

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15742

研究課題名（和文）口腔癌における B 細胞の局在と機能

研究課題名（英文）Localization and function of B cells in oral cancer

研究代表者

浜川 裕之（Hamakawa, Hiroyuki）

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20127905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：最近、第4の癌治療法として免疫療法が注目されており、T細胞の免疫チェックポイント阻害剤やNK細胞のADCC活性を期待した抗体薬が用いられている。そこで、本研究では口腔癌におけるB細胞の意義について検討した。免疫組織化学染色にて口腔癌組織におけるB細胞数と生存率の関連性を評価したところ、B細胞が癌間質に多く浸潤しているほど予後は良好であった。さらに、癌部においては隣接正常部と比較してB細胞誘引性サイトカインであるCXCL13が高発現していた。

研究成果の概要（英文）：Recently, immunotherapy has attracted attention as a novel treatment with cancer, and immunosuppressive inhibitors against T cells and antibodies inducing ADCC activity of NK cells are used in clinical setting. In this study, the significance of B cells in oral cancer was examined. Assessment of the relationship between the number of B cells in oral cancer tissues by immunohistochemical staining and the survival rate revealed that the prognosis was better as B cells more invaded the cancer stroma. Furthermore, CXCL13, a B cell attracting cytokine, was highly expressed in the cancerous tissues as compared with the adjacent normal tissues.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 B細胞 CXCL13

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対するわれわれの知見や治療技術は大きく進歩を遂げているにもかかわらず治療成績はこの30年間ほとんど向上しておらず、5年生存率は早期癌で88%、進行癌においては40%程度にとどまっているのが現状である(Head and Neck Surg 16:117-126, 2008)。よって、手術療法、放射線療法、化学療法に加えて、新たな治療法の開発が急務である。近年、第4の癌治療法として免疫療法が注目を浴びている。癌免疫療法としては1970年代に非特異的に免疫を活性化するレンサ球菌由来免疫賦活剤 OK-432(中外製薬)が開発され、その後サイトカイン注入療法やナチュラルキラー(NK)細胞や細胞障害性Tリンパ球(CTL)などを用いた細胞治療が行われてきた。1990年代に入りCTLA4やPD-1/PD-L1を介した宿主の癌免疫抑制機構の解明が進み、2011年には抗CTLA4抗体であるIpilimumabにより切除不能悪性黒色腫の生存期間の中央値が6.4か月から10.1か月に延長したことが報告され(N Engl J Med 363:711-23, 2010)、IpilimumabはFDAの承認を受けた。さらに、2014年には本邦発の抗PD-1抗体(Nivolumab)が世界に先駆けて日本で承認され、癌免疫療法の有用性が広く認知されるようになった。癌免疫を担う最たるものは細胞性免疫であり、その主役はT細胞であることはすでに知られている。現在の癌免疫研究においても、T細胞ネットワークを中心に研究が進められている。しかし、2013年に大腸癌において予後良好群と不良群に分けて癌免疫にかかわる因子のマイクロアレイ解析が行われたところ、今までは液性免疫(炎症や自己免疫疾患などに関与)を担うと考えられていたB細胞ネットワークに関与する分子(CD20, CXCL13, CXCR5など)が予後良好群に高発現しているということが報告され(Immunity 39:782-95, 2013)、B細胞ネットワークが癌免疫に少なからず関与している可能性が示された。しかしながら、口腔癌における癌免疫療法の有用性に関する報告は少なく、B細胞の局在や機能に関する報告に至っては皆無である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、口腔扁平上皮癌の発癌および進行におけるB細胞の役割を明らかにすることを目的とした。すなわち、口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織におけるB細胞の局在と再発・転移および生命予後との相関性を明らかにする。さらに、口腔癌扁平上皮癌患者の腫瘍組織および血清において特異的に発現誘導されるB細胞ネットワークに関与する分子を同定する。

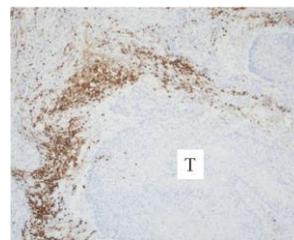
### 3. 研究の方法

最初に、標準治療を完遂できた口腔扁平上皮癌症例の原発腫瘍組織を用いて免疫組織化学染色を行った。染色対象はB細胞の表面

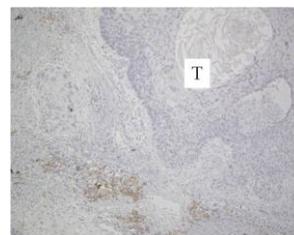
抗原であるCD20とした。すなわち、2006～2010年に愛媛大学医学部附属病院歯科口腔外科にて根治手術を行った口腔扁平上皮癌50症例を対象とし、anti-CD20 monoclonal antibody (DAKO®)を用いて免疫組織化学染色を行った。つづいて、BIOREVO®にて染色陽性細胞数を計測し、それぞれ中央値を基準に高および低浸潤群に分類したのちに、無病生存率(DFS)および全生存率(OS)との相関を Kaplan-Meier法にて評価した。次に、口腔扁平上皮癌の手術検体より癌部(10症例)および隣接正常部(3症例)組織の一部を採取し、total RNAを抽出した。つづいて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、正常部と比較して癌部で有意かつ20倍以上の発現変動を示すB細胞ネットワークに関与する遺伝子群を探索した。さらに、2005年～2012年に愛媛大学医学部附属病院歯科口腔外科にて治療を行った口腔扁平上皮癌158症例を対象とし、治療前後で血清を採取し、ELISA法を用いてB細胞ネットワークに関与する分子の血清濃度を定量した。コントロールとして健常人30名の血清を用いた。さらに、測定結果よりStage分類とTN分類別の感度および特異度を算出し、既存の腫瘍マーカーであるSquamous Cell Carcinoma Antigen(SCC)と比較した。

### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌組織の癌間質には、CD20陽性細胞の浸潤が認められたが、その数は症例間で相違が認められた。CD20陽性細胞数の中央値を境として高浸潤症例群(high)と低浸潤症例群(low)の2群に分割した。



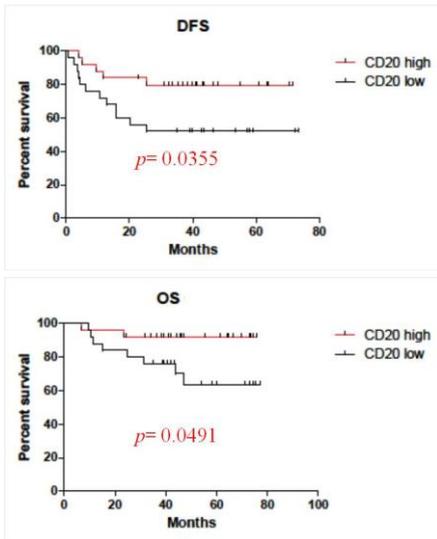
CD20 陽性細胞高浸潤症例(CD20 high)



CD20 陽性細胞低浸潤症例(CD20 low)

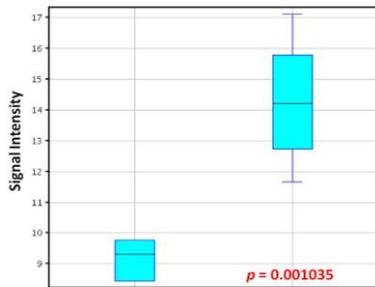
T:腫瘍部

つづいて、各群のDFSおよびOSを評価したところ、いずれにおいてもCD20陽性細胞高浸潤症例群の方が有意に良好であった。



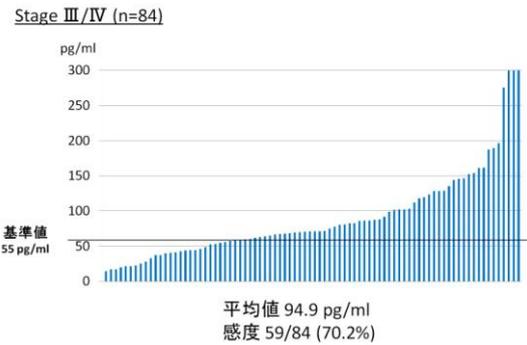
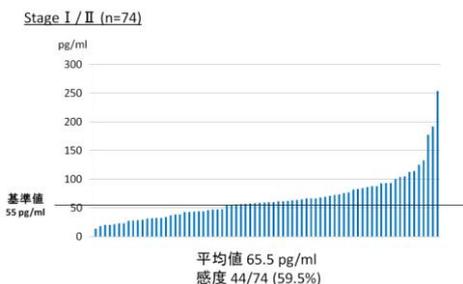
以上の結果より、口腔扁平上皮癌において CD20 陽性 B 細胞浸潤が予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。

次に、口腔扁平上皮癌組織において著明かつ有意に発現変動する B 細胞ネットワークに関与する遺伝子群を探索したところ、正常部と比較して 34 倍の発現亢進を示す B 細胞誘導サイトカインの一つである CXCL13 を同定した。

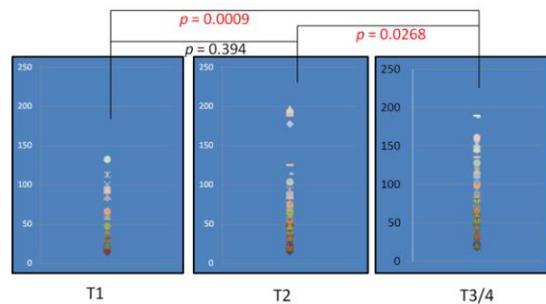


口腔扁平上皮癌における CXCL13 mRNA の発現

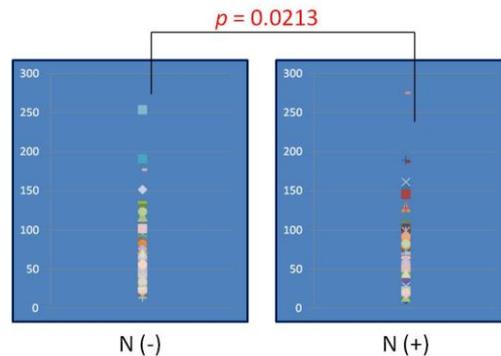
つづいて、口腔扁平上皮癌を早期症例 (74 例) および進行症例 (84 例) に分類し、血清 CXCL13 値を定量したところ、その濃度平均値はそれぞれ 65.5 pg/ml、94.9 pg/ml、コントロール群では 34.1 pg/ml であり各群には有意差が認められた。これら 3 群における感度と特異度が最大となる基準値を 55 pg/ml と設定したところ、感度は早期症例で 59.5%、進行症例で 70.2%であった。また、コントロール群における特異度は 96.7%であった。



T 分類別では、T3/4 症例の血清 CXCL13 は、T1 あるいは T2 症例と比較して有意に高値を示したが、T1 と T2 症例間では有意差は認められなかった。



また、N 分類別では N (+) 症例において血清 CXCL13 値は有意に高かった。



最後に、CXCL13 を既存の腫瘍マーカーである SCC と比較したところ、感度および特異度と共に優れていた。

CXCL13 と SCC の診断精度の比較

	CXCL13 (106 例)		SCC (106 例)	
	平均値	感度	平均値	感度
Stage I / II (n=51)	73.3	54.9%	1.38	23.5%
Stage III/IV (n=55)	95.5	70.9%	3.61	60.5%

以上の結果より、口腔扁平上皮癌において B 細胞誘導サイトカインの一つである CXCL13 が発現亢進していること、また患者血清においても CXCL13 が高値を示すことが明らかとなった。また、CXCL13 は早期症例の検出に優

れていたことから、口腔扁平上皮癌の新たな腫瘍マーカーとして有用となる可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa, Hiroyuki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20127905

##### (2) 研究分担者

中城 公一 (Nakashiro, Koichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880