

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03140

研究課題名（和文）口腔がんの微小環境に立脚した免疫療法の開発に向けての基礎的検討

研究課題名（英文）Basic study for the development of immunotherapy based on the microenvironment of oral cancer

研究代表者

山本 哲也（Yamamoto, Tetsuya）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00200824

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌において、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）単剤によるがん免疫療法の効果は限定的であり、その有効性を高めるためには耐性メカニズムの解明が喫緊の課題である。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌細胞に発現するPD-L1のintrinsic作用とその機序、殺細胞薬ならびにEGFR標的薬のPD-L1発現に及ぼす影響を検討するとともに、再発または遠隔転移を有する口腔癌のICI治療症例の臨床検体を用いて、一連の治療過程におけるPD-L1の動的発現変化を解析し、ICI療法の治療効果との関連を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICI療法により生存期間の若干の延長は認められるものの、奏効率の低さ、治療効果の個体差、治療薬が高額であること、免疫関連有害事象など解決すべき数多くの問題がある。本研究では、癌細胞に発現するPD-L1そのものを標的とする新規治療法、ICI療法と殺細胞薬、分子標的薬の併用、また口腔癌の一連の治療過程においてどのタイミングでICI療法を行うのが効果的なのかを提案するものである。

研究成果の概要（英文）：In head and neck cancer, the efficacy of cancer immunotherapy using immune checkpoint inhibitors (ICIs) is limited, and elucidation of the resistance mechanism is an urgent task to improve its efficacy. In this study, we investigated the intrinsic effects of PD-L1 expressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and its mechanism. Furthermore, we examined the influences of cytotoxic drugs and EGFR-targeting drugs including erlotinib and cetuximab on PD-L1 expression in OSCC cells. We also analyzed the dynamic changes in PD-L1 expression during a series of treatments using clinical specimens from oral cancer patients with recurrent or distant metastasis treated with nivolumab and clarified the relationship with the therapeutic effect of ICI therapy.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は自身の遺伝子異常や腫瘍浸潤細胞が産生する IFN- γ などのサイトカインにより PD-L1 を高発現し、免疫細胞に発現される PD-1 との結合を介した細胞間相互作用 (extrinsic 作用) により免疫を回避することが知られている^{1,2)}。近年、がん細胞が発現する PD-L1 は、これらの extrinsic な作用以外に PD-1 との結合を介さない癌細胞自体に対する直接作用 (intrinsic 作用) を有しており、癌細胞の糖代謝促進、オートファジー誘導、DNA 修復促進、PI3K/AKT や Ras シグナルの活性化を介した上皮間葉移行 (EMT)、転移、治療抵抗性、がん幹細胞形質獲得の促進などにより癌細胞の悪性を促進することが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、口腔扁平上皮癌 (OSC) が発現する PD-L1 の intrinsic な作用は未だ不明な点が多い。

近年、頭頸部癌に対しても抗 PD-1 抗体である免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) が承認され臨床使用されているが、臨床試験での奏効率は 10~25% と満足のいく成績とは言い難い。我々の OSC 症例における経験では、原発腫瘍の縮小が一旦生じるもののその後増悪した症例、転移巣は縮小したが原発巣には変化が認められなかった症例、全く奏効しなかった症例などを経験している。そもそもニボルマブ投与例は投与以前に手術、化学放射線治療、分子標的薬治療などの治療が奏功せず再発転移を来した難治症例か、初診時に既に他の治療法が選択できないほど腫瘍が進展していた症例であり、様々な治療耐性を獲得している高悪性度のがんを自己の免疫賦活化のみで根絶させることは困難であると思われる。そこで、ICI 療法に他の ICI や殺細胞薬、分子標的薬を併用すると、奏効率や全生存期間が改善することが複数のがん種で報告され臨床応用されている。これらは、抗がん剤、分子標的薬による癌細胞の Phenotype の変化や細胞死の誘導と ICI 療法による抗腫瘍免疫の促進が、相加的あるいは相乗的に作用していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、OSC 細胞株を用いて PD-L1 の intrinsic 作用とその機序を明らかにするとともに、殺細胞薬ならびに分子標的薬の OSC 細胞における PD-L1 の発現への影響を検討した。さらに、ICI 投与症例の臨床検体を用いて、患者背景ならびに初診時生検組織の PD-L1 の発現と ICI 療法の治療効果との関連を統合的に検討するとともに、手術、化学放射線治療といった一連の治療過程におけるがん微小環境における PD-L1 の動的発現変化について検討した。

3. 研究の方法

OSC 細胞株の SAS および HSC-3 に PD-L1-siRNA を導入後、PD-L1 のノックダウン効果を定量的 RT-PCR、Western blotting にて確認した。その後、PD-L1 の細胞局在をフローサイトメトリー、共焦点顕微鏡ならびに細胞分画キットを用いて検討した。同時に、PD-L1 ノックダウンによる SAS および HSC-3 細胞の増殖能 (CCK-8 assay)、遊走能 (Wound healing assay)、浸潤能 (Invasion assay)、幹細胞様形質獲得能 (CD44/Oct4 の発現、Sphere 形成能) への影響を検討した。さらに、PD-L1 ノックダウンにより発現が抑制される蛋白のスクリーニングを行い、著明な発現低下が認められた分子への影響について検討した。また、SAS、HSC-3 を 5-FU、CDDP、PXT、DOX ならびに EGFR 標的薬であるセツキシマブ、エルロチニブで処理し、PD-L1 発現への影響を Western blotting およびフローサイトメトリーにて検討した。

臨床検体を用いた検討では、2013 年 12 月から 2023 年 12 月に高知大学附属病院歯科口腔外科で再発・転移口腔扁平上皮癌と診断されニボルマブの投与を行った 12 例を対象とし、ニボルマブの治療効果と初診時生検組織における PD-L1 の発現との関連について後ろ向きに検討した。治療効果の判定は、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST version) に準拠し、

complete response (CR)、partial response (PR)を奏功群、stable disease (SD)、progressive disease (PD)を非奏功群として2群に分類した。免疫組織学的評価は、腫瘍組織における陽性細胞率(CPS)をKEYENCE BZ-X700解析アプリケーションにて解析した。さらに、3例で上記検討を初診時生検、術後再発時、化学放射線後に行い、一連の治療過程におけるPD-L1の動的発現変化について解析した。

4. 研究成果

SASおよびHSC-3細胞におけるPD-L1のintrinsic作用についての検証

両細胞はPD-L1を高発現しており、PD-L1-siRNA導入によりmRNAおよび蛋白レベルは著明に低下した。PD-L1は両細胞の細胞膜に最も高発現しており、次いで細胞質、可溶性核分画に発現していたが、PD-L1ノックダウンによりこれらの発現はすべて減弱した。また、両細胞におけるPD-1の発現についてWestern blottingにて検討した結果、SASおよびHSC-3細胞はPD-1を発現していたが、PD-L1ノックダウンによる影響は認められなかった。

次に、PD-L1ノックダウンのOSC細胞の悪性形質への影響について検討したところ、コントロール細胞と比較して、PD-L1ノックダウン細胞では増殖能が低下するとともに、G2/M arrestが誘導され、細胞増殖に関わるシグナル分子であるAKTおよびSTAT3のリン酸化レベルが低下した。さらに、スフェア形成能への影響について検討したところ、PD-L1ノックダウン細胞のスフェアサイズの縮小が認められるとともに、Total cell lysateにおいて幹細胞マーカーのOct4およびCD44の発現が低下した。加えて、PD-L1ノックダウンによりOSC細胞の遊走、浸潤能も低下し、間葉系マーカーのN-cadherinおよびVimentinの発現低下が認められた。また、PD-L1ノックダウンによりAKTの上流因子であるEGFRのmRNA、蛋白レベルはいずれも低下した。これらの結果から、OSC細胞に発現するPD-L1はOSC細胞自身にintrinsicに作用し、EGFRの発現誘導ならびに下流シグナルの活性化を介して、がん細胞の悪性形質獲得を促進していることが示唆された。

殺細胞薬ならびに分子標的薬がOSC細胞のPD-L1発現に及ぼす影響

SAS、HSC-3において、5-FU、CDDP、PXTは有意にPD-L1の蛋白発現を誘導した。一方、セツキシマブ、エルロチニブはPD-L1の発現を抑制したことから、OSC細胞に発現するPD-L1は殺細胞薬により誘導され、一方EGFR標的薬によって抑制されることが示唆された。

ニボルマブの効果と患者背景因子ならびにPD-L1発現との関連

対象患者は、男性が9例、女性が3例、年齢は中央値が43歳から77歳で、中央値は62.5歳であった。内訳は、65歳未満が6例、65歳以上が6例であった。原発部位は、舌が8例、上顎歯肉が3例、口底が1例であった。初診時の臨床病期は、Stage IIが4例、Stage IVが8例であった。標的病変は、局所再発病変が7例、遠隔転移が3例、局所再発+遠隔転移2例であった。組織学的分化度は、高分化4例、中分化7例、低分化1例であった。それぞれの患者背景因子とニボルマブの治療効果との間では、組織学的分化度ならびに初診時のステージとの間に相関が認められた。一方、生検組織におけるPD-L1陽性率(CPS)と治療効果との間に明らかな相関は認められなかった。一連の治療過程におけるPD-L1の発現変動について検討したところ、初診時生検組織と比較して、化学療法後の組織におけるPD-L1の発現レベルが上昇した。

【参考文献】

1. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 16(5):275-87.
2. Kornepati AVR, Vadlamudi RK, Curiel TJ. Programmed death ligand 1 signals in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2022 22(3):174-89.
3. Yadollahi P, Jeon YK, Ng WL, Choi I. Current understanding of cancer-intrinsic PD-L1: regulation of expression and its protumoral activity. *BMB Rep*. 2021 54(1):12-20.
4. Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, et al. Tumor-intrinsic PD-L1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Res* 2016 76:6964-74.
5. Gupta HB, Clark CA, Yuan B, Sareddy G, Pandeswara S, Padron AS, et al. Tumor cell-intrinsic PD-L1 promotes tumor-initiating cell generation and functions in melanoma and ovarian cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016 1:16030.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasabe Eri, Tomomura Ayumi, Yamamoto Tetsuya.	4. 巻 53
2. 論文標題 The involvement of EGFR/AKT in the tumor intrinsic PD-L1-induced malignant potential of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Oral Pathol Med.	6. 最初と最後の頁 310-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jop.13540.	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Eri Sasabe, Ayumi Tomomura, Tetsuya Yamamoto
2. 発表標題 The involvement of EGFR/AKT signaling in the tumor intrinsic PD-L1-induced malignant potential of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 27th EACMFS Congress（国際学会）
4. 発表年 2024年～2025年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞が発現するPD-L1はintrinsicに作用して癌の悪性形質を促進する
3. 学会等名 第77回口腔科学会学術大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞が発現するPD-L1のintrinsic作用の解析
3. 学会等名 第58回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞が発現するPD-L1はintrinsicに作用して癌の悪性形質を促進する
3. 学会等名 第77回口腔科学会学術大会
4. 発表年 2022年～2023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
研究分担者	笹部 衣里 (Sasabe Eri) (40363288)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	
研究分担者	北村 直也 (Kitamura Naoya) (70351921)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	
研究分担者	仙頭 慎哉 (Sento Shinya) (30635264)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	

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
---------	---------