N, Okamoto Y. The functional subsets of regulatory T cells correlate with clinical outcome. 第75回日本癌学会学術総会(パシフィコ横浜・神奈川県横浜市)2016. 10. 6-8

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/dept/jibika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 美孝 (OKAMOTO, Yoshitaka)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 40169157

(2) 研究分担者

- ① 櫻井 大樹 (SAKURAI, Daiju)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 10375636
- ② 本橋 新一郎 (MOTOHASHI, Shinichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 60345022

③ 関 直彦 (SEKI, Naohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号: 50345013
(平成24年度～平成27年度まで)

④ 福本 一郎 (FUKUMOTO, Ichiro)

千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 70748764
(平成28年度より)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし