

## 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：21791606

研究課題名（和文）頭頸部癌微小環境における MDSC の分化・成熟と免疫抑制機構の解明

研究課題名（英文）The immunosuppressive role of MDSC in microenvironment of head and neck cancer.

研究代表者

山本 卓典（YAMAMOTO TAKANORI）

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60436863

研究成果の概要（和文）：Myeloid-derived suppressor cells:MDSC は免疫寛容を誘導する細胞癌患者の末梢血や癌組織での存在が確認されている。頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血において CD14+HLA-DR-細胞と制御性 T 細胞の比率が健常人に比べて増加していた。癌局所においても CD14+HLA-DR-細胞の比率には相関があり MDSC の集積あるいは増殖が示唆された。CD14+HLA-DR-細胞を抗 CD28 抗体で刺激した場合 T リンパ球の増殖能と IFN- $\gamma$ 産生を効率的に抑制し今回の研究結果から頭頸部扁平上皮癌患者において、CD14+HLA-DR-細胞は免疫寛容機能を担っており、新たな頭頸部癌治療ターゲットになりうると思われた。

研究成果の概要（英文）：Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) represent a heterogeneous population and have the potential to suppress immuneresponses via diverse mechanisms. MDSC was identified by the markers HLA-DR in the peripheral blood from cancer patients. In this study, we investigated the proportions and characteristics of CD14+ HLA-DR\_ cells in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck(SCCHN). The sorted CD14+ HLA-DR\_ cells were able to suppress effectively both the proliferation and IFN- $\gamma$  production of anti-CD28 stimulated T cells, suggesting that CD14+ HLA-DR\_ cells act as potent immunosuppressive cells and particularly contribute to tumor escape from the host immune system in patients with SCCHN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

癌細胞には、癌細胞のみではなく様々な間質細胞が含まれている。癌の間質細胞には endothelial cells, fibroblast, adipocytes, macrophage, granulocytes, immature myeloid cells などが含まれており、これら寛容細胞によってユニークな微小環境が形成される。癌細胞は cell-to-cell contact や腫瘍由来の様々な因子の産生によって腫瘍の発育を促進するが、この間質細胞にも影響を及ぼし、間質細胞自身もまた癌の増殖、浸潤、転移に対して重要な働きをしていることがわかってきている。この間質細胞のうち myeloid origin の免疫抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) が現在注目を浴びている。これまでに MDSC の習俗は細菌・寄生虫感染、急性・慢性炎症・外傷性ストレスなどにおいて免疫寛容を誘導する細胞として報告されている。癌においても MDSC は癌細胞および他の間質細胞との相互に関係しながら癌の免疫監視機構逃避のメカニズムの一翼を担っているということが報告され始めている。この MDSC の population について単一のマーカーはまだ同定されていない。MDSC は顆粒球、樹状細胞、マクロファージ、前骨髄芽球などの前駆細胞であり、様々な腫瘍産生サイトカインに反応して誘導され、分化度もさまざまな非常に多様な細胞集団である。その一方でいくつかの共通の機能も有しており中でも *in vitro* あるいは *in vivo* で免疫応答抑制の機能を有することである。特に抗腫瘍免疫応答において重要な T 細胞に不応答性やアポトーシスを誘導することが明らかとなり、そのシグナル伝達経路も報告されている。これまでに主に癌のマウスモデルにおける MDSC の研究から MDSC における抑制メカニズムや細胞導体 に及ぼすシグナル伝達機構について報告されてきた。

## 2. 研究の目的

今回の研究においてはマウスの study から得られたエビデンスをもとに、人の癌種の中でも免疫抑制が比較的強い頭頸部扁平上皮癌患者を対象にして、原発巣、所属リンパ節、末梢血における MDSC の動態を調べる。さらにその抑制メカニズムを解明し、克服へと向けた基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 当大学の倫理委員会の承認を得たうえで、研究の説明を行い同意を得られた患者より手術の際に原発巣、リンパ節、末梢血を採取する。原発巣およびリンパ節は酵素処理あるいはナイロンメッシュによる機械的処理により細胞浮遊液とする。この細胞浮遊液と末梢血はそれぞれ Ficoll 比重法により単核

球と腫瘍細胞に分離する。このようにして得られた細胞成分は Flow cytometry により以下の population についてその比率の解析を行う。

(2) 癌患者および健常人の末梢血を CFSE を用いて染色し 96 well plate で CD14+HLA-DR-細胞と CD14+HLA-DR+細胞と 5 日間 coculture する。T 細胞の増殖はフローサイトメトリーで確認した。さらに抗 CD86 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 TGF- $\beta$  抗体を用いて T 細胞増殖能を確認した。

(3) 上記で得られた細胞培養液を集めて、TGF- $\beta$  産生および IFN- $\gamma$  産生を確認した。

## 4. 研究成果

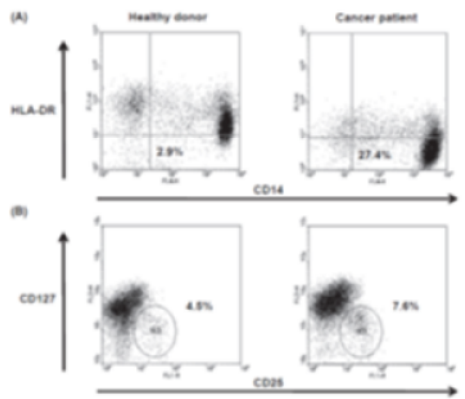
当研究に関して同意の得られた頭頸部扁平上皮癌と診断された 34 症例から治療前に末梢血を得た。34 症例の内訳を表 1 に示す。の頭頸部癌は口腔癌 22 例、喉頭癌 6 例、下咽頭癌 4 例、上顎洞癌 2 例であった。進行度は 24 症例が進行癌であった。(表 1)

Characteristic	Value
Total no. patients (male/female)	34 (27/7)
Age, mean (range) (years)	66.2 (35-89)
Tumor site	
Oral cavity	22
Larynx	6
Hypopharynx	4
Maxillary sinus	2
TNM classification	
T1	2
T2	13
T3	9
T4	10
N0	18
N1	6
N2	10
N3	0
M0	34
M1	0
Stage	
I	1
II	9
III	6
IV	18

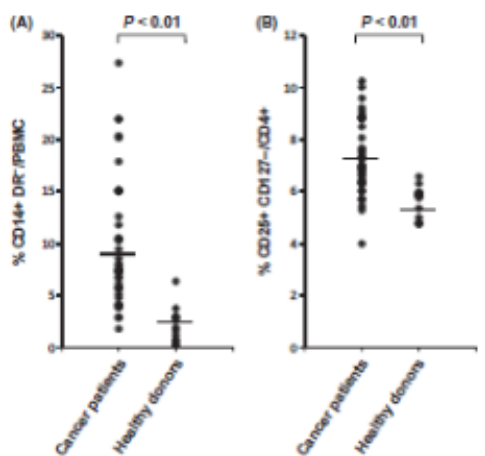
SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck.

(表 1)

(1) 頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血において単球系 MDSC の subset である CD14+HLA-DR-細胞の比率が健常人に比べて増加していた。また同時に調べた CD4+CD25+CD127-制御性 T 細胞の比率も増加していることも確認できた。興味深いことに、CD14+HLA-DR-細胞と制御性 T 細胞の比率の間に逆相関を認め、このことは免疫抑制状態でも一種の homeostasis が存在を示唆する結果であった。(図 1.2)



(図 1)

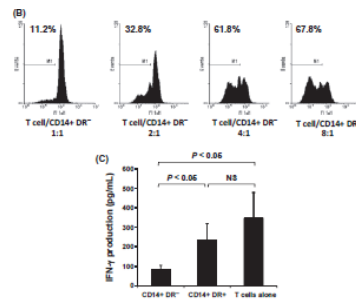


(図 2)

癌局所において CD14+細胞と CD14+HLA-DR-細胞の比率には相関関係を認めた。末梢血においてはこのような相関は認めておらず、癌局所における MDSC の集積あるいは増殖が示唆された。

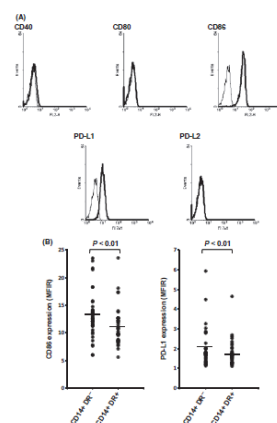
(2) ソーティングした CD14+HLA-DR-細胞は抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激した T リンパ球の増殖能と IFN- $\gamma$ 産生を効率的に抑制した。これらから頭頸部扁平上皮癌患者においても CD14+HLA-DR-細胞により免疫寛容状態が誘導されていることが示唆された。

(図 3)

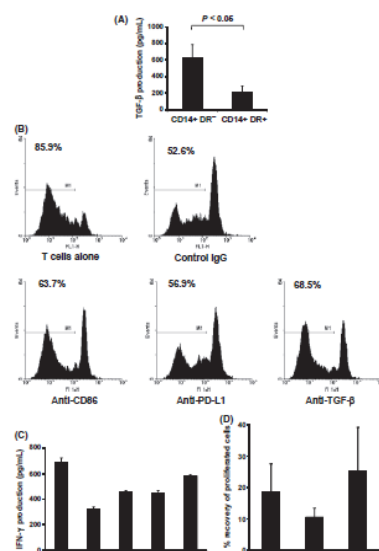


(図 3)

(3) CD14+HLA-DR-細胞は CD14+HLA-DR+細胞に比して B7 family ligand である CD86 や PD-L1 の発現が多く、TGF  $\beta$  産生が多かった。さらに CD86、PD-L1 の抗体によるブロック、および TGF  $\beta$  を中和抗体で抑制することで T 細胞増殖能抑制効果がなくなり、IFN  $\gamma$  産生が増加した。(図 4. 5)



(図 4)



(図 5)

今回の研究結果から頭頸部扁平上皮癌患者において、CD14+HLA-DR-細胞は免疫寛容機能を担っており、新たな頭頸部癌治療ターゲットになりうると考えられた。

#### 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2件)

- ① Kazuaki Chikamatsu, Koichi Sakakura, Minoru Toyoda, Katsumasa Takahashi, Takanori Yamamoto, Masuyama Keisuke. Immunosuppressive activity of CD14+ HLA-DR-cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Research (査読有) Jun;103(6):976-83. 2012
- ② Masuyama K, Chikamatsu K, Ikagawa S, Matsuoka T, Takahashi G, Yamamoto T, Endo S. Analysis of Helper T Cell Responses to Cry J 1-Derived Peptides in Patients with Nasal Allergy:Candidate for Peptide-Based Immunotherapy of Japanese Cedar Pollinosis Allergology International (査読有) Mar;58(1):63-70. 2009

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 卓典 (YAMAMOTO TAKANORI)  
山梨大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60436863

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし