

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17147

研究課題名(和文)免疫染色やリキッドバイオプシーによる頭頸部癌の腫瘍免疫能と放射線治療の解析

研究課題名(英文) Analysis of tumor immunity and radiation therapy for head and neck cancer by immunostaining and liquid biopsy

研究代表者

福島 悠希 (Fukushima, Yuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60749787

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)：中咽頭扁平上皮癌の放射線治療の結果に影響を及ぼす腫瘍免疫に関与するタンパク質の発現の影響について研究を行った。中咽頭癌に対して施行した根治的放射線治療症例の治療前生検標本において、制御性T細胞のマーカーであるFoxP3抗体を用いて免疫染色を行った結果、FoxP3が多く浸潤している症例で有意に予後良好であることが示された。p16など従来の予後予測因子に加えることで治療成績の予測精度の向上につながる可能性があると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中咽頭癌において、腫瘍免疫関連蛋白の一つであるFoxp3が多く浸潤している症例で放射線治療成績が良好であることが研究成果として示された。今後癌細胞の腫瘍免疫関連蛋白を用いた放射線感受性予測の臨床応用や、個別化放射線治療の実用化の一步となる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of expression of proteins involved in tumor immunity that affect the outcome of radiation therapy for oropharyngeal squamous cell carcinoma. In pretreatment biopsy specimens of definitive radiotherapy cases performed for oropharyngeal cancer, immunostaining using FoxP3 antibody, which is a marker of regulatory T cells, showed that heavy infiltrated FoxP3 cases were significantly better in the prognosis. Addition to conventional prognostic factors such as p16 may lead to improved prediction accuracy of treatment results.

研究分野：放射線治療

キーワード：頭頸部癌 放射線治療 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

放射線治療による抗腫瘍(殺細胞)メカニズムは、直接およびフリーラジカル生成を介した間接的な DNA 傷害作用による細胞死が中心的な役割を担っていると考えられてきた。ところが臨床において、放射線治療時に放射線照射範囲外の腫瘍が縮小する「アブスコパル効果」と呼ばれる現象が古くから知られていた。アブスコパル効果のメカニズムは長らく不明であったが、近年、局所的な放射線治療が全身の免疫系を活性化することによって起こることが明らかになってきた。よって従来考えられていた DNA 損傷だけではなく、抗腫瘍効果には腫瘍免疫機構などが関連している可能性がある。

腫瘍免疫に関わる蛋白として、腫瘍細胞表面に発現している PD-L1 (Programmed death ligand-1) 蛋白や、腫瘍を攻撃する T 細胞の細胞表面に発現している PD-1 蛋白が知られており、PD-L1 と PD-1 が結合すると、腫瘍を攻撃する T 細胞にブレーキがかかるため治療抵抗性となると考えられている。また、免疫細胞である CD8 陽性の T リンパ細胞が腫瘍内に多く浸潤している場合には治療効果が良好であることも報告されている。この両面から放射線治療の効果予測に関連する研究が行われている。

以上より、放射線治療の抗腫瘍効果としてはこれまでいわれてきた DNA 傷害作用に加えて、近年は腫瘍免疫機構による免疫応答が関与していることが明らかとなってきておりこれについて研究が進んでいる。

2. 研究の目的

近年、ヒトパピローマウイルス (HPV) 関連の頭頸部癌が増加しており、特に中咽頭癌で顕著である。HPV 陽性の中咽頭癌は放射線治療の感受性が良好で予後良好と考えられている。しかし、このメカニズムについては未解明の部分が多い。我々のグループではこれまで各種の癌において、DNA 損傷修復蛋白発現と放射線治療成績が相関することを報告してきた。そこで本研究ではこれらの成果を発展させ、中咽頭癌を主とした頭頸部癌の腫瘍免疫関連蛋白の発現と放射線治療成績の相関を解明し、臨床応用に結びつけることを目的とする。具体的には、治療開始前の生検検体を用いた腫瘍免疫関連蛋白の免疫組織染色を行い、癌細胞の腫瘍免疫関連蛋白を用いた放射線感受性予測法の臨床応用と個別化放射線治療の実用化を目指す。

3. 研究の方法

当院で 2005 年から 2019 年の期間に行われた中咽頭癌に対する根治的放射線治療 70 例の治療前生検標本において、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が認識する癌細胞の HLA class 抗体、制御性 T 細胞のマーカーである FoxP3 抗体を用いて免疫染色を行った。

顕微鏡下で陽性細胞数の測定を行い、カットオフ値を設定し陽性群、陰性群に分け、p16 や予後(全生存率 OS や無再発生存率 PFS)との関連を検討した。

70 症例の内訳としては、年齢の中央値は 68 歳、p16 陽性は 37 例で全体の 52.9%であった。中咽頭癌の発生部位は扁桃が最も多く 47 例であった。化学療法併用は 53 例、分子標的薬併用は 5 例であった。UICC 第 8 版において、期は 19 例、期は 16 例、期は 15 例、

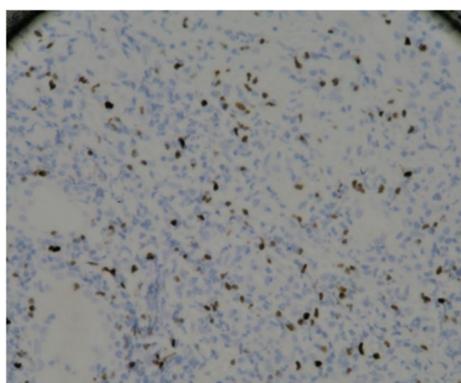
期は 20 例であった。観察期間の中央値は 36 か月、全症例に 60Gy 以上の根治線量が投与されていた。

免疫染色の評価方法としては、腫瘍の HLA class の陽性率は病理診断専門医との合議によって評価し、陽性率が 70%以上であるものを陽性と定義した。FoxP3 は 400 倍の顕微鏡倍率で腫瘍の陽性細胞数を手動でカウントし、陽性細胞数が 60 個以上であるものを陽性と定義した。HLA class 、FoxP3 の免疫染色写真を以下に示す。

【中咽頭癌細胞の免疫組織染色】



HLA class



FoxP3

4 . 研究成果

【結果】

はじめに免疫染色と p16 との関連について示す。

HLA class は p16 との相関関係は見られなかったが、FoxP3 において p16 陽性群は陰性群と比較して FoxP3 陽性割合が高い傾向を認めた。

結果① (免疫染色の結果とp16との関連)

	p16 positive	p16 negative	P value
HLA class I			
positive	19	21	0.341
negative	18	12	
FoxP3			
positive	24	14	0.092
negative	13	19	

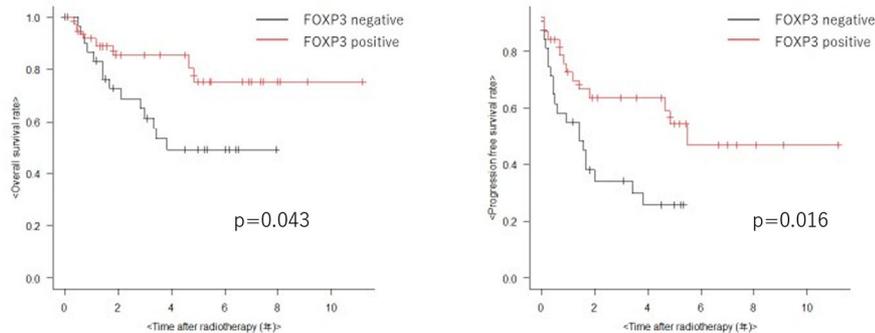
p16陽性群は陰性群と比較してFoxP3陽性の割合が高い傾向にあった。

続いて免疫染色と生存率との関係を示す。

HLA class では高発現群と低発現群の間に OS、PFS とともに有意差は認めなかった。。

FoxP3 高発現群は低発現群と比較して OS では p 値 0.043、PFS では p 値 0.016 と有意に予後良好であった。

結果② (FoxP3と生存率との関係)



FoxP3高発現群は低発現群と比較して、OS,PFSともに有意に予後良好であった。

多変量解析の結果を示す。

単変量・多変量解析 (OS)

	Parameter	Hazard ratio	95% CI	P value
Univariate	年齢	1.659	0.699-3.940	0.251
	性別	0.500	0.183-1.367	0.177
	併用療法	0.463	0.168-1.277	0.137
	TNM stage	10.29	3.008-35.19	<0.001
	p16 status	0.297	0.115-0.765	0.012
	FoxP3	0.404	0.163-1.001	0.050
	HLA class I	1.928	0.748-4.972	0.174
Multivariate	併用療法	0.327	0.110-0.965	0.043
	TNM stage	10.43	2.464-44.15	0.001
	p16 status	1.041	0.341-3.176	0.944
	FoxP3	0.849	0.300-2.401	0.757
	HLA class I	1.484	0.520-4.235	0.461

FoxP3やHLA class I は独立した予後予測因子にはならなかった。

化学療法などの併用療法の有無や TNM stage の臨床因子が独立した予後予測因子となり、免疫染色の結果は独立した予後予測因子とはならなかった。

以上の結果をまとめると、中咽頭癌の放射線治療前生検標本において、FoxP3 高発現群の方が低発現群と比較して有意に予後良好であった。HLA class I は高発現群と低発現群で予後に有意な差は認められなかった。多変量解析では両者ともに独立した予後予測因子とはならなかった。

【考察】

FoxP3 は制御性 T 細胞の特異的分子マーカーであり、一般的に FoxP3 が高発現である腫瘍は治療抵抗性で予後不良と考えられている。しかし HPV 関連腫瘍では FoxP3 が高発現

である腫瘍の方が治療成績が良好であることが報告されており、本研究も同様の結果が得られた。

HLA class はウイルスなどの抗原ペプチドを CD8 陽性 T 細胞に提示する働きをする。本研究では p16 と HLA class の関係や HLA class の発現差による予後に有意差は認められず、症例数が少ない影響などがあると考えられた。

【結語】

中咽頭癌の放射線治療前生検標本において、FoxP3 が多く浸潤している症例で有意に予後良好であることが示された。p16 など従来の予後予測因子に加えることで治療成績の予測精度の向上につながる可能性があると思われた。

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 0件）

1. 著者名 Someya Masanori, Tsuchiya Takaaki, Fukushima Yuki, Hasegawa Tomokazu, Takada Yu, Hori Masakazu, Miura Katsutoshi, Kitagawa Mio, Gocho Toshio, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Iwasaki Masahiro, Matsuura Motoki, Saito Tsuyoshi, Sakata Koh-ichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Association between cancer immunity and treatment results in uterine cervical cancer patients treated with radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa149	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 HASEGAWA TOMOKAZU, SOMEYA MASANORI, HORI MASAKAZU, TSUCHIYA TAKAAKI, FUKUSHIMA YUUKI, MATSUMOTO YOSHIHISA, SAKATA KOH-ICHI	4. 巻 34
2. 論文標題 Prediction of Results of Radiotherapy With Ku70 Expression and an Artificial Neural Network	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2865 ~ 2872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12114	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 Tsuchiya Takaaki, Someya Masanori, Takada Yu, Hasegawa Tomokazu, Kitagawa Mio, Fukushima Yuki, Gocho Toshio, Hori Masakazu, Nakata Kensei, Hirohashi Yoshihiko, Torigoe Toshihiko, Saito Tsuyoshi, Sakata Koh-ichi	4. 巻 196
2. 論文標題 Association between radiotherapy-induced alteration of programmed death ligand?1 and survival in patients with uterine cervical cancer undergoing preoperative radiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Strahlentherapie und Onkologie	6. 最初と最後の頁 725 ~ 735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00066-019-01571-1	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 Someya Masanori, Hasegawa Tomokazu, Tsuchiya Takaaki, Kitagawa Mio, Gocho Toshio, Fukushima Yuuki, Hori Masakazu, Miura Katsutoshi, Takada Yu, Nakata Kensei, Sakata Koh-ichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Retrospective DVH analysis of point A based intracavitary brachytherapy for uterine cervical cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 265 ~ 274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrz099	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福島悠希、染谷正則、堀正和、長谷川智一、土屋高旭、小塚陽介、池内佑太郎、眞船翔、坂田耕一
2. 発表標題 根治的放射線治療を行った中咽頭癌症例における腫瘍免疫と予後との関連
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第33回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷正則、土屋高旭、福島悠希、廣橋良彦、鳥越俊彦、坂田耕一
2. 発表標題 HPV関連癌における腫瘍免疫と放射線治療効果との関係
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会 第33回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 染谷正則、土屋高旭、福島悠希、廣橋良彦、鳥越俊彦、坂田耕一
2. 発表標題 Relationship between tumor immunity and radiotherapy effects in HPV associate cancer
3. 学会等名 第56回日本医学放射線学会 秋季臨床大会
4. 発表年 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
---------	---------