

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09310

研究課題名(和文) 頭頸部癌に対するCD70を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of CD70-targeted therapies for head and neck cancers

研究代表者

長門 利純(NAGATO, Toshihiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：80431419

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)：各種頭頸部癌細胞株を用いた解析から、上咽頭癌細胞株の細胞表面にCD70が発現していることが明らかとなった。上咽頭癌患者組織を用いた検討では、腫瘍細胞にCD70の発現を認めるとともに、腫瘍周囲に浸潤しているリンパ球にCD27の発現を認めた。組織中のCD70発現とEBウイルス感染の間に有意な相関が認められた。また、上咽頭癌患者血清中に可溶性CD27の発現を認めるとともに、健常人と比較して有意に高値を示した。以上より、上咽頭癌においてEBウイルスが腫瘍細胞のCD70発現に関与している可能性と腫瘍細胞がCD70/CD27経路を介して周囲のリンパ球に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者組織を用いた詳細な検討により、CD70が上咽頭癌の新しい治療標的分子となる可能性が明らかとなった。また、症例を増やした更なる検討が必要ではあるが、上咽頭癌患者血清中の可溶性CD27がバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞のCD70発現にEBウイルスの関与が示されたことから、CD70が上咽頭癌以外のEBウイルス関連腫瘍に対しても治療標的分子となる可能性があり、癌研究・治療全体への学術的・社会的貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We detected the expression of CD70 on the surface of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines. Immunohistological staining of biopsy samples from NPC patients showed that CD70 was found on malignant cells, while CD27-positive mononuclear cells infiltrated the tumor tissues. CD70 expression in malignant cells of tumor tissues significantly correlated with Epstein-Barr virus infection. Furthermore, soluble CD27 was present in sera of NPC patients at higher levels as compared to healthy individuals. These results suggest that the CD70/CD27 pathway may be an important factor in the development of NPC.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

キーワード：CD70 CD27 頭頸部癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌の治療は手術療法、化学療法、放射線療法の単独または併用が標準治療であった。近年、第4の治療としてEGFRに対する分子標的薬が追加され、一定の効果を示しているが満足のいく治療成績には至っていない。また、第5の治療である免疫療法として、2017年3月から本邦でも免疫チェックポイント分子阻害剤の抗PD-1抗体が適応となり、今までにない治療効果が確認されているが、有効な患者は10~20%と限られている。したがって、頭頸部癌に対する新しい分子標的薬もしくは免疫療法の開発は急務である。

(2) 正常組織にほとんど発現せず、腫瘍細胞に強発現しており、かつ、免疫系を抑制する分子は、殺傷性(補体依存性細胞傷害(CDC)や抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性)と中和性を有した抗体を用いることにより、腫瘍細胞を直接殺傷し、かつ、免疫抑制を解除することによって腫瘍免疫系を賦活して間接的にも殺傷することができる可能性がある。CD70は正常組織では一部の活性化T細胞やB細胞に発現しているのみで、その他の組織ではほとんど発現が認められない。さらに、免疫担当細胞に発現しているCD27との相互作用により免疫系を抑制するという報告も多く、仮に頭頸部癌細胞にCD70が高発現していれば、分子標的薬、もしくは免疫関連分子阻害薬の標的分子として非常に魅力的である。

2. 研究の目的

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌などの頭頸部癌細胞株および臨床検体におけるCD70とそのレセプターであるCD27の発現を検討する。

(2) CD70が抗体などの分子標的薬の標的分子となり得るかを明らかにする。

(3) CD70/CD27経路が免疫関連分子として果たす機能的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌などの頭頸部癌細胞株における細胞表面のCD70およびCD27の発現をフローサイトメトリーで解析する。

(2) 頭頸部癌患者の生検・手術組織材料を用いて、免疫組織化学染色により腫瘍細胞のCD70発現、腫瘍組織内浸潤リンパ球のCD27発現を検討する。また、年齢、性別、病期、ウイルス感染の有無といった各種臨床関連因子とCD70/CD27発現の関連を統計学的に明らかにする。

(3) 頭頸部癌患者血清と健常人血清を用いて可溶性CD27値をELISAにて測定・比較する。さらに、患者の各種臨床関連因子や組織内CD70発現量と血清可溶性CD27値の関連を統計学的に明らかにする。

(4) 免疫不全マウスにヒトCD70陽性頭頸部癌細胞株を皮下移植しXenograftモデルを作製するとともに、CD70に対するヒト化抗体を投与して抗腫瘍効果を明らかにする。

(5) マウス癌細胞株における細胞表面のCD70発現をフローサイトメトリーで解析する。マウスCD70陽性癌細胞株を野生型マウスに皮下移植し、マウスCD70やマウスCD27に対する中和抗体を投与して抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) 咽頭癌、喉頭癌、舌口腔癌、甲状腺癌を含む各種頭頸部癌細胞株を国内外の細胞バンクから購入、または学内外の研究者から可能な限り分与して頂き、細胞表面におけるCD70の発現をフローサイトメトリーにて解析した。また、ウイルス感染とCD70発現の関連を検討するために、Epstein-Barr(EB)ウイルスまたはヒトパピローウイルス陽性の頭頸部癌細胞株も入手して、解析に含めた。さらに、頭頸部癌とそれ以外の癌におけるCD70の発現の違いを明らかにする目的で、肺癌、乳癌、肝癌、胃癌、大腸癌、腎癌、膀胱癌の細胞株におけるCD70発現もあわせて解析した。その結果、上咽頭癌細胞株において、細胞表面上にCD70が強く発現していることが明らかとなった。一方、CD70のレセプターであるCD27に関しては、解析したすべての細胞株において細胞表面上に発現を認めなかった。

(2) 上咽頭癌細胞株でCD70の発現を認めたことから、上咽頭癌患者生検組織におけるCD70の発現を検討したところ、71%の患者で腫瘍細胞に発現を認めた。また、78%の患者で腫瘍周囲に浸潤しているリンパ球にCD27の発現を認めた。CD70およびCD27の発現と各種臨床因子との関連を統計学的に解析したところ、両者ともEBウイルス感染と有意な相関が認められた。さら

に、CD70 発現と CD27 発現の間にも有意な相関を認めた。

われわれは以前の研究で、頭頸部領域に初発することが多い EB ウイルス関連腫瘍である鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の腫瘍細胞に CD70 が高発現していることを報告したが(文献) 患者組織における CD27 の発現に関しては未検討であった。そこで、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者の生検組織材料を用いて免疫組織化学染色により CD27 の発現を調べたところ、上咽頭癌と同様に腫瘍周囲に浸潤しているリンパ球に CD27 が発現していることが明らかとなった。

(3) CD70 と CD27 の結合の結果、CD27 陽性細胞から可溶性 CD27 が分泌されるとの報告があるため、上咽頭癌患者血清と健常人血清を用いて可溶性 CD27 値を測定した。その結果、患者血清中に可溶性 CD27 の発現を認めるとともに、健常人と比較して有意に高値を示した。さらに、組織中の CD70 と CD27 の両方が陽性の患者群は、それ以外の患者群と比較して血清中の可溶性 CD27 値が有意に高かった。

以前の研究で、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫患者血清中に可溶性 CD27 の発現が認められ、健常人と比較して有意に高値を示すことを報告したが(文献) 検体数が患者 8 名、健常人 7 名と少なかったため、患者を 19 名、健常人を 23 名と増やし再検討を行った。その結果、患者血清中の可溶性 CD27 値は健常人血清中よりも有意に高いことが再確認された。また、治療前と治療後の患者血清を用いて可溶性 CD27 値を比較したところ、治療後に有意に低下することが明らかとなった。

(4) CD70 陽性上咽頭癌細胞株を免疫不全マウスである SCID マウスに皮下移植して異種移植モデルを作製した。皮下に形成された腫瘍における CD70 発現を検討したところ、腫瘍の細胞膜に発現を認めた。

また、CD70 陽性鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株を免疫不全マウスである NOG マウスに皮下移植して異種移植モデルを作製した。皮下に形成された腫瘍における CD70 発現を検討したところ、腫瘍の細胞膜に発現を認めた。

(5) 複数のマウス扁平上皮癌細胞株でマウス CD70 の発現を調べたが、細胞表面上に発現は認められなかった。一方、マウスリンパ腫細胞株である A20 の細胞表面上に CD70 が発現していることが報告されており、われわれの検討でも A20 の細胞表面上に CD70 が発現していることが確かめられた。

(6) 上記の結果から、上咽頭癌において、EB ウイルスが腫瘍細胞の CD70 発現に関与している可能性と、腫瘍細胞が CD70/CD27 経路を介して周囲のリンパ球に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、上咽頭癌と同じ EB ウイルス関連腫瘍である鼻性 NK/T 細胞リンパ腫においても、腫瘍内リンパ球が CD27 を発現しているとともに、治療前に高値であった血清中の可溶性 CD27 が治療後に低下することから、CD70/CD27 経路が腫瘍進展に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

今後は、上咽頭癌患者の組織を用いて二重免疫染色を行うことにより、CD27 陽性のリンパ球分画を詳細に検討する予定である。また、CD70 に対するヒト化抗体を異種移植マウスに投与して抗腫瘍効果を検討するとともに、腫瘍細胞の CD70 発現が周囲に浸潤するリンパ球にどのような影響を与えるのかを A20 細胞を移植した野生型マウスモデルを用いて詳細に解析することで、上咽頭癌に対する CD70 を標的とした新規治療法開発を目指して研究を継続していく予定である。さらに、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫についても同様の検討を行うことで、EB ウイルス関連腫瘍全体に対する新規知見の提供および新規治療法の開発に貢献できると考えている。

<参考文献>

Yoshino K, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Komabayashi Y, Takahara M, Harabuchi Y. Expression of CD70 in nasal natural killer/T cell lymphoma cell lines and patients; its role for cell proliferation through binding to soluble CD27. Br J Haematol. 2013;160(3):331-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、原淵翔平、永田真莉乃、大原賢三、大原みずほ、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、小林博也
2. 発表標題 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるCD27の発現
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagato T, Hayashi R, Harabuchi S, Kumai T, Kishibe K, Takahara M, Nagata M, Yajima Y, Kosaka A, Ohkuri T, Oikawa K, Harabuchi Y, Kobayashi H
2. 発表標題 Expression of CD27 and its soluble form in nasal natural killer/T-cell lymphoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、原淵翔平、野崎 結、大原賢三、熊井琢美、岸部 幹、高原 幹、永田真莉乃、大原みずほ、大栗敬幸、小坂 朱、青木直子、及川賢輔、小林博也、原淵保明
2. 発表標題 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるCD27の発現
3. 学会等名 第15回EBウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、原淵翔平、野崎 結、大原賢三、熊井琢美、岸部 幹、高原 幹、小林博也、原淵保明
2. 発表標題 鼻性NK/T細胞リンパ腫におけるCD27の発現
3. 学会等名 第37回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、原淵翔平、永田真莉乃、矢島優己、小坂 朱、大栗敬幸、野崎 結、大原賢三、熊井琢美、岸部 幹、高原 幹、及川賢輔、原淵保明、小林博也
2. 発表標題 上咽頭癌におけるCD70およびCD27の発現解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、永田真莉乃、矢島優己、安田俊輔、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、原淵保明、小林博也
2. 発表標題 上咽頭癌におけるCD70およびCD27の発現解析
3. 学会等名 第53回北海道病理談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長門利純、林 隆介、永田真莉乃、矢島優己、安田俊輔、小坂 朱、大栗敬幸、及川賢輔、原淵保明、小林博也
2. 発表標題 上咽頭癌におけるCD70およびCD27の発現解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------