

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09347

研究課題名(和文) 頭頸部癌における骨髄由来抑制細胞とアデノシン代謝

研究課題名(英文) Adenosine regulates myeloid cells in head and neck cancer

研究代表者

井之口 豪 (INOKUCHI, GO)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10457046

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)：頭頸部扁平上皮癌におけるアデノシン代謝の役割について検討を行った。頭頸部癌においてはCD39やCD73などのエクトエンザイムの発現が更新しており、細胞外アデノシンの分泌に関与している。その結果、腫瘍微小環境における腫瘍免疫を抑制することに繋がっていると考えられる。本研究により、腫瘍におけるMDSC(骨髄由来抑制細胞)が主に細胞外アデノシンの供給源であり、活発な糖代謝を行っていることが判明した。腫瘍環境におけるCD73の阻害やCD73陽性細胞の糖代謝を阻害するなど方法により、腫瘍環境を変化させ、がん免疫療法の治療効果を向上させることができる可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌は予後不良な疾患であり、抗がん剤や放射線などが奏功しないことも多い疾患である。陰性者今回の研究により、その一因であると推測されている細胞外アデノシンを分泌している骨髄由来抑制細胞の種類や作用について一端が明らかになった。予後が良好とされるHPV陽性者と比較して、HPV陰性者では、この骨髄由来抑制細胞が活発に働いていることが判明した。頭頸部腫瘍における免疫を抑制している原因を取り除く、抑制するなどの手法により、頭頸部癌治療の抗がん剤や放射線治療の効果を高められる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of adenosine metabolism in head and neck squamous carcinoma. Ecto-Enzyme like CD73 and CD39 which is upregulated in head and neck cancer excrete extracellular adenosine in the tumor microenvironment. Tumor immunity is suppressed from this adenosine in the end. Our study revealed that myeloid derived suppressor cells played the major supplier of adenosine and uptake glucose actively in the tumor. By regulating the CD73 or CD73 glucose metabolism in the tumor microenvironment, we might change the tumor environment and improve the anti-tumor immunity in head and neck cancer.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：頭頸部癌 アデノシン代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌に対する免疫療法は奏功すると長期予後が見込めるが、頭頸部癌においては他の腫瘍と比較して、免疫療法の奏効率が低いことが問題となっている。頭頸部扁平上皮癌の組織中では骨髓由来細胞の増殖が多くみられ、腫瘍の増殖及び免疫抑制に関与していると考えられている。これらの骨髓由来細胞は骨髓由来抑制細胞 (MDSC) と呼ばれているが、腫瘍環境におけるその免疫作用機序については明らかではない。本研究ではヒト扁平上皮癌組織中に存在する MDSC がアデノシン代謝を通じて腫瘍免疫を抑制しているのではないかと仮説を立てた。

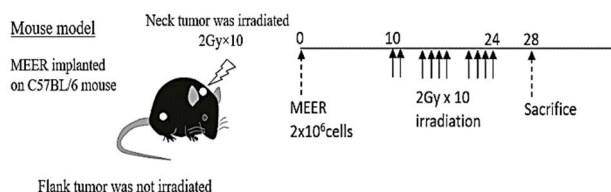
(2) 細胞外アデノシンは CD73 や CD39 などのエクトエンドザイムによって、AMP から産生される。CD73 は膵癌や胃癌、肺癌など、いくつかの腫瘍では予後不良因子とされているが、頭頸部癌における位置づけについてはまだ確立しておらず、免疫組織学的に CD73 の発現が予後不良因子と報告されているのみである (Oncotarget 2016 20;7:61690-61702)。また腫瘍組織内のどの細胞やどのエクトエンドザイムが細胞外アデノシンを産生しているかは明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト扁平上皮癌組織中の MDSC について解析し、アデノシン産生を通じた腫瘍免疫の抑制メカニズムについて明らかにすることである。MDSC にはアデノシン受容体として、A2A, A2B の発現がしており、細胞外アデノシンを産生する CD39/CD73 の膜結合型酵素の発現も認められる。MDSC は自らアデノシンを産生し、アデノシンシグナルを受け取ることでよりその抑制能を強化していると仮定した。癌組織におけるアデノシン代謝についてはいくつかの報告があるが、CD73 を発現していない癌 (マウスメラノーマの B16F10 など) も知られており、組織型に左右される点が多い。今回、我々は MDSC のアデノシン代謝に注目し、その制御によって MDSC の機能を改変することで、新たな治療に結び付けていくことを目的とした。

3. 研究の方法

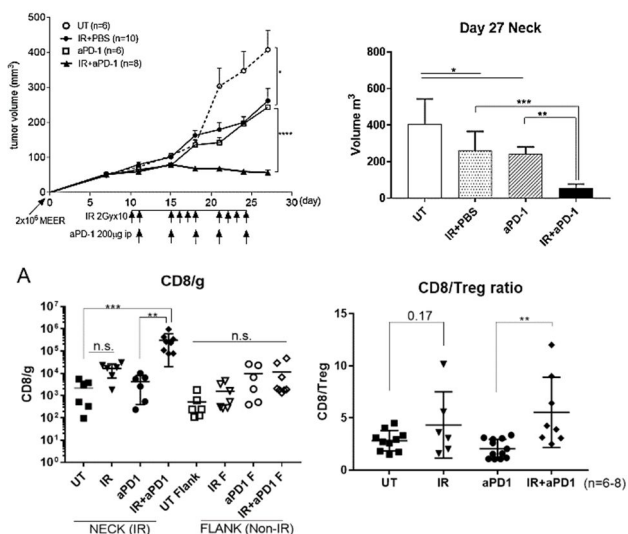
(1) 治療によりアデノシン代謝への影響を調べるため、マウスモデルを用いる。マウスの頸部皮下および側腹部に頭頸部扁平上皮癌細胞株 (CD73 陽性) およびメラノーマ細胞株 (CD73 陰性) を注射し、皮下腫瘍モデルを作成する。抗 PD-1 抗体による治療および頸部の腫瘍への放射線照射を行い、腫瘍-体積曲線を作成する。治療終了後に腫瘍を採取し、腫瘍内の MDSC におけるアデノシン代謝について解析を行う。



(2) 手術時あるいは生検時に腫瘍から採取した標本と末梢血 (PBL) を用いて、腫瘍及び血液中に存在する免疫細胞を単離し、ヒト扁平上皮癌における MDSC の表現型、頻度について同定する。Ficoll 濃度勾配法により血液から Polymorphonuclear cells を採取する。フローサイトメトリーにおいて骨髓系マーカーの組み合わせにより、血液中および癌組織中の MDSC を同定し、アデノシン代謝に関わるエクトエンドザイムおよびその代謝マーカーについて解析する。

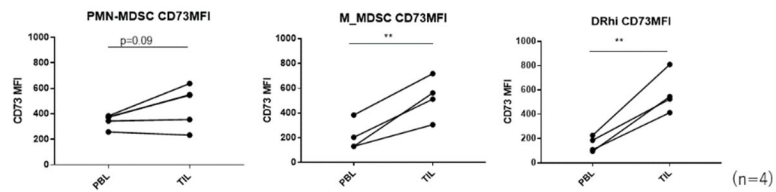
4. 研究成果

(1) 頸部に播種した腫瘍細胞に対して、UT (未治療)、IR (放射線単独)、aPD-1 抗体、IR+aPD-1 の 4 群にわけて、治療効果について検討した。その結果、右図の腫瘍-体積曲線が得られ、併用療法の効果が高いことが明らかとなった。放射線治療を行っていない側腹部腫瘍に対する Abscopal 効果については、腫瘍の縮小傾向は認められるものの、このモデルでは有意差を認めなかった。腫瘍内の抗腫瘍免疫の指標として、CD8/g と CD8/Treg の 2 つを用いて解析したところ、IR + aPD-1 の併用療法が最も抗腫瘍免疫を最も活性化しているという、腫瘍-体積曲線と合致する結果が得られた。CD73 の発現は骨髓抑制細胞と腫瘍の両方に認められ、放射線により CD73 の発現がさらに亢進することが明らかになった。

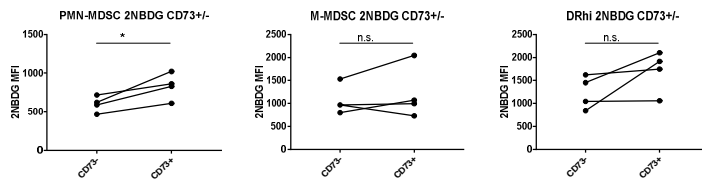


(2) 手術検体の解析では、Polymorphonuclear (PMN)、Myeloid、HLA-DRhi の3つに分けて MDSC の解析を行った。

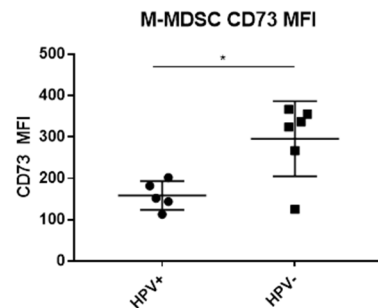
PBL と腫瘍内 (TIL) との比較では、腫瘍内の方が CD73 の発現が亢進しており、腫瘍環境の影響によって MDSC のアデノシン産生能が亢進していることが示唆された。



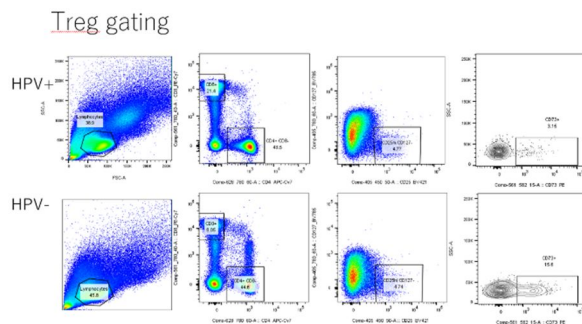
(3) 腫瘍環境がアデノシン産生に及ぼしていると仮定し、腫瘍内におけるグルコース代謝を 2NBDG で、ミトコンドリア代謝を MitoTracker による取り込みで評価した。その結果、PMN-MDSC では CD73 陽性細胞で 2NBDG の取り込みが亢進していることが確認されたが、M-MDSC や HLA-DRhi では明らかな差は認めなかった。PBMC を低グルコース、低酸素などの疑似腫瘍環境下で培養し、CD73 やアデノシン産生に変化があるかどうかを調べたが、環境変化による明らかな違いは検出できなかった。



(4) 凍結保存されていた HPV 陽性者、陰性者の血液を用いて、CD73 の発現について検討した。HPV 陽性者の頭頸部扁平上皮癌は免疫原性が高く、放射線や抗がん剤が奏功し、生命予後もよいことが知られている。HPV 陽性者では免疫抑制に関わる CD73 の発現が低値であり、HPV 陰性者は逆に高い発現を認めた。同時に行った Treg の解析では、HPV 陽性者の Treg には CD73 の発現が低く、HPV 陰性者では CD73 の発現が高いことが分かった。以上より、免疫原性の低い腫瘍では M-MDSC と Treg 両方の CD73 の発現が高く、腫瘍免疫を抑制することで結果として免疫原性が低下している可能性が示唆された。



(5) MDSC はヒトにおける Phenotype マーカーが確立しておらず、本研究においては CD11b, CD14, CD15, HLA-DR を用いた。近年、頭頸部癌に対してはトランスクリプトーム解析を用いた CD73 のクラスター解析と予後調査が行われ、CD73 は頭頸部扁平上皮癌において予後不良を示唆する指標となることが報告された (Front Immunol. 2022 Nov 16;13:969034. doi: 10.3389/fimmu.2022.969034. eCollection 2022.) この研究では CD73 の遺伝子発現量を細胞腫



別に比較しているが、線維芽細胞、上皮細胞、腫瘍、その他の順に CD73 の発現量が高値となっている。線維芽細胞は種々の細胞から分化するが、Monocytes や macrophages 等の骨髄系細胞からも脱分化して生じるとされており、本研究で Monocytic マーカーとして用いた CD14 は線維芽細胞でも陽性となるとされており (Arch Med Sci. 2021, <https://doi.org/10.5114/aoms/131088>), 本研究で調査していた MDSC は線維芽細胞を含んでいた可能性がある。

<引用文献>

井之口豪、丹生 健一、頭頸部 HPV 陽性扁平上皮癌マウスモデルにおける放射線分割照射と抗 PD-1 抗体併用療法の効果、耳鼻咽喉科免疫アレルギー 37 巻 2 号、2019、70-71

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井之口 豪
2. 発表標題 頭頸部HPV陽性扁平上皮癌マウスモデルにおける放射線分割照射と抗PD-1抗体併用療法の効果
3. 学会等名 第13回頭頸部癌基礎研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 井之口 豪
2. 発表標題 頭頸部HPV陽性扁平上皮癌マウスモデルにおける放射線分割照射と抗PD-1抗体併用療法の効果
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～2020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
---------	---------