

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21648

研究課題名（和文）モデルマウスを用いた免疫代謝解析に基づく頭頸部癌に対する抗腫瘍免疫活性化法の開発

研究課題名（英文）Development of the method for reinforcement of the antitumor immunity for head and neck cancer based on the analyses of immunometabolism using the mouse model

研究代表者

脇坂 尚宏（Wakisaka, Naohiro）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70377414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は抗腫瘍免疫の主役であるTリンパ球のいわゆる免疫代謝経路を解明するために実施した。免疫代謝経路を解明するためにホルマリン固定病理標本を使用し、空間的解析技術によりmRNAの発現を解析した。解析の結果、抗腫瘍免疫で腫瘍の進展を制御するために重要な代謝プロセスは解糖系ではなく、ミトコンドリア関連経路であることが判明した。加えてToll-like receptor 4経路がその活性化に大きく寄与することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により頭頸部癌の免疫代謝プロセスのさらなる解明が見込まれ、さらに将来、腫瘍免疫を活性化するための薬剤選択など頭頸部癌免疫療法による患者予後の改善が見込まれる。加えてミトコンドリア経路が免疫代謝に深く関与し、そしてそこにToll-like receptor 4経路が関与することが示されたことで、学術的にも本研究から派生して咽頭癌症例の扁桃における細菌叢の解明が進み、その結果、さらに新しい治療法の開発が見込まれる意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to elucidate the immunometabolic pathways of the T lymphocytes which were associated with antitumor immunity. Using a formalin fixation pathology specimen, the expressions of mRNAs were analyzed by a digital spatial profiler to elucidate an immunometabolic pathways. The analyses showed that the most significant immunometabolic process was mitochondria-related pathway, but not the glycolytic pathway to regulate the tumor progression. In addition, it was revealed that Toll-like receptor 4-related pathway greatly contributed to their activation.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 免疫代謝 ミトコンドリア Toll-like receptor 4

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は好气的環境下でも解糖系により ATP を産生する (Warburg 効果)。これまで癌細胞がこの様な好气的解糖を行うためのメカニズムが解明されてきた。一方、癌免疫の分野では、免疫担当細胞の機能と代謝の正の相関性が指摘されている。癌微小環境に着目すると、癌細胞が好气的解糖により大量のブドウ糖やアミノ酸を消費するため、間質のブドウ糖やアミノ酸は不足する (代謝競合)。そのため、抗腫瘍免疫の主役である T リンパ球をはじめとする免疫担当細胞では解糖系によるブドウ糖からの ATP の産生やアミノ酸の代謝が抑制され、エネルギー不足に陥る。その結果、腫瘍浸潤 T リンパ球の抗腫瘍活性は低下する。また、programmed cell death (PD)-1 をはじめとする免疫チェックポイントが刺激されると、T リンパ球の解糖系をはじめとする代謝が低下し、その結果、T リンパ球の抗腫瘍活性が低下する。従って、免疫チェックポイント阻害剤により腫瘍浸潤 T リンパ球の解糖系代謝が促進すると、T リンパ球の機能は活性化するが、その割に再発・進行頭頸部癌ではその奏効率は現状で 10% 程度とその効果はまだ不十分であった。

そこで著者は、T リンパ球の代謝を活性化する薬剤による治療法を取り入れることで免疫療法 (免疫チェックポイント阻害剤や養子免疫療法) との併用により癌の治療効果を劇的に改善できると考えた。また、免疫療法の個別化のステージでは、薬剤を投与することでモデルマウスの癌微小免疫環境の変化と薬剤の効果を評価し、その結果をもとに実際に患者に投与する薬剤を選択することが必要と考えた。

また著者は以前、頭頸部癌のセンチネルリンパ節 (SN) では、免疫担当細胞の流路となるリンパ洞が拡張して癌細胞を受け容れやすい環境にあることを示した。そこで著者は、SN では T リンパ球の抗腫瘍活性も低下して癌細胞を受け容れやすい状態にある、と考えた。そこで SN の T リンパ球の代謝を解析し、その結果に基づき薬剤により SN の T リンパ球の代謝を促進して抗腫瘍活性を高めればリンパ節転移を予防できる、と考えた。

2. 研究の目的

癌組織では抗腫瘍免疫の主役である T リンパ球の解糖系代謝と抗腫瘍活性がともに低下していることが報告されている。また、免疫担当細胞で代謝が促進すると機能が向上することが指摘されている。そこで著者は、T リンパ球の解糖系をはじめとする代謝を促進することでその抗腫瘍活性が高められ、頭頸部癌の免疫療法の効果を劇的に改善できると考えた。これらの背景を踏まえ、本研究では頭頸部癌の研究に免疫代謝という新しい概念を持ち込み、癌微小環境における免疫代謝活性を解析する。モデルマウス (免疫ヒト化マウスとシンジェニックマウス) を作成して頭頸部癌の個々の患者の T リンパ球の代謝を解析し、その結果に基づいて、T リンパ球の代謝を促進する薬剤を免疫療法と併用してその抗腫瘍効果を評価する。さらに、癌組織のリンパ流が最初に流入するセンチネルリンパ節の T リンパ球の代謝を促進する薬剤を選択し、リンパ節転移を抑制する効果も評価する。

3. 研究の方法

A) モデルマウスの作成 : i) シンジェニックマウス [C57BL/6 マウスに同マウス由来口腔癌 MOC 細胞を移植する (C57BL/6-MOC モデル)]、ii) 免疫系ヒト化マウス [免疫不全マウスに頭頸部癌患者由来末梢血単核細胞 (PBMC) を移植後、同一患者の癌組織を移植する (PBMC-PDX モデル)]。癌細胞・癌組織は下肢足部に移植し、膝窩部のリンパ節を SN とする。B) 免疫代謝系の解析 : i) TCA サイクル活性の指標として酸素消費速度を測定する、ii) 解糖系活性の指標として細胞外酸化速度を測定する、iii) T リンパ球の代謝産物プロファイルの解析は、細胞代謝産物アッセイとメタボローム解析で行う。C) T リンパ球の機能解析 : CD8⁺ と CD4⁺ T リンパ球の活性を、フローサイトメーターで IFN-ガンマ、TNF-アルファなどのサイトカイン発現を測定して評価し、抗腫瘍効果と腫瘍浸潤リンパ球、SN のリンパ球の代謝・機能を解析する。→ところが、動物モデル作成において腫瘍の移植が順調に進まなかった。

そこでやむを得ず、免疫代謝経路を解明するために、ホルマリン固定病理検体を使用して、1) 腫瘍周囲の免疫組織から RNA を採取して網羅的に mRNA の発現を解析する方法、2) 空間トランスクリプトーム解析技術を使用して免疫組織での mRNA の発現を解析する方法、を採用して目的とする解析を行うことにした。

1) 中咽頭癌周囲のリンパ組織を切り出して RNA を抽出し、マイクロアレイ法で mRNA の発現を解析した。解析結果から活性化している免疫経路を明らかにするとともに、当初の目的通り免疫代謝経路も解析することにした。

2) 空間トランスクリプトーム解析技術を使用して mRNA の発現を解析することでさらに細部の腫瘍組織・周辺組織における免疫活動の評価を行った。

4. 研究成果

6 症例では空間トランスクリプトーム解析法で腫瘍周囲のリンパ組織について、免疫関連遺伝

子発現プロフィールを転移の有無で比較した。その結果、転移が無い症例では、転移を有する症例よりも 237 遺伝子の発現が増加していた。

さらに 27 症例ではマイクロアレイ法で腫瘍周囲の腫瘍を含まない口蓋扁桃組織について、同様に転移の有無で比較した。その結果、転移が無い症例では、転移を有する症例よりも 192 遺伝子の発現が増加していた。その 192 遺伝子の Gene Ontology 解析の結果、転移が無い症例の口蓋扁桃組織では転移を有する症例と比較して T リンパ球の活性化に関与する遺伝子が多く発現していることが判明した。また、扁桃組織での免疫関連遺伝子発現レベルをスコア化することで、リンパ節転移の有無を判別することができた。

免疫代謝経路の解析の結果、抗腫瘍免疫で腫瘍の進展を制御するために重要な代謝プロセスは解糖系ではなく、ミトコンドリア関連経路であることが判明した。加えて Toll-like receptor 4 経路がその活性化に大きく寄与することが判明した。これらの結果は、今後の免疫代謝プロセスのさらなる解明のためと免疫を活性化するために薬剤を選択する際の糸口となる成果であるとともに、研究の発展のために癌周囲の細菌叢の解析が重要であることを示唆している。

これらの研究成果を英語論文で公表することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Wakisaka Naohiro, Moriyama-Kita Makiko, Kondo Satoru, Kobayashi Eiji, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 19
2. 論文標題 Lymph node metastasis regulation by peritumoral tonsillar tissue mitochondria-related pathway activation in oropharyngeal cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0299750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0299750	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 Wakisaka Naohiro, Moriyama-Kita Makiko, Kondo Satoru, Kobayashi Eiji, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 193
2. 論文標題 Immune-Related Gene Expression Profile at Peritumoral Tonsillar Tissue Is Modified by Oropharyngeal Cancer Nodal Status	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1006 ~ 1012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2023.04.010	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 Kondo Satoru, Okabe Atsushi, Nakagawa Takuya, Matsusaka Keisuke, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Dochi Hiroto, Mizokami Harue, Kitagawa Yuki, Kurokawa Tomoya, Mima Masato, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Wakisaka Naohiro, Misawa Kiyoshi, Yoshizaki Tomokazu, Kaneda Atsushi	4. 巻 1869
2. 論文標題 Repression of DERL3 via DNA methylation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166598 ~ 166598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2022.166598	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 Kobayashi Eiji, Kondo Satoru, Dochi Hiroto, Moriyama-Kita Makiko, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Protein Farnesylation on Nasopharyngeal Carcinoma, Molecular Background and Its Potential as a Therapeutic Target	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2826 ~ 2826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14122826	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 Dochi Hiroto, Kondo Satoru, Jiang Wen Ping, Mizokami Harue, Moriyama Kita Makiko, Kobayashi Eiji, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Wakisaka Naohiro, Juang Shin Hun, Muramatsu Masamichi, Kaneda Atsushi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 113
2. 論文標題 Estrogen induces the expression of EBV lytic protein ZEBRA, a marker of poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2862 ~ 2877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15440	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 Kondo Satoru, Okuno Yusuke, Murata Takayuki, Dochi Hiroto, Wakisaka Naohiro, Mizokami Harue, Moriyama Kita Makiko, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Ueno Takayoshi, et al.	4. 巻 113
2. 論文標題 EBV genome variations enhance clinicopathological features of nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic region	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2446 ~ 2456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15381	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 Murono Shigeyuki, Komori Takeshi, Endo Kazuhira, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 141
2. 論文標題 Intra-arterial chemotherapy targeting metastatic cervical lymph nodes in head and neck cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2021.2003858	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 Endo Kazuhira, Ueno Takayoshi, Hirai Nobuyuki, Komori Takeshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 132
2. 論文標題 In Response to Low Skeletal Muscle Mass Is a Risk Factor for Aspiration Pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29792	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 Kase Kina, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Dochi Hiroto, Mizokami Harue, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Komori Takeshi, Hirai Nobuyuki, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Moriyama-Kita Makiko, Sugimoto Hisashi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus LMP1 Induces Soluble PD-L1 in Nasopharyngeal Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 603 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9030603	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 Makita Haruna, Endo Kazuhira, Kasahara Yoshiya, Nakata Asuka, Moriyama-Kita Makiko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Gotoh Noriko, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 21
2. 論文標題 Xenografts derived from patients with head and neck cancer recapitulate patient tumour properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12646	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 近藤悟, 溝上晴恵, 土地宏朋, 上野貴雄, 中西庸介, 遠藤一平, 脇坂尚宏, 吉崎智一
2. 発表標題 上咽頭癌におけるEBV-LMP1によるDNAメチル化誘導機構の網羅的解析
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 脇坂尚宏・吉崎智一
2. 発表標題 遺伝子発現プロファイルの解析による中咽頭癌の転移有無予測法の開発
3. 学会等名 第23回 SNNS研究会
4. 発表年 2021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
---------	---------