

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10799

研究課題名(和文) 頭頸部癌患者の免疫抑制を解除しNKT細胞免疫系を賦活する新たな複合免疫治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy for head and neck cancer patients;
combination of reversal of immune suppression and activation of NKT cells

研究代表者

櫻井 大樹(Daiju, Sakurai)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10375636

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)：本研究において、免疫抑制細胞と臨床経過の関連の解明、免疫抑制機序の解明、および免疫抑制細胞の阻害薬の検討を行った。頭頸部癌患者において骨髄系免疫抑制細胞と活性化型制御性T細胞の治療前の増加例は予後不良であった。これら免疫抑制細胞は予後予測、効果判定や再発判定マーカーとなる可能性が示唆された。またリンパ節の解析から、鼻腔の所属リンパ節である上頸部リンパ節には制御性T細胞が少なく、鼻腔は抗腫瘍免疫応答の誘導に適した部位と考えられた。また制御性T細胞によるNKT細胞への抑制は、ある抗腫瘍薬によって解除され、免疫治療の効果を増強する可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the association between immunosuppressive cells and clinical course, the suppressive mechanism in the antitumor immunity, the drug that interferes with immunosuppressive cells. The head and neck cancer patients who had higher frequency of myeloid-derived suppressor cells and effector regulatory T cells (Treg) in the peripheral blood showed poor prognosis. The frequency of these cells showed significant association with clinical course and were suggested to be useful markers for prognosis prediction, therapeutic efficacy or tumor recurrence. Because upper jugular lymph node which was regional lymph node of nasal mucosa included lower frequency of Treg, suggesting that nasal mucosa was the suitable site for the induction of antitumor immunity. The suppressive activity of eTreg on NKT cells was reversed by the addition of an antitumor medicine, suggesting that the control of immunosuppressive cells enhances the efficacy of cancer immunotherapy.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 癌免疫 免疫抑制 制御性T細胞 免疫抑制細胞 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

頭頸部進行癌に対し、放射線化学療法、拡大手術による治療が行われているが、再発・転移をきたすことも多く、治療成績はいまだ満足いくものではない。

近年、癌が誘導する免疫抑制作用の存在が明らかとなり、治療効果の減弱や、免疫治療の効果が抑制される要因として注目されている。癌細胞は体内で免疫抑制細胞である骨髄性抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells; MDSC) や制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Treg) を誘導・増殖させ、リンパ球機能に影響を与え、癌細胞に対する抗腫瘍免疫を抑制することが明らかとなり注目されている。

MDSC は T 細胞にアポトーシスを誘導するとともに癌細胞表面の抗原認識を阻止し、その結果、癌細胞は T 細胞からの攻撃を逃れ排除を免れると考えられている。近年、いくつかの癌種において MDSC や Treg が末梢血中に増加する症例は予後が不良であることが報告され、臨床的な重要性が強く示唆されている。

免疫抑制細胞による抗腫瘍免疫の抑制は、癌が免疫による排除から逃れるための重要な手段の一つと考えられ、免疫抑制細胞の制御により癌治療の成績を向上させる可能性が期待される。しかし、頭頸部扁平上皮癌患者において上記免疫抑制細胞の意義の解明は進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究は、免疫抑制細胞と臨床経過との関連、抗腫瘍免疫抑制機序の解明、免疫抑制細胞の増殖や機能を阻害する薬剤の探索、さらに頭頸部癌患者における抗腫瘍免疫を賦活させ標準治療や免疫療法の効果を高める新たな治療法の開発を目的とした。また頸部リンパ節における免疫細胞、免疫抑制細胞の領域の違いにおける意義を検討した。

さらに当教室で先進医療として進められている NKT 免疫細胞療法と組み合わせる方法を研究し、再発腫瘍にも対応できる強力な次世代の複合免疫療法への発展を目指すための基礎検討を行った。

3. 研究の方法

標準治療を行った頭頸部扁平上皮癌患者において、治療前の末梢血中の顆粒球型骨髄系免疫抑制細胞およびエフェクター型制御性 T 細胞を測定した。エフェクター型制御性 T について、CD45RA-Foxp3^{high} の細胞を、MDSC については、顆粒旧型 G-MDSC として Lin⁻, HLA-DR^{low}/-, CD33⁺, CD11b⁺ CD15⁺細胞、および単球型 M-MDSC として Lin⁻, HLA-DR^{low}/-, CD33⁺, CD11b⁺ CD14⁺細胞

の比率をフローサイトメトリーにて解析し、臨床情報を収集し、臨床経過、予後との関連について検討を行った。

エフェクター型制御性 T 細胞および NKT 細胞を用いて、エフェクター型制御性 T 細胞による NKT 細胞への抑制作用の検討を行った。具体的には IL-2 および TGF- β により健常者の末梢血より制御性 T 細胞、特にエフェクター型制御性 T 細胞を、また IL-2 および GalCer により NKT 細胞を誘導した。これらの細胞を共培養し、GalCer の添加による再刺激を加え、NKT 細胞の増殖をフローサイトメトリーにて、IFN- γ の産生を ELISA 法にて測定した。

MDSC については、頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血よりフローサイトメトリーにて MDSC (Lin⁻, HLA-DR^{low}/-, CD33⁺, CD11b⁺, CD14⁺ もしくは CD15⁺) のリンパ球中の比率の増加症例を選択する。MDSC のリンパ球への影響を検討するため、磁気ビーズにより MDSC を除去したものと、除去しないそのままの末梢血リンパ球を準備し、T 細胞、NKT 細胞と培養し増殖能、サイトカイン産生能を比較検討した。

制御性 T 細胞の阻害薬の検討には、頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血単核球分画を蛍光色素 CFSE でラベルし、制御性 T 細胞の阻害薬を加え一定時間培養した。また、同じ条件の培養で阻害薬を加えないものをコントロールとした。次に細胞を洗浄し新しい培養液に交換したのち、両者に GalCer-抗原提示細胞を加え 7 日間培養した。NKT 細胞、T 細胞、NK 細胞について、抗体染色と CFSE の発現から細胞分裂をフローサイトメトリーにて測定し、IFN- γ の産生を ELISA にて測定し、細胞活性化の違いを評価した。

頸部リンパ節の領域別の機能を解析する目的で、手術治療を受けた頭頸部癌患者における頸部リンパ節中の T 細胞、NKT 細胞、骨髄系免疫抑制細胞、制御性 T 細胞等について解析を行った。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血において、活性化型の制御性 T 細胞が、良性腫瘍患者と比較し著明に増加し、治療効果や病状経過をよく反映することが確認された。

顆粒球型骨髄系免疫抑制細胞の末梢血リンパ球中において 1% 以上の上昇例は非上昇例に比べ予後は不良であった。CD45RA-Foxp3^{high} のエフェクター型制御性 T 細胞の比率においても 1% 以上の上昇例と、1% 以下の非上昇例とに分けて予後と比較すると、上昇例は非上昇例に比べ、解析した全症例においても進行癌 IV 期症例のみにおいても、予後が不良であることが明らかとな

った。

エフェクター型制御性T細胞の血液中の比率は治療経過とも良く関連し、標準治療後の寛解例において有意に減少し再発時に早期に再上昇を認めた。このことからエフェクター型制御性T細胞の比率は予後予測因子となり、その挙動は治療効果の判定や再発予測を判定するマーカーとなる可能性が示唆された。

T細胞の活性化は顆粒球型MDS Cおよびエフェクター型制御性T細胞によってその活性が抑制されたが、NKT細胞はエフェクター型制御性T細胞にのみ抑制された。エフェクター型制御性T細胞はT細胞やNKT細胞の活性化による分裂、サイトカイン産生を強く抑制することが示された。エフェクター型制御性T細胞によるNKT細胞の抑制はある種の抗腫瘍薬の添加によって回復し、NKT細胞のリガンド刺激による増殖・IFN産生能は増強した。免疫抑制細胞の阻害薬は、免疫治療の効果を増強する可能性が期待された。

また、顎下部リンパ節は口腔粘膜の所属リンパ節であると考えられるが、顎下部リンパ節は上顎部リンパ節よりエフェクター型制御性T細胞が多く、口腔内の免疫寛容環境との関連が示唆された。これまでの我々の検討から鼻腔投与された樹状細胞は上顎部リンパ節へ移動し免疫応答を誘導すると考えられており、上顎部リンパ節にはエフェクター型制御性T細胞が少ないことから、鼻腔投与は頭頸部癌をターゲットとした免疫応答の誘導には適した投与ルートであることが示唆された。また顎下部リンパ節の樹状細胞には高親和性IgEレセプターの発現頻度が高く、口腔内の抗原に対する免疫寛容への関連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

櫻井大樹 頭頸部癌に対するNKT免疫細胞治療と今後の展開 耳鼻咽喉科免疫アレルギー 2017. 35(4): 291-295. (査読あり)

Ihara F, Sakurai D, Horinaka A, Makita Y, Fujikawa A, Sakurai T, Yamasaki K, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y. CD45RA-Foxp3high regulatory T cells have a negative impact on the clinical outcome of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2017; 66(10): 1275-1285. (査読あり) Nakagawa T, Matsusaka K, Misawa K, Ota S, Takane K, Fukuyo M, Rahmutulla B, Shinohara KI, Kunii N, Sakurai D, Hanazawa T, Matsubara H, Nakatani Y, Okamoto Y, Kaneda A. Frequent promoter

hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer. *Cancer Lett.* 2017 18;407:21-31. (査読あり)

Horinaka 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.* 2016; 107(3): 207-16. (査読あり)

〔学会発表〕(計 5件)

Daiju Sakurai, Fumie Ihara, Syuji Yonekura, Tomohisa Inuma, Yoshitaka Okamoto Identification of specifically reduced memory Th2 cell subsets in HDM-induced allergic rhinitis patients after sublingual immunotherapy 2018 AAAAI/WAO (The American Academy of Allergy, Asthma & Immunology /World Allergy Organization) Joint Congress, Featured Poster session. Orange county convention center, Orland, Florida, USA 2018.3.4

櫻井大樹、山崎一樹、茶園英明、花澤豊行、岡本美孝、当科で経験した耳下腺原発 Mammary analogue secretory carcinoma (MASC)症例の検討、第28回日本頭頸部外科学会、2018.1.25、栃木県宇都宮市

Daiju Sakurai NKT cell-mediated immunotherapy and immune suppression in head and neck cancer patients. Japan week program, workshop, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA 2017.5.3

櫻井大樹 頭頸部癌に対するNKT免疫細胞治療と今後の展開 シンポジウム：頭頸部癌免疫療法のブレークスルー、現状と未来 第35回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 北海道旭川市 旭川グランドホテル 2017.4.14

櫻井大樹、山崎一樹、米倉修二、茶園英明、花澤豊行、岡本美孝 当科における頸部傍神経節腫症例の臨床的検討 第27回頭頸部外科学会 (2017.2.3, 東京都新宿区 京王プラザホテル)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕特になし。

出願状況(計 0件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕特になし。

6．研究組織

(1) 研究代表者

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