

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09355

研究課題名(和文) 頭頸部癌幹細胞に対する宿主免疫応答

研究課題名(英文) Host Immunity for Head and Neck Cancer Stem Cells

研究代表者

西野 宏 (NISHINO, HIROSHI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50245057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD44<sup>rich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>がん細胞は静止期の細胞周期にある。がん組織に浸潤したリンパ球の多くががん細胞を攻撃した形跡がある。なぜならば多くのリンパ球がCD39<sup>rich</sup>の活性化されたリンパ球であったからである。そのリンパ球はFoxp3<sup>rich</sup>など免疫抑制系のリンパ球であり、がん細胞を攻撃し疲弊したリンパ球であることがわかった。しかしCD44<sup>rich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>がん細胞を多く認める癌組織中ではCD39<sup>rich</sup>Foxp3<sup>rich</sup>の浸潤リンパ球は少ない。CD44<sup>rich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞は宿主免疫脳から逃避している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

担がん宿主免疫より逃避する機序の解明につながる。免疫チェックポイント阻害薬を投与しても担がん宿主免疫能より逃避する機序が残存している場合には効果が期待できない。宿主免疫より逃避する機序の解明に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were observed CD39. That was showed those TILs attacked cancer cells. And TIL were also observed Foxp3. That means those TILs were exhausted after attacking cancer cells. CD44<sup>rich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup> cancer cells were thought as cancer stem cells of head and neck cancer. When CD44<sup>rich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup> cancer cells were rich in tumor, CD39<sup>rich</sup>Foxp3<sup>rich</sup> TILs were poor in the macro environment cancer tissue.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：ALDH1A1 CD39 Foxp3

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療において手術、放射線照射、抗癌薬、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬と多くの選択が存在する。しかし全生存率が飛躍的に改善したわけではない。その理由の一つが癌幹細胞の存在とされている。癌幹細胞は細胞周期が静止期にあり、抗癌薬と放射線治療の効果が期待できない。そのため多くの癌細胞が抗癌薬や放射線照射で死滅しても、癌幹細胞は生存し遺残する。遺残した癌幹細胞は、癌細胞を萌出させ分裂増殖を開始し、再発病巣を形成する。しかしここで一つの疑問が発生する。上記のように治療抵抗性であっても担癌宿主の免疫機構により同定されれば、宿主免疫機構により癌幹細胞は排除されてしまうはずである。排除されず生存している事実を考えると、担癌宿主免疫機構より逃避している可能性がある。詳細不明な頭頸部癌幹細胞を同定し、さらに担癌宿主免疫能より逃避する機序を解明したい。

## 2. 研究の目的

宿主がん免疫を回避する機序の解明に癌幹細胞の免疫逃避に注目している。多くの癌種の癌幹細胞の表面にはCD133が発現していると報告される。頭頸部癌幹細胞においてはCD44<sup>rich</sup>CD133<sup>rich</sup>発現が癌幹細胞の表面マーカーの候補として報告されている。本研究の目的はⅠ：頭頸部癌幹細胞の適切な表面マーカーの同定、Ⅱ：癌微小環境における癌幹細胞の宿主免疫応答からの逃避の機序の解明である。

## 3. 研究の方法

I：手術切除試料よりCD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞を分離する。分離した細胞の細胞周期を検討し、癌幹細胞としての性質を確認。

1. 試料より癌細胞を分離。
2. 抗CD44<sup>v</sup>抗体と抗ALDH1A1抗体を使用しフローサイトメトリでCD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞を分離し回収。
3. 回収したCD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞の細胞周期：フローサイトメトリによるG0/G1期、S期、G2/M期の分布を確認

II：癌微小環境中の免疫応答

1. 患者手術切除試料より浸潤リンパ球を分離。
2. CD4抗体、CD25抗体、CD39抗体、Foxp3抗体を使用しフローサイトメトリでCD4<sup>rich</sup>CD25<sup>rich</sup>CD39<sup>rich</sup>Foxp3<sup>rich</sup>リンパ球を分離する。
3. CD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞とCD4<sup>rich</sup>CD25<sup>rich</sup>CD39<sup>rich</sup>Foxp3<sup>rich</sup>リンパ球の相関を確認する。

## 4. 研究成果

I：頭頸部癌幹細胞の適切な表面マーカーの同定

### ① 頸部癌細胞株のCD44とCD133の発現

当科で所有する頭頸部癌細胞株5株において1株の細胞の一部のみにCD44<sup>rich</sup>CD133<sup>rich</sup>発現を認めたのみであった。

### ② 手術切除試料におけるCD44とCD133の発現

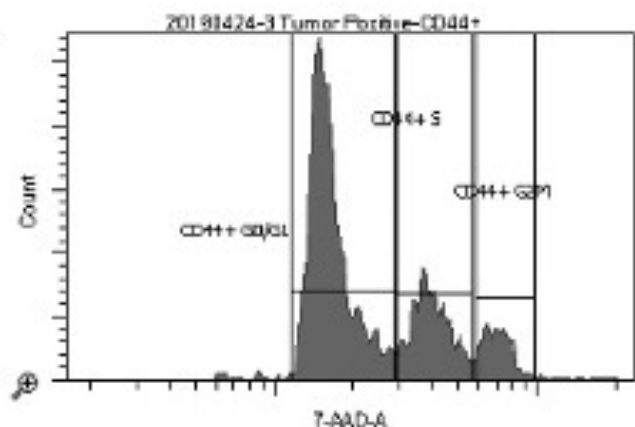
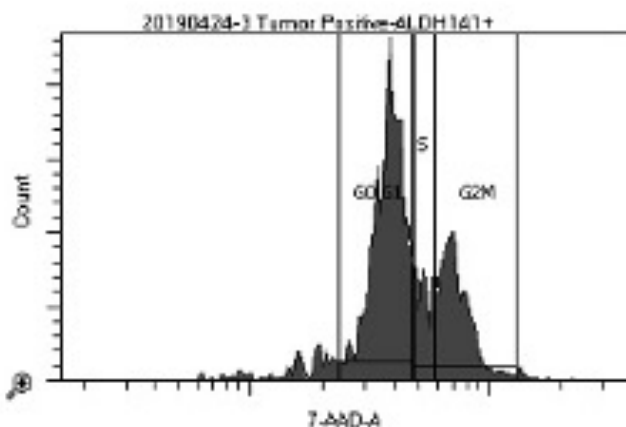
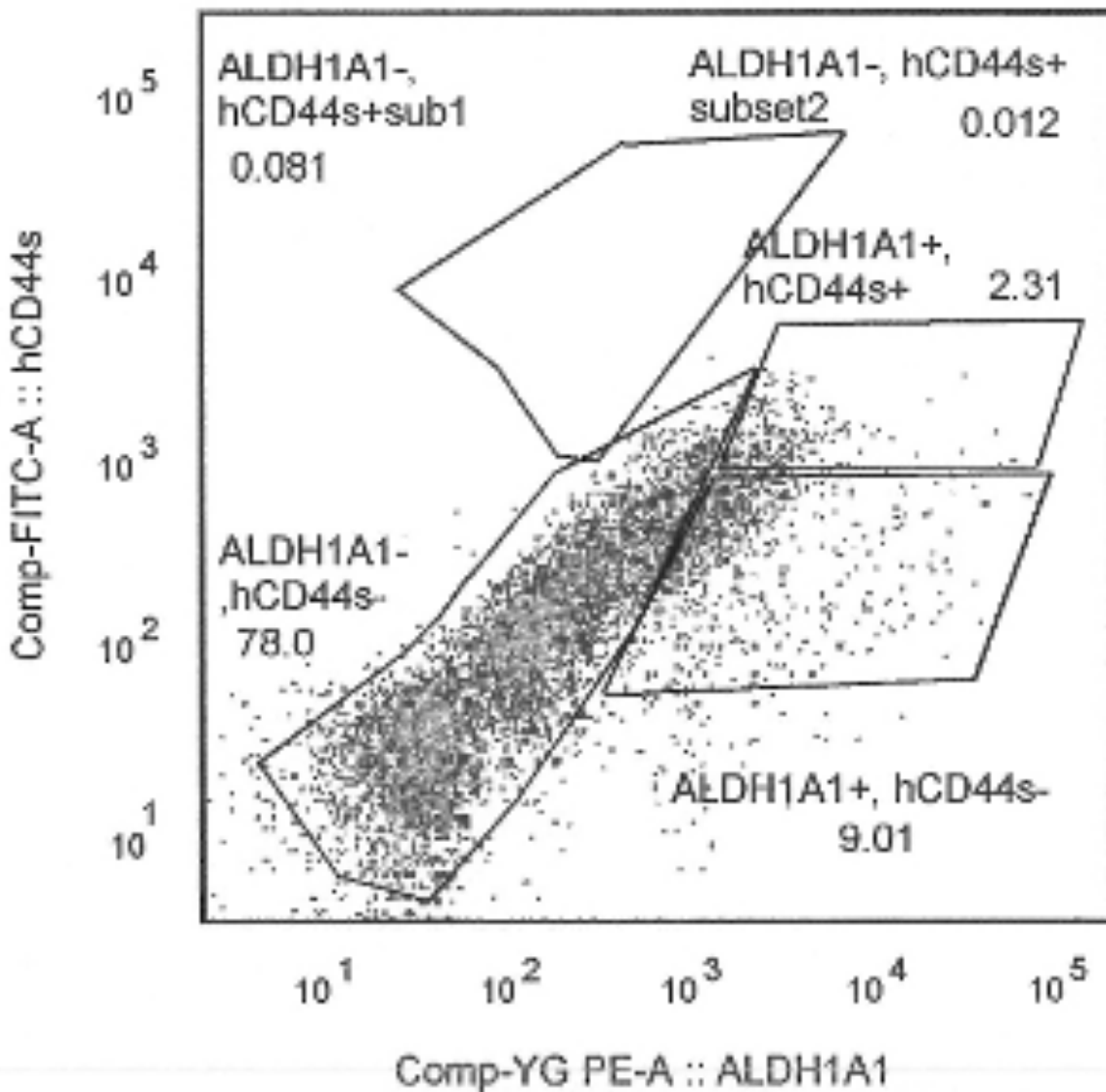
CD133を発現する癌細胞を同定できなかった。

小括：頭頸部癌幹細胞の研究としてCD133<sup>rich</sup>細胞を検討することは不適切と判断された。

③ 頭頸部癌癌幹細胞のマーカー

他の癌腫において報告のあるALDH1A1の発現に注目した。手術切除試料の検討ではCD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞は発現率に幅があるものの1.0~19.6%の割合で存在した。細胞周期を確認すると静止期に該当する細胞周期であった。

小括：CD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>は頭頸部癌癌幹細胞の可能性はある。



## II：癌微小環境における癌幹細胞の宿主免疫応答からの逃避の機序の解明

### ①手術切除標本癌組織中に浸潤したリンパ球

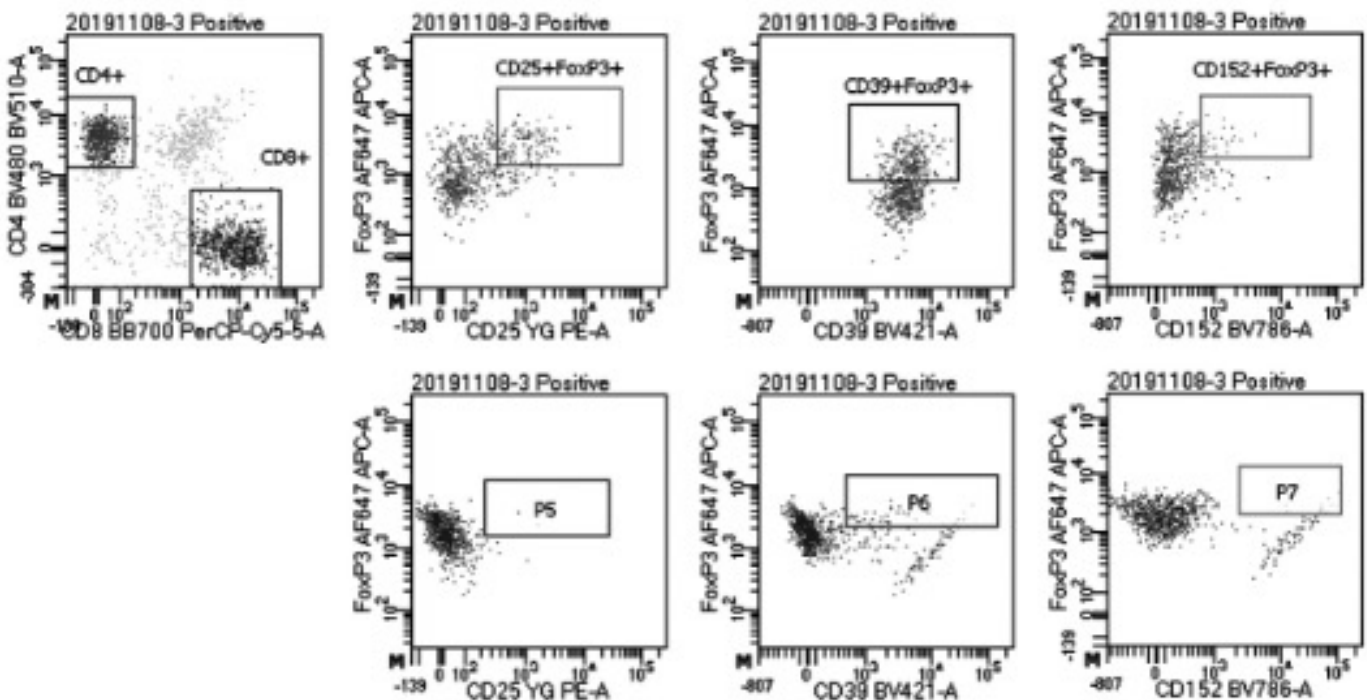
程度の差はあるがリンパ球の浸潤を認めた。浸潤したリンパ球の表面にはCD39の発現を認め活性化されたリンパ球であった。そのリンパ球はFoxp3の発現を認めた。小括：癌組織に浸潤したリンパ球は癌細胞に対してなんらかの反応を行いその結果疲弊したリンパ球である。

### ②手術切標本癌組織中のCD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞と疲弊リンパ球の関係

CD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>を比較的多く認める癌組織ではCD39<sup>rich</sup>Foxp3<sup>rich</sup>のリンパ球が占める割合が低かった。

小括：癌幹細胞と考えられる細胞を多く含む癌微小環境では、浸潤したリンパ球が癌細胞への反応が低い。

総括：頭頸部癌幹細胞の表面マーカーはCD133は活用しにくい。頭頸部癌幹細胞の表面マーカーにはALDH1A1が妥当ではないかと考える。CD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞を多く含む癌微小環境において、浸潤したリンパ球は癌細胞に対する反応が低かった。CD44<sup>vrich</sup>ALDH1A1<sup>rich</sup>細胞が多く存在する癌微小環境では癌免疫が生じにくい環境が形成されている。。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kono, E., Sasaki, T., Yamauchi, T., Nishino, H	4. 巻 5
2. 論文標題 A rare case of extraskeletal Ewing's sarcoma arising from the larynx.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica Case Reports	6. 最初と最後の頁 47-51
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 翁長龍太郎、山内智彦、今吉正一郎、伊藤真人、西野宏	4. 巻 41
2. 論文標題 小児甲状腺癌と考えられた症例の再発経過と病理学的再検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児耳鼻科	6. 最初と最後の頁 1047
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 西野宏	4. 巻 112
2. 論文標題 上顎洞がん治療の課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻臨床	6. 最初と最後の頁 351-355
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 塚本裕司、佐々木徹、西野宏	4. 巻 91
2. 論文標題 確定診断が困難であった鼻腔原発悪性末梢神経鞘腫疑いの1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻頭頸	6. 最初と最後の頁 473-477
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 甲州亮太、伊藤真人、山内智彦、長友孝文、西野宏
2. 発表標題 異時性に発症した両側外耳道癌例
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 甲州亮太、長友孝文、山内智彦、西野宏
2. 発表標題 膝窩嚢胞（ペーカ－嚢胞）にて発覚したニホルマブによる関節リウマチの1例
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光野瑛美、西野宏
2. 発表標題 喉頭から下咽頭領域の骨外性Ewing肉腫の1症例
3. 学会等名 耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西野宏、山内智彦、長友孝文、翁長龍太郎、上村佐恵子、高橋さとか、濱野有美子、塚本裕司、手塚綾乃、光野瑛美、長谷川智宏
2. 発表標題 CDDP耐性再発転移頭頸部癌に対するWeekly PTX/Cmab治療
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 翁長龍太郎、山内智彦、長友孝文、西野宏
2. 発表標題 ニボルマブが有効であった粘膜原発悪性黒色腫の一例
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 翁長龍太郎、山内智彦、今吉正一郎、伊藤真人、西野宏
2. 発表標題 小児甲状腺癌の術後再発例
3. 学会等名 小児耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Onaga, Hiroshi Nishino
2. 発表標題 Results of Multidisciplinary Approach of Patients with T4b Malignant Tumors observed Middle Cranial Fossa Invasion of Maxillary Sinus
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------