

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20172

研究課題名(和文) 頭頸部悪性腫瘍に対するpoly-ICと抗PD-L1抗体を併用した免疫療法の開発

研究課題名(英文) Combinatorial Immunotherapy of poly-IC and anti-PD-L1 antibody for head and neck malignancies

研究代表者

長門 利純(NAGATO, Toshihiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80431419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：扁平上皮癌細胞株をマウスに皮下移植し、poly-ICと抗PD-L1抗体による治療を行ったが、抗腫瘍効果を認めなかった。摘出腫瘍の免疫染色ではPD-L1の発現を認めなかった。以上より、今回使用した細胞株はPD-L1を発現していないために治療効果が出なかった可能性が考えられ、今後は別の細胞株を用いて検討する予定である。

同時に行っていた鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるPD-L1/PD-1の発現検討では、腫瘍組織にPD-L1が強発現していること、組織中にPD-1陽性リンパ球が浸潤していること、血清中に可溶性PD-L1が存在し、高値の患者群は低値群と比較して有意に全生存率が低いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We detected the expression of PD-L1 in biopsy samples from nasal NK/T-cell lymphoma (NNKTL) patients. PD-L1 was found on both malignant cells and tumor-infiltrating macrophages, while PD-1-positive mononuclear cells also infiltrated the tumor tissues. Most significantly, soluble PD-L1 (sPD-L1) was present in sera of NNKTL patients at higher levels as compared to healthy individuals. In addition, the high sPD-L1 group of patients showed significantly worse prognosis than the low sPD-L1 group. Furthermore, we confirmed that membrane and soluble PD-L1 was expressed on the surface and in the culture supernatant, respectively, of NNKTL cell lines. The expression of PD-L1 was observed in tumor tissues and sera from a murine xenograft model inoculated with an NNKTL cell line. Our results suggest that sPD-L1 could be a prognostic predictor for NNKTL and open up the possibility of immunotherapy of this lymphoma using PD-1/PD-L1 axis inhibitors.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：poly-IC PD-L1 PD-1 頭頸部悪性腫瘍 扁平上皮癌 鼻性NK/T細胞リンパ腫

### 1. 研究開始当初の背景

扁平上皮癌に代表される頭頸部悪性腫瘍の治療は手術、放射線治療、化学療法を単独もしくは併用して行っているのが現状である。しかし、これらの治療だけでは治癒させるのに不十分な症例も多く、第4の治療法が必要とされている。がん免疫療法は最も期待されている新しい治療法のひとつであり、特に腫瘍特異的細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)を効率よく誘導でき、かつ、持続させることができる免疫療法の開発が求められている。最近、われわれは肺癌、大腸癌、メラノーマのマウス皮下腫瘍モデルを用い、Toll-like receptor (TLR) のリガンドである poly-IC と抗 PD-L1 抗体を組み合わせた免疫療法が CD8 陽性の腫瘍特異的 CTL を誘導することにより腫瘍を排除できる程の強力な抗腫瘍効果を発揮することを示した(引用文献①, ②)。以上より、poly-IC と抗 PD-L1 抗体もしくは抗 PD-1 抗体の併用は扁平上皮癌に代表される頭頸部悪性腫瘍に対しても抗腫瘍効果を発揮する可能性が十分にある。

### 2. 研究の目的

(1) マウス扁平上皮癌細胞株を用い、マウス皮下腫瘍モデルに対する poly-IC と抗 PD-L1 抗体の併用療法の抗腫瘍効果を検討する。

(2) 抗 PD-1/PD-L1 抗体の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞上の PD-L1 の発現強度に依存するという報告がある。そのため、頭頸部悪性腫瘍のひとつである鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者の組織材料を用いて、PD-L1 の免疫染色を行い発現を検討する。同時に、腫瘍組織に浸潤している単核球細胞の PD-1 発現も検討する。さらに、血清中の可溶性 PD-L1 値を測定する。

### 3. 研究の方法

(1) 他施設より供与して頂いたマウス扁平上皮癌細胞株における細胞表面上の MHC 分子および PD-L1 発現をフローサイトメトリーにて確認する。

(2) 上記細胞株をマウスに皮下注射し、5×5mm 大に成長したところで poly-IC を 5 日毎に 3 回尾静脈より経静脈的に投与する。また各 poly-IC 投与後 1 日目と 3 日目に抗 PD-L1 抗体を腹腔注射にて投与する。比較対照として未治療群、poly-IC 単独投与群、抗 PD-L1 抗体単独投与群も作製する。径時的に腫瘍径を計測し、抗腫瘍効果を判定する。

(3) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者 17 名より得られた生検組織を用いて、PD-L1 と PD-1 の免疫染色を行う。また、治療前に得られた患者血清中の可溶性 PD-L1 値を ELISA 法にて測定し、健康人血清中の値と比較する。

(4) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株における

PD-L1 および PD-1 の発現をフローサイトメトリーにより調べる。また細胞株培養上清中の可溶性 PD-L1 の発現を ELISA 法にて検討する。

(5) 超免疫不全マウスである NOG マウスに鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を皮下移植した異種移植モデルを用いて、腫瘍組織における PD-L1 発現を免疫染色で、血清中の可溶性 PD-L1 発現を ELISA 法でそれぞれ確認する。

### 4. 研究成果

(1) 他施設より供与して頂いたマウス扁平上皮癌細胞株における MHC 分子および PD-L1 の細胞表面上の発現を検討したところ、MHC クラス I の発現は確認できたが、PD-L1 の発現は確認できなかった。しかし、培養液中に IFN- $\gamma$  を添加したところ、細胞表面に PD-L1 分子の発現を認めたため、この扁平上皮癌細胞株をマウスに皮下移植し、腫瘍が確認できたところで、poly-IC と抗 PD-L1 抗体を併用した治療を行った。しかし、コントロール群と比較して有意な抗腫瘍効果を認めなかった。皮下腫瘍を摘出してホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製したところ、形態学的には扁平上皮癌で間違いなかったが、免疫染色による検討では PD-L1 の発現は認められなかった。以上より、今回使用した扁平上皮癌細胞株は PD-L1 を発現していない(もしくは発現が弱い)ために poly-IC と抗 PD-L1 抗体の併用療法の効果が出なかった可能性が考えられ、今後は別の細胞株を用いて検討を続けていく予定である。

(2) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者における PD-L1 および PD-1 の発現を検討するために、本疾患患者の治療前生検組織を用いて、PD-L1 および PD-1 の免疫染色を行った。その結果、PD-L1 は腫瘍細胞と腫瘍組織内マクロファージに発現しており、検討できた症例すべてで陽性であった(図1)。一方、PD-1 は腫瘍細胞周囲のリンパ球と思われる細胞に発現しており、検討できた 14 症例中 5 例(36%)で陽性であった(図2)。また、PD-1 陽性細胞の一部は CD8 陽性細胞であった。

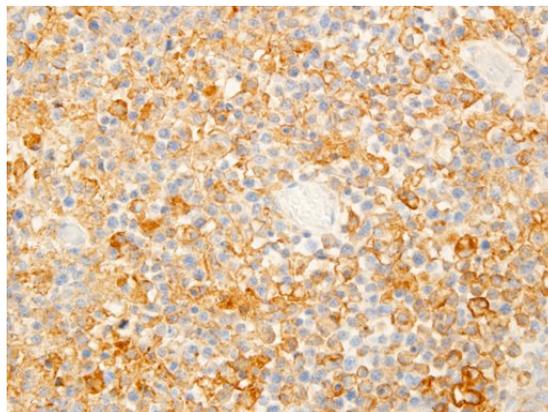


図1：患者組織における PD-L1 の発現

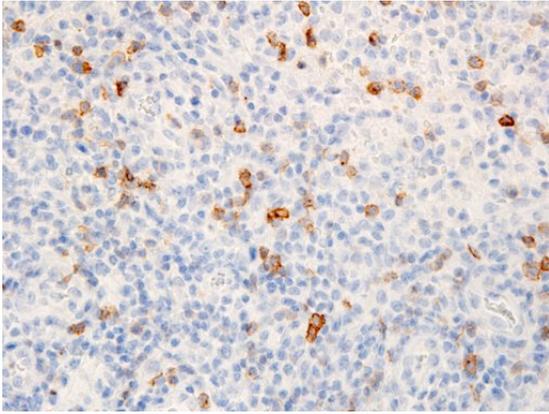


図 2 : 患者組織における PD-1 の発現

(3) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清中と健常人血清中の可溶性 PD-L1 を測定した。その結果、患者血清に可溶性 PD-L1 の発現を認め、その発現量は健常人血清と比較して有意に高かった (図 3)。また、患者血清中における可溶性 PD-L1 値は、組織中の腫瘍細胞における PD-L1 の発現率と正の相関を認めた。さらに、血清中の可溶性 PD-L1 値が高い患者群において、生存率が有意に低いことがわかった (図 4)。

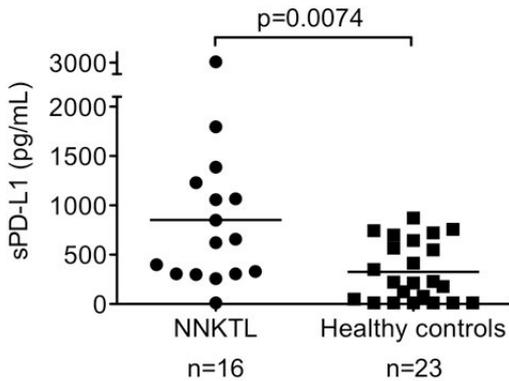


図 3 : 患者および健常人血清における可溶性 PD-L1 値 (NNKTL : 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫)

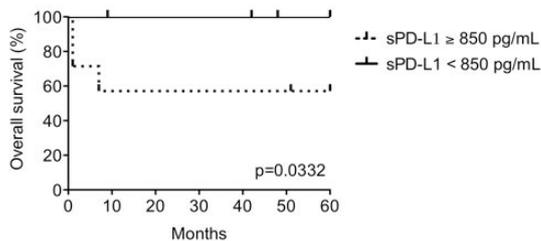


図 4 : 可溶性 PD-L1 値による全生存率の違い

(4) 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株 SNK-6 における PD-L1 および PD-1 の発現を検討するために、フローサイトメトリーを行った。その結果、SNK-6 の細胞表面上に PD-L1 の発現を認めたが (図 5)、PD-1 の発現は認めなかった (図 6)。次に、細胞株培養上清中の可溶性 PD-L1 を ELISA 法にて測定した。その結

果、SNK-6 培養上清中に可溶性 PD-L1 の存在が確認され、SNK-6 が可溶性 PD-L1 を産生していることが明らかとなった。

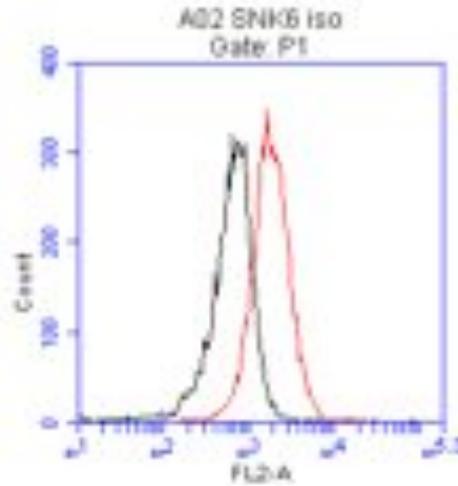


図 5 : SNK-6 における PD-L1 の発現

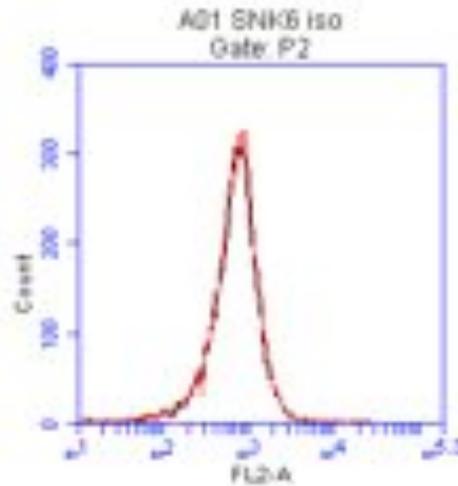


図 6 : SNK-6 における PD-1 の発現

(5) NOG マウスに SNK-6 を皮下移植してできた腫瘍における PD-L1 の発現を免疫染色にて確認したところ、PD-L1 が腫瘍細胞膜に発現していることが確認された (図 7)。また、皮下腫瘍を有するマウスの血清中可溶性 PD-L1 値は、コントロール (細胞株非移植) 群マウスと比べて高い値を示した。以上より、少なくとも今回のマウスモデルでは、血清中の可溶性 PD-L1 は腫瘍細胞が供給源であることが示唆された。

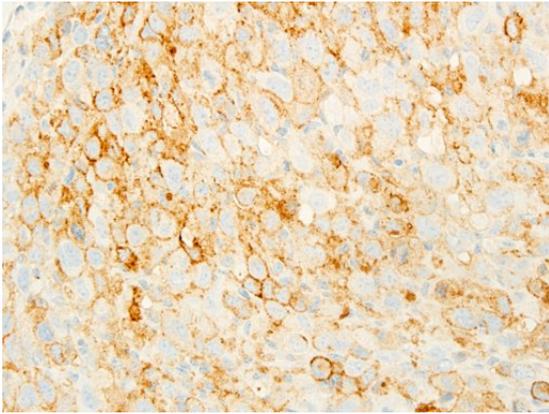


図7：NOGマウスにSNK-6を皮下移植した異種移植モデルにおけるPD-L1の発現

③ 長門 利純、鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるPD-L1の発現、日本耳鼻咽喉科学会、2016年5月18日、愛知県名古屋市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長門 利純 (NAGATO, Toshihiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80431419

#### <引用文献>

① Nagato T, Lee YR, Harabuchi Y, Celis E. Combinatorial immunotherapy of polyinosinic-polycytidylic acid and blockade of programmed death-ligand 1 induce effective CD8 T-cell responses against established tumors. Clin Cancer Res. 2014 Mar 1;20(5):1223-34.

② Nagato T, Celis E. A novel combinatorial cancer immunotherapy: poly-IC and blockade of the PD-1/PD-L1 pathway. Oncoimmunology. 2014 May 15;3:e28440.

#### 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1件)

① Nagato T, Ohkuri T, Ohara K, Hirata Y, Kishibe K, Komabayashi Y, Ueda S, Takahara M, Kumai T, Ishibashi K, Kosaka A, Aoki N, Oikawa K, Uno Y, Akiyama N, Sado M, Takei H, Celis E, Harabuchi Y, Kobayashi H. Programmed death-ligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2017 [Epub ahead of print]  
DOI: 10.1007/s00262-017-1987-x.

[学会発表] (計3件)

① 長門 利純、鼻性NK/T細胞リンパ腫に対する革新的免疫療法の開発、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2017年4月13日、北海道旭川市

② 長門 利純、鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるPD-L1の発現、日本癌学会、2016年10月6日、神奈川県横浜市