

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463042

研究課題名(和文) CCR4分子標的治療薬の頭頸部癌での抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Antitumor effect of anti-CCR4 antibody in head and neck cancer

## 研究代表者

銅前 昇平 (DOMAE, Shohei)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：70397892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CCR4を発現した制御性T細胞(Treg)をヒトモノクローナル抗体で除去し、抗腫瘍免疫の抑制を解除することを目的としたがん免疫療法の開発が行われている。頭頸部癌腫瘍組織において腫瘍浸潤リンパ球(TIL)にCCR4発現を認め、間質細胞におけるCCL22発現と相関を認めた。腫瘍組織そのものの発現は稀であった。CCR4陽性腫瘍細胞において抗CCR4抗体による抗腫瘍効果の明らかな増強は認められなかったが、頭頸部癌に対する一定の抗腫瘍効果は確認できた。

研究成果の概要(英文)：CCR4 expressing FoxP3+CD4 regulatory T cells (Treg) depletion using humanized anti-CCR4 monoclonal antibodies may enhance the host immune response against tumors. The current ongoing clinical trial investigates the use of humanized anti-human-CCR4 monoclonal antibody in the treatment of solid tumors. CCR4 expressing stroma infiltrating lymphocytes were detected in 32 of 42 (76.2%) head and neck cancer samples and were correlate with CCL22/MDC. CCR4 expressing tumor cells were detected in only 7 of 42 (16.7%) same samples. There was no markedly enhancement of antitumor effect by anti-CCR4 antibody in CCR4 expressing tumor cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：CCR4分子 制御制T細胞 腫瘍浸潤リンパ球 頭頸部癌

### 1. 研究開始当初の背景

ケモカイン受容体CCR4 は、正常のCD4陽性T細胞のTh2、Th17、Tregに発現することが知られているが、ヒト腫瘍においては成人T細胞白血病(ATL)の約90%の患者で、そのATL細胞にCCR4が高発現している。CCR4 はATL治療における有望な標的として注目され、CCR4 タンパクを標的としたヒト化モノクローナル抗体の臨床開発が進められた(再発または難治性のCCR4 陽性ATLリンパ腫を適応症として2012年3月に国内承認)。抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性により抗腫瘍効果を発揮する。ATL細胞はCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Tregと同様の表面マーカーと転写因子をもち、免疫抑制能も有することが明らかとなり、ATL細胞は主にCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg に由来する可能性が示唆されている。一方、固形悪性腫瘍局所では、Treg 細胞が腫瘍細胞の周辺に集まり、免疫応答を抑制することで、自己免疫による抗腫瘍活性を抑えていると考えられている。ATL 細胞だけでなく、固形悪性腫瘍のTreg細胞に発現しているCCR4が治療標的となることで、その抑制を解除、本来の抗腫瘍活性を賦活化できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

ATL 治療薬である抗 CCR4 抗体は、固形悪性腫瘍においては Treg を除去する免疫賦活薬としての可能性を有している。抗腫瘍免疫応答の抑制を解除するだけではなく、腫瘍自体に CCR4 を発現した頭頸部癌を含む固形悪性腫瘍に対しては、直接的な細胞傷害活性も期待できる。頭頸部癌(CCR4 陽性、CCR4 陰性)の臨床検体、および動物モデルを用いて免疫学的解析を行い、臨床応用に向けての知見を得る。

### 3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞株、頭頸部癌組織における CCR4 発現と、頭頸部癌患者 PBMC、頭頸部癌局所に浸潤した aTreg における CCR4 発

現

頭頸部癌細胞株、頭頸部癌患者臨床検体から、免疫組織化学染色、フローサイトメーターにて腫瘍局所の CCR4 発現を確認する。同時に(TIL)を採取、CD4/CD25/CD45RA/CCR4 分子を特異的蛍光標識抗体により染色、展開し、aTreg (CD4<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD25<sup>hi</sup>) 分画における CCR4 発現をフローサイトメーターにより確認する。頭頸部癌局所の aTreg の存在を明らかにする。

#### (2) 抗 CCR4 抗体による抗腫瘍効果

in vivo で抗 CCR4 抗体による頭頸部癌細胞に対する抗腫瘍作用を明らかにする。フローサイトメーター(FCM)により CCR4 陽性頭頸部癌細胞株、CCR4 陰性頭頸部癌細胞株を SCID マウスにそれぞれ  $1 \times 10^6$  個を皮内接種し、腫瘍細胞を生着させる。腫瘍塊が形成された後に、健常人由来 PBMC および抗 CCR4 抗体を投与し、腫瘍径を比較、抗腫瘍効果を観察する。in vitro においても抗 CCR4 抗体による頭頸部癌細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにする。上記 CCR4 陽性および陰性の腫瘍細胞株をそれぞれカルセインで蛍光標識し、96 ウェルプレートで培養する。健常人 PBMC および抗 CCR4 抗体を培養液中に添加し、ウェル内の蛍光強度の低下を測定する。以上により、抗 CCR4 抗体の直接的な抗腫瘍作用を in vivo、in vitro で明らかにする。

#### (3) CCR4 発現と腫瘍浸潤リンパ球浸潤度についての臨床病理学的解析

CCR4 発現強度、発現の有無、患者の病歴、病理組織学的特徴などと併せて検討し、統計学的解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 頭頸部癌細胞株での CCR4 発現

頭頸部癌細胞株 17 株(HSQ-89、Sa3、CJM、Ca9-22、HO-1-u-1、HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS、HSC-3-M3、KON、KOSC-2 cl3-43、OSC-19、OSC-20、SAT、SCC-4、SKN-3)に

ついて、免疫組織化学染色 (IHC) FCM にて CCR4 の発現確認をおこなった。IHC では 2 種類の細胞株 (SAT、HSC-3-M3) の細胞膜あるいは細胞質に不均一に陽性反応を示し、FCM では 3 種類の細胞株 (SAT、SAS、HSC-4) で陽性細胞の割合が 7~15% と比較的高かった。SAS についてはセルソーターにて CCR4 陽性細胞のみを分離し培養、また複数の頭頸部癌細胞株に対しては TNF- $\alpha$  を添加し培養を行って CCR4 陽性細胞の頻度を確認してみたが、いずれも発現頻度の明らかな上昇は認められなかった。チャンバースライドで培養した細胞を固定して直接頭頸部癌細胞株の染色を行い SAT、HSC-3-M3 を陽性、KOSC-2、SKN を陰性と判定した。

#### (2) 頭頸部癌患者での CCR4 発現

3 名の健常人の PBMC および 6 名の頭頸部癌患者の PBMC と TIL 中の CD4 陽性細胞を CD4/CD25/CD45RA/CCR4 分子を特異的蛍光標識抗体により染色展開し、活性化 Treg (CD4<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> CD25<sup>hi</sup>) 分画における CCR4 発現を FCM により確認した。PBMC ではナイーブ Treg がみられるが、TIL では活性化 Treg の割合が高くナイーブ Treg の割合が少ない傾向が認められた。さらに TIL において活性化 Treg では CCR4 が高発現しているが、他の CD4 陽性細胞では発現が低いあるいは認められなかった。また健常人 PBMC と頭頸部癌患者 PBMC での Treg の割合を比較したところ頭頸部癌患者 PBMC で Treg の割合が高い傾向が認められた。

#### (3) 抗 CCR4 抗体による抗腫瘍効果

6-8 週齢 C.B-17 SCID mice 背部皮下に、頭頸部癌細胞株 SAT (CCR4 発現陰性) KOSC-2 (CCR4 発現陽性) 株を接種し皮下腫瘍を形成後、腫瘍直径が 8mm の時点を Day0 とし、PBMC と抗 CCR4 抗体をそれぞれ計 5 回 4 日おきに腹腔内投与した。(a) control (saline)、(b) human PBMC、(c) 抗 CCR4 抗体、(d) 抗 CCR4 抗体 + human PBMC の群に分け投与、腫瘍の

発生後、隔日で、腫瘍径の測定を行った。抗 CCR4 抗体 + human PBMC の群において腫瘍増殖を抑制する傾向がみられたが、CCR4 発現の有無による違いは明らかではなかった。in vitro においても抗 CCR4 抗体による頭頸部癌細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにするため、上記 CCR4 陽性および陰性の腫瘍細胞株をそれぞれカルセインで蛍光標識し、96 ウェルプレートで培養した。健常人 PBMC および抗 CCR4 抗体を培養液中に添加し、ウェル内の蛍光強度の低下の測定を行ったが、両者間に差は認めなかった。さらに、抗 CCR4 抗体単独、活性化 NK 細胞単独、活性化 NK 細胞と抗 CCR4 抗体とともに 4 時間培養して上清の蛍光強度を測定した。抗 CCR4 抗体単独では明らかな細胞増殖抑制を認めなかった。一方、活性化 NK 細胞単独において、E/T 比依存性に細胞障害活性を認め、さらに抗 CCR4 抗体を併用することで抗腫瘍効果の増強がみられた。

#### (4) CCR4 発現と腫瘍浸潤リンパ球浸潤度についての臨床病理学的解析

CCR4 発現を再評価する目的にて、頭頸部癌手術検体 (Cohort A) を用いて、CCR4 および CCR4 リガンド (CCL17/TRAC、CCL22/MDC) 発現を免疫組織化学染色で検討した。Intensity と Distribution による免疫染色スコアリングによる詳細な解析をおこなったところ、頭頸部癌組織での発現は 7/42 例 (16.7%) で、腫瘍細胞における CCR4 の発現頻度は低かった。一方、頭頸部癌組織の TIL での発現はほぼ全例に認め、CCR4<sup>hi</sup> に分類される割合は 32/42 (76.2%) であった。CCR4<sup>hi</sup> 群において間質細胞における CCL22 と正の相関を認めた。次に頭頸部癌手術検体 (Cohort B) を、非 NAC 群 13 例 (外科療法単独群) と NAC 群 25 例 (術前化学療法群) の 2 群に分類し、CCR4、PD-L1 の発現、腫瘍局所へのリンパ球浸潤度 (CD4、CD8、CD16、FoxP3 陽性細胞数) などについて、IHC にて比較検討した。

TIL における CCR4 発現は非 NAC 群および NAC 群において有意差を認めなかったが、PD-L1 低/高発現群における CCR4 発現は PD-L1 高発現群において有意に上昇していた。PD-L1 低/高発現群、CCR4 低/高発現群における 5 年無病生存率でいずれも有意な差は認めなかった。

#### 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 2 件)

1, Hiroaki Takakura, Shohei Domae, Toshiro Ono, Akira Sasaki. The Immunological Impact of Chemotherapy on the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. Acta Medica Okayama, 2017, Vol. 71, No. 3, 印刷中、査読有  
2, Shohei Domae, Toshiro Ono, Akira Sasaki. Cancer/testis antigens: a prospective reagent as diagnostic and immunotherapeutic targets for squamous cell carcinoma of the head and neck. Japanese Dental Science Review, 50(4): 91-99, 2014 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

1, Shohei Domae, Hiroaki Takakura, Yuki Kunisada, Toshiro Ono, Akira Sasaki, Izumi Asahina. The Immunological Impact of Chemotherapy on the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma. 23rd International conference on oral & maxillofacial surgery. 香港(中国) 2017 年 3 月 31 日~4 月 3 日

2, 銅前昇平、高倉裕明、國定勇希、吉田祥子、朝比奈 泉、佐々木 朗、口腔癌における免疫チェックポイント分子発現の意義と

Chemoimmunotherapy の可能性、第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会、幕張メッセ(千葉県・千葉市) 2016 年 11 月 25 日~27 日

3, 高倉裕明、銅前昇平、吉田祥子、國定勇希、小野喜章、岸本晃治、佐々木 朗、口腔扁平上皮癌における術前化学療法に伴う腫瘍浸潤リンパ球の変化、第 40 回日本頭頸部癌学

会、ソニックシティ(埼玉県・おおみや市) 2016 年 6 月 9 日~10 日

4, 國定勇希、榮川伸吾、銅前昇平、上原健敬、渡邊元嗣、山崎千尋、一柳朋子、佐々木 朗、鵜殿平一郎、メトホルミンは腫瘍局所における制御制 T 細胞の細胞死と制御能とを調整する、第 74 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015 年 10 月 8 日~10 日

5, 高倉裕明、銅前昇平、吉田祥子、國定勇希、松本憲一、岸本晃治、佐々木 朗、口腔扁平上皮癌に対する術前化学療法のがん微小環境に及ぼす免疫学的変化、第 33 回口腔腫瘍学会総会・学術大会 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市) 2015 年 1 月 29~30 日

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

銅前 昇平(DOMAE, Shohei)  
長崎大学・病院(歯学系)・講師  
研究者番号: 70397892

##### (2)研究分担者

小野 俊朗(ONO, Toshiro)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・教授  
研究者番号: 50185641  
花房 直志(HANAFUSA, Tadashi)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・准教授  
研究者番号: 00228511

榮川 伸吾(EIKAWA, Shingo)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 40635265

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

國定勇希(KUNISADA, Yuki)  
高倉裕明(TAKAKURA, Hiroaki)