

令和元年6月20日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05543

研究課題名(和文) 網羅的分子解析による口腔癌複合免疫化学療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy for oral cancer based on molecular analysis

研究代表者

浜川 裕之 (Hamakawa, Hiroyuki)

愛媛大学・医学部・研究員

研究者番号：20127905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌患者の術前血清のサイトカインアレイにより予後因子との相関を認め、IL-6/8 および TNF- α のうち、IL-6 についての検討を行った。IL-6 については、clinical stage1-2 グループの予後と相関が認められ、さらに、センチネルリンパ節生検を併用することにより、高い予知性が得られるマーカーであることが示唆された。また、局在においては、癌間質の主成分である癌関連線維芽細胞における局在が強いことより、患者検体より正常部線維芽細胞および癌関連線維芽細胞を分離培養し、ELISA にて IL-6 の分泌量を測定し、癌関連線維芽細胞からの有意な分泌促進が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療における免疫療法は前立腺癌、悪性黒色腫等の疾患において他に有効な治療法のない癌患者の生存期間を有意に延長させることが報告されているが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。近年の癌細胞のエクソシークエンスにより癌の個別変異に対する免疫応答が注目されている。当科がこれまでに行ってきた genomics 解析と免疫応答の関連を検索することは、全身性および局所的な免疫抑制状態や癌進展促進環境構築における分子・細胞機構の解明に大変有益な情報であり、本研究によりバイオマーカーとなりうる分子が同定されれば、より効果的ながんの診断法、治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently immunotherapy is promising cancer therapy. However, the biomarker evaluating immunological condition is not established. In this study, we have identified IL-6/8 as a critical biomarker in oral squamous cell carcinoma. Serial immunohistochemical staining of oral squamous cell carcinoma (OSCC) specimens showed that the IL-6 was mainly limited to cancer stromal region. We confirmed that cancer associated fibroblast (CAF) produced significant amounts of IL-6 and VEGF than normal fibroblast (NF). Moreover, IL-6 enhanced VEGF production in NF and CAF, thereby inducing angiogenesis. We examined the in vitro cell proliferation of OSCC cells and CAF cells by WST-8 assay. In vivo study the IL-6 antibody reduced tumor volume by 70%. These data suggest that inhibition of the relationship between IL-6 and stromal fibroblasts offers new approaches to OSCC therapy.

研究分野：歯科口腔外科、口腔癌

キーワード：口腔癌 癌免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌治療はこれまで国際対がん連合 (UICC) の定めた TNM ステージを指標とした stage 分類にもとづき様々な臨床試験が生まれ、標準治療が確立されてきた。しかし、早期癌とされ根治的外科処置が適切に施行された口腔癌症例で、約 20-30% の再発、転移症例が認められ予後不良群が存在する。また、進行癌や再発切除不能症例および遠隔転移症例に対しては十分な治療法がない。そこで、TNM が癌の形態の特徴のみを指標としていることに対して、患者予後における、癌に対する生体側の反応、特に癌免疫の因子を考慮すべきである。実際、Galon らは、生存率等に関連する因子として CD8+ T 細胞や CD45RO+ T 細胞の有用性を報告し、いわゆる immune score の概念を提唱している (J. Transl. Med., 10:1, 2012)。また、近年、癌細胞に対する免疫監視機構や逃避機構の解明のみならず、浸潤、増殖や血管新生の促進等をはじめとする免疫による癌進展促進機構も明らかにされている。腫瘍抗原ワクチン、養子免疫療法や抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体などの免疫療法が FDA でも認証され腫瘍免疫学と癌免疫療法の重要性が見直されている。特に、既存の化学療法剤や分子標的薬剤が担癌状態に由来する免疫抑制状態、がん進展促進環境を制御することが証明されており、今後の口腔癌免疫複合化学療法にとって非常に有用であると考えられる (Ko HJ et al, Cancer Res, 67:7477-86, 2007, Ramakrishnan R et al, J Clin Invest, 120: 1111-24, 2010 等)。われわれの施設においても、2010 年より癌免疫療法、特に樹状細胞ワクチンを用いた治療法に着目しその有用性について検討を行ってきた (口腔がん 術後補助療法における自己がん組織を用いた樹状細胞ワクチンの有用性に関する検討: 愛大医病倫 1003014 号、口腔がん術後補助療法における人工抗原 MUC1 を用いた樹状細胞ワクチンの有用性に関する検討: 愛大医病倫 1203011 号)。現在、ヒト T 細胞認識腫瘍抗原の同定やテトラマーアッセイなどの免疫測定技術の進歩に伴い、抗腫瘍 T 細胞の局在、量的評価、また、免疫応答やサイトカイン産生能および細胞障害能等の測定による質的評価が可能となり腫瘍免疫学の発展は目を見張るものがある。さらに、近年、癌細胞の全エクソソームにより個々の患者毎に突然変異部位が異なることが報告されており、抗腫瘍免疫応答は、これらの個別変異に対する免疫応答である場合も多いと考えられているが詳細は不明である。患者にとって有効な免疫治療を提供するためには、各症例における全身的および局所的な免疫抑制状態や、腫瘍組織微小環境内における癌免疫逃避機構の解析などのいわゆる、宿主の免疫学的な個性 (網羅的分子解析) を把握すること、つまり、免疫療法の効果が期待できるバイオマーカーの同定と、新たな治療標的分子の同定が必要である。他癌種においても現在、これらの項目に関する様々な知見が蓄積されてきており、近い将来、癌に対する免疫療法が標準治療の一つとなることが期待されている。

2. 研究の目的

本研究目的は、従来の治療法で制御困難な口腔癌に対する複合免疫化学療法の確立である。具体的には、これまで蓄積してきた口腔扁平上皮癌患者の術前、術後血清、腫瘍および正常組織手術検体から得られた、RNA、miRNA、エキソソーム、上清等のゲノム、プロテオーム、メタボローム解析情報を bioinformatics 手法により解析する。癌抗原の探索および、癌免疫関連分子を中心とした予後との比較による免疫逃避機構を明らかにする。次に、より効果的な治療法を確立し、個別免疫療法およびその適応基準を開発する。

3. 研究の方法

年齢調整した健常人および治療前後の口腔癌患者由来血清、組織およびにおける遺伝子 (mRNA) および miRNA の網羅的発現解析を Affymetrix 社製 Human Gene 1.0 ST Array および GeneChip miRNA Array を用いて行う。また、同血清を用いて multi-ELISA にて各種サイトカイン、ケモカインの測定を、パラフィン切片を用いて腫瘍間質および実質に浸潤している免疫細胞の表面マーカーおよびケモカイン受容体の検索を行う。これらの網羅的分子解析により最終的に、強力な癌抗原の同定および個別免疫状態を反映するバイオマーカーとしての腫瘍免疫関連分子を同定し、既存の抗がん剤、分子標的薬を含めた治療標的としての有用性と安全性を臨床研究にて明らかにする。

4. 研究成果

当科にて 2006 年から 2013 年の間に、口腔扁平上皮癌と診断された新鮮症例 55 例 (stage1/2 26 症例、stage3/4 29 症例) を対象とし、術前血清を用いた multiplex suspension array 法を用いたスクリーニングおよび生化学的検査による検討を行った。multiplex suspension array 法においては、Interleukin (IL)-2, 4, 6, 8, 10, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interferon (IFN)- γ , Tumor necrosis factor (TNF)- α を対象とした。解析は、Kaplan-Meier 法、Log-rank test、T-test および Fisher の正確検定にて、予後および各種因子との相関を検討した。予後との相関では、IL-6 および IL-8 のみ早期癌患者において、disease free survival との相関が認められた ($P < 0.05$)。各因子間においては、IL-6/IL-8 間 ($P < 0.001$)、IL-6/TNF 間 ($P < 0.001$)、IL-8/TNF 間 ($P = 0.012$) に相関が認められた。また、IL-6 は CRP ($P = 0.004$) および ALB ($P = 0.029$) とそれぞれ正および負の相関が認められた。続いて、手術検体を用いて抗 IL-6 抗体および抗 CD34 抗体を用いた免疫組織学的染色法にて局所評価を行った。また、口腔扁平上皮癌患者の手術検体より正常部線維芽細胞および腫瘍部

線維芽細胞を培養し、主要な血管新生因子である VEGF-A の発現を検討した。さらに、抗ヒトおよびマウス IL-6 レセプター抗体を用いて、in vitro/ vivo における腫瘍増殖抑制効果について検討を行った。術前血清 IL-6 と腫瘍間質の IL-6 発現には強い相関が認められた ($P < 0.001$)。さらに CD34 陽性細胞数と血清 IL-6 値にも相関が認められた ($P < 0.001$)。また、腫瘍部線維芽細胞は、正常部線維芽細胞に比較し、VEGF-A の高発現が認められた。また、in vivo においては、IL-6 シグナルの阻害により腫瘍増殖の抑制が認められた ($P < 0.05$)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Goda H, Okamoto M, Nakashiro K, Hino S, Murase R, Hamakawa H. Prognostic impact of preoperative serum interleukin-6 levels in patients with early-stage oral squamous cell carcinoma, defined by sentinel node biopsy. *Oncol Lett.* 2017 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 合田啓之、岡本正人、中城公一、徳善紀彦、浜川裕之 口腔扁平上皮癌における Interleukin-6 シグナルを標的とした治療アプローチの検討 第 70 回日本口腔科学会学術集会 2016 年

2. 合田啓之、岡本正人、中城公一、浜川裕之 口腔扁平上皮癌における予後予測因子としてのバイオマーカーの探索 第 54 回日本癌治療学会学術集会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中城公一

ローマ字氏名：Nakashiro Koh-ichi

所属研究機関名：愛媛大学大学院 医学系研究科

部局名：口腔顎顔面外科学講座

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：90314880

研究分担者氏名：合田啓之

ローマ字氏名：Goda Hiroyuki

所属研究機関名：愛媛大学大学院 医学系研究科

部局名：口腔顎顔面外科学講座

職名：講師

研究者番号(8桁): 00464371

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡本正人

ローマ字氏名：Okamoto Masato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。