

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791820

研究課題名(和文) Autophagyによる抗原提示を用いた頭頸部癌ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of vaccination for head and neck cancer utilizing antigen presentation by autophagy

研究代表者

坂倉 浩一 (Sakakura, Koichi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40400741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は癌細胞のautophagy(自己消化)と免疫応答の関係を解明し、頭頸部癌に対する新しい癌免疫療法の開発を目指すものである。我々は74例の舌癌検体における3種のautophagy関連分子の存在と、抗原提示分子の発現、さらに癌組織に浸潤する3種の免疫細胞と、臨床病理データ・予後との相関を評価した。その結果、autophagyはリンパ球の浸潤や抗原提示分子の発現を促進する一方、同時に腫瘍の悪性化や予後の悪化に関与していることが分かった。この結果はCancer Science誌に掲載され、その他にも4本の英文原著を発表した。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is an endogenous process that degrades bulk proteins and organelles to maintain energy homeostasis under cellular stress and nutrient starvation. To explore the association between autophagy and anti-tumor immune responses, we investigated the expression of 3 autophagy-related proteins, HLA molecules and infiltration of 3 kinds of immune cells in 74 patients with oral squamous cell carcinoma in relation to various clinicopathological parameters. Interestingly, autophagy was significantly associated with lymphocyte infiltrations and HLA expressions. Meanwhile, several unfavorable clinicopathological parameters including short overall survival significantly correlates with autophagy. Autophagy is likely to actively mobilize immune cells toward cancer bed and increase tumor antigenicity, while autophagy also relates to malignant potentials and unfavorable prognosis. This results was published in Cancer Science, in addition to other 4 publications.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 頭頸部癌 autophagy LC3 TIL HLA 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の多くはタバコとアルコールとの関係が非常に強い扁平上皮癌で、全世界で毎年 65 万人の新患者が発生、35 万人が死亡し(Argiris, 2008)、30 年以上に渡り 5 年生存率がほとんど改善していない(Jemal, 2009)。従来の手術・放射線・化学療法の三者併用療法に加えて、**患者への負担が少ない免疫療法/癌ワクチン療法**が新たな頭頸部癌治療の手段として近年注目・期待されている。

1991 年に Boon らによって悪性黒色腫の癌抗原が発見されて以来、癌抗原特異的免疫療法/癌ワクチン療法は、従来の手術・放射線・化学療法に加えた第 4 の新たな固形癌治療の手段として急速に研究が進み、特に 21 世紀に入って世界各国の多くの施設で臨床試験が行われ、**申請者も頭頸部癌患者末梢血から、癌抗原に対する特異的な免疫応答の誘導に成功し報告している**(Sakakura, 2007; Chikamatsu, 2008; Chikamatsu, 2009)。

しかしその臨床試験のほとんどは決して臨床的に満足できる結果ではなかった。その原因の最たるものは、癌細胞が患者の免疫細胞による監視・攻撃をすり抜ける免疫逃避/免疫抑制のメカニズムによるものであった。現在癌細胞による腫瘍局所/全身における様々な免疫抑制機構が知られ、**申請者も癌患者における免疫抑制システムを多く研究・報告し**(Sakakura, 2005; Sakakura, 2006; Sakakura, 2007; Chikamatsu, 2007; Chikamatsu, 2008)、これら免疫逃避/抑制機構の制御が腫瘍免疫研究の最大の問題点となっている。

特に攻撃の標的となる癌細胞表面の癌抗原を、癌細胞や樹状細胞等の抗原提示細胞が効率的に提示するメカニズムは、癌ワクチン療法の根幹であり、**ノーベル医学生理学賞の対象**となった。しかし癌患者では癌細胞や樹状細胞の癌抗原提示能が高頻度に発現低下・消失していることが報告され(Ferrone, 2007; Sakakura, 2006)、**癌細胞や患者抗原提示細胞の抗原提示能の回復・効率化は癌免疫療法の現在の最重要課題**となっている。

一方、特に癌細胞は生体内で低栄養・低酸素状態にあることが多く、その際に自己消化 = autophagy により細胞内小器官を分解、エネルギーを調達し増殖している可能性がある。一方で癌の増殖抑制を目指して autophagy を抑制すると、アポトーシスも阻害されてしまうためにさらに一層腫瘍が増殖してしまうことが報告されている(White, 2009)。このように autophagy と癌の増殖との関係については現在もまだ見解が定まっていない。

2005 年に Blum ら、Munz らのグループによって、相次いで autophagy を介した HLA class II 分子による抗原提示(ヘルパー T 細胞を活性化する)が報告された。正常細胞の抗原提示メカニズムにおける autophagy の役

割は、その後研究が進むにつれてその重要性を増すばかりで、現在では **HLA class II 系のみならず class I を介した細胞障害性 T 細胞の活性化にも関与**すると考えられ(Munz, 2010)、癌細胞での autophagy と抗原提示の関係の解明は、癌免疫療法の更なる進歩のために不可欠な条項となっている。

2. 研究の目的

本研究は癌細胞における癌抗原の発現メカニズム、特に癌細胞に多い低栄養状態における **autophagy (自己消化)と抗原提示との関係の解明**に焦点を当て、患者の免疫細胞に対しより効果的に癌抗原を提示して、**より強力な抗腫瘍免疫応答の誘導を目指す**ものである。

研究の大きな 2 本柱として、以下の 2 つの課題の解明を目標に据えた。

【課題 1】頭頸部癌細胞株における自己消化 = autophagy 関連分子と抗原提示機構の発現解析と抗原特異的免疫応答の誘導 (*in vitro*)

【課題 2】頭頸部癌臨床サンプルにおける抗原提示機能と臨床因子との相関の解明と癌ワクチン治療モデルの確立 (*in vivo*)

3. 研究の方法

(1)課題 1: *in vitro* の系

頭頸部扁平上皮癌細胞株を IFN- γ 処理、あるいは serum free media や低酸素状態等の starved condition で培養した上で、Beclin1 や LC3 等の autophagy 関連分子 (Wan, 2010; Crotzer, 2009) と、HLA class I (classical/ non-classical; Campoli, 2008)/ class II (Reith, 2006) による抗原提示機構に関わる分子 (APM) の発現を調べる。処理後の癌細胞の flow cytometry (FCM) による解析を行う。

次に の実験で特に重要なターゲットであることが明らかになった autophagy 分子について、細胞株や健常人樹状細胞への遺伝子導入による強制発現、あるいは RNAi による発現阻害実験を行い、それにより抗原提示がどのように増強/抑制されるか評価する。

の様々な条件で処理された癌細胞/癌抗原を Allo の系で誘導された健常人由来抗原提示細胞に貪食させ、健常人 CD4+/CD8+T 細胞に対して *in vitro* stimulation (IVS) を行う。また の結果による抗原提示能の増強も、同様に IVS に利用される。誘導された腫瘍特異的 T 細胞の特異的免疫応答を、ELISPOT assay や flow cytometry (FCM) により評価し (Sakakura, 2007; Chikamatsu, 2009)、それにより *in vitro/ex vivo* における新たな抗原提示メカニズムによる治療モデルを確立する。

(2) 課題 2: *in vivo* の系

頭頸部扁平上皮癌のパラフィン包埋 (FFPE) 病理サンプルにおいて、Beclin1 や LC3 等の autophagy 関連分子と HLA class I/II APM の発現を、免疫組織化学染色によって調べる。これら特に FFPE で APM を認識する抗体は、我々のグループがオリジナルに開発した抗体シリーズである (Wang, 2005)。

一方で癌細胞の IL-10 や TGF- β などの免疫抑制性サイトカイン産生や、腫瘍浸潤リンパ球の IFN- γ を中心としたサイトカイン産生を免疫染色にて評価する。それにより癌組織の microenvironment における免疫細胞との相互作用を明らかにすると共に、HLA 等の抗原提示に関わる分子発現や autophagy との相関を見る。さらに臨床病理学的パラメータ、予後因子との相関を解析する。

仮想抗原として我々が非常に使い慣れている p53 の系を用い (Chikamatsu, 2009; Sakakura, 2007)、p53 陽性腫瘍を持つ HLA-A2, A24 あるいは DP5 陽性の患者の末梢血より CD4+/CD8+T 細胞を分離する。p53 抗原あるいは頭頸部癌細胞株に対する免疫応答を ELISPOT にて評価する。

4. 研究成果

(1) *In vitro* の系

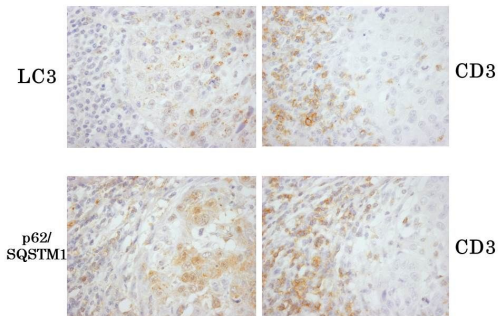
頭頸部扁平上皮癌細胞株 Gun-1, HSC-3 を、autophagy の誘導でよく使用される 2 種の無血清培地で数時間培養し、western blotting にて autophagy のマーカーである LC3-II が発現していることを確認した。その上で同条件で autophagy 誘導時の HLA class I, HLA-DR, PD-L1, PD-L2, CD44, CD133 などの抗原提示分子・免疫関連分子・幹細胞マーカーなどの発現の変化を、FCM で評価した。その結果 HLA class I 分子は autophagy 誘導で発現減少、class II は不変、PD-L1, PD-L2 も不変、CD44 は発現が減少した。*In vitro* においては autophagy による抗原提示能の増強は、現段階では容易ではないと判断し、*in vivo* の微小環境における癌組織の autophagy と免疫系との相互作用の解明へと研究計画をシフトした。

(2) *In vivo* の系

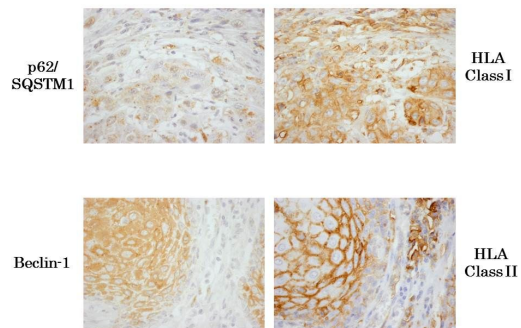
腫瘍微小環境における頭頸部癌組織の autophagy と免疫系との相互作用を解明するため、患者検体を用いた解析を計画し、群馬大学医学部臨床研究倫理委員会により承認された。74 例の舌癌症例の FFPE 標本より連続切片を作製し、癌組織において autophagy のマーカーである LC3、また autophagy の pathway で重要な働きを行う Beclin-1, p62/SQSTM1、さらに HLA class I, class II の免疫組織化学染色を行った。さらに癌蜂巣内および周辺に浸潤する CD1a 陽性

樹状細胞、CD3+T 細胞リンパ球、CD56 陽性 natural killer (NK) 細胞の染色も行った。全ての分子の発現は癌蜂巣内と腫瘍周辺に分けて解析され、それらと臨床病理因子や生存率との関連を調べた。

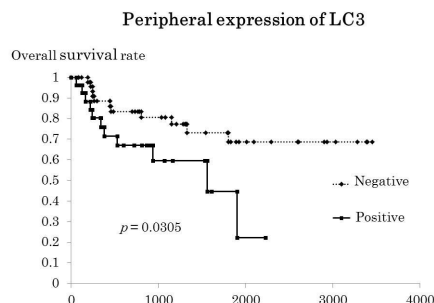
舌癌 74 症例中、LC3 は 27 例 (36.5%)、Beclin-1 は 27 例 (36.5%)、p62/SQSTM1 は 24 例 (32.4%) に発現していた。興味深いことに、腫瘍辺縁の **LC3 と p62/SQSTM1 発現は、T 細胞の浸潤に有意に相関**していた (LC3: $p=0.0345$, p62: $p=0.0084$, 下図)。



また腫瘍辺縁部の p62/SQSTM1 は HLA class I 発現に ($p=0.0029$)、Beclin-1 は HLA class II 発現に ($p=0.0362$)、有意に相関していた (下図)。



また腫瘍辺縁部の LC3 発現は、リンパ管浸潤 ($p=0.00258$)、臨床ステージ ($p=0.00980$)、腫瘍サイズ ($p=0.00680$)、Ki-67 スコア ($p=0.0187$) と相関し、Beclin-1 発現は腫瘍の分化度 ($p=0.00644$) と相関、p62/SQSTM1 は分化度 ($p=0.0426$) と血管浸潤 ($p=0.0127$) と有意に相関していた。



さらに多変量解析により **LC3 は全生存率の独立した予後規定因子**であり ($p=0.030$)、**LC3 陽性症例は陰性症例と比べて有意に全生存率が悪かった** ($p=0.0305$, 前頁右下図)。

これらの結果から、**autophagy は活発に免疫細胞を癌組織に動員**していることが明らかになった。その一方で同時に autophagy は腫瘍の**悪性化や予後不良因子にも深く関与**していることも分かった。その役割の乖離について、癌患者の T 細胞の機能低下や免疫系を抑制する regulatory T cell の存在等が疑われる。**以上の結果は Cancer Science 誌に 2015 年に掲載**された。

Autophagy 関連分子の舌癌患者検体における発現解析は、現在も続けられている。マクロファージ (M ϕ) による貪食に対する**"Don't eat me" signal である CD47**の癌細胞における発現と、汎 M ϕ マーカー CD68、その中の免疫抑制性サブセットである M2 のマーカー CD163 を、同じ 74 症例で免疫染色を行った。すると Beclin-1 発現が CD47 発現と正の相関を示し ($p=0.00175$)、また LC3 と p62/SQSTM1 は汎 M ϕ (LC3: $rs=0.418$, $p=0.0009$; p62: $rs=0.300$, $p=0.03924$) と M2 (LC3: $rs=0.321$, $p=0.01456$; p62: $rs=0.368$, $p=0.00691$) に有意に相関した。これら腫瘍微小環境における癌細胞と免疫細胞のダイナミックな相互作用について、現在論文執筆中である。

(3) その他のプロジェクト

同様の舌癌・下咽頭癌・腺様嚢胞癌の FFPE 検体において、LAT1-CD98、ASCT2、xCT 等のアミノ酸代謝に関係する分子の免疫組織化学染色を行った。特に LAT1 発現は種々の癌の予後と強く相関しており、Br J Cancer 等に掲載されている。

またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) は、ヒストンのアセチル化を促進して癌抑制遺伝子の活性化・細胞周期の停止・分化/アポトーシスの誘導を起こす。我々は頭頸部癌細胞株に対する HDACi の免疫系・幹細胞系マーカーの変化についても報告している。

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 5 件)

Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.** 2015 Jan;106(1):1-8. (査読あり)

Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, Tominaga H, Oriuchi N, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Tsukamoto N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck.** 2014 Jun 10. doi: 10.1002/hed.23797. [Epub ahead of print] (査読あり)

Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. **Br J Cancer.** 2014 May 13;110(10):2506-13. (査読あり)

Chikamatsu K, Ishii H, Murata T, Sakakura K, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Masuyama K. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Sci.** 2013 Nov;104(11):1468-75. (査読あり)

Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Clinicopathological significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in patients with adenoid cystic carcinoma. **Pathol Oncol Res.** 2013 Oct;19(4):649-56. (査読あり)

[学会発表](計 5 件)

Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of p62/SQSTM1 accumulation in oral squamous cell carcinoma. **5th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies, 2014 Annual Meeting of American Head and Neck Society**; 2014 July 25-31; New York City, NY, USA

Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Expressions of autophagy-related proteins positively correlate with infiltration of immune cells and disease progression in oral squamous cell carcinoma [abstract]. Proceedings of **the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA,

USA. AACR; 2014. Abstract nr 155.

Takahashi H, Sakakura K, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of p62/SQSTM1 accumulation in oral squamous cell carcinoma [abstract]. Proceedings of **the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research**; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA, USA. AACR; 2014. Abstract nr 156.

坂倉浩一・高橋秀行・解良恭一・豊田実・小山徹也・近松一朗. 口腔扁平上皮癌における autophagy 関連分子の発現と腫瘍浸潤免疫細胞との関係. **第115回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会**. 2014年5月16日 ヒルトン福岡シーホーク, 福岡, 福岡県

坂倉浩一・高橋秀行・解良恭一・豊田実・小山徹也・近松一朗. 舌扁平上皮癌における autophagy 関連分子の発現と腫瘍免疫原性との関係. **第38回日本頭頸部癌学会**. 2014年6月13日 東京ファッションタウンビル, 江東区, 東京都

〔その他〕

ホームページ

http://jibika.med.gunma-u.ac.jp/~main_contents/?page_id=245

6 . 研究組織

研究代表者

坂倉 浩一 (SAKAKURA, Koichi)

群馬大学 医学部附属病院 助教

研究者番号 : 40400741