

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10142

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の免疫チェックポイント阻害薬耐性機序の解明と新規治療戦略

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of resistance to immune checkpoint inhibitors in oral squamous cell carcinoma and novel therapeutic strategies

研究代表者

永田 将士（Nagata, Masashi）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：10635791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌における免疫チェックポイント阻害薬（ICIs）の有効性が注目されているため、ICIsのマーカーであるPDL1の治療予後因子としての可能性を探索した。PD-L1EVs-high群ではPFS、PFS2、OSいずれにおいてもPD-L1 EVs-lowに比べて予後が不良となり、OSにおいてPD-L1 EVsは独立した予後因子であった。次に、栄養指標と末梢血中のT cell exhaustionの関連を解析した結果、低OPNI値患者ほど、末梢血中CTLのT cell exhaustionが進行しており、栄養状態低下は、全身の免疫状態に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療予後因子の解明により、患者1人1人に適した抗腫瘍薬を選択することが可能になり、治療効果向上が期待される。また、根治的加療が不可能である進行例においても、効果的な薬剤の使用や、補助療法の併用にてQOLの維持に繋がると思われる。

研究成果の概要（英文）：As the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in oral squamous cell carcinoma has been attracting attention, we explored the possibility of PDL1, a marker of ICIs, as a treatment prognostic factor. The PD-L1EVs-high group had a worse prognosis in PFS, PFS2, and OS compared to the PD-L1EVs-low group, and PD-L1EVs was an independent prognostic factor for OS. Next, we analyzed the relationship between nutritional indicators and T cell exhaustion in peripheral blood, and found that patients with low OPNI values had more advanced T cell exhaustion of CTLs in peripheral blood, suggesting that poor nutritional status may affect the immune status of the whole body.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 免疫チェックポイント阻害剤 治療マーカー

1. 研究開始当初の背景

OSCCは口腔癌の80%以上を占める悪性腫瘍である。近年、がん免疫療法が目覚ましい発展を遂げている。がん免疫療法は「がんワクチン療法」、「免疫細胞移入療法」、「免疫チェックポイント阻害療法」などに大別され、特に近年は、活性化T細胞に発現する免疫抑制分子であるCTLA-4やPD-1、ならびにがん細胞や免疫細胞を含むがん間質細胞に発現するPD-L1に対する免疫チェックポイント阻害療法に注目が集まっている。口腔がんを含む頭頸部がんにおいても、2017年3月に抗PD-1抗体であるニボルマブが、続いて2019年12月に同じく抗PD-1抗体のペンブロリズマブが再発や遠隔転移をきたした頭頸部がん患者に対して保険承認され、現在臨床の現場でも旧来の化学療法や放射線治療抵抗性の腫瘍に対抗するKey drugとして使用されている。しかしながら、現実的には生命予後の延長は認めるものの、腫瘍消失まで効果を認める事は非常に

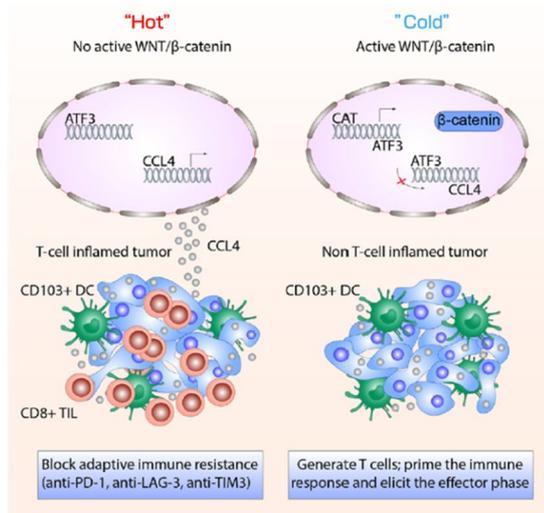


図1: “Hot tumor”と“Cold tumor”

希であり、未だ有意な生存率改善には繋がっていない(Siegel et al. *CA Cancer J Clin* 2020)。その理由にはICIsに対する抵抗性があり、腫瘍自体の性格だけでなく、宿主の免疫力および腫瘍微小環境と、多角的な条件が重なり、治療抵抗性を獲得しているとされている。腫瘍微小環境を、PD-L1発現の有無と腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の有無から4種類にサブタイピングすると、TIL陽性/PD-L1陽性であるType IおよびTIL陽性/PD-L1陰性であるType IVが、抗PD-1抗体単剤あるいは併用で効果が認められる“Hot tumor”であるといわれている(Teng MW, et al.: *Cancer Res*, 2015)。“Hot tumor”とは、腫瘍微小環境においてCD8陽性T細胞の浸潤が有意に多く認められるT cell-inflamedで、抗PD-1抗体薬の効果が得られにくいとされている。“Cold tumor”とは、CD8陽性T細胞の浸潤が認められないNon-T cell-inflamedである(Gajewski TF, et al.: *Nat Immunol*, 2013)。両者の違いはWNT/β-カテニン経路活性の有無にあり、WNT/β-カテニン経路活性があることによってT細胞が排除され、“Cold tumor”になるという報告がある(図1)。また、特定の細菌種と免疫チェックポイント阻害薬の効果の相関性や、腸内細菌の多様性が免疫チェックポイント阻害薬の効果と相関することが報告されており(Fukuoka S, et al.: *ASCO* 2018)、宿主側のバイオマーカーを検索していくことも重要である。近年、次世代シーケンサーが発達し、様々な遺伝子解析が行われている。その中で、マイクロサテライト不安定性が高い(MSI-H)大腸がん患者における腫瘍遺伝子変異量(TMB)は免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子としてなり得ることが報告された(Fakih et al. *Ann Oncol* 2020)。しかしながら、口腔癌を含む頭頸部癌において、ICIs治療抵抗性のメカニズムは未だ明らかにならず、効果予測因子は認められない。

上述のような学術的背景と問いを出発点として、本研究では、口腔癌におけるICIs耐性機序の解明および新たな治療戦略の開発を目的として、実際に免疫チェックポイント阻害薬を投与した患者検体やPatient Derived Xenograft: PDXモデルを使用し、新たな分子機構の解明を行う。現在、実際のOSCC患者検体によるICIs耐性の分子メカニズム解明を目指した研究はほとんどなく、独自性に富んだものである。また、上述のような独自性から、研究成果は既存治療では限界を迎えつつある口腔がん治療に大きなパラダイムシフトをもたらし得ると考えられた。更に、OSCCのICIs耐性機序解明に寄与するだけでなく、他癌種におけるICIs治療抵抗性の解明にも新たな知見をもたらし、治療予測因子および新規治療法開発に大きく貢献すると考えられた。

(3) 本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか

本研究では、ICIs耐性口腔がんに対して、多角的な観点から、耐性メカニズム解明と新規治療予測因子およびより効果の高い治療戦略の創出を目指す。

2. 研究の目的

上述のような学術的背景と問いを出発点として、本研究ではHNCにおけるICIs治療抵抗性獲得メカニズムを解明し、口腔扁平上皮癌の制御を目指した、革新的診断法・治療法の確立を目指すこととした。

3. 研究の方法

対象は免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法を受けた再発・転移性OSCC患者37例とした。免疫療法前の患者から血液サンプルを採取し、血清を分離して-80℃で保存した。得られ

た血清サンプルを ELISA (PD-L1/CD9 Exosome ELISA Kit, Human; Code No. HAK- HELPD109-1, Hakarel Inc.) で測定した。検体をアッセイバッファーで 10 倍に希釈し、抗 CD9 抗体固相化プレートの各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ添加した後、攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。さらに、洗浄後、アッセイバッファーで希釈した HRP 標識抗 PD-L1 抗体 100  $\mu$ L を各ウェルに添加し、攪拌 (800rpm) しながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、洗浄後、基質溶液 100  $\mu$ L を各ウェルに加え、遮光し、室温で 20 分間反応させた。発色濃度を測定した後、各ウェルに 50  $\mu$ L の停止液を加えた。その後、Bio-Rad プレートリーダー (iMark Microplate Reader) を用いて、各プレートのウェルの吸光度を 450nm で読み取った。標準タンパク質 (PD-L1/CD9 融合タンパク質) を用いて標準曲線を作成し、ELISA が信頼性の高い直線検出範囲 (0.156-10 ng/ml) をもつことを確認した。

次に、ICI 投与 OSCC 患者の末梢血を用いて、栄養指標 (OPNI, NLR) と予後との関連に関して解析を行った。ICI 投与患者の予後については、後方視的に解析を行い、ICI 投与直前に BD バキュティナ® CPT™ 単核球分離用採血管を用いて、末梢血を採取 末梢血単核球 (PBMC) を採取した。Flow cytometry で、PBMC 中の CD4 陽性 T 細胞 (Th 細胞) と細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の exhaustion marker (PD-1, TIM-3, LAG-3) の発現を解析し、生存率との関連性を検討した。

#### 4. 研究成果

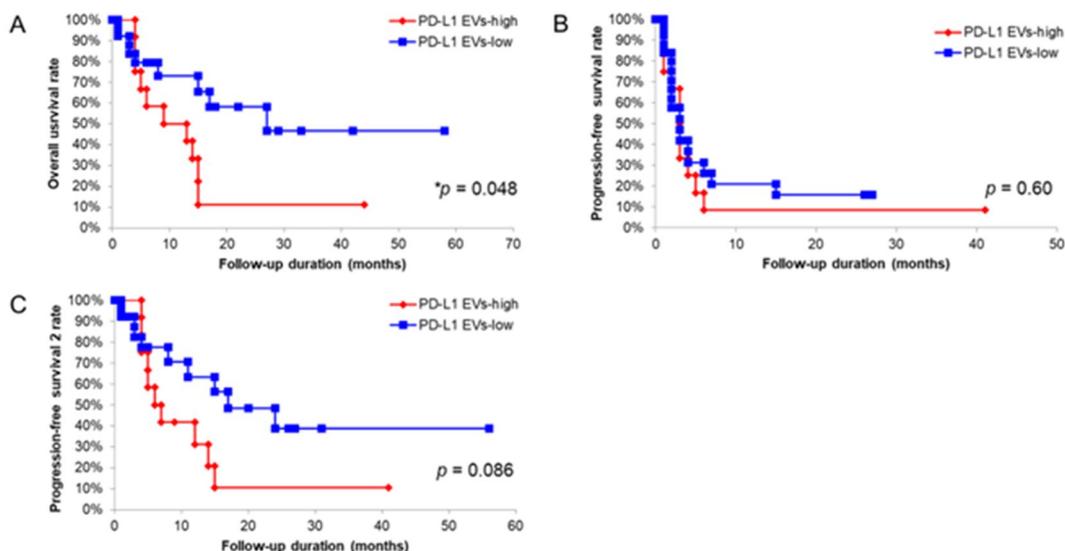
再発・転移性 OSCC 患者の血中 PD-L1 EVs の平均濃度は 6.79 (範囲、0-126.9) ng/ml であった。ROC 解析を行い PD-L1 EVs のカットオフ値を設定した。PD-L1 EVs の濃度は 0 ~ 126.9 (平均、6.79) ng/ml の範囲であり、5 年 OS をエンドポイントとした ROC 曲線下面積は 0.756 であった。PD-L1 EVs 濃度が 2.90 ng/ml の場合、5 年生存率の診断能が最も高かった (感度 = 0.526、特異度 = 0.889)。したがって、この値を PD-L1 EV 低値群 (< 2.90 ng/ml) と PD-L1 EV 高値群 ( $\geq$  2.90 ng/ml) に分類するカットオフ値として選択した。

続いて、ICI 治療前の患者血清中の PD-L1 EVs 濃度の臨床的意義を調べるために、PD-L1 EV と臨床病理学的因子との関係を調べた。その結果、年齢、性別、原発腫瘍部位、分化度、浸潤様式、RECIST、CPS の観点からは、PD-L1 EVs 濃度との間に有意差はなかった。一方、ICI に良好な反応を示した患者では PD-L1 EVs 濃度が高い傾向にあった ( $p = 0.146$ )。

因子	Total n = 37	PD-L1 EVs濃度		p-value
		High 12 (32.4%)	Low 25 (67.6%)	
年齢				
中央値	76	71.5	78	
範囲	59-89	62-89	69-87	
< 75	16	7 (43.8)	9 (56.2)	0.291
$\geq$ 75	21	5 (23.8)	16 (76.2)	
性別				
男性	21	8 (38.1)	13 (61.9)	0.491
女性	16	4 (25.0)	12 (75.0)	
原発巣				
舌	16	7 (43.8)	9 (56.2)	0.291
その他	21	5 (23.8)	16 (76.2)	
分化度				
中分化/低分化	20	4 (20.0)	16 (80.0)	0.157
高分化	17	8 (47.1)	9 (52.9)	
RECIST				
CR/PR	14	7 (50.0)	7 (50.0)	0.146
SD/PD	23	5 (21.7)	18 (78.3)	
浸潤様式				
POI-1,2,3	20	5 (25.0)	15 (75.0)	0.482
POI-4, WPOI-5	17	7 (41.2)	10 (58.8)	
CPS status				
< 20	11	3 (27.3)	8 (72.7)	1
$\geq$ 20	26	9 (34.6)	17 (65.4)	

Abbreviations: POI Pattern of invasion; RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors; CR: Complete response; PR: Partial response; SD: Stable disease; PD: Progressive disease; CPS: Combined Positive Score.

治療前の血中 PD-L1 EVs 濃度と予後の関係を明らかにするため、再発・転移性 OSCC 患者 37 人の OS、PFS、PFS2 を Kaplan-Meier 法で解析した。5 年全生存率は、PD-L1 EVs 低値群で PD-L1 EVs 高値群より有意に低かった ( $p = 0.048$ )。5 年 PFS および PFS2 率は PD-L1 EVs 高群で低い傾向にあったが、その差は統計学的に有意ではなかった ( $p = 0.600$ ;  $p = 0.086$ )。これらのデータから、治療前の血中 PD-L1 EVs 濃度が、免疫療法を受ける再発・転移性 OSCC 患者の予後因子である可能性を示唆された。



更に、治療前の PD-L1 EVs の状態が全生存率に及ぼす影響を詳細に解析し、Cox 比例ハザード回帰モデルを用いて多変量解析を行った。年齢、性別、原発部位、分化度、浸潤様式、および CPS の状

態で調整した後も、全生存率に対する PD-L1 EVs 濃度の影響は残っており(ハザード比 = 0.305、95%CI = 0.096-0.970、 $p = 0.044$ )、PD-L1 EVs 濃度は全生存率の独立した予後因子であることが明らかとなった(表 4)。

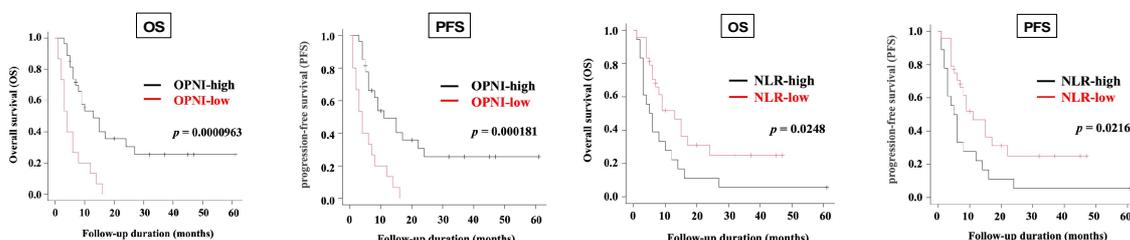
以上の結果から、OSCC の中でも特に悪性度が高い腫瘍によって起こる再発・転移性 OSCC においても病態形成や治療抵抗性にエクソソームが関与している可能性が示唆された。また、miRNA は転写制御を介してその機能を発揮することから、作用発現までに一定の時間を要する一方で、エクソソーム表面に存在、あるいは内包されるタンパク質の場合には速やかにその生理活性が発揮されることが想定される。予備研究における偶発的発見の成果ではあったが、本研究成果は日本口腔外科学会の機関誌である *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* に投稿・受理された。

今後は、PD-L1 EVs が腫瘍微小環境、特に腫瘍免疫において果たす役割を *in vitro*、*in vivo* の両面で解析していく予定である。

Variables	全生存	
	Hazard ratio (95%CI)	p-value
年齢		
≥ 75	1.697 (0.562-5.126)	0.349
< 75		
性別		
男性	1.418 (0.438-4.592)	0.561
女性		
原発巣		
舌	1.230 (0.423-3.578)	0.704
その他		
分化後		
高分化	0.462 (0.130-1.645)	0.233
中分化/低分化		
浸潤様式		
POI-4, WPOI-5	0.884 (0.265-2.954)	0.842
POI-1,2,3		
CPS status		
> 20	0.965 (0.334-2.794)	0.948
< 20		
PD-L1 EVs		
Low	0.305 (0.096-0.970)	*0.044
High		

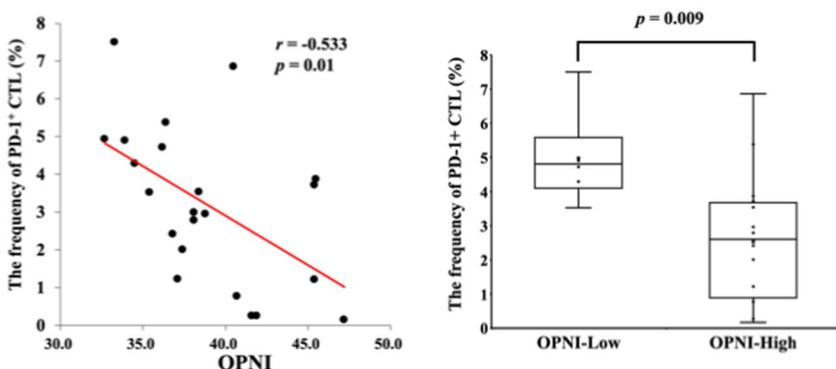
Abbreviation: POI: Pattern of invasion. CPS: Combined Positive Score  
\*,  $p < 0.05$

次に、ICI 投与 OSCC 患者の末梢血を用いて、栄養指標 (OPNI, NLR) と予後との関連に関して解析を行った結果、高 OPNI 患者の方が、OS、PFS とともに良好であり、低 NLR 患者の方が、OS、PFS とともに良好であった。



Characteristics	n	OS				PFS			
		Univariate analysis		Multivariate analysis		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		Hazard ratio (95% CI)	p-value						
RECIST									
CR/PR	13	2.487 (1.091-5.67)	< 0.05	4.03 (1.01-16.12)	< 0.05	2.402 (1.052-5.48)	< 0.05	4.10 (1.01-16.60)	< 0.05
SD/PD	29								
OPNI									
< 36.4	15	3.77 (1.81-7.85)	< 0.01	11.54 (1.70-78.12)	< 0.05	3.57 (1.72-7.42)	< 0.01	11.31 (1.71-74.66)	< 0.05
≥ 36.4	27								
NLR									
< 6.4	24	0.473 (0.238-0.94)	< 0.05	1.76 (0.40-7.67)	0.455	0.466 (0.234-0.927)	< 0.05	1.67 (0.39-7.18)	0.494
≥ 6.4	18								
PD-1-positive Th cell*									
< 3.360	9	0.564 (0.192-1.66)	0.286			0.554 (0.189-1.63)	0.271		
≥ 3.360	13								
PD-1-positive CTL*									
< 3.720	13	0.328 (0.116-0.932)	< 0.05	0.89 (0.21-3.83)	0.876	0.351 (0.124-0.999)	< 0.05	0.93 (0.22-4.02)	0.924
≥ 3.720	9								

OPNI は OS、PFS とともに予後予測因子になり得ることが示唆された。低 OPNI 値患者ほど、末梢血中 CTL の T cell exhaustion が進行しており、Th cell については有意差は認めなかった。ICI 投与患者において、OPNI は予後予測因子になりうることを示唆され、OPNI が低い患者では、末梢血中の CTL の exhaustion が進行しており、栄養状態低下は、全身の免疫状態に影響を与えている可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------