

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11869

研究課題名(和文) 口腔癌浸潤先端部微小環境での腫瘍免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of Tumor Immunosuppressive Mechanisms in the Oral Cancer Invasive Microenvironment.

研究代表者

中村 博幸 (Nakamura, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30542253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1；EMTが誘導する4D型高浸潤口腔癌細胞や癌関連線維芽細胞の形成過程で発現低下するMMPを特定し、2；PD-L1に対する分解活性を調べ、3；切断部位を同定した。4；PD-L1を分解するMMPのなかで、T細胞の免疫寛容を抑制するMMPを特定した。5；さらにこの免疫寛容を抑制するMMPを安定発現する4D型高浸潤口腔癌細胞や、選択的MMP合成インヒビターを用いてMMPの癌微小環境での腫瘍免疫活性化効果を検証した。浸潤先端部の4D型高浸潤口腔癌細胞がMMPで活性化された腫瘍免疫により低浸潤癌へと変化するかを、マウス口腔癌浸潤転移モデルを用いて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにされるPD-L1を分解するMMPの発現が亢進している癌組織では、すでに免疫寛容が抑制されている可能性があり、この場合ニボルマブの効果が期待できないだけでなく、投与により過剰な免疫反応等の副作用を引き起こす可能性がある。したがってこの場合、ニボルマブ使用適正患者を選定する際の有効なバイオマーカーとしてMMPが有用であると期待される。ま本研究から得られる結果はMMPインヒビターによる癌治療の挫折を乗り越えて、近年急速に注目されている癌免疫療法の有効性を高めるための有益な情報を与える点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we addressed to 1; identify MMPs that are reduced in expression during EMT-induced formation of type 4D highly invasive oral cancer cells and cancer-associated fibroblasts; 2; investigate their degradative activity against PD-L1. 3; identify cleavage sites. 4; among MMPs that degrade PD-L1, we identified MMPs that suppress T-cell immune tolerance. 5; in addition, the tumor immune activation effects of MMP in the cancer microenvironment were verified using 4D type high invasion oral cancer cell which stably expresses MMP which suppresses this immune tolerance and selective MMP synthetic inhibitors. We verified whether type 4D highly invasive oral cancer cells at the invasive front were transformed into minimally invasive cancer by tumor immunity activated with MMPs using a murine oral cancer invasive metastatic model.

研究分野：口腔癌

キーワード：MMP PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究室では、口腔扁平上皮癌の浸潤様式を1、2、3、4C、4D型の5段階に分類し、それぞれの段階の癌の性質を調べてきた。そのなかで、最も高浸潤性である4D型(以下4D型高浸潤口腔癌)は高転移性で化学療法や放射線療法への耐性を獲得しており、再発の頻度も高く5年生存率が最も低いことを報告してきた。さらに申請者は、数年前頭頸部癌で適用が承認された分子標的抗癌剤(セツキシマブ)の標的であるEGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)の発現が4D型高浸潤口腔癌細胞で低く、そのためにセツキシマブへの感受性が低いことを明らかにした。さらに上皮間葉移行(Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT)関連遺伝子の発現が4D型高浸潤口腔癌細胞で増加し、EMTがEGFR発現低下と関連することを明らかにした。これに対し4D型高浸潤口腔癌細胞を抗乳癌治療薬のエリブリンで処理すると間葉上皮移行(Mesenchymal-Epithelial Transition; MET)が誘導され、さらにEGFRの発現亢進が誘導されセツキシマブへの感受性が高まることを明らかにした。これらの結果よりセツキシマブ耐性能獲得や4D型高浸潤様式への移行にEMTが関わる可能性が考えられた。

近年、癌免疫療法は外科手術・化学療法・放射線治療の三大標準治療に続く第四の治療法として注目されている。免疫抑制受容体PD-1(programmed cell death 1)は活性化したT細胞に発現して、アポトーシスを誘導しT細胞の機能を抑制する。多くの癌細胞はPD-1リガンド(PD-L1、PD-L2)を発現し、T細胞の機能を抑制するシグナルを送ることで宿主の免疫監視機構から逃れている。4D型高浸潤口腔癌において、少ない数の癌細胞の集団でありながら免疫担当細胞の攻撃から逃避し生存するためには、腫瘍周囲に免疫抑制性の微小環境を構築することが必要である。申請者は、ヒト4D型高浸潤口腔癌組織でのPD-L1の発現は癌細胞で低下しているが、腫瘍細胞周囲の間質細胞で発現が亢進していることを報告した。さらに、*in vitro*で癌細胞でのPD-L1の発現低下や腫瘍周囲細胞での発現亢進にはEMTが関わることを示した。これらの結果は、高浸潤口腔癌微小環境での免疫寛容にEMTが関わる可能性を示唆している。

一方、組織内微小環境を構成する細胞外マトリックスやそれと結合するEMTに関連する生理活性物質の代謝にはMMP(Matrix Metalloproteinase)遺伝子ファミリーが中心的役割を果たしている。これまで申請者は一群のMMPが、頭頸部癌、甲状腺癌、胃癌、乳癌で高発現していることを報告し、MMPの高い細胞外マトリックス分解能から、癌浸潤・転移治療の最適の標的であると考えてきた。しかしながら、理論的には有効と思われたMMPインヒビターは臨床治験で明らかな治療効果を示さなかった。臨床治験に用いたインヒビターの中にはプラセボと比較して生存率がかえって悪化した症例や、癌の進行や肝転移を促進した例もあった。臨床治験は図らずも一部のMMPの腫瘍抑制効果を示唆する結果となった。実際に後の検証で、これらのMMPノックアウトマウスに移植した扁平上皮癌は、大きさは縮小したが未分化癌細胞が増え悪性度が增大していた。初期の臨床治験に用いられたMMPインヒビターは特異性が低く、すべてのMMPを一律に阻害することから、どのMMPが腫瘍抑制効果をもつのかは明らかでなく、またMMPが腫瘍を抑制する詳しいメカニズムも不明である。

最近他の研究室から、EMTにより誘導される癌関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast; CAF)で発現している一部のMMPがPD-L1に対する分解活性をもち、それによりT細胞の免疫寛容を抑制することが報告された。この報告から、MMPインヒビターの臨床治験で癌の悪性化が亢進したのは、PD-L1の分解が阻害され、腫瘍免疫が抑制されたことが原因である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

一般的に癌細胞は腫瘍免疫により大部分は死滅すると考えられているが、悪性度の高い癌は様々な環境で免疫寛容を成立させ生存している。高浸潤型の口腔扁平上皮癌の浸潤先端部では、僅か数個の癌細胞が周囲微小環境で免疫寛容を成立させ腫瘍免疫から逃れ生存している。画像や手術中に、この少数個の癌細胞を検出することは極めて困難なため、腫瘍切除範囲の設定を誤り、再発の可能性が高まる。さらに、この高浸潤口腔癌細胞は分子標的薬を含む既存の抗がん剤に対して耐性を獲得している。よって、高浸潤口腔癌は予後不良で現在でも根本的な治療が困難である。以上の背景から、本研究は高浸潤口腔癌の浸潤先端部微小環境での腫瘍免疫抑制機構の解明を目的とし、高浸潤口腔癌の克服のための情報を提供することを目指す。

3. 研究の方法

本研究は以下の5研究項目のもとに、EMTが誘導する4D型高浸潤口腔癌細胞や癌関連線維芽細胞の形成過程で発現低下するMMPを調べる。さらに、PD-L1を分解するMMPを特定し、MMPが腫瘍免疫を活性化するかを検証する。

1、EMTが誘導する4D型高浸潤口腔癌や癌関連線維芽細胞の形成過程で発現低下するMMPの特定：上皮系細胞の表現型をもつ低浸潤口腔癌細胞株OSC-20とヒト歯肉線維芽細胞でEMTを誘導し、それぞれ4D型高浸潤口腔癌細胞と癌関連線維芽細胞へ移行させ、MMPの発現を検討する。これまでヒト口腔癌組織での発現が報告されているMMPのうち、EMTの誘導に伴い発現低下するMMPを調べる。

2、EMTの誘導により4D型高浸潤口腔癌や癌関連線維芽細胞で発現低下するMMPのPD-L1分解活性の検討：上記で明らかになったMMPとPD-L1を安定発現するHEK293細胞を遺伝子導入により作製し、細胞膜から切断されたPD-L1量を測定する。これにより、EMTの誘導で発現低下する

MMPのうちPD-L1に切断活性をもつMMPが明らかになる。

3、PD-L1のMMPによる切断部位の同定：膜結合部位を欠失した分泌型PD-L1のリコンビナントタンパクを作製し、2で特定されたMMPで切断させ、その切断部位をアミノ酸シーケンスにて同定する。MMPの切断部位が、PD-L1とPD-1の結合に必要な領域であるかを確認する。

4、PD-L1の分解を介して活性化T細胞のアポトーシスを抑制するMMPを特定：PD-L1分解活性をもつMMPのリコンビナントタンパクを活性化T細胞とPD-L1発現細胞の共培養液に添加し、T細胞のアポトーシスを調べる。PD-L1の分解を介してT細胞のアポトーシスを抑制するMMPを特定する。以上1から4までの結果から、PD-L1の分解を介して免疫寛容を抑制するMMPを特定する。

5、MMPの腫瘍免疫活性化効果を、マウス口腔癌浸潤転移モデルを使用して検証：4で特定されたMMPを安定発現する4D型高浸潤口腔癌細胞や、個々のMMPに特異性が高い選択的MMPインヒビターを用いて、4D型高浸潤口腔癌組織でのMMPの腫瘍免疫活性化効果をマウス口腔癌浸潤転移モデルで調べる。4D型高浸潤口腔癌細胞が、MMPによる腫瘍免疫活性化で低浸潤癌に移行するかを検証する。

4. 研究成果

本研究では、1；EMTが誘導する4D型高浸潤口腔癌細胞や癌関連線維芽細胞の形成過程で発現低下するMMPを特定し、2；PD-L1に対する分解活性を調べ、3；切断部位を同定した。4；PD-L1を分解するMMPのなかで、T細胞の免疫寛容を抑制するMMPを特定した。5；さらにこの免疫寛容を抑制するMMPを安定発現する4D型高浸潤口腔癌細胞や、選択的MMP合成インヒビターを用いてMMPの癌微小環境での腫瘍免疫活性化効果を検証した。浸潤先端部の4D型高浸潤口腔癌細胞がMMPで活性化された腫瘍免疫により低浸潤癌へと変化するかを、マウス口腔癌浸潤転移モデルを用いて検証した。

1、EMTが誘導する4D型高浸潤口腔癌や癌関連線維芽細胞の形成過程で発現低下するMMPの特定

申請者のこれまでの報告でOSC-20細胞が低浸潤性で上皮系細胞の性質をもつことが明らかになっている。この細胞培養液にTGF- β を添加し、EMTにより4D型高浸潤口腔癌細胞へ誘導した。同様に、ヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF細胞)をEMTの誘導により、癌関連線維芽細胞へ移行させた。EMT誘導の確認は、EMT関連分子(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail)の発現を、mRNAレベルでは定量PCR法で、タンパクレベルではWestern blot法で行った。さらに、病理切片を用いてEMT関連分子の免疫染色を行い、これらの発現変化と細胞の形態学的変化を調べEMT移行の確認を行った。

申請者を含むこれまでの報告で、MMPはヒトで23種類同定されている。これらのMMPの遺伝子発現をマイクロアレイや定量PCRにて解析し、EMTの誘導で発現低下したMMPを調べた。遺伝子発現が確認されたMMPについては、タンパク発現をWestern blot法やELISA法にて発現を確認した。

2、EMTの誘導により4D型高浸潤口腔癌や癌関連線維芽細胞で発現低下するMMPのPD-L1分解活性の検討

遺伝子導入効率の高いHEK293細胞に、1の実験で特定されたMMPとPD-L1のタンパク発現ベクターを共導入し、それぞれのタンパクを恒常的に発現する安定発現細胞株を作製した。発現ベクターはEBNA配列とハイグロマイシン耐性配列をもつpEBMultiベクターを用いる。安定発現株は抗生剤の選択により得た。

つぎに、MMPとPD-L1を安定発現するHEK293細胞の培養上清中に含まれる、細胞膜から切断されて遊離したPD-L1を、Western blot法にて調べた。空ベクターを導入したHEK293細胞と比較し、PD-L1の遊離が亢進しているMMP安定発現株を調べ、PD-L1切断活性をもつMMPを特定した。さらに、PD-L1のタンパク発現ベクターのみ導入したHEK293細胞にリコンビナントMMPを添加し固定したのち、フローサイトメーターで解析し、細胞表面のPD-L1が減少した細胞を調べ、PD-L1切断活性をもつMMPを特定した。

3、PD-L1のMMPによる切断部位の同定

膜結合部位を欠失し、C末端に6xHisタグを付加した分泌型PD-L1の発現ベクターを作製した。HEK293細胞にこのPD-L1発現ベクターを導入し安定発現株を作製した。分泌されたPD-L1はHisタグカラムで精製した。精製したPD-L1を活性化T細胞培養液に添加し、フローサイトメーターを用いてT細胞でアポトーシスが誘導されるかを確認し、生物学的活性を確認した。さらに、試験管中で精製されたりコンビナントPD-L1をMMPで分解させ、その切断部位をアミノ酸シーケンスにて同定した。

4、PD-L1の分解を介してT細胞のアポトーシスを抑制するMMPの特定

CD3+T細胞をヒト末梢血からDynabeadsを用いてポジティブ単離した。分離したT細胞をPHAで処理し活性化T細胞を得た。さらに、PD-L1発現HEK293細胞を30Grayで放射線処理し、細胞表面のPD-L1タンパクに影響を与えることなく、細胞増殖を抑制させた。この細胞にリコンビナントMMPを添加し24時間培養した後、活性化T細胞を加え共培養した。その後フローサイトメーターでAnnexin+/DAPI-細胞を測定し初期アポトーシスを起こしたT細胞を測定した。MMP処理によるアポトーシスT細胞の減少を調べ、PD-L1の分解によりT細胞の免疫寛容を抑制するMMPを特定した。

5、MMP の腫瘍免疫活性化効果の、マウス口腔癌浸潤転移モデルを使用した検証

まず、臨床治験で使用された合成 MMP インヒビターをマウス口腔癌浸潤転移モデルに投与し、臨床治験で観察された癌の悪性度の亢進を確認した。PD-L1 タンパクの分解による増減を免疫染色、Western blot 法、ELISA 法にて調べた。合成 MMP インヒビター投与により PD-L1 の分解が抑制され 4D 型高浸潤口腔癌が誘導されるかを検討した。

さらに、ここまでの実験で明らかになった PD-L1 の分解活性をもつ MMP の発現ベクターを、4D 型高浸潤口腔癌細胞である HOC313 細胞に遺伝子導入し、MMP 安定発現高浸潤口腔癌細胞を作製した。この細胞を免疫不全マウスの口腔底に同所移植し、移植癌細胞の浸潤様式を病理切片で、頸部リンパ節転移を造影剤を用いたマイクロ CT を用いて観察した。MMP 発現により癌組織中の PD-L1 が分解され、腫瘍免疫が活性化されることにより高浸潤癌細胞が死滅し、浸潤様式が高浸潤から低浸潤へと変化するかを観察した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Murasawa Yusuke, Furuta Katsunori, Noda Yasuhiro, Nakamura Hiroyuki, Fujii Satoshi, Isogai Zenzo	4. 巻 26
2. 論文標題 Ointment vehicles regulate the wound healing process by modifying the hyaluronan rich matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Wound Repair and Regeneration	6. 最初と最後の頁 437 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/wrr.12673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hira-Miyazawa Mayuko, Nakamura Hiroyuki, Hirai Mariko, Kobayashi Yutaka, Kitahara Hiroko, Bou-Gharios George, Kawashiri Shuichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 379-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3892/ijo.2017.4221	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 -
1. 著者名 Murasawa Yusuke, Nakamura Hiroyuki, Watanabe Ken, Kanoh Hiroyuki, Koyama Emiko, Fujii Satoshi, Kimata Koji, Zako Masahiro, Yoneda Masahiko, Isogai Zenzo	4. 巻 188
2. 論文標題 The Versican G1 Fragment and Serum-Derived Hyaluronan-Associated Proteins Interact and Form a Complex in Granulation Tissue of Pressure Ulcers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 432 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.ajpath.2017.10.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishimiya Mai, Nakamura Hiroyuki, Kobayashi Yutaka, Noguchi-Shinohara Moeko, Abe Chiemi, Dohmoto Chiaki, Ikeda Yoshihisa, Tokuno Kahori, Ooi Kazuhiro, Yokokawa Masami, Iwasa Kazuo, Komai Kiyonobu, Kawashiri Shuichi, Yamada Masahito	4. 巻 13
2. 論文標題 Tooth loss-related dietary patterns and cognitive impairment in an elderly Japanese population: The Nakajima study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0194504 ~ 0194504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0194504	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 -

1. 著者名 Noguchi-Shinohara Moeko, Abe Chiemi, Yuki-Nozaki Sohshi, Dohmoto Chiaki, Mori Ayaka, Hayashi Koji, Shibata Syutarō, Ikeda Yoshihisa, Sakai Kenji, Iwasa Kazuo, Yokogawa Masami, Ishimiya Mai, Nakamura Hiroyuki, Yokoji Hidehiro, Komai Kiyonobu, Nakamura Hiroyuki, Yamada Masahito	4. 巻 63
2. 論文標題 Higher Blood Vitamin C Levels are Associated with Reduction of Apolipoprotein E E4-related Risks of Cognitive Decline in Women: The Nakajima Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1289 ~ 1297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3233/JAD-170971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hira-Miyazawa Mayuko, Nakamura Hiroyuki, Hirai Mariko, Kobayashi Yutaka, Kitahara Hiroko, Bou-Gharios George, Kawashiri Shuichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 379 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.4221	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 該当する

1. 著者名 Hirai Mariko, Kitahara Hiroko, Kobayashi Yutaka, Kato Koroku, Bou-Gharios George, Nakamura Hiroyuki, Kawashiri Shuichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 41 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2016.3785	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 該当する

1. 著者名 Murasawa Yusuke, Nakamura Hiroyuki, Watanabe Ken, Kanoh Hiroyuki, Koyama Emiko, Fujii Satoshi, Kimata Koji, Zako Masahiro, Yoneda Masahiko, Isogai Zenzo	4. 巻 188
2. 論文標題 The Versican G1 Fragment and Serum-Derived Hyaluronan-Associated Proteins Interact and Form a Complex in Granulation Tissue of Pressure Ulcers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 432 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.10.015	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 該当する

1. 著者名 Hirai M., Kitahara H., Kobayashi Y., Kawashiri S., Nakamura H.	4. 巻 28
2. 論文標題 1721P The role of PD-L1 in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 1721P
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/annonc/mdx391.020	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 -

1. 著者名 Kitahara H., Hirai M., Kawashiri S., Nakamura H.	4. 巻 28
2. 論文標題 56P Oral squamous cell carcinoma cells were sensitized to cetuximab by Eribulin via induction of the mesenchymal-to-epithelial transition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 56P
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/annonc/mdx361.051	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hirai M., Kitahara H., Kobayashi Y., Kawashiri S and Nakamura H.
2. 発表標題 The role of PD-L1 in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment.
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kitahara H., Hirai M., Kobayashi Y., Kawashiri S and Nakamura H.
2. 発表標題 Oral squamous cell carcinoma cells were sensitized to cetuximab by Eribulin via induction of the mesenchymal-to-epithelial transition.
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017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	北原 寛子 (kitahara hiroko) (70507053)	金沢大学・附属病院・医員 (13301)	