

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861397

研究課題名(和文) 頭頸部癌における局所免疫応答の解明と新規ワクチンの開発

研究課題名(英文) Elucidation of the local immune response and development of a new vaccine in head and neck cancer

研究代表者

能美 希 (NOMI, NOZOMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療において“がん微小環境”における免疫抑制を解除することが新たな治療戦略となりうると考えられており、そのターゲットのひとつとしてMFG-E8に注目した。今回の研究結果より MFG-E8は頭頸部癌組織内に発現しており局所進行度・生存率と関連しており、MFG-E8は頭頸部癌細胞株において細胞内顆粒として分泌されるもの。

頭頸部癌細胞株におけるMFG-E8の発現量の変化が生じても抗癌剤感受性に変化は見られないことより、MFG-E8は癌細胞から分泌され、直接抗アポトーシス効果に直接作用するのではなく、がん微小環境における免疫担当細胞に作用し、局所免疫応答に抑制的に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Weaning the immunosuppression in tumor microenvironment might be a new therapeutic target in cancer therapy, and we focused MFG-E8 for a in this study. We revealed following; 1) MFG-E8 expressed in head and neck cancer and there was significantly association between the expressions of MFG-E8 and T stage and survival rate, 2) MFG-E8 was released by granular form in head and neck cancer cell lines, however, 3) the expression of MEG-E8 did not correlate the sensitivity of anticancer drug. Therefore, MFG-E8 might not affect directly anti-apoptotic effect in head and neck cancer cells but suppress the local immunity in tumor environment.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 腫瘍免疫 ワクチン がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

癌細胞とその微小環境(がん微小環境)に存在する周辺細胞との相互作用は非常に重要であり、局所的に免疫抑制環境にあること、またがん細胞自体が免疫抵抗性であることが、種々の化学療法や放射線治療に対する抵抗性や腫瘍の増大、進行と関連していることが知られている。研究代表者はこれまで主として Toll-like receptor (TLR) を中心に自然免疫を介した癌細胞に対する治療戦略 (Nomi et al, Oncology reports 2010) を検討してきた。しかし、癌細胞自体をターゲットとした治療のみでは局所の免疫抑制状態より十分な抗がん作用を誘導できず、drug delivery の問題などの理由より生体に適応するにはまだ解決すべき課題が多く存在すると考えられる。したがって“がん微小環境”における免疫抑制状態を解除することがひとつの新たな治療戦略となりうると考えられる。

研究代表者はそのターゲットのひとつとして milk fat globule epidermal growth factor-8 (MFG-E8) に注目した。MFG-E8 は N 末端には EGF like domain, α , β integrin binding-site を、C 末端には factor V/VII domain, Phosphatidylserine (PS) binding-site を持っていることが知られている。もともとは乳汁中に発見され、乳腺、脳、心臓、肺などに発現してホメオスタシスを保つ機能を担う分子として知られている。また、MFG-E8 は GM-CSF の刺激を受けて活性型 M ϕ や immature DC より分泌され、TGF- β , CCL22 産生により Treg の活性化し、免疫寛容を誘導すると考えられている。一方で、MFG-E8 は TLR の存在下では発現が抑制され、IFN- γ と協調して Th1 型免疫応答、すなわち抗腫瘍免疫応答を誘導すると考えられている。このように MFG-E8 は“がん微小環境”における GM-CSF の機能や免疫応答を調整すると考えられている。これまでに甲状腺癌、肝細胞癌、膵癌、悪性黒色腫での報告があり、悪性黒色腫での研究では MFG-E8 はアポトーシス抵抗性や上皮間葉転換 (EMT)、血管新生、浸潤能を誘導することより、腫瘍の悪性度との関連が報告されている。しかしながら、現在まで頭頸部癌における MFG-E8 の報告はほとんどなく、またこれまで我々が研究を行ってきた TLR を介する免疫応答との関連性も見いだせるのではないかと考え、MFG-E8 に着想するに至った。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに頭頸部癌における MFG-E8 の発現について検討するために、以下の実験を行った。まず下咽頭癌組織の

免疫染色でその発現を検討した結果、癌細胞周囲の免疫担当細胞のみならず癌細胞自体にも MFG-E8 の発現がみられた。以上の結果より癌細胞周囲の細胞からの産生のみならず、癌細胞自体からの MFG-E8 の分泌が“がん微小環境”における免疫抑制あるいは癌自体の悪性度と関与しており、autocrine で抗腫瘍免疫応答からの回避をしているのではないかと仮説を立てた。本研究では頭頸部癌における MFG-E8 の発現、機能解析とともに、将来的にワクチンへの応用の可能性についても解明していくことを目的とした。

3. 研究の方法

頭頸部癌における MFG-E8 の発現

頭頸部癌患者の生検標本や手術摘出標本を用いて MFG-E8 の免疫染色を行い、発現の強さ、パターンと臨床病期、予後との関連を検討した。

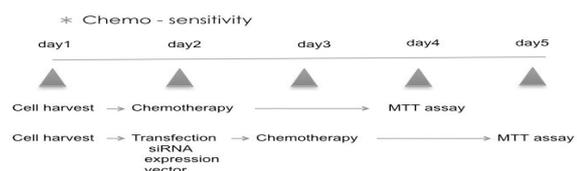
また、腫瘍周囲の免疫担当細胞の浸潤、とくに MFG-E8 により活性化されると考えられている Treg のマーカーの Foxp3 についても組織学的に関連が見られるか検討をおこなった。前癌病変 (白斑症) や正常組織から得られた組織についても同様に MFG-E8 の発現を検討した。さらに、数種の異なる頭頸部癌細胞株を用いて、ウエスタンブロット法で MFG-E8 の発現を検討した。

頭頸部癌における MFG-E8 の分泌形態

予備実験において、細胞株の蛍光免疫染色を行うと、MFG-E8 は癌細胞より細胞内の顆粒として分泌されることが明らかとなった。この MFG-E8 の分泌が一定のストレス下、例えば抗癌剤であるシスプラチン投与後変化するか検討した。

頭頸部癌における MFG-E8 の抗アポトーシス効果

MFG-E8 の抗アポトーシス効果を検討するため、MFG-E8 発現ベクター、siRNA を頭頸部癌細胞株に導入し、MFG-E8 強制発現細胞株および発現抑制細胞株において、シスプラチン (0, 1, 2 mg/ml) に対する感受性の変化を検討した。感受性の評価については MTT assay で、アポトーシスの評価については、annexin V および PI 染色を行い flow cytometry で検討した。具体的なプロトコールについて下図に示す。



4. 研究結果

頭頸部癌における MFG-E8 の発現

頭頸部癌患者のうち下咽頭癌，舌癌，上顎癌の組織を用いて MFG-E8，Foxp3 の免疫染色をおこなった。MFG-E8 および Foxp3 は腫瘍細胞および間質の一部で発現が見られた。なお，前癌病変ならびに正常組織の上皮細胞内には MFG-E8 の発現は見られなかった。それぞれの患者を発現群，非発現群にわけ，TNM 分類，病期分類 (stage)，分化度，腫瘍の部位，生存率に差異が認められるか検討した。その結果の一部を提示する (表 1)。T 分類および分化度と MFG-E8 の発現は有意な関連性を認め，MFG-E8 発現群は T3 以上の局所進行例，ならびに高分化型で多く発現が見られた (表 2)

表 1 頭頸部癌組織中における MFG-E8 免疫染色をおこなった患者の内訳

Sex			Staging	
male	29(93.5)		I	0(0)
female	2(6.5)		II	4(12.9)
			III	11(35.5)
			IV	16(51.6)
Age			Differentiation	
mean	65.4		well	9(29.0)
range	38-80		moderate	16(51.6)
			poor	6(19.4)
T classification			Tumor site	
1	0(0)		PS	22(71.0)
2	12(38.7)		PW	4(12.9)
3	15(48.4)		PC	4(12.9)
4	4(12.9)		unclassified	1(3.2)
N classification			Follow-up duration (M)	
0	11(35.5)		mean	52.7
1	5(16.1)		median	45.0
2	13(41.9)			
3	2(6.5)			
M classification				
0	30(96.8)			
1	1(3.2)			

表 2 頭頸部癌組織中における MFG-E8 免疫染色をおこなった患者-各カテゴリー別比較

	MFG-E8(-)	MFG-E8(+)	P value		MFG-E8(-)	MFG-E8(+)	P value
T classification				Differentiation			
1	8	4	0.004	well	2	6	0.01
2	3	16		moderate	5	9	
3+4				poor	8	1	
N classification			0.51	Tumor site			0.20
0	2	9		PS	9	13	
1	2	3		PW	1	3	
2	6	7		PC	0	4	
3	1	1					
Staging			0.55	Follow-up duration (M)			
II	1	3		mean	49.9	54.2	
III + IV	11	16		median	43.0	60.0	

5 年生存率については有意差は見られなかったが，MFG-E8 発現群で低い傾向にあった (図 1)。

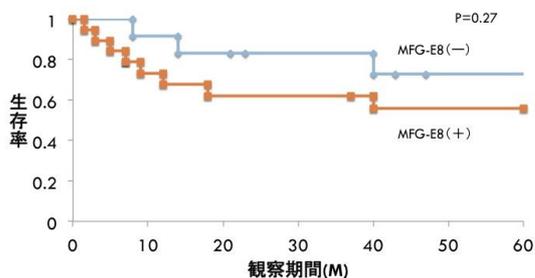


図 1 MFG-E8 発現の有無と 5 年生存率

また，Foxp3 発現群についても有意差はなかったが，5 年生存率が低い傾向にあった。また，数種の異なる頭頸部癌細胞株を用いて，ウエスタンブロット法で MFG-E8 の発現を検討したところ，発現の程度の差はあるものの全ての細胞株で発現が見られた。以上の結果より，MFG-E8 は頭頸部癌において in vivo でも in vitro でも発現が見られ，in vivo において腫瘍の悪性度，生存率と関連していることが示唆された。

頭頸部癌における MFG-E8 の分泌形態

複数の頭頸部癌細胞株において MFG-E8 の蛍光免疫染色を行うと，MFG-E8 は癌細胞から細胞内の顆粒として分泌が認められた。また，その分泌はシスプラチン (2 mg/ml) 添加後に増強されることが明らかとなった。

頭頸部癌における MFG-E8 の抗アポトーシス効果

頭頸部癌における MFG-E8 の発現と抗癌剤の感受性との関連を検討するために，頭頸部癌細胞株に MFG-E8 siRNA および MFG-E8 発現ベクターを導入し，シスプラチン添加後の抗癌剤感受性の変化を検討した。siRNA 導入群と対照群で比較すると，シスプラチン感受性に変化は見られなかった。また，強制発現群ならびに対照群でも両者にシスプラチン感受性に差は認められなかった。同様にアポトーシスのマーカーである annexinV PI ならびに caspase-3 についても同様に両群で差は見られなかった。

以上の結果より MFG-E8 は頭頸部癌組織内に発現しておりその発現は腫瘍の局所進行度・生存率と関連していること，MFG-E8 は頭頸部癌細胞株において細胞内顆粒として分泌され，ストレス下で分泌が増強されることで抗アポトーシス，あるいはがん微小環境における免疫担当細胞に免疫抑制的に作用している可能性が示唆されること，しかし頭頸部癌細胞株において MFG-E8 の発現量の変化が生じても抗癌剤の感受性に変化は見られなかったことより，MFG-E8 は癌細胞から分泌され，直接抗アポトーシス効果に直接関与するのではなく，がん微小環境における免疫担当細胞に作用し，Treg による免疫寛容やマクロファージによるアポトーシス細胞貪食の抑制など局所免疫応答に抑制的に関与していることが示唆された。したがって頭頸部癌から分泌される MFG-E8 が，がん微小環境における免疫寛容を誘導しており，この免疫寛容を解除し，抗癌剤や放射線治療といった従来の治療法との組み合わせをすることでより有

効な治療効果を得られる可能性があり，将来的に有効な生体内ワクチンに応用できる可能性があると考えられる。しかしながら，今回の検討では頭頸部癌細胞自体に主眼をおいた研究を中心として進めてきたため，今後 MFG-E8 による免疫寛容のメカニズムをさらに解明するには MFG-E8 ノックアウトマウスや頭頸部癌モデルマウスを用いた研究を行う必要があると考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

能美 希 (NOZOMI NOMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：