

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10337

研究課題名(和文) 再発口腔がんに対する遺伝子変異量が免疫チェックポイント阻害剤の有効性を検証する

研究課題名(英文) The estimation of the efficacy of immuno-checkpoint inhibitor in gene mutation for recurrent oral cancer

研究代表者

萩 和弘 (Ogi, Kazuhiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40433114

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)：再発口腔癌に対し免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の適応は、緩徐に変化するICI投与後の治療効果や、ICIから殺細胞性抗癌剤または分子標的治療薬へのスイッチングについて慎重な見極めが必要である。また投与期間にもついても規定が見当たらずにICIは治療開始から腫瘍免疫応答を引き起こすまで一定の期間を要する遅発性効果を示し、さらに投与終了後も腫瘍が残存しているながら病状の進行あるいは縮小がないまま病状の安定が得られる持続効果があると考えられた。本研究においてICIの治療効果予測規定因子として腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、遺伝子変異を臨床検体からそれぞれ検出しその関連性を検証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
再発口腔癌に対して、ICI投与前にがん関連遺伝子変異を調べてICIの有効性を検証することができる。これによりirAEなどの有害事象の軽減に繋がり、がん免疫療法を適正な治療法として確立することができる。

研究成果の概要(英文)：The indications of immune checkpoint inhibitors (ICIs) are mainly for recurrent oral cancer. It carefully requires the assessment of the slowly continuous therapeutic effects after administration of ICIs, and the switching from ICIs to cytotoxic anticancer agents or to molecular-targeted agents. In addition, there are no evidence regarding to the administration period. Also, it shows a delayed effect, and prolong a long time until it occurs a tumor immune response. In our research, we were able to verify the relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and somatic gene mutations in our clinical specimens, resulting from the exploration of some factors for predicting the therapeutic effect of ICI.

研究分野：oral cancer

キーワード：Immunotherapy squamous cell carcinoma gene mutation

## 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬(ICI), 2017年より頭頸部癌の再発あるいは転移症例において単剤あるいはFPとの併用療法で導入されてきた。特に再発口腔癌では、緩徐に変化するICI投与後の治療効果や、ICIから殺細胞性抗癌剤、分子標的治療薬へのスイッチングについて慎重な見極めが必要である。また投与期間にもついても規定が見当たらず、ICIは治療開始から腫瘍免疫応答を引き起こすまで一定の期間を要する遅発性効果を示し、さらに投与終了後も腫瘍が残存しているながら病状の進行あるいは縮小がないまま病状の安定が得られる持続効果があると考えられる。このためICIの効果予測の高いバイオマーカーの開発が急務である。

## 2. 研究の目的

ICI投与に際し、がん微小環境、flow cytometry、免疫組織染色、遺伝子変異にともなうネオアンチゲンの同定などから様々なバイオマーカーを組み合わせた効果予測因子の検索が行われている。これまでにわれわれはNivolumabを使用した治療前の患者の末梢血からctDNAを抽出し全エクソーム解析を行ったところ、著効例においてNotchシグナルの異常が認められていたことを経験した。今回、その機序としてNotchシグナルの異常がCD8+T細胞の活性化に関与し、新たに効果予測の高いバイオマーカーとしての有用かどうかの検証を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

口腔癌組織において同定した遺伝子異常について、体液中の腫瘍由来循環DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)に対する解析システムを構築し、がん診断・治療のバイオマーカーとしての使用した。サンプルとして末梢血中のセルフリーDNA、腫瘍の影響を受けた血小板(tumor educated platelets, TEP)上のDNAを診断時、治療後経時的に抽出し、腫瘍サンプルで同定した遺伝子変異のモニタリングを行った。体液中に含まれる腫瘍性DNAはごくわずかと考えられるため、coverage depth 100,000以上のultra deepシーケンスを行い、検出頻度1%以下の変異検出も試みた。遺伝子変異解析は、サンプル数、解析領域数に応じて半導体シーケンシングシステムIon Proton / Ion PGMを使用した。さらに従来の腫瘍マーカー、PET/CTなどの画像診断と対比することで、治療抵抗性、再発、予後不良を予測した。

## 4. 研究成果

### 4-1 PD-L1の発現の不均一性

まず初めに、PD-L1の発現の不均一性が明らかとなった。すなわち生検部によってPD-L1の発現量に差があり動的な変化を示す可能性が示唆されたため、PD-L1とがん関連遺伝子変異量の相関について検索した。肺がんでは、EGFR遺伝子の変異を認める癌においてPD-L1の発現が高いことが報告されている。しかしながら治療効果との相関はなく、PD-L1の発現が著しく低下している場合でもICIの持続的な効果を示した。同様に再発口腔癌においても、がん微小環境下でがん細胞の浸潤、転移、腫瘍細胞と直接対峙しているリンパ球の浸潤が必要で、PD-L1の発現とICIの治療効果に相関は認め

られなかった。

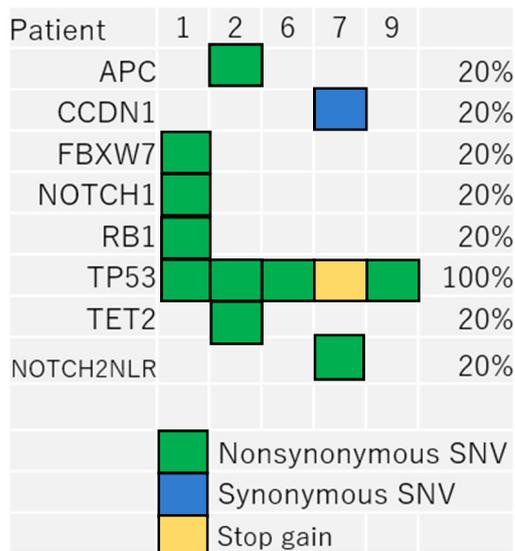
#### 4-2 CD8 陽性 T 細胞の浸潤

つぎに、TIL の表面マーカー CD3, CD4/CD8, さらに Treg 同定のための CD25/FoxP3 の発現に着目した。まず臨床検体でもちいて癌浸潤先端部で CD8 の免疫染色を行い、陽性 T 細胞の浸潤と ICI の治療効果と相関するかを検証した。PD-L1 の発現は動的であったが、リンパ球の浸潤が強い症例では PD-L1 の発現も相関して高発現し、臨床検体では 5 例中 2 例で治療効果が持続した。つまり T 細胞の浸潤に伴い、PD-L1 も上昇し、ICI の Responder で PD-L1(+), CD8+T 細胞(TIL)との結果であった。

#### 4-3 Notch シグナル異常との関連性

最後に WES をもちいて、遺伝子変異解析を行った。結果、Notch の下流にある遺伝子変異を検出した。なかでも Notch1 および CCND1, FBXW7 の遺伝子異常を認めた症例において、ICI 投与後の抗がん剤が著効または ICI 投与により腫瘍抑制的な効果を持続していた。

図 1 ) 遺伝子解析を行った 5 例の遺伝子変異の内訳



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koike K, Nishiyama K, Dehari H, Ogi K, Sasaki T, Shimizu S, Sasaya T, Tsuchihashi K, Sonoda T, Hasegawa T, Hiratsuka H, Miyazaki A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Prognostic Value of CD45Ro + T-Cell Expression in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4515-4522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15262.	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 Hatanaka Y, Niinuma T, Kitajima H, Nishiyama K, Maruyama R, Ishiguro K, Toyota M, Yamamoto E, Kai M, Yorozu A, Sekiguchi S, Ogi K, Dehari H, Idogawa M, Sasaki Y, Tokino T, Miyazaki A, Suzuki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 DLEU1 promotes oral squamous cell carcinoma progression by activating interferon-stimulated genes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 20438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99736-5.	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 Koike K, Dehari H, Shimizu S, Nishiyama K, Sonoda T, Ogi K, Kobayashi J, Sasaki T, Sasaya T, Tsuchihashi K, Hasegawa T, Tsukahara T, Torigoe T, Hiratsuka H, Miyazaki A	4. 巻 111
2. 論文標題 Prognostic value of HLA class I expression in oral squamous cell carcinoma patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1491-1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14388.	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 Koike K, Dehari H, Ogi K, Shimizu S, Nishiyama K, Sonoda T, Sasaki T, Sasaya T, Tsuchihashi K, Hasegawa T, Torigoe T, Hiratsuka H, Miyazaki A	4. 巻 15
2. 論文標題 Prognostic value of FoxP3 and CTLA-4 expression in patients with oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237465	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 荻 和弘	4. 巻 102
2. 論文標題 Chemotherapy after progression on nivolumab is essential for responders with genetic alterations of driver gene: Review of two recurrent/metastatic squamous cell carcinoma patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荻 和弘、岩本空大、笹谷 聖、西山廣陽、岡本準也、金子 剛、佐々木敬則、出張裕也、中井裕美、宮崎晃巨
2. 発表標題 全エクソーム解析によるがん遺伝子変異と臨床効果との関連性が示唆された舌癌の1例
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小池和茂、出張裕也、荻 和弘、西山廣陽、佐々木敬則、土橋 恵、笹谷 聖、中井裕美、岡本準也、宮崎晃巨
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における腫瘍浸潤リンパ球の局在と予後との関連性についての研究
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koike K, Dehari H, Ogi K, Shimizu S, Nishiyama K, Sonoda T, Sasaki T, Sasaya T, Tsuchihashi K, Hasegawa T, Torigoe T, Hiratsuka H, Miyazaki A
2. 発表標題 Prognostic impact of HLA class I expression and its association with CD8 T-cell density in patients with oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻 和弘、小林淳一、西山廣陽、小池和茂、高田弘一、染谷正則、宮崎晃亘
2. 発表標題 再発または遠隔転移を有する口腔癌に対しニボルマブ投与は遺伝子変異が指標となるか
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千種 達也、荻 和弘ら
2. 発表標題 IgG関連疾患が疑われる頸部リンパ節腫大の1症例
3. 学会等名 第45回日本口腔外科学会北日本支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池和茂、荻 和弘ら
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における制御性T細胞の発現に関する免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮崎 晃亘、荻 和弘、小池 和茂、岡本 準也、出張 裕也、中井 裕美	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 94
3. 書名 Precision Medicine 2020年12月号 口腔癌に対する免疫療法：個別化・複合免疫療法の臨床応用に向けての研究	

〔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	西山 廣陽  (Nishiyama Koyo)  (60749563)	札幌医科大学・医学部・助教    (20101)	
研究 分 担 者	宮本 昇  (Miyamoto Sho)  (80749565)	琉球大学・医学部附属病院・助教    (18001)	

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