

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 19 日現在

機関番号：13501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21791605
 研究課題名（和文）頭頸部癌における B7-H3 分子発現の免疫学的意義と臨床応用に関する研究
 研究課題名（英文）The expression of B7-H3 costimulating factor in head and neck cancer.

研究代表者

森山 元大 (MORIYAMA MOTOHIRO)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
 研究者番号：00402074

研究成果の概要（和文）：

B7-H3 は B7 family に属する T リンパ球活性化に関わる共刺激因子の一つであり、頭頸部扁平上皮癌細胞株での発現を調べた。Gun-1 では B7-H3 分子の発現を認めなかったが Ca9-22 では B7.2 と B7-H1 発現に加えて B7-H3 も弱いながら発現を確認できた。また癌幹細胞様細胞である CD44+細胞で B7-H3 発現が CD44-細胞に比べて多いことを確認している。CD44 は variant form の発現が優位であり、TGF β の産生がほとんどなかった。頭頸部癌における B7-H3 とリンパ組織での制御性 T 細胞の誘導との関連性が示唆される結果となった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the role of B7-H3, which in the co-stimulating factor of B7 family, activated T lymphocyte in Head and Neck carcinoma. We verified the expression of B7-H3 slightly on Ca9-22 cell line of oral squamous cell carcinoma. CD44+ cells are population of cancer stem like cells. I compared the B7-H3 expression on CD44+cell with CD44-cells. Moreover, we confirmed the expression of CD44 variant form is higher than CD44 standard form on Ca9-22. Ca9-22 hadn't produced most of the TGF-beta.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部外科学

1. 研究開始当初の背景

Adaptive immune response の活性化とその発達は抗原ペプチド-MHC complex と TCR の結合によって始まる。この結合はさらに共刺激分子である B7 family とそのレセプターである CD28 family 間の結合による costimulation あるいは coinhibition によって規定される。

すなわち T 細胞は抗原ペプチド-MHC complex からの刺激では不十分であり、B7 family からの共刺激を受けることにより活性化し機能を発揮するかアナジーを起こすのである。このように抗原提示細胞上の適当な costimulatory 分子と coinhibitory 分子の発現が T 細胞応答のプラ

イミング、増殖、分化、機能的成熟をコントロールしている。現在 B7 family と CD28 family は数多く同定されている。

現在これら B7 family や CD28 receptor をターゲットとした癌免疫療法の臨床試験が行われている。すなわち costimulation の強化あるいは coinhibition のブロックにより癌患者生体内に存在する抗腫瘍免疫応答を強力に惹起しようとするものである。

(1) B7-1、B7-2、B7h-transfected tumor cell vaccine

Costimulation 分子の B7-1、B7-2、B7h を腫瘍細胞に遺伝子導入してそれをワクチンとして使用する臨床試験が腎癌や非小細胞肺癌、急性骨髄性白血病などで行われている。

(2) Anti-CTLA-4 療法

CTLA-4 抗体によって特異的にブロックする方法で、TCR や CD28 の発現には影響されない。2 種類の anti-CTLA-4 抗体、MDX-010 (Ipilimumab) と CP-675, 206 (Ticilimumab) が開発され、多施設で、前立腺癌、卵巣がん、乳がん大腸がんに対して臨床試験が行われている。

また治療への利用はないが、PD-L1/PD-1 については癌細胞の多くが PD-L1 を発現していることにより、これが癌の免疫監視からのエスケープ機構の一つとして、あるいは臨床予後の predictor としての有用性が報告されている。

これら B7 family のうち、B7-H3 は最近同定された分子で costimulation と coinhibition の両面を持つといわれている。現在までのところ costimulation のリガンドが TLT-2 であると報告されたが coinhibition のリガンドはまだ同定されていない。一方、B7-H3 分子は抗原提示細胞以外に癌細胞にも発現していることが非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌において報告された。マウスの実験では B7-H3 の遺伝子導入した腫瘍細胞は免疫原性の増強、腫瘍の退縮、CD8+CTL の活性化と増殖など免疫増強に働くという報告がある一方で、前立腺癌ではその発現が予後不良と報告されており、この分子の二面性が示唆される。このように癌細胞上に発現している B7-H3 分子の果たす役割については解明すべき点が多い。さらに頭頸部癌幹細胞として位置付けられている CD44+細胞では細胞増殖能、抗癌剤耐性、免疫抑制能、アポトーシス抵抗性などの治療抵抗性および浸潤・転移能が高いことが確認されている。特に浸潤・転移能は上皮間葉転換 (EMT) が起こることで獲得すると言われており、TGF β が誘導因子として挙げられる。また口腔粘膜間葉系幹細胞での B7-H3 発現が高値で制御性 T 細胞の増員に寄与するという報告もある。

2. 研究の目的

今回の研究では頭頸部扁平上皮癌を対象に免疫学的アプローチを用いて癌細胞上に発現している B7-H3 分子の役割を明らかにすることである。さらには癌幹細胞および EMT や制御性 T 細胞などとの関連性を見るときにも様々な臨床因子とのかかわりについても検討を加え、予後因子や治療マーカーとしての可能性についても探索していく。

3. 研究の方法

(1) 細胞免疫学的解析

頭頸部扁平上皮癌の手術標本を酵素処理によって細胞浮遊液とする。これらの細胞浮遊液をさらに癌細胞と腫瘍浸潤単核球に分離したのち、フローサイトメトリーによって以下のことについてその比率、発現強度を解析する。

① 癌細胞の B7-H3 の発現

② 樹状細胞、monocyte、MDSC の比率と B7-H3 発現

癌細胞の B7-H3 発現と免疫担当細胞間の関係について解析する。

(2) CD44 細胞における CD44 isoform

CD44+細胞は serum free medium にて培養することで、CD44+細胞の population の増加を確認。マグネットによるソーティングして CD44+細胞と CD44-細胞を分離。それぞれの細胞から RNA を抽出し cDNA を作成し、Realtime-RT-PCR にて CD44 isoform を mRNA レベルで確認。

(3) Ca9-22 細胞株のサイトカイン分泌能

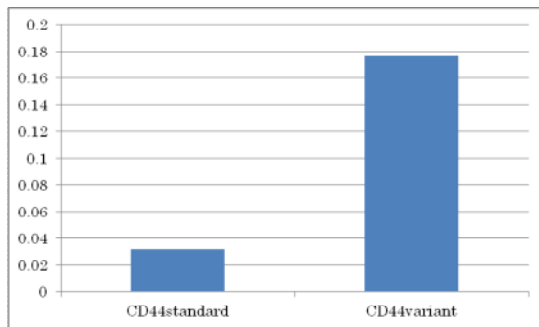
ELISA にて Ca9-22 細胞での TGF β の産生、IL-10 の産生を確認する。

4. 研究成果

(1) Gun-1、Ca9-22 についてフローサイトメトリーを用いて B7 family 分子の発現を調べたが Gun-1 では B7.2 と B7-H1 発現を認めるものの B7-H3 分子の発現を認めなかった。しかしながら Ca9-22 では B7.2 と B7-H1 発現に加えて B7-H3 も弱いながら発現を確認できた。B7.2 分子は T 細胞上に恒常的に発現している CD28 受容体に結合して costimulation の作用を示すが、競合的に CTLA-4 にも結合し、後者に対して親和性が高いと言われている。今回の結果からも頭頸部癌細胞自体にも B7.2 発現が見られることを考えると CTLA-4/B7 共刺激系の免疫抑制が主体と考えられる。ただ Ca9-22 細胞株では B7-H3 発現があり、その受容体である TLT-2 の発現確認までは至っていないが今後 TLT-2 発現および coinhibition に関わる受容体が見つかることができれば共刺激分子での差の検討ができ抗腫瘍免疫の

効率的な治療につながると考える。

(2) CD44 は選択的スプライシングによって standard form と variant form の発現が決められる。今回 Ca9-22 細胞株では優位に variant form の発現が上昇していることが確認された。(図 1)



(図 1)

Variant form の増加が予後に影響する報告もあることから悪性度の評価の一端を担う可能性が示唆される。

(3) Gun-1 と Ca9-22 細胞株の TGF-β と IL-10 産生は TGF β 産生は Gun-1 では産生されているが Ca9-22 ではほとんど産生されていないことが確認された。IL-10 に関しては両細胞株ではほとんど産生されていなかった(表 1)。

TGF-β は腫瘍抑制の機能を持つ制御性 T 細胞の分化誘導や癌の浸潤・転移に関わる EMT の誘導因子である。Gun-1 ではその発現が高値であり、逆に Ca9-22 ではその産生がほとんどない。Gun-1 では腫瘍免疫寛容の状態に制御性 T 細胞が関与している可能性が示唆されるが、Ca9-22 細胞株では制御性 T 細胞による制御がかかっている可能性がある。B7-H3 の発現状況を考慮すると B7-H3 分子と coinhibition に作用する何らかの受容体で免疫寛容を起こしている可能性が考えられた。

Cytokine (pg/ml)	Gun-1	Ca9-22
TGF-beta	219.1	< 4.0
IL-10	< 3.0	< 3.0

(表 1)

以上の結果から今回 Ca9-22 細胞株における B7-H3 発現が弱いことは確認できたがヒト腫瘍組織標本での発現を確認するまでには至らなかった。しかしながら頭頸部癌に

おける B7-H3 とリンパ組織での制御性 T 細胞の誘導との関連性が示唆される結果となったため有益な知見となったと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Chimamatsu K, Ishii H, Takahashi G, Okamoto A, Moriyama M, Sakakura K, Masuyama K. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. Head Neck(査読あり) Jun;103(6):976-83. 2012

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 初鹿恭介, 森山元大, 増山敬祐 当科におけるハイドロデブリッターシステムの使用経験(第 50 回日本鼻科学会)岡山(2011 年 12 月 1-3 日)
- ② 森山元大, 増山敬祐 好酸球性副鼻腔炎術後に発症した Churg-Strauss 症候群による多発単神経炎の 1 例(第 50 回日本鼻科学会)岡山(2011 年 12 月 1-3 日)
- ③ 金井真理, 森山元大, 増山敬祐 救命しえた多発脳神経障害を伴う侵襲性副鼻腔真菌症の一例(第 50 回日本鼻科学会)岡山(2011 年 12 月 1-3 日)
- ④ 近松一朗, 森山元大, 増山敬祐 エピジェネティクスを標的とした頭頸部扁平上皮癌への新しい治療戦略の可能性(第 35 回日本頭頸部癌学会)愛知(2011 年 6 月 9-10 日)
- ⑤ 山西貴大, 森山元大, 増山敬祐 孤立性の動眼神経麻痺で発症した蝶形骨洞原発悪性リンパ腫の 1 例(第 35 回日本頭頸部癌学会)愛知(2011 年 6 月 9-10 日)
- ⑥ 森山元大, 増山敬祐 当科における喉頭癌の臨床的検討(第 35 回日本頭頸部癌学会)愛知(2011 年 6 月 9-10 日)
- ⑦ 近松一朗, 森山元大, 増山敬祐 頭頸部扁平上皮癌患者の免疫制御に及ぼす myeloid-derived suppressor cell の役割(第 29 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会)大分(2011 年 2 月 10-12 日)
- ⑧ 森山元大, 増山敬祐 サルベージ手術後の縫合不全に対して皮弁再建を試行した下咽頭癌の 1 症例(第 34 回日本頭頸部癌学会)東京(2010 年 6 月 10-11 日)
- ⑨ 遠藤周一郎, 森山元大, 増山敬祐 当科における TRT の効果の検討(第 20 回日本耳下学会)愛媛(2010 年 10 月 7-9 日)
- ⑩ 上條篤, 森山元大, 増山敬祐 スギ花粉症に対するボツリヌス治療の有効性の検

討(第 49 回日本鼻科学会)北海道 (2010 年 8 月 26-28 日)

- ⑪ 森山元大、増山敬祐 マクロライド療法中に偽膜性腸炎を発症した 1 例(第 49 回日本鼻科学会)北海道(2010 年 8 月 26-28 日)
- ⑫ 遠藤周一郎、森山元大、増山敬祐 当科における小児先天性真珠腫症例の検討(第 5 回日本小児耳鼻咽喉科学会)北海道(2010 年 6 月 26-27 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森山 元大 (MORIYAMA MOTOHIRO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：00402074

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし