

令和元年6月18日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11697

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるPD-1とPD-L1の発現

研究課題名(英文) PD-1 and PD-L1 expression in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

東條 格 (Tojyo, Itaru)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70405439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌49例の生検材料を用い、p53、CK17、PD-L1の免疫組織化学染色を行い、その発現の関連性を検討した。p53の陽性率は63.2%、CK17の陽性率は91.7%、PD-L1(腫瘍細胞)の陽性率は48.9%、PD-L1(腫瘍浸潤リンパ球)の陽性率は57.1%であった。口腔扁平上皮癌腫瘍細胞においてPD-L1の発現はp53の発現に正の相関を認めた。変異型p53 蛋白質は分解時間が遅延し核内に蓄積されるため、過剰発現として認定される。p53はPD-L1の発現を直接阻害するが、機能を失った変異型p53が蓄積されると、PD-L1が過剰に発現し、p53とPD-L1は相関を示すと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には口腔扁平上皮癌において、p53の発現がPD-L1の発現に正の相関を示すことは、これまで報告されたことはなく、新知見である。社会的にはPD-L1の口腔扁平上皮癌組織における発現は、ニボルマブが口腔扁平上皮癌に奏功するかどうかのバイオマーカーの一つと考えられており、口腔扁平上皮癌においてp53がPD-L1の発現に正の相関を示すことが確認されれば、口腔扁平上皮癌組織におけるp53の発現もニボルマブが患者に奏功するかどうかのバイオマーカーの一つとして考えられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied the correlation among immunohistochemical expressions of p53, CK17, PD-L1 in 48 biopsy samples of oral squamous cell carcinoma. Positive rate of p53, CK17, PD-L1 (tumor cells) and PD-L1(infiltrating lymphocytes in tumor) is 63.2%, 91.7%, 48.9% and 57.1% respectively. Regarding tumor cells The expression of PD-L1 and p53 positively correlated. Because resolution time of variant p53 protein delays and the protein is accumulated into a nucleus, the variant p53 protein is identified as overexpression. Although p53 inhibits the expression of PD-L1 directly, when variant p53 which lost a function is accumulated, PD-L1 overexpresses. Thus, it is thought that the expression of p53 and PD-L1 shows positively correlation in oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 PD-L1 p53 CK17 免疫チェックポイント阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬のがんに対する優れた臨床効果が、現在、大変注目されている。分子生物学の発展により、がん微小環境における「がん免疫逃避機構」の存在が明らかとなり、その中心的経路の一つとして、T細胞性免疫の機能抑制にかかわる免疫チェックポイントB7/CTLA4経路およびPD-1/PD-L1経路とそれらの阻害薬の画期的な有効性が示されつつある。2010年以降、がん治療の大きなブレイクスルーが訪れたといわれている。2011年にMellmannらはNature誌のなかで「がん免疫療法の時代が到来した」と称している。まさに現在、PD-1/PD-L1経路を標的とした抗がん治療は、製薬企業7社から9種類の抗体薬について臨床試験が行われている。2012年の米国臨床腫瘍学会(ASCO)では、抗PD-1抗体ニボルマブの第Ⅲ相試験の奏効率は、非小細胞肺癌、メラノーマ、腎細胞がんで18%、28%、27%と報告された。また同時に抗PD-L1IgG4抗体の奏効率は、同様のがん腫で10%、17%、12%とであり、有害事象は抗PD-1抗体に比べ、やや少なかったと報告された。2014ASCOでは、膀胱がん、頭頸部がん(Sewert TY, et al)および卵巣がんに対するPD-1/PD-L1経路阻害薬の一定の有効性が初めて示された。我が国の頭頸部がんにおいても2015年の日本癌治療学会にて、国立がん研究センター東病院の田原らが「日本人進行性頭頸部扁平上皮癌患者に対する、MK-3475(抗PD-1抗体)の第Ⅱb相試験」を報告し、その有効性を示しつつある。また、臨床検体を用いた検討にて、腎がん、悪性黒色腫、食道がんなどの多くのがん細胞がPD-L1を高発現しており、予後不良と関わっているものが多い。さらに2010年にBrahmerらの報告以降、数多くのがん種において、腫瘍でPD-L1発現が高い症例ほど、PD-1経路阻害薬の治療効果が高いと報告された。また、メラノーマや膀胱がんなどでは腫瘍だけではなく、腫瘍内浸潤したT細胞数やPD-L1やPD-1発現陽性T細胞数が治療効果の指標となると報告されている。しかし、頭頸部がん、口腔がんにおける臨床試験は他にはほとんどなく、また臨床検体を用いた研究も、少ない。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害薬、特に抗ヒトPD-1抗体薬、抗ヒトPD-L1抗体薬のがんに対する優れた臨床効果が次々と様々ながん種で報告され、注目されている。また、PD-1、PD-L1をより多く発現しているがんでは予後が悪いことが報告されているが、それらが発現しているほど免疫チェックポイント阻害薬(抗ヒトPD-1抗体薬、抗ヒトPD-L1抗体薬)の奏効度が高いのではないかと、様々ながん種で報告されている。ただ、口腔がんではそれらについての報告は少なく、免疫チェックポイント阻害薬の臨床試験の報告も少ない。今回、我々は、口腔扁平上皮癌での生検標本、切除標本、培養がん細胞でPD-1、PD-L1、その関連遺伝子の発現の検討を行い、口腔がんへの、その阻害薬の適応を検討する。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌の生検組織のパラフィンブロックから薄切切片(5 μ m)を作製。口腔扁平上皮癌の生検組織標本で、抗PD-L1抗体、抗CK抗体、抗p53抗体を用いて、その薄切切片において発現の分布について免疫組織学的(immunohistochemistry, IHC)に検討した。PD-L1とCK、p53が口腔癌、周囲組織でどのように発現しているかを免疫組織化学的に検討。舌、歯肉、頬粘膜、口蓋、口底、口唇にわけ、部位別にPD-1、PD-L1の発現を検討した。また、年齢別、性差、術前の化学療法、転移、悪性度、浸潤様式、リンパ球浸潤度、ステージ、全生存期間などの因子の影響も検討した。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌におけるCK17の陽性率は91.7%、p53の陽性率63.2%はPD-L1(tumor cells, TCs)の陽性率は48.9%、PD-L1(tumor infiltrating lymphocytes, TILs)の陽性率は57.1%であった(Figure 1)。

1. 口腔扁平上皮癌49例中、女性が29名、男性が20名であった。
2. 年齢は49歳から91歳で、平均年齢は65.7歳であった。
3. 部位は舌が11例、下顎歯肉が18例、口底が7例、上顎歯肉が5例、軟口蓋と上顎洞が3例、硬口蓋が2例であった。
4. 分化度は高分化型35例、中等度分化型11例、低分化型3例であった。
5. YK分類はYK-1が3例、YK-2が9例、YK-3が17例、YK-4Cが16例、YK-4Dが4例であった。
6. Table 1は性別、年齢、T stageなどの臨床的因子とPD-L1、p53、CK17の陽性、陰性の免疫組織学的結果との関連性についての評価を統計的にFisher's 正確検定を用いて行った表であるが、T stageとTNM stageにおいて、p53の発現は、stageが進むにつれて、発現率の増加が認められた。また、口腔扁平上皮癌腫瘍細胞において、PD-L1の発現と、p53の発現に正の相関を認めた。
7. Kaplan-Meier法による5年疾患特異的生存率は、PD-L1(-)、CK17 strongでやや低くなる傾向があるが、有意差は認めなかった。他のp53発現による生存率の差は認められなかった。ハザード比をみてもこれらの因子と生存率に有意な関連は認められなかった(Table 2)。

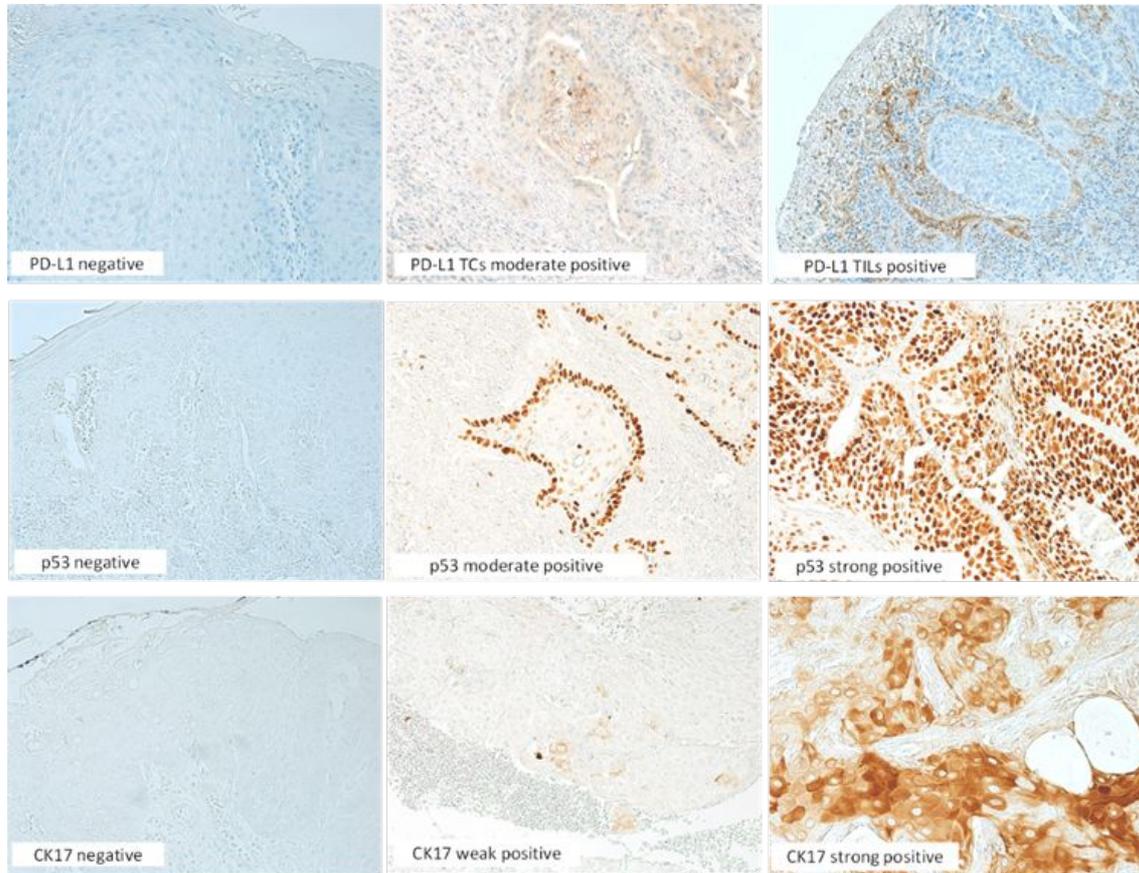


Figure 1. Representative images of PD-L1, p53 and CK17 expression by IHC (original magnification x200). TCs; tumor cells, TILs; tumor-infiltrating lymphocytes.

Table 1. Characteristics of PD-L1/p53/CK17 expression in patients with oral squamous cell carcinoma.

Characteristics	Cases	PD-L1 expression in TCs			p53 expression			CK17 expression			
		positive (≥5%)	negative (<5%)	P-value	positive (≥10%)	negative (<10%)	P-value	strong (≥60%)	weak (<60%)	P-value	
Gender	Male	29	14	15	1.00	20	9	0.37	4	25	0.27
	Female	20	10	10		11	9		6	14	
Age	<65years	22	12	13	1.00	15	10	0.76	5	20	1.00
	>65years	27	12	12		16	8		5	19	
T stage	T1-T3	34	15	19		18	16		5	29	0.12
	T4	14	8	6	0.52	12	2	0.049*	5	9	
	Unknown	1	1	0		1	0		0	1	
N stage	N(+)	20	10	10		13	7		4	16	
	N(-)	28	13	15	1.00	17	11	1.00	6	22	1.00
	Unknown	1	1			1			1		
M stage	M0	48	22	25		29	18		0	1	
	M1	0	1	0	0.47	1	0	1.00	10	37	1.00
	Unknown	1	1	0		1	0		0	1	
TNM stage	I - III	30	13	17		15	15		4	26	
	IV	18	10	8	0.55	15	3	0.03*	6	12	0.14
	Unknown	1	1	0		1	0		0	1	
Differentiation	Well	35	19	16		20	15		8	27	
	Moderate	11	4	7	0.54	8	3	0.31	1	10	0.47
	Poor	3	1	2		3	0		1	2	
Mode of invasion	Grade 1	3	2	1		2	1		2	1	
	Grade 2	9	4	5		3	6		1	8	
	Grade 3	17	9	8	0.96	11	6	0.21	3	14	0.37
	Grade 4C	16	7	9		11	5		3	13	
	Grade 4D	4	2	2		4	0		1	3	
PD-L1 expression in TCs	Positive	24				21	10	0.0009*	17	22	0.17
	Negative	25				3	15		7	3	
PD-L1 expression in TILs	Positive	28	21	7	<.0001*	21	7	0.07	20	19	0.15
	Negative	21	3	18		11	10		8	2	
p53 expression	Positive	31	21	10	0.0009*				22	17	0.06
	Negative	18	3	15					9	1	
CK17 expression	Weak	39	17	22	0.17	22	17	0.06			
	Strong	10	7	3		9	1				

P-value : χ^2 test and Fisher's exact test were used. *P<0.05 was defined as significantly difference in statistical analysis. Unknown include those cases with Tx, Nx, Mx and TNM status and they were excluded from statistical analysis

Table 2. Prognostic factors for disease-specific survival of the patients with oral squamous cell carcinoma according to multivariate analysis

Characteristics	Group	Hazard ratio (95%CI)	P-value
Gender	Female/male	0.389 (0.094-1.610)	0.193
T stage	T1-T3/T4	0.818 (0.077-8.673)	0.867
N stage	N(-)/N(+)	0.860 (0.262-2.829)	0.805
TNM stage	I -III/IV	1.259 (0.088-17.941)	0.864
PD-L1 expression in TCs	Positive/negative	0.412 (0.111-1.530)	0.185
p53 expression	Positive/negative	0.655 (0.176-2.440)	0.528
CK17 expression	Strong/weak	3.418 (0.806-14.49)	0.095

*P<0.05 was defined as significantly difference in statistical analysis.

我々の今回の研究結果から、口腔扁平上皮癌で PD-L1 と p53 の発現に正の相関がある可能性が考えられる。Cortezらは、非小細胞肺癌において microRNA34 によって p53 が PD-L1 の発現を制御していると報告した。p53 遺伝子は、全悪性腫瘍の約 50% に変異が検出されている。変異型 p53 蛋白は分解時間が著しく遅延し核内に蓄積されるため、免疫組織学的に蛋白過剰発現として同定される。p53 はマイクロ RNA の miR-34a を活性化させ、miR-34a が PD-L1 の発現を直接阻害する。p53 が機能を失う (loss of function) と、miR-34a も失われて PD-L1 が過剰に発現する。また、腫瘍遺伝子変異のバイオマーカーの代替として p53 の状態の評価が使用できるとの報告もある。腫瘍遺伝子変異量の多い腫瘍ほど免疫チェックポイント阻害薬の奏効率が上がることが報告されており、PD-L1 と p53 の関連が示唆される。

CK17 は、癌の増殖分化に関与していると考えられるが、PD-L1 との発現の相関は、今回の研究では確認できなかった。

さらに、免疫組織学的染色の形態的観察から、強く発現する部位が PD-L1 と p53 では明確に分かれている所見が見られた。変異型 p53 だけではなく、正常 p53 も存在し、その発現している部位では PD-L1 の発現を阻害している可能性がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Hasegawa T, Hayashida S, Kondo E, Takeda Y, Miyamoto H, Kawaoka Y, Ueda N, Iwata E, Nakahara H, Kobayashi M, Soutome S, Yamada SI, Tojyo I, Kojima Y, Umeda M, Fujita S, Kurita H, Shibuya Y, Kirita T, Komori T. Medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in cancer patients: a multicenter retrospective study. *Osteoporos Int.* 30(1):231-239, 2019
2. Shintani Yukari, Nakanishi Takashi, Ueda Masamichi, Mizobata Naoki, Tojyo Itaru, Fujita Shigeyuki. Comparison of Subjective and Objective Assessments of Neurosensory Function after Lingual Nerve Repair. *Medical Principle.* doi: 10.1159/000497610, 2019
3. 新谷ゆかり, 東條 格, 高山三郎, 岡本健二郎, 武田侑也, 藤田茂之. Eisenmenger 症候群患者の全身麻酔下での抜歯経験. *口外誌* 63(8):382-387 2017.
4. Hitoshi Maezawa, Itaru Tojyo, Kazuya Yoshida, Shigeyuki Fujita. Recovery of Impaired somatosensory evoked fields after improvement of tongue sensory deficits with neurosurgical reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg.* 74(7):1473-82, 2016
5. Yukihiro Hiraishi, Itaru Tojyo, Koji Tanimoto, Shigeyuki Fujita. A Case of Verruciform Xanthoma Arising in the Tongue. *J Clin Diagn Res.* 10(12):7-8, 2016.
6. 新谷ゆかり, 和田 健, 東條 格, 根来健二, 木賀紀文, 森 恵一, 武田侑也, 高山三郎, 藤田茂之. 舌癌に対する導入化学療法の頸部後発リンパ節転移の制御の有効性について. *和歌山医学* 67(3):92-95 2016
7. Itaru Tojyo, Kenjiro Okamoto, Yuji Shinohara, Yukihiro Hiraishi, Norifumi Kiga, Shigeyuki Fujita: Inflammatory pseudotumor in the submandibular region: A case report with immunohistochemical findings. *Case Studies in Surgery* 2016 Jun; 2(3): 18-22.

[学会発表](計 3 件)

1. 東條 格, 新谷ゆかり, 中西 隆, 岡本健二郎, 平石幸裕, 藤田茂之, 恵中まゆ, 佐藤冬樹, 村垣泰光: 口腔扁平上皮癌における CK17 と p53 の発現と PD-L1 の発現に関する臨床的および免疫組織学的検討. 第 37 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 長崎市 2019.01
2. Itaru Tojo, Shigeyuki Fujita. Iatrogenic lingual nerve injuries : Retrospective study of 82 cases. 7th Annual conference of Nepalese Association of Oral and Maxillofacial Surgeons and Nepal-Japan Joint Scientific Meeting of Oral and Maxillofacial Surgeons 2017 in Kathmandu 2017. 2. 4
3. 東條 格, 中西 隆, 上田真道, 新谷ゆかり, 藤田 茂之: 抜歯時に舌神経麻痺を生じやすい

下顎智歯とは. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会 京都市 2017.10.22.

〔図書〕(計 5 件)

1. Yuya Takeda, Itaru Tojyo, Yukari Shintani, Kenjiro Okamoto, Kenji Negoro, Norifumi Kiga and Shigeyuki Fujita. A clinical study of maxillofacial fractures treated in cooperation with other clinical departments during the past 5 years. Oral Science in Japan 29-30, 2016
2. Shinohara Y, Matsumoto T, Kiga N, Tojyo I, Fujita S. Neurilemmoma of the Vagus Nerve in the Poststyloid Parapharyngeal Space. Clin Diagn Res. 10(1):ZD17-9, 2016
3. Keiichi Mori, Kenji Negoro, Yukari Shintani, Naiki Mizobata, Saki Hayashida, Yukihiro Hiraishi, Norifumi Kiga, Itaru Tojyo and Shigeyuki Fujita. A clinico-statistical study of patients with temporomandibular disorders in our department. Oral Science in Japan 27-28, 2016
4. Takashi Nakanishi, Naoki Mizobata, Yuya Takeda, Shinsuke Ieda, Yukari Shintani, Shigeru Suzuki, Kenjiro Okamoto, Itaru Tojyo, Shigeyuki Fujita. A case of spindle cell squamous cell carcinoma induced by frequent episodes of herpes stomatitis. Oral Science in Japan 73-75, 2018
5. Naoki Mizobata, Takashi Nakanishi, Shinsuke Ieda, Shigeru Suzuki, Yuya Takeda, Masamichi Ueda, Tomoji Fukutani, Itaru Tojyo, Shigeyuki Fujita. Iatrogenic lingual nerve injury induced to the inappropriate procedure on lower third molar extraction: reports of two cases and literature review. Oral Science in Japan 69-72, 2018

〔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：平石 幸裕

ローマ字氏名：Yukihiro Hiraishi

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：博士研究員

研究者番号（8桁）：40573449

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中西 隆

ローマ字氏名：Takashi Nakanishi

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。