

●研究目的

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)に対する新しい治療法として癌免疫療法が注目されている。しかし、単用による治療では十分な効果が得られていないことから、現在の癌免疫療法に関する臨床治験および基礎研究では、単用療法からシスプラチンなどを用いた化学療法との併用療法が中心的な研究課題になっている。そして化学療法と癌免疫療法を効果的に併用するためには、化学療法が及ぼす癌免疫学的な影響を考慮しなければならないが、それに関する前臨床的な研究は不足している。

STING: Stimulator of interferon genes は様々なウイルスに対する生体防御機構に重要な役割を果たす小胞体局在膜蛋白質であり、核酸を認識して活性化することでI型インターフェロン(IFN)の産生を誘導し、免疫応答を促進する。これまでの我々の癌免疫研究において、STING アゴニストである cGAMP を腫瘍内投与することで局所の炎症反応を惹起し、抗腫瘍免疫応答を強く活性化できることを明らかにしている。

今回我々はシスプラチン療法の癌免疫学的な影響を解析し、その結果を元にシスプラチンと STING 活性化療法の併用における有効性とメカニズムを、マウスの扁平上皮癌(SCC)細胞株を移植したマウスモデルを用いて検討した。

●材料・方法

1. ヒトリンパ球を用いたシスプラチンを用いた化学療法の癌免疫学的な影響の解析
健康人および2018年から2019年間に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で診療を行った新規HNSCC患者12例の血液検体を用いて、シスプラチンがリンパ球活性化に及ぼす影響およびシスプラチンを用いた化学療法後の末梢血リンパ球の活性化能を解析した。ヒト末梢血を用いた研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った(承認番号16040)。
2. マウス SCC モデルを用いたシスプラチン単用療法の癌免疫学的な影響の解析
2種類のマウス SCC 細胞株(mSCC1, mSCC2)をそれぞれ移植したBALB/cマウスにシスプラチンを腹腔内投与し、所属リンパ節および腫瘍組織の免疫細胞動態への影響をフローサイトメトリーにて解析した。
3. マウス SCC モデルに対するシスプラチンと STING 活性化療法の併用効果の検討
上記マウスモデルにシスプラチンの腹腔内投与および cGAMP の腫瘍内投与の併用療法を施行し、所属リンパ節および腫瘍組織内の免疫細胞動態の変化をフローサイトメトリーにて解析した。さらに併用療法の有効性を継時的な腫瘍径の計測によって検討した。
4. 併用療法施行によるケモカイン産生の変化およびその関連性の評価
mSCC1 マウスモデルにシスプラチンの腹腔内投与および cGAMP の腫瘍内投与を行い、腫瘍組織内の Cxcl9, Cxcl10 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて評価した。また所属リンパ節中のキラーT細胞(CD8+T細胞)のケモカイン受容体である CXCR3 の発現をフローサイトメトリー法で解析した。ケモカイン産生亢進と併用療法の治療効果との関連を検討するため、mSCC1 マウスモデルの併用療法群に対し CXCR3 経路の反応を阻害する

抗体(抗 CXCR3 抗体)を用いた際の抗腫瘍効果を継時的な腫瘍径の計測によって検討した。

●成績

1. 抗 CD3 抗体を用いてヒトリンパ球を刺激した結果、シスプラチン存在下で培養したリンパ球における分裂細胞数および培養上清中の IFN- γ 濃度が、シスプラチン非存在下と比較して低下した。

また、健常人および HNSCC 患者の末梢血から単核細胞を回収して解析した結果、化学療法後の HNSCC 患者検体において血液 1mL あたりの細胞数が低下していた。しかし、リンパ球の IFN- γ 産生量を指標とした抗 CD3 抗体の 50%有効濃度 (EC50) は、化学療法後の HNSCC 患者検体においても低下を認めず、リンパ球の活性化能の維持が示唆された。

2. コントロール群とシスプラチン単用療法群のマウス SCC モデルの所属リンパ節を解析した結果、シスプラチン単用療法群において総細胞数が低下していた。また、活性化した樹状細胞および CD8+T 細胞の割合も減少していた。回収したリンパ節細胞を抗 CD3 抗体にて刺激した結果、両群間の培養上清に含まれる IFN- γ 濃度に差は認められなかった。腫瘍浸潤白血球(TIL)における CD8+T 細胞の割合は、シスプラチン単用療法群において減少していた。

3. マウス SCC モデルの所属リンパ節を解析した結果、シスプラチンと cGAMP の併用療法群におけるリンパ節中の全細胞、単球・マクロファージ、および CD8+T 細胞の細胞数が、コントロール群およびシスプラチン単用療法群と比較して有意に増加していた。また、TIL を解析した結果、併用療法群において活性化単球・マクロファージの割合が増加し、骨髄由来抑制性細胞の割合が減少していた。さらに腫瘍増殖抑制効果を評価した結果、併用療法群が最も高い腫瘍増殖抑制効果を示した。

4. 併用療法群における腫瘍組織内の Cxcl9 および Cxcl10 の発現量は、コントロール群およびシスプラチン単用療法群と比較して有意に増加した。

CXCL9 や CXCL10 は T 細胞上に発現される CXCR3 と結合して T 細胞を炎症局所へと遊走させる。CXCR3 はケモカインと結合後、一時的に細胞内に取り込まれることから、T 細胞表面上の CXCR3 の発現量を解析することによって、T 細胞が CXCL9 および CXCL10 の刺激を受け取ったかどうかを判断することができる。本研究においても腫瘍内における Cxcl9 および Cxcl10 の発現量と相反するように、cGAMP 単用療法群および併用療法群の CD8+T 細胞上の CXCR3 の発現量がコントロール群およびシスプラチン単用療法群と比較して低下していた。また、cGAMP を腫瘍内投与する前日に抗 CXCR3 抗体を腹腔内投与した結果、併用療法による腫瘍増殖抑制効果が認められなくなった。

●考案

近年の報告では、シスプラチンを用いた化学療法によって、MHC class I 発現の増加、エフェクター T 細胞の機能増強、免疫抑制細胞の減少などの効果が得られることから、シス

プラチンは癌免疫療法にポジティブな影響をもたらすと言われている。しかしながら本研究結果において、シスプラチン存在下ではリンパ球の活性化が直接的に阻害されることが示された。そのためシスプラチンが血中に残存しているときに癌免疫療法を併用してリンパ球を活性化することは非効率であると思われる。だが同時に、シスプラチン療法後のHNSCC患者において、末梢血中の免疫細胞数が減少していてもリンパ球そのものの活性化能は失われていないことも示された。これらのことより、シスプラチン療法の終了後に癌免疫療法の導入を行えば、シスプラチンによる上記のポジティブな影響を残しつつリンパ球に対する阻害作用を回避でき、かつ癌免疫療法により免疫環境も改善され、相乗的な抗腫瘍効果が得られると我々は考案した。

本研究では、シスプラチン療法に併用する癌免疫療法として STING 活性化療法を選択した。我々の事前研究において、cGAMP の腫瘍内投与が活性化マクロファージを腫瘍組織内に誘導し、炎症反応の惹起による扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果を示した。シスプラチン療法によって活性化能を維持しつつも細胞数を減少させたリンパ球に対して、STING 活性化療法の導入が癌免疫学的な状態の改善に寄与すると我々は考案した。また、シスプラチンにより傷害された癌細胞から癌抗原が多く放出されるため、STING 活性化療法の単用と比べて強い抗腫瘍免疫応答が得られることも期待された。以上の仮説に基づいて我々はシスプラチンと STING 活性化療法の併用の、SCC に対する有効性を検討した。

マウス SCC モデルを用いた実験ではシスプラチン腹腔内投与後に所属リンパ節内の活性化抗原提示細胞および CD8+T 細胞、そして腫瘍組織内の CD8+T 細胞の減少が認められたことから、生体内が免疫学的に疲弊していることが示された。しかし、その時期に STING 活性化療法を導入することでリンパ節および腫瘍組織における活性化 CD8+T 細胞や活性化マクロファージなどの抗腫瘍免疫細胞が増加し、それぞれの単用療法群よりも併用療法群においてより高い腫瘍増殖抑制効果を示した。この相乗的な抗腫瘍効果は抗 CXCR3 抗体で認められなくなったことから、cGAMP 投与による腫瘍組織の CXCL9 および CXCL10 といったケモカイン産生の増加、およびそれに伴う CD8+T 細胞の腫瘍内浸潤の促進が寄与しているものと思われる。

●結論

本研究にてシスプラチンを用いた化学療法における、癌免疫学的にポジティブな影響とネガティブな影響が明らかとなった。STING 活性化療法を併用することによって、シスプラチン単用療法のネガティブな影響を相殺し相乗的な抗腫瘍効果が得られた。当研究成果は将来的な扁平上皮癌患者治療予後の改善に寄与するものと思われる。