

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17202

研究課題名(和文) 遺伝子解析と免疫学的手法を用いた口腔癌患者の免疫動態解析と癌免疫療法への応用

研究課題名(英文) Genetic analysis of immunological status in oral cancer patients and applications for cancer immunotherapy

研究代表者

平山 真敏 (Hirayama, Masatoshi)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：50779171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は根治的手術後の口腔癌患者を対象に、再発予防を目的とした術後アジュバントペプチドワクチン療法の医師主導臨床試験を行った。本研究では、この臨床試験において採取した末梢血単核球(PBMC)を用いて、ペプチド抗原特異的なCTLの誘導の有無やPBMC中の免疫関連細胞(NK細胞、M2マクロファージ、制御性T細胞など)をフローサイトメトリーで解析した。また、生検や手術によって採取した腫瘍検体中の免疫関連遺伝子の発現をNanoString Technologiesで解析した。さらに、血清中のIL-6濃度をELISAで解析した。今後はこれらの結果と臨床効果の相関について解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行口腔癌に対しては、以前より手術療法に加えて放射線療法や化学療法を組み合わせることが一般的である。しかし、口腔癌患者の5年生存率は過去30年間ほとんど変化しておらず、抗PD-1抗体療法を含む癌免疫療法が口腔癌治療のブレイクスルーとなることが期待される。癌免疫療法は、患者個人の免疫状態によってその効果は大きく異なるとされるが、口腔癌患者における患者個々の免疫状態の解析は不十分な面がある。したがって、本研究の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We conducted the clinical trial of peptide-based cancer vaccines as an adjuvant therapy for oral cancer patients. In this study, we harvested peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from these patients and confirmed the presence of the peptide-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and the frequencies of M2-macrophages, NK cells, and regulatory T cells by using flow cytometry. In addition, we analyzed the expression of immunologically relevant genes in oral cancer tissues by using NanoString Technologies. Furthermore, we analyzed the concentration of IL-6 in serum collected from oral cancer patients received peptide-based cancer vaccines by ELISA. From now, we analyze the association between these data and clinical efficacy.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 癌免疫療法 ペプチドワクチン療法

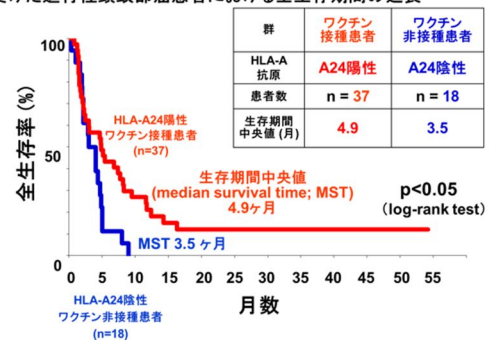
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌免疫療法が大きな注目を浴びている。特に T 細胞に発現する免疫抑制分子である CTLA-4 や PD-1、ならびに癌細胞や免疫細胞を含む癌間質細胞に発現する PD-L1 に対する免疫チェックポイント阻害療法が、悪性黒色腫や肺癌をはじめとする進行性癌患者に対して著明な効果を示しており (*New Engl. J. Med.* 366: 2443, 2012)、これらの免疫チェックポイント阻害療法に対して保険承認がなされる癌腫が拡大しつつある。口腔癌を含む頭頸部癌においても、2017 年 3 月に抗 PD-1 抗体であるニボルマブが再発や遠隔転移をきたした頭頸部癌患者に対して保険承認され、2020 年 3 月には同様にペンブロリズマブが再発や遠隔転移をきたした頭頸部癌患者に対して保険承認された。当科においても複数の口腔癌患者に対して抗 PD-1 抗体の投与を行っており、今後も投与と患者の増加が予想される。

申請者らはこれまで、3 種類の癌抗原に由来する HLA-A24 結合性の細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) 誘導性ペプチドを用いた癌ペプチドワクチン療法の医師主導型臨床試験を進行口腔癌患者を対象に施行し、その安全性と臨床効果を報告した(図 1)。また、これらの CTL 誘導性ペプチドを用いて、根治的手術後の口腔癌患者を対象に、再発予防を目的とした術後アジュバント癌ペプチドワクチン療法の医師主導臨床試験を行った。

図 1. CTLを誘導するがん抗原ペプチド3種混合ワクチンの接種を受けた進行性頭頸部癌患者における全生存期間の延長



免疫チェックポイント阻害療法の課題としては、①奏効率の低さ、②超高額な薬価、③治療効果や有害事象を予測するマーカーが確立されていないなどが挙げられる。これらの問題点を解決すべく、治療効果や有害事象の予測マーカーの開発や、癌免疫療法と従来の標準療法、もしくは複数の癌免疫療法の併用療法の開発が精力的に行われている。本研究は、これらの免疫チェックポイント阻害薬と当科で行っていたペプチドワクチン療法の併用療法により、より強力な癌免疫療法の開発ができないかと考えたことから着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌患者に対するより有効性の高い癌免疫療法の開発を目指して、抗 PD-1 抗体と癌ペプチドワクチン療法の併用療法を目指した基礎的解析を行い、臨床応用に資することである。

## 3. 研究の方法

まず、根治的手術後の口腔癌患者を対象とした術後アジュバント癌ペプチドワクチン療法を施行した口腔癌患者の PBMC と血清を、治療前、治療途中(4 回目投与後)、治療後(8 回目投与後)で採取した。同様に、抗 PD-1 抗体療法を施行した口腔癌患者の PBMC と血清を治療前、治療後 3 ヶ月後、治療後半年後で採取した。これらの PBMC を用いて、ペプチドワクチン療法や抗 PD-1 抗体療法の前後で、PBMC 中の免疫細胞(CD4<sup>+</sup> T 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞、骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC)、制御性 T 細胞など)や間葉系幹細胞 (MSC) の存在頻度をフローサイトメトリーで解析した。また、CD4<sup>+</sup> T 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞については、PD-1 の発現頻度をフローサイトメトリーで解析した。

また、ペプチドワクチン療法を施行した口腔癌患者の血清中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。

次に、術後アジュバント癌ペプチドワクチン療法を施行した患者の生検、もしくは手術による切除検体を用いて、腫瘍組織中の免疫関連遺伝子の発現を NanoString Technologies などを用いて解析した。

これらの解析については、アメリカ・NIH に出向中の当科・共同研究者に臨床検体の一部を

送付し、解析を依頼した。

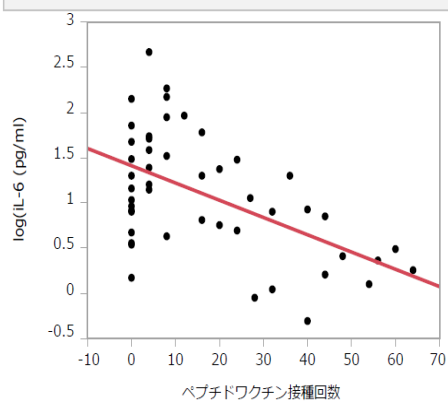
#### 4. 研究成果

ペプチドワクチン療法を施行した口腔癌患者の血清中の IL-6 濃度を ELISA で測定したところ、ペプチドワクチン接種回数に比例して血中 IL-6 濃度が低下する傾向が見られた(図 2)。

ペプチドワクチン投与患者や抗 PD-1 抗体投与患者の PBMC 中の免疫関連細胞の頻度や腫瘍組織検体中の免疫関連遺伝子の発現を NanoString Technologies で解析したが、これらの結果は現在、臨床効果や全生存率との関連を検討中である。

(図 2)

ペプチドワクチン接種回数とlog(iL-6 (pg/ml))の二変量の関係 group=1



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Miki Tsuruta, Shohei Ueda, Poh Yin Yew, Isao Fukuda, Sachiko Yoshimura, Hiroyuki Kishi, Hiroshi Hamana, Masatoshi Hirayama, Junji Yatsuda, Atsushi Irie, Satoru Senju, Eiji Yuba, Tomomi Kamba, Masatoshi Eto, Hideki Nakayama, Yasuharu Nishimura.	4. 巻 7:4
2. 論文標題 Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4+ T cells expressing converged T-cell receptor genes in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1415687-1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/2162402X.2017.1415687	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, Akiyuki Hirose, Ryoji Yoshida, Kenta Kawahara, Yuichiro Matsuoka, Tatsuro Yamamoto, Masafumi Nakamoto, Masatoshi Hirayama, Nozomu Takahashi, Takuya Nakamura, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Masashi Nagata, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama	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 2473-2488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20102473.	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasuharu Nishimura, Miki Tsuruta, Shohei Ueda, Poh Yin Yew, Isao Fukuda, Sachiko Yoshimura, Hiroyuki Kishi, Hiroshi Hamana, Masatoshi Hirayama, Junji Yatsuda, Atsushi Irie, Satoru Senju, Eiji Yuba, Tomomi Kamba, Masatoshi Eto and Hideki Nakayama
2. 発表標題 Identification of bladder cancer-associated cancer-testis antigens-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----