

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11878

研究課題名（和文）口腔癌における抗腫瘍免疫とリンパ節免疫環境の関連性

研究課題名（英文）Relationship between antitumor immunity and lymph node immune environment in oral cancer

研究代表者

川原 健太（Kawahara, Kenta）

熊本大学・病院・病院教員

研究者番号：90732735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔癌の術後検体を用い、リンパ節の免疫環境とがん組織中のリンパ節浸潤、その他の臨床病理学的因子との関連性を検討した。術前化学放射線療法を施行した口腔癌50症例のリンパ節をCD169で免疫染色したところ、全生存率、癌特異的生存率、無再発生存率においてCD169の高発現群で有意に予後良好であった。つまり所属リンパ節洞マクロファージのCD169発現が抗腫瘍免疫を反映し、予後予測に有用であることが示唆された。またCD169陽性マクロファージと原発腫瘍組織内のCD8陽性T細胞浸潤との相関を検討したところ、CD169陽性マクロファージが多い程、原発巣でのCD8の発現が有意に高い事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年頭頸部癌においても、ニボルマブやペンブロリズマブ等の免疫チェックポイント阻害剤の登場により抗腫瘍免疫に注目が集まっている。本研究は、主にリンパ節の免疫環境に注目した研究であり、口腔癌では本研究が初めてである。使用するリンパ節は、口腔癌手術時に病理検査に出すサンプルあるいはそのあまりの新鮮検体であり、比較的入手しやすいサンプルでもあり、今後の発展が期待できる。本研究は、がん患者の抗腫瘍免疫をモニタリングするための新たな免疫病理診断につながるものであり、またがん患者の予後予測や個別化治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the relationships between immune environment of lymph nodes, lymph nodes infiltration in cancer tissues, and other clinicopathological factors using postoperative specimens of oral cancer. Immunohistochemical staining of CD169 with lymph nodes in 50 cases of oral cancer who underwent preoperative chemoradiotherapy showed a significantly better prognosis in high CD169 expression group in overall, cancer-specific, and recurrence-free survival. It was suggested that the density of CD169-positive macrophages in regional lymph node was associated with antitumor immunity and might represent a useful for assessing clinical prognosis in patients with oral cancer.

Moreover, the correlations between CD169-positive macrophages and infiltration of CD8-positive T cells in the primary tumor tissue were examined. It was shown that the higher density of CD169-positive macrophages were associated with higher density of CD8-positive cytotoxic T cells within the tumor sites.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 腫瘍免疫 リンパ節マクロファージ CD169 CD8

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌における腫瘍免疫

がん患者には個人差があるものの、がん細胞に対する免疫反応が存在する。がん細胞を傷害する細胞にはキラーT細胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) と Natural killer (NK)細胞があるが、ヒトではCTLの方が優位と考えられている。我々は、これまで免疫療法にも注目した研究を行っており、ペプチドがんワクチンの臨床試験では、LY6K, CDCA1, IMP3の合成ペプチドを末期口腔癌患者に免疫することで、生存期間の延長(対照群では3.5ヶ月を4.9ヶ月に延長)することに成功している(Clin Cancer Res. 2015;21:312-21)。しかしながら、ワクチンが劇的な効果をあげる症例や対照的に殆ど効果の無い症例があり、癌患者の抗腫瘍免疫のポテンシャルを評価する免疫モニタリング系の確立が必要である。同様のことは最近話題の免疫チェックポイント阻害剤の使用にもいわれていることである。がんに対する免疫反応を評価する方法として、腫瘍組織内のリンパ球浸潤を病的に評価する方法があるが、検索した限りでは口腔癌において組織中のリンパ球と臨床予後の関連性で再現性のあるデータはない。

(2) 免疫におけるリンパ節の重要性

リンパ節には樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞が存在しており、リンパ球への抗原提示を通して免疫反応の誘導に関わっている。リンパ節の辺縁部から髄質に存在するリンパ洞には多数のマクロファージが存在しており、一方でリンパ濾胞内には多数の樹状細胞が存在する。リンパ管を通じて流入した癌死細胞などの大きな腫瘍抗原はリンパ洞のマクロファージに貪食される。リンパ洞を通過した小さな腫瘍抗原は樹状細胞に取り込まれ、それぞれがリンパ球に抗原提示を行う。これまでがん免疫においては樹状細胞のみが注目されてきたが、リンパ洞マクロファージの抗原提示細胞としての重要性が指摘されつつある。

(3) 抗腫瘍免疫の誘導とリンパ節の炎症性(M1)マクロファージ

マクロファージは存在する臓器の微小環境・炎症状態により様々な活性化状態に変化する。例えば、細菌感染により炎症が惹起されると血液中の単球が感染部位に動員されマクロファージに分化する。その際、細菌由来成分に暴露されると炎症性分子を多く産生し、対照的に抗炎症性因子の産生は少ない。また、創傷治癒部位や腫瘍組織などでは、低酸素環境や腫瘍由来分子により抗炎症性因子を多量に産生し、炎症性分子の産生は少ない。前者は炎症性(M1)、後者は抗炎症性(M2)マクロファージとそれぞれ呼称されている。腫瘍組織内のマクロファージはM2であるのに対して、リンパ節のマクロファージはM1の性質を有している。共同研究者である当大学病理学の菰原らは、大腸癌や黒色腫、子宮体癌においてリンパ節においてM1マーカーであるCD169を発現するマクロファージが多い症例ほどがん組織へのCTL浸潤が多く、予後が良いことを見出した(Cancer Immunol Res. 2015;3:1356-63)。口腔癌においてもリンパ節CD169陽性M1マクロファージががん患者の抗腫瘍免疫を反映していることが示唆される。

2. 研究の目的

近年、がんに対する免疫療法への期待が高まっているが、そのためには患者個人の免疫能を的確に評価する免疫モニタリング法の確立が重要な課題である。現在、がん免疫の評価としてはがん組織中の浸潤リンパ球数の評価が一般的であり、リンパ球浸潤が多い症例ほど免疫療法に対する反応性も良いことが知られている。一方で、がん免疫の誘導に関わる器官はリンパ節であるが、口腔癌患者のリンパ節に注目した研究はない。近年、大腸癌や黒色腫ではリンパ節における免疫環境が宿主の抗腫瘍免疫の誘導に関わることが指摘されている。本研究では、口腔癌の術後検体を用い、リンパ節の免疫環境とがん組織中のリンパ球浸潤、その他の臨床病理学的因子との関連性を検討し、リンパ節サンプルを用いたがん免疫病理診断法の確立を目指したい。

3. 研究の方法

口腔癌原発巣と所属リンパ節の病理検体を用いて、様々な免疫細胞やマクロファージのフェノタイプを免疫染色にて解析し、臨床病理学的諸因子との関連性を検討する。特に、原発巣へのリンパ球浸潤とリンパ節の免疫細胞の関連性に注目する。新鮮リンパ節検体を用いて、フローサイトメトリーや網羅的発現遺伝子解析を加え、リンパ節免疫細胞の更なる解析を行う。現在は、リンパ節のCD169陽性マクロファージががん患者の抗腫瘍免疫状態を反映しているマーカーと考えているが、CD169よりも腫瘍組織内のリンパ球浸潤や治療反応性、臨床予後などと関連する分子を見出したい。術後の所属リンパ節検体を用いて、がん患者の抗腫瘍免疫を評価・予測できる免疫病理診断法としての確立を目指す。

(1) 口腔癌組織における免疫細胞(T細胞、B細胞、マクロファージ、制御性T細胞)の解析

口腔扁平上皮癌の症例に関しては我々が以前研究(APMIS.2015;123:205-14)に用いた症例に最近の症例を加え約100症例の使用を目指す。手術あるいは生検(術前治療有りの場合)

のパラフィン包埋サンプルを使用する。T細胞のマーカーとしてCD3・CD8、B細胞のマーカーとしてCD20、マクロファージのマーカーとしてCD68(汎マクロファージ)・CD163(M2マクロファージ)、制御性T細胞のマーカーとしてFOXP3を使用する。それぞれのマーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行う。

腫瘍巣内あるいは間質に浸潤したそれぞれの細胞数をカウントし、年齢や性別、原発部位、T-stage、リンパ節転移、臨床病期、組織学的分化度、浸潤様式、治療効果、無再発生存率、全生存率など臨床病理学的因子との相関性を検討する。

(2) リンパ節検体における免疫細胞(T細胞、B細胞、マクロファージ、制御性T細胞)の解析

(1)で用いた症例の多くは手術時にリンパ節が採取されており、パラフィン包埋されている。(1)と同様に、それぞれのマーカーに対する抗体を用いて免疫染色を行い、リンパ節におけるT細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞、制御性T細胞の数を評価する。マクロファージのマーカーとしてはCD68・CD169を用いる。

臨床病理学的因子との相関性を検討すると同時に、原発腫瘍組織内の免疫細胞数との相関性も検討する。可能であれば口内炎の有無とリンパ節免疫環境との関連性についても検討を加える。

(3) リンパ節新鮮サンプル(病理診断に提出した残り)を用いた免疫環境解析

径1cmを越えるようなリンパ節が採取された場合に、半分を病理組織検査に提出し、残りのサンプルを研究に使用する。リンパ節をRPMI培地に入れて4℃保存(24時間以内に解析)しておく。リンパ節細胞をメッシュを用いてバラバラにし、細胞を様々な表面マーカーに対する抗体を用いて、フローサイトメトリーを行う。

これまで述べたようにリンパ節マクロファージにおけるCD169には個人差が認められる。CD169の個人差と表面マーカーの違いに変化があるかどうかも検討する。また口内炎の有無とリンパ節免疫環境との関連性についても検討を加え、臨床にフィードバックする。

4. 研究成果

(1) 口腔癌扁平上皮癌のリンパ節におけるCD169の発現解析

<対象と方法>

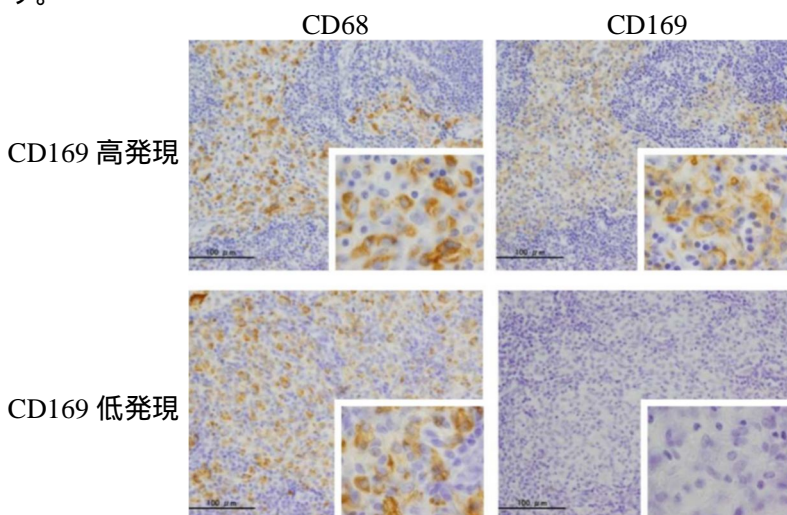
対象：術前化学放射線療法(S-1:14日間連続内服+放射線照射2Gy/day計30Gy)後に根治的手術を施行した口腔扁平上皮癌患者53例

サンプル：術前化学放射線治療後の切除検体(原発検体、非転移リンパ節検体)。非転移リンパ節とは、頸部転移症例における転移リンパ節の下流に存在するリンパ節検体および、頸部非転移症例における所属リンパ節検体(センチネル)を意味する。

方法：免疫組織化学染色でCD169発現の評価、臨床的意義を検討した。

結果；

すべての標本でリンパ節洞にはマクロファージが一定の密度で存在し、洞マクロファージには汎マクロファージのマーカーであるCD68が陽性であった。CD169の発現強度は症例によってばらつきがあった。CD169陽性細胞が多い症例と少ない症例の典型例を図1に示す。



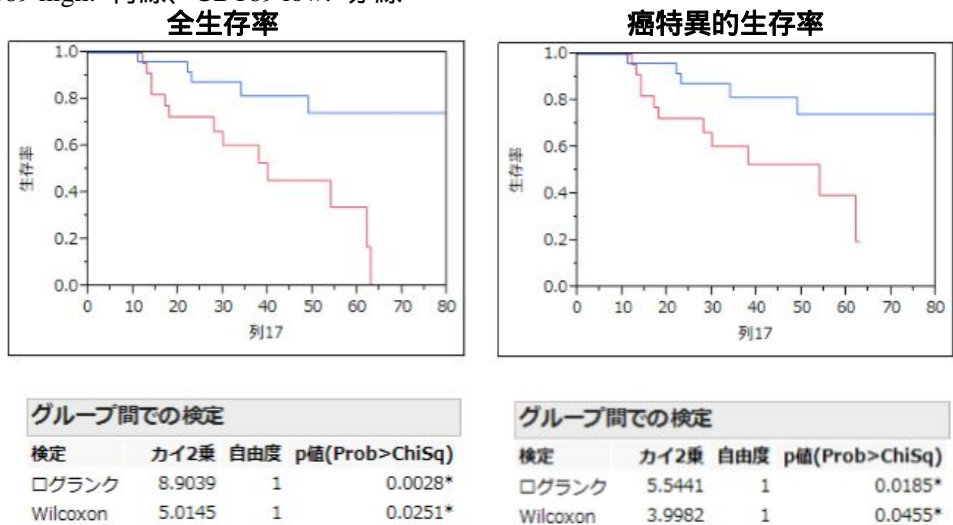
<図1>

そこで口腔扁平上皮癌患者53例の臨床病理組織学的特徴とCD169発現に関する単変量解析を行ったところ、年齢、性別、腫瘍の分化度、T-stage、転移リンパ節の有無とは相関を認めなかった。

結果；

次にリンパ節洞マクロファージのマーカー発現(CD169)と全生存率、癌特異的生存率との相関の有無について解析を行った。その結果、CD169高発現群では全生存率、癌特異的生存率において有意に長期の生存を保っていた(図2)。多変量解析においても全生存率でCD169

が独立した予後因子であった(図 3)。
 CD169 high: 青線、CD169 low: 赤線



< 図 2 >

Variables	Assigned Score	OS	
		Hazard ratio (95% CI)	P
CD169 expression			
High	0		
Low	1	3.944 (1.346 – 13.655)	0.00116*
Age			
< 70	0		
≥ 70	1	0.714 (0.190 – 2.509)	0.601
Sex			
Male	0		
Female	1	0.764 (0.232 – 2.366)	0.642
T stage			
T 1,2	0		
T 3,4	1	0.919 (0.279 – 3.036)	0.889
LN metastasis			
absent	0		
present	1	1.954 (0.684 – 5.884)	0.209
Differentiation			
Well	0		
Moderate, poor	1	1.610 (0.472 – 4.986)	0.426

Abbreviations: CI=confidence interval. *p < 0.05, **p < 0.01.

< 図 3 >

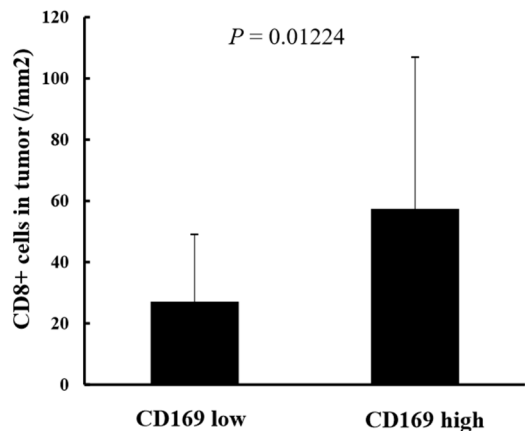
(2) 口腔癌扁平上皮癌の原発巣における CD8 および PD-L1 の発現解析

サンプル: 術前化学放射線治療後の切除検体(原発巣)。

方法: 免疫組織化学染色で CD8 および PD-L1 発現の評価ならびに CD169 との関連性を評価した。

結果 ;

原発巣腫瘍組織内 CD8 陽性 CTLs 浸潤と CD169 陽性細胞数との関連を統計学的に解析したところ、CD169 高発現群では CD8 陽性 CTL 浸潤と正の相関を示した(図 4)。



< 図 4 >

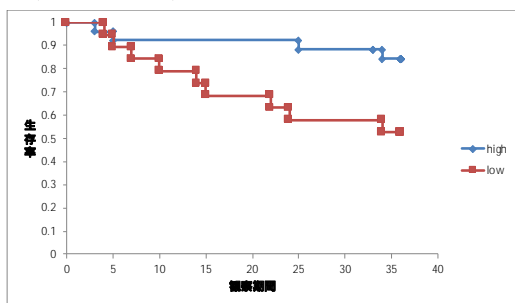
結果 ; しながら原発巣腫瘍組織内 PD-L1 の発現と CD169 陽性洞マクロファージには明らかな相関は認めず、また予後との相関も認めなかった。

(3) 口腔癌扁平上皮癌のリンパ節における CD169 の発現解析

サンプル : 初回治療で手術を行った切除検体 46 例(原発検体、非転移リンパ節検体)。

結果 ;

術前化学放射線療法を施行した症例と同様に CD169 陽性細胞が多い症例と少ない症例を認め、その結果、CD169 高発現群では全生存率において有意に長期の生存を保っていた(図 5)



< 図 5 >

これらの結果より、口腔扁平上皮癌においても CD169 陽性洞マクロファージと CD8 陽性 CTL は正の相関を示し、種々の癌腫で報告されているように、所属リンパ節の CD169 陽性洞マクロファージは CD8 陽性 CTL を活性化して抗腫瘍免疫を活性化している可能性が示唆された。また CD169 の発現が患者の予後予測ツールになり得る可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hikaru Nakashima	4. 巻 41
2. 論文標題 Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tumour Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Junki Sakata	4. 巻 76
2. 論文標題 Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human PATHOLOGY	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Junki Sakata	4. 巻 20
2. 論文標題 HMGA2 contributes to distant metastasis and poor prognosis by promoting angiogenesis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenta Kawahara
2. 発表標題 Overexpression of miR-30a confers 5-FU resistance by inhibiting cell proliferation through targeting cyclin E2 in oral cancer.
3. 学会等名 23rd International Symposium on Molecular Medicine（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川原 健太
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるmiR-30aはcyclin E2を介して5-FU耐性に寄与する
3. 学会等名 第62回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 遼司 (Yoshida Ryoji) (10632458)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	中山 秀樹 (Nakayama Hideki) (70381001)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	