

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11412

研究課題名(和文) 頭頸部がん治療における新たなる免疫化学療法の開発 - CTLと抗がん薬併用の意義

研究課題名(英文) Development of a New Immunochemotherapy for Head and Neck Cancer - Significance of Combination of CTL and Anticancer Drugs

研究代表者

小川 徹也 (Ogawa, Tetsuya)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40334940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌における抗がん薬療法と免疫療法の関連性について検討した。全身薬物投与では白血球の低下が認められるが、CTLが有意に低下することが示唆された。更に制御性T細胞も低下するが、休薬期間で制御性T細胞の方が、より増加する傾向を見いだした。さらに頭頸部希少癌である粘表皮癌症例から、原発、再発腫瘍から細胞株を樹立した。それらを用いることで、細胞形態、核型、抗がん薬感受性、免疫関連研究を行った。その結果、粘表皮癌では原発再発とも、有用な染色体変異を確認出来た。更にその核型解析から、新たなる遺伝子変異の可能性を見いだした。抗がん薬感受性は低い、免疫チェックポイント阻害剤の可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少癌である頭頸部原発粘表皮癌症例に対し、新たなる免疫治療、そして免疫化学療法の可能性を見いだした。従来の抗がん薬療法では効果が低い可能性を基礎的研究からも証明した。一方、ある条件下では抗がん薬療法ではなく、免疫チェックポイント阻害剤の有用性がある事を示唆した。今後の頭頸部粘表皮癌に対する、新たなる免疫治療の可能性を示したことは有用である。また抗がん薬療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用は、制御性T細胞と細胞傷害性T細胞との関係性を考慮して行う必要性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The relationship between anticancer drug therapy and immunotherapy in head and neck cancer was studied. Systemic drug administration was found to decrease leukocytes, suggesting a significant decrease in CTLs. Furthermore, regulatory T cells were also decreased, we found a trend toward a greater increase in regulatory T cells during the withdrawal period. Furthermore, cell lines were established from primary and recurrent tumors of mucoepidermoid carcinoma, a rare cancer of the head and neck region. Using these cell lines, we performed cell morphology, karyotype, anticancer drug sensitivity, and immune-related studies. As a result, useful chemosensitivity were identified in both primary and recurrent mucoepidermoid carcinoma. Furthermore, immunotherapy revealed the possibility of new treatment strategy. Although the patients were not sensitive to anticancer drugs, we found the possibility of using immune checkpoint inhibitors.

研究分野：頭頸部外科腫瘍学

キーワード：免疫治療学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌はその発生部位より、解剖学的部位に応じた機能温存と根治性のバランスを求めた治療法選択が重要となる。生活の上で重要な役割をもつ頭頸部領域の手術治療は、侵襲の大きさにかかわらずこれら領域の重要な機能を冒すことになる(Ogawa T et al. Auris Nasus Larynx 2000)。一方頭頸部癌は比較的抗癌剤に効きやすい癌であり、患者の生活の質を考慮すると可能な限り手術を避け、抗癌剤を中心とした治療がより望ましい(Ogawa T et al. Gan to Kagaku Ryoho 2005)。しかしながらその効果は実際に抗癌剤を投与してみないと判断できないのが現実である。これらの経験的な抗癌剤治療は、無効例に対しては非常に不利益かつ不経済である。我々はこれまで頭頸部癌において様々な *in vitro* および *in vivo* の感受性試験、さらには分子標的に基づく抗癌剤感受性試験を行い、知見を得てきた(Aoki K, Ogawa T et al. Oncol Rep 2000, Bradford CR et al. Head Neck 2003, Muramatsu Y et al. Anticancer Res 2000)。また頭頸部癌に特異的な癌関連遺伝子を同定、報告した(Takebayashi S, Ogawa T et al. Cancer Res 2004, Henson BS et al. J Bio Chem 2005)。しかしながら未だ、真の抗癌剤感受性規定因子を解明したとは言えない。

近年、がん治療に於いて免疫治療が注目されている。これまで CTL(Cytotoxic T cell Lymphocyte)治療は、患者自身の細胞傷害性 T 細胞を使用し、腫瘍を直接認識するため高い効果と低い有害事象が期待されてきて、愛知医科大学病院高度先進医療として様々ながん腫に治療を行ってきた(Ohtani T, Yoshikawa K, et al. Int J Oncol)。しかしながらその効果は決して良好とは言えないと考えられる。頭頸部癌治療において、抗がん薬療法は重要な役割を果たしており、免疫チェックポイント阻害剤が標準的保険主催治療となった現在に於いても、両者(抗がん薬療法と免疫チェックポイント阻害剤)の治療効果における関係性は重要である。今後は抗がん薬療法と現在の免疫治療の主である免疫チェックポイント阻害剤との関係性を、より実際の臨床症例に即した観点からの検討を行うことが重要となる。

### 2. 研究の目的

抗がん薬療法と免疫治療が併用されている現在、両者が如何に影響し合っているのかを知ることが重要である。さらに手術と免疫治療の兼ね合いに関しても、関係性について検討を行うことが重要である。以上の状況を踏まえ、院内倫理審査承認の元、頭頸部扁平上皮がん患者から抗がん薬療法前後の末梢血免疫動態を、フローサイトメトリー法にて、免疫関連分子がどの様に推移するかを確認し、抗がん薬療法と免疫治療との関連性、そしてその最適な方法を確認することを目的とした。さらに、頭頸部癌の中でも更に希少癌とされる、舌根原発(中咽頭癌のカテゴリー)の粘表皮癌症例に対し、初回時原発手術、及び再発時組織から細胞株を樹立し、未だ有効な治療法の確立がされていない同腫瘍の、抗がん薬療法、並びに免疫療法の有効性を探ることを目的とした。これら研究は、愛知医科大学院内倫理審査承認の元、施行された。

### 3. 研究の方法

#### 1) 抗がん薬療法における免疫細胞動態

##### 研究の方法

平成 29 年度から令和 2 年度で、愛知医科大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科でシスプラチンと 5FU の抗がん薬治療を受けられた患者を対象とした。投与前、投与後 2 日目、5 日目、12 日目において採血を行い、末梢血リンパ球の様相と免疫治療との関連性についてさらに検討した。CD8、CD4、FOXP3、CD45RA でそれぞれの分画を確認した。

## 2) 舌根原発粘表皮癌における細胞生物学的検討

### 研究の方法

69 歳男性の症例を用いた。現病歴として 2 ヶ月前からの嚥下痛、両側頸部リンパ節腫脹を主訴に来院の方である。喉頭内視鏡検査で舌根に腫瘤あり、生検にて粘表皮癌の診断であった。病期は T4aN2cM0 であった。舌喉頭全摘、両側頸部郭清術、大胸筋皮弁による再建を行った。

手術時摘出標本からの細胞株作成を試みた。

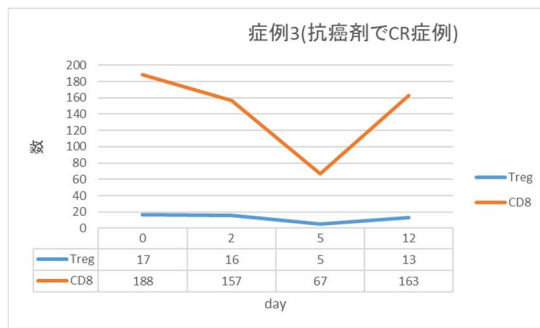
手術 2 ヶ月後、作成した永久気管孔下方に肉芽様病変が出現、生検の結果、再発と診断されたこの部位から 2 カ所、組織を採取し、それぞれで細胞株作成を試みた。

作成した細胞株を用いて、DNA 量の解析を行った。また BrdU を用いて、細胞分裂能の確認を行った。そして様々な種類の抗がん薬、分子標的薬に対する薬物感受性試験を行った。さらに免疫チェックポイント分子である PD-L1 発現についても検討を行った。

### 4. 研究成果

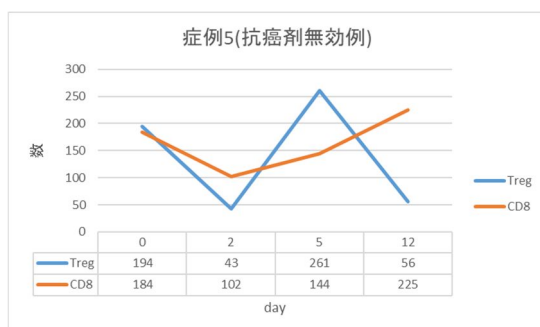
#### 1) 抗がん薬療法における免疫細胞動態

対象症例は 5 例であった。代表例として抗がん薬療法で完治となった症例の推移を示す。



図に示すように、効果の見られた症例 3 では Treg (制御性 T 細胞) の発現は治療中低値のまま推移した。一方、CD8 陽性 T 細胞は腫瘍攻撃性 T 細胞と考えられるが、5 日目での低下は見られたものの、高値で推移していることが示された。抗腫瘍免疫の状態と成っていることが示唆された。

一方、抗がん薬療法無効例の結果を示す。



図に示すように、投与後 2 日目で Treg、CD8 陽性 T 細胞とも低値を示したが、5 日目では Treg の上昇が見られた結果となっていた。腫瘍免疫抑制状態となっている可能性が示唆された。

## 2) 舌根原発粘表皮癌における細胞生物学的結果

### 1. 細胞株の作成

原発腫瘍摘出標本からの細胞株 (AMU-MEC1)、気管孔周囲再発組織からの細胞株 (AMU-MEC1-R1:AMU-MEC1-R2) を樹立することが出来た。

## 2. DNA 含有量

AMU-MEC1 と AMU-MEC1-R2 では正常リンパ球に対し大凡 2 倍の DNA 量であった。AMU-MEC1-R1 では Hyperdiploidy であった。3 細胞株とも異なったクローンから樹立されたものと考えられた。

## 3. 細胞分裂能の確認

BrdU を用いての検討では、口腔がん細胞株と比較し取り込みが低く、増殖の程度が低いことが判明した。これは臨床的な粘表皮癌の振る舞いを示す結果とも考えられた。

## 4. 抗がん薬感受性

細胞は 10% 非働化牛胎児血清 (IBL, Tokyo, Japan) と 100U/ml ペニシリンと 0.1mg/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI1640 medium (SIGMA, St. Louis, USA) を培養液として、5%CO<sub>2</sub> 通気下、37 °C にて培養した。シスプラチン感受性試験に関しては下記のとおりである。96 穴平底プレート (Falcon 3072, Beckton Dickinson, NJ, USA) にヒト頭頸部癌細胞株を播種し、様々な濃度 (0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 μg/ml) のシスプラチン (日本新薬, Tokyo, Japan) を添加して 5%CO<sub>2</sub> 通気下、37 °C にて培養した。培養開始後 5 日後に、WST-1 assay Kit (Cell Counting Kit, DOJINDO, Tokyo, Japan) を用いて細胞数の比較を行い、シスプラチンによる細胞増殖抑制効果の判定を行った。

その結果、3 つ全ての細胞株でシスプラチン、5FU、そして両者の併用に於いて感受性は低い結果であった。

### 5. PD-L1 発現についての結果

AMU-MEC1、AMU-MEC1-R1 について、EGF、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1 で刺激を行い、PD-L1 発現について検討を行った。その結果、EGF、TGF- $\beta$ 1 刺激では PD-L1 発現は誘導されなかったが、IFN- $\gamma$  にて PD-L1 発現が増強することが示された。

## 5. 考察

### 1) 抗がん薬療法における免疫細胞動態

抗がん薬治療と免疫治療の併用検討では、抗がん薬治療が腫瘍免疫に重要な役割を果たす CD8 陽性 T 細胞を減少させる可能性を示唆した。今後、抗がん薬治療と免疫治療を併用する場合には、制御性 T 細胞を減少させるが CD8 陽性 T 細胞は維持するような方法を考慮する必要があると思われる。もしくは免疫チェックポイント阻害剤の使用は、抗がん薬療法による上記のような有害事象が発生しない段階で施行するなどと言うところも示唆された。今後更なる検討が必要と考えられる。

### 2) 舌根原発粘表皮癌における細胞生物学的結果

粘表皮癌症例では、頭頸部がん自体が希少癌なこと、更にその中でも希少な組織型である事から、標準治療法が手術以外、決定されて居らず今後更なる検討が必要とされるがん腫である。頭頸部がん自体が比較的抗がん薬療法にこうかがあるがん腫である事から、これまで実地臨床

ではシスプラチン、5FUを用いた抗がん薬療法が行われてきた。しかしながらその効果が如何なるものか、詳細に述べた報告は少ない。また頭頸部がん粘表皮癌は、低悪性度腫瘍から高悪性腫瘍まで広く存在している。悪性度の違いを探る研究は積極的に行われているが、未だ確実なマーカーなどは存在しない。

今回我々は、舌根原発粘表皮癌症例に対し根治手術を行ったが、比較的早期に、原発部位とは離れた部位に再発を来した症例を経験した。初回時原発手術が施行可能であったこと、しかしながらこの症例では早期に、再発を来したことから、この症例は基礎的研究モデルとして有用な症例であったと考えられる。すなわち、初回時原発手術に比べ、再発時組織としての腫瘍は、初回時原発手術より、高悪性度であったと考えることも出来ると判断する。

院内 IRB の元、初回時原発手術標本だけでなく、再発時組織からもそれぞれ、細胞株を作成することが出来た。この両者を用いて、基礎的研究を詳細に行う事で、頭頸部希少癌の粘表皮癌に対し、新たなる知見を得ることが出来た。

これまで実地臨床では、粘表皮癌症例は従来の抗がん薬療法では無効であるとされてきた。今回の我々の検討で、細胞株における検討でも頭頸部癌抗がん薬療法に使用されるシスプラチン 5FU に対する、感受性は原発腫瘍摘出標本、再発時組織標本とも、低いことが示された。これはこれまでの臨床所見を裏付ける結果であった。頭頸部がん粘表皮癌症例に対し、積極的な抗がん薬療法の期待はあまり出来ない可能性が、基礎的研究からも裏付けられた。

一方、近年頭頸部がん治療に於いて、我が国でも標準的保険診療で用いられる、免疫チェックポイント阻害剤との関連性についても検討を行った。その結果、従来の抗がん薬療法では全く効果が期待されない頭頸部原発粘表皮癌であるが、ある条件下では免疫チェックポイント阻害剤が有用である可能性が示唆された。すなわち AMU-MEC1、AMU-MEC1-R1 では、共通して IFN $\gamma$ 、刺激により PD-L1 発現が増強することが示された。これは原発腫瘍摘出標本細胞株のみならず、再発時組織細胞株でも同様の結果であり、頭頸部原発粘表皮癌における、新たなる免疫治療の可能性を示唆するものと考えられる。

今後の頭頸部がん治療では、従来の抗がん薬療法のみならず免疫チェックポイント阻害剤の有用性が示唆されている。抗がん薬療法は患者自身の抗腫瘍免疫能を低下させている可能性もあり、今後の治療法選択では、抗がん薬療法を上手く組み合わせつつも、最善の免疫チェックポイント阻害剤の効果発揮を考えた、新しい免疫化学療法の開発が必要なことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Susumu, Ogawa Tetsuya, Sano Rui, Takahara Taishi, Inukai Daisuke, Akira Satou, Tsuchida Hiromi, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Tsuzuki Toyonori | 4. 巻<br>111               |
| 2. 論文標題<br>Immune checkpoint molecules on regulatory T cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers                             | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>1943 ~ 1957 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.14422   | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Ogawa Tetsuya, Nishimura Kunihiro, Takahashi Yasuhiro, Iwami Kenichiro, Yasumura Tsuneo, Yo Kinga, Okamoto Hiroki, Inukai Daisuke, Sano Rui, Watanabe Tadashi, Kakizaki Hirohiko | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>Incisionless facial resection for Kadish stage C olfactory neuroblastoma: Transcaruncular approach with combined endonasal and skull base surgery                               | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Case Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>1494 ~ 1501 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/ccr3.2906  | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Inukai D, Nishimura K, and Ogawa T.  | 4. 巻<br>82            |
| 2. 論文標題<br>Identification of cisplatin-resistant factor by integration of transcriptomic and proteomic data using head and neck carcinoma cell lines | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Nagoya J. Med. Sci.  | 6. 最初と最後の頁<br>519-531 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Inukai Daisuke, Kan Taichi, Yamanaka Shunpei, Okamoto Hiroki, Fujimoto Yasushi, Ito Takanori, Taniguchi Natsuki, Yamamoto Yuuki, Tsuzuki Toyonori, Takami Akiyoshi, Ogawa Tetsuya | 4. 巻<br>8                 |
| 2. 論文標題<br>Pathological and Virological Studies of p16-Positive Oropharyngeal Carcinoma with a Good Response to Neoadjuvant Chemotherapy  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Microorganisms  | 6. 最初と最後の頁<br>1497 ~ 1497 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/microorganisms8101497   | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sano R, Suzuki S, Ogawa T, Inukai D, Okamoto H, Takahara T, Satou A, Yoshikawa K, Tsuzuki T, Ueda R |
| 2. 発表標題<br>Characterization of immune-suppressive microenvironment in head & neck cancer.                      |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会.  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sano R, Suzuki S, Ogawa T, Inukai D, Okamoto H, Takahara T, Satou A, Yoshikawa K, Tsuzuki T, Ueda R   |
| 2. 発表標題<br>Multicolor analysis of characterization of immuno-suppressive microenvironment in head & neck cancer. |
| 3. 学会等名<br>6th Asian society of head and neck oncology. (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐野壘、岡本啓希、犬飼大輔、植田広海、小川徹也                       |
| 2. 発表標題<br>甲状腺癌での免疫抑制環境におけるeffector regulatory T cellの解析 |
| 3. 学会等名<br>第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会                        |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                        | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 吉川 和宏<br><br>(Kazuhiro Yoshikawa)<br><br>(60109759) | 愛知医科大学・公私立大学の部局等・特務教授<br><br><br><br>(33920) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|-------------------|---|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 鈴木 進<br><br>(Susumu Suzuki)<br><br>(70518422) | 愛知医科大学・公私立大学の部局等・准教授<br><br><br><br>(33920) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |