慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	頭頸部癌における低酸素応答因子の免疫応答への影響の解析とその臨床応用
Sub Title	Functional analysis of hypoxia and hypoxia inducible factor in tumor-immune respose of head and neck cancers
Author	小澤, 宏之(Ozawa, Hiroyuki) 御子柴, 卓弥(Mikoshiba, Takuya) 永井, 遼斗(Nagai, Ryoto)
Publisher	
Publication year	2023
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	頭頸部癌細胞を低酸素培養した結果、一部の細胞ではHIF1-αの発現が上昇し、それに伴い免疫応答を制御するPD-L1の発現も増加した。HIF1-α阻害薬を用いると、これらの発現上昇が抑制され、低酸素またはHIF1-α発現によってPD-L1発現が制御されていることが示された。手術検体におけるHIF1-αの発現とPD-L1発現の関連は現在検討中である。さらにTCGAデータを用いた遺伝子発現解析の分析から、HIF1-α高発現群ではPD-L1の発現が有意に高く、他の免疫関連遺伝子の発現パターンもHIF1-α発現により制御されている可能性が示唆された。 Upon cultivating head and neck carcinoma cells under hypoxic conditions, we observed an augmentation in HIF1-α expression in certain cells, which was accompanied by a concomitant elevation in PD-L1 expression, a key modulator of the immune response. The use of a HIF1-α inhibitor suppressed this heightened expression, suggesting that hypoxic conditions or elevated HIF1-α expression may be instrumental in regulating PD-L1 expression. We are currently investigating the correlation between HIF1-α and PD-L1 expression in surgical specimens. Furthermore, our analysis using TCGA data indicated that the expression of PD-L1 was notably higher in the group with high HIF1-α expression, suggesting the potential for HIF1-α expression to modulate the expression patterns of other immune-related genes.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2020～2022 課題番号：20K09762 研究分野：頭頸部癌
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20K09762seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ０９７６２

研究課題名（和文）頭頸部癌における低酸素応答因子の免疫応答への影響の解析とその臨床応用

研究課題名（英文）Functional analysis of hypoxia and Hypoxia inducible factor in tumor-immune respose of head and neck cancers

研究代表者

小澤　宏之（Ozawa, Hiroyuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：３０３２７６２１

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）：頭頸部癌細胞を低酸素培養した結果、一部の細胞ではHIF1-αの発現が上昇し、それに伴い免疫応答を制御するPD-L1の発現も増加した。HIF1-α阻害薬を用いると、これらの発現上昇が抑制され、低酸素またはHIF1-α発現によってPD-L1発現が制御されていることが示された。手術検体におけるHIF1-αの発現とPD-L1発現の関連は現在検討中である。さらにTCGAデータを用いた遺伝子発現解析の分析から、HIF1-α高発現群ではPD-L1の発現が有意に高く、他の免疫関連遺伝子の発現パターンもHIF1-α発現により制御され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
本研究の成果は、頭頸部癌に対してHIF1-α阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬と併用することにより治療効果が増強される可能性を示した。将来の新規治療を開発するための基礎的なデータとなる。これまで頭頸部癌転移において、低酸素が免疫機構に与える影響ついて検討した報告はほとんどなく、本研究は学術的な独自性が高い。

研究成果の概要（英文）：Upon cultivating head and neck carcinoma cells under hypoxic conditions, we observed an augmentation in HIF1-α expression in certain cells, which was accompanied by a concomitant elevation in PD-L1 expression, a key modulator of the immune response. The use of a HIF1-α inhibitor suppressed this heightened expression, suggesting that hypoxic conditions or elevated HIF1-α expression may be instrumental in regulating PD-L1 expression. We are currently investigating the correlation between HIF1-α and PD-L1 expression in surgical specimens. Furthermore, our analysis using TCGA data indicated that the expression of PD-L1 was notably higher in the group with high HIF1-α expression, suggesting the potential for HIF1-α expression to modulate the expression patterns of other immune-related genes.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌　低酸素応答因子　腫瘍免疫

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

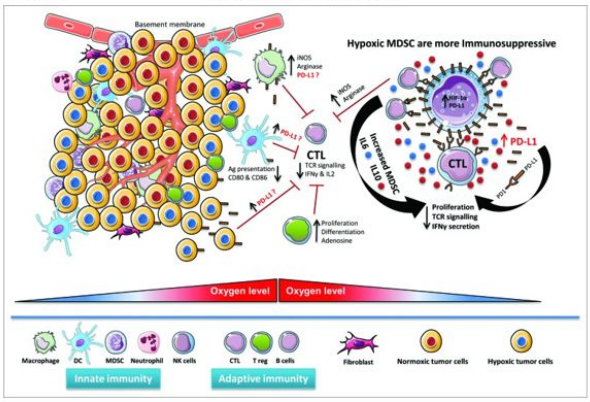
１．研究開始当初の背景

腫瘍組織における低酸素状態（Tumor hypoxia）は様々ながん腫において腫瘍の進展プロセスに関与する。特に、HIF1-α は低酸素下で細胞内に蓄積され核内に移行し、種々の遺伝子転写を促す。その中には、血管新生、腫瘍の増殖や生存に関わる遺伝子、浸潤転移に関わる遺伝子、代謝関連遺伝子、炎症性サイトカインなどがあり、腫瘍の悪性化に重要な役割を担っていると考えられている。これまで、HIF1-α 発現を予後因子とする報告は多数あり、頭頸部癌領域でも HIF1-α 過剰発現が予後不良因子であることが示されている（Silva, Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008, Kitagawa, Cancer Lett 2013, Kwon, Head Neck 2014)。申請者も、HIF1-α が頭頸部癌の転移促進に関わるメカニズムについての検討をこれまで継続的に行っており、その成果を報告している（AACR annual meeting 2017, 日本頭頸部癌学会 2018 年)。

頭頸部癌全体の生存率は 50～60%に過ぎない。2017 年より頭頸部癌でも使用可能となった免疫チェック阻害薬ニボルマブは、これまでにない新しい機序を持つ薬剤であり、頭頸部癌の予後を大きく改善させると期待された。しかし、その奏効率は 13.3%、2 年生存率は 16.9%であり恩恵を受けられる症例は限られている。同じ免疫チェックポイント阻害薬であるペンロリズマブでは化学療法との併用で有効性を示しており（KEYNOTE-048)、今後も種々の既治療と免疫チェックポイント阻害薬との併用が行われ、新規の治療開発が続いていくことが予想される。

近年、低酸素が免疫応答に与える影響について注目されてきている。2014 年 Noman らにより、腫瘍細胞において HIF1-α が核内で HRE に結合し PD-L1 proximal promoter の発現を制御すること、そして低酸素下で腫瘍細胞が PD-L1 の発現を上昇させことが示された。(Noman, J Exp Med 2014)。さらに、HIF1 がその転写因子である EJNPD2 を介して免疫抑制の作用を持つ骨髄由来系細胞を腫瘍へ浸潤増加させることや（Chiu, Nat Commun 2017)、HIF1-α が Type I collagen 産生を促すことで腫瘍組織を繊維化させ T 細胞浸潤を制御すること(Daniel, Clin Transl Med 2019)が報告されている。腫瘍内の低酸素状況が免疫チェックポイント分子発現に関与するだけでなく、リンパ球浸潤などを含めた腫瘍の微小環境全体（図 1）をコントロールする重要な役割を果たしている証拠が集まってきている。これらの結果から、低酸素関連分子の機能を制御することで免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を高めることができる可能性が推察される。

【図1】　低酸素下の免疫応答



Noman MZ　Oncoimmunology 2014

２．研究の目的

本研究は頭頸部癌において HIF1-αが免疫応答に与える影響を明らかにすることを目的としている。本研究の成果は、将来、HIF1-α阻害薬を免疫チェックポイント阻害薬と併用することにより、治療効果を増強する新規治療を開発するための基礎的なデータとなる。これまで頭頸部癌転移において、低酸素が免疫機構に与える影響ついて検討した報告はほとんどなく、本研究は学術的な独自性が高い。

HIF1-αを制御する薬剤という観点では、これまで各種のがんを対象に HIF1-α阻害薬の有効性をみる臨床試験が行われてきたが、治療効果や副作用のため Phase I で終了している。本研究では、免疫チェックポイント阻害薬との併用という観点での薬剤開発がゴールとなるため、抗腫瘍効果を生じるより低濃度で併用効果を示すことができる可能性がある。また HIF1-α以外にもその制御分子（HSP90, VHL, PHD など）を標的とした薬剤も開発されており、これらの薬剤も候補薬になり得る。本研究の成果は、これまでの HIF1-α阻害薬としての治療とは異なる形で頭頸部癌の予後の改善に寄与すると考える。

また、各種のがんにおける免疫チェックポイント阻害薬の効果予測には、その標的分子 PD-L1 の発現をバイオマーカーとすることが一般的である。しかし PD-L1 発現は時間的・空間的な不均一性があること、また特に頭頸部癌では PD-L1 発現の多少に関わらず治療効果を有することからバイオマーカーとして有用ではない。免疫チェックポイント阻害薬の有効例の選別には、より鋭敏なマーカーの開発が必要であり、本研究において低酸素と免疫応答との関係性を示すことは、HIF1-αやその関連分子が新たなバイオマーカーとなる可能性を秘めている。

３．研究の方法

（１）頭頸部癌細胞株を用いた低酸素下の免疫関連分子発現の検討

ヒト由来の頭頸部癌細胞株（FaDu、Detroit532、HSC-2、HSC-4）これらの細胞の正常

酸素分圧および低酸素下で培養し、HIF1-α と免疫応答に関連する分子の発現について、遺伝子レベルで解析を行った。遺伝性解析には Real time PCR を用いた。さらに HIF1-α 阻害薬（KC7F2）を用い、低酸素培養下での遺伝子発現への影響と抗腫瘍効果を評価した。

（２）頭頸部癌手術検体を用いた低酸素応答因子発現と腫瘍免疫関連蛋白発現の検討

手術治療を行った頭頸部癌の腫瘍組織を用いて HIF1-α と PD-L1 蛋白の免疫染色を行った。一次抗体として、Rabbit monoclonal：Anti-PD-L1 抗体 [28-8] (ab205921)、Mouse monoclonal：Anti-HIF-1 alpha 抗体 [H1alpha67] (ab1)を用い、二次抗体以降の発色には SignalStain® Boost Detection Reagent（Cell Signaling Technology）を用い、DAB Map kit (Ventana)で発色させた。

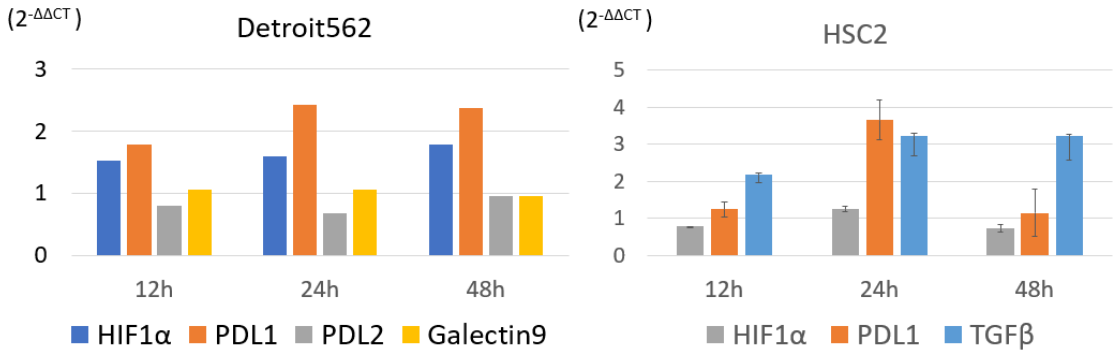
（３）パブリックデータベースを用いた頭頸部癌組織における HIF1-α 発現と PD-L1 発現の検討

UCSC XENA データベース（https://xenabrowser.net/datapages/）（TCGA）を用いて、頭頸部癌における HIF1-α 遺伝子発現と PD-L1（DC274）およびその他の腫瘍免疫関連遺伝子（CTLA4, LAG3, IDO, IL-10, TGFB1）の発現レベルを検討した。

４．研究成果

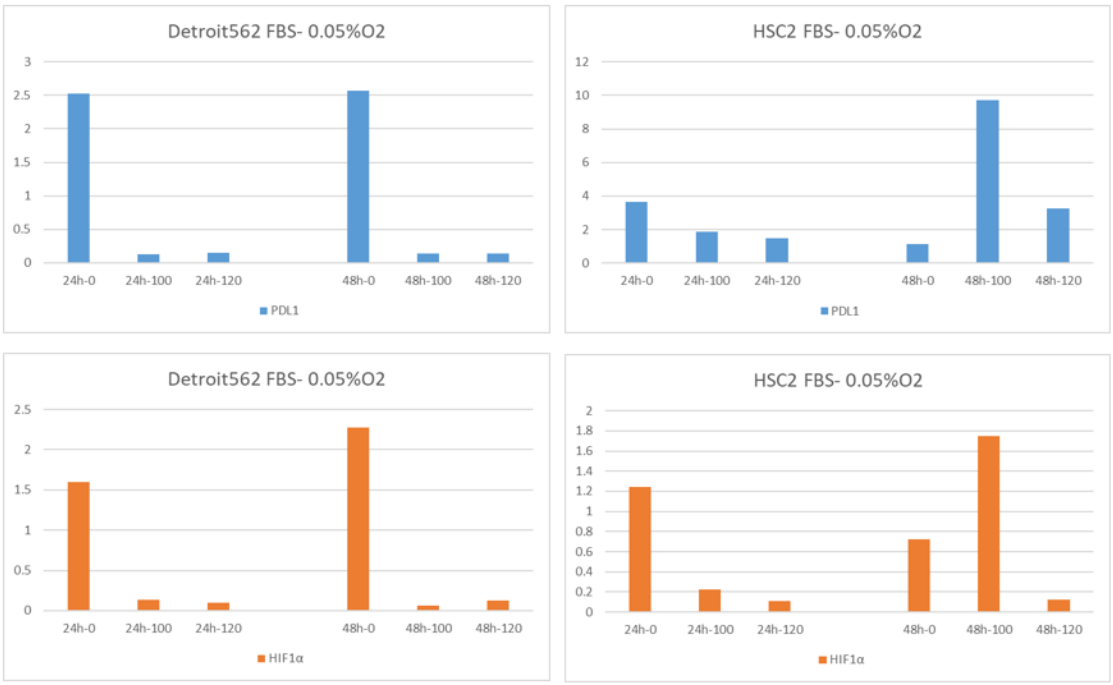
（１）それぞれの細胞を酸素濃度 0.05%＋低栄養下で培養し、12、24、48、72、96 時間の時点で腫瘍細胞から mRNA を抽出し、Real-time PCR を用いて正常酸素分圧での遺伝子発現と比較した。Detroit 562 では低酸素培養下 24 時間で HIF1-α の発現が上昇し、これにあわせて PD-L1 発現が上昇した。この効果は 48～96 時間で不安定であった。PDL2、HVEM、Galectin9 など腫瘍の免疫応答に関連する遺伝子について発現は上昇しなかった。HSC-4 では HIF1-α 上昇は見られなかったが、低酸素培養 24 時間後の時点で PD-L1 は高度に上昇した。一方で FaDu や HSC-2 細胞では PD-L1 の上昇は生じなかった。これらのことから、Detroit562、HSC-2 では腫瘍の低酸素下にともない PD-L1 発現が生じ、腫瘍細胞が免疫細胞より逃避する機構が働くことが推測された（図2）。これに対し、FaDu、HSC-4 は HIF1-α 発現に変化がなく、その他の遺伝子の変動が生じないことから、低酸素環境に影響を受けない細胞であることが推測された。

【図2】



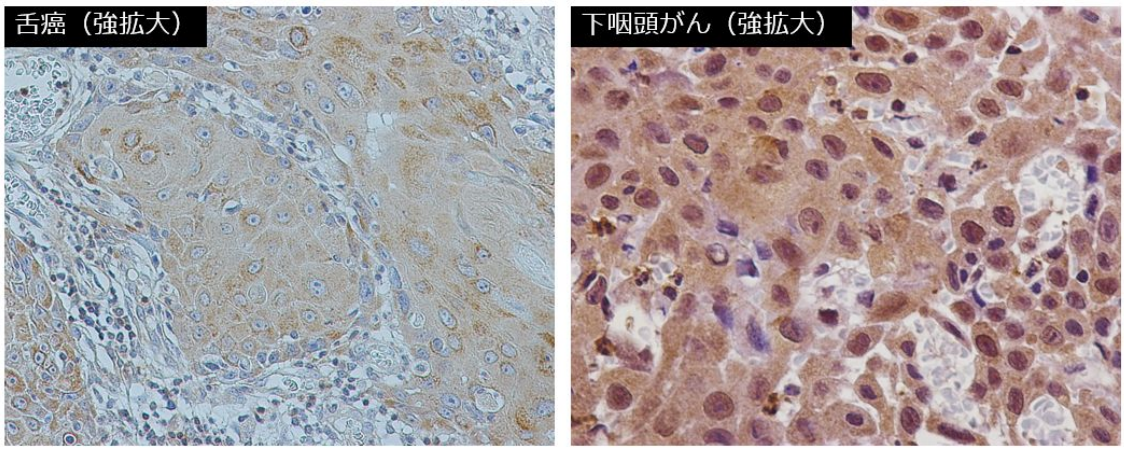
次に、この低酸素下の PD-L1 誘導が HIF1-α を介したものであるかを確かめるため、HIF1-α 阻害薬（KC7F2）をもちいての検討を行った。Detroit 562 では低酸素培養下で上昇した HIF1-α および PD-L1 発現が HIF1-α 阻害薬を負荷することにより上昇しなくなり、その効果は HIF1-α 阻害薬の濃度依存性であった。HSC-2 についても HIF1-α 阻害薬を投与したところ、HIF1-α 発現の低下および PD-L1 発現の低下が生じた。これらのことから HIF1-α の下流シグナルの中に PD-L1 が含まれ、低酸素あるいは HIF1-α 発現により PD-L1 発現が遺伝子レベル（mRNA レベル）でコントロールされていることが示された。

【図3】



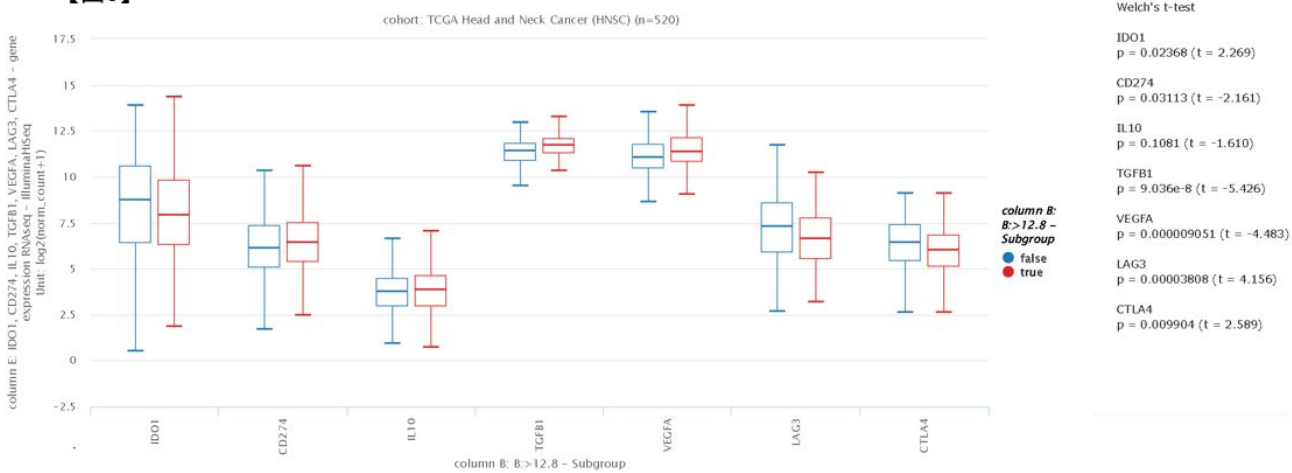
（２）舌癌・下咽頭癌の手術検体を用いて HIF1-α の免疫染色を施行した（図 4）。現在 PD-L1 の免疫染色を施行中で、HIF1-α 発現と PD-L1 発現との相関関係について検討中である。

【図4】



（３）TCGA のデータセットから Head and Neck Cancer の遺伝子発現解析データを用い、原発病変のみを抽出した。HIF1-α 発現の中央値（12.8）でデータを 2 群に分け、HIF1-α 高発現群と低発現群とで遺伝子発現を比較した（図 5）。PD-L1（CD274）は HIF1-α 高発現群で有意に高かった。その他にも TGFB1、VEGFA は HIF1-α 高発現群で有意に上昇していた。一方で、IDO、LAG3、CTLA4 は HIF1-α 低発現群で有意に上昇していた。これらのことから頭頸部癌における免疫関連蛋白発現にかかわる発現プロファイルは、HIF1-α 発現によって制御されている可能性が示唆された。

【図5】


cohort: TCGA Head and Neck Cancer (HNSC) (n=520)
column E: IDO1, CD274, IL10, TGFB1, VEGFA, LAG3, CTLA4 - gene expression RNAseq - IlluminaHiSeq
Unit: log2(norm_count+1)
17.5
15
12.5
10
7.5
5
2.5
0
-2.5
IDO1
CD274
IL10
TGFB1
VEGFA
LAG3
CTLA4
column B: B:>12.8 – Subgroup
column B: B:>12.8 – Subgroup
false
true
Welch's t-test
IDO1
p = 0.02368 (t = 2.269)
CD274
p = 0.03113 (t = -2.161)
IL10
p = 0.1081 (t = -1.610)
TGFB1
p = 9.036e-8 (t = -5.426)
VEGFA
p = 0.000009051 (t = -4.483)
LAG3
p = 0.00003808 (t = 4.156)
CTLA4
p = 0.009904 (t = 2.589)

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

1．著者名 Saito S, Ozawa H, Imanishi Y, Sekimizu M, Watanabe Y, Ito F, Ikari Y, Nakahara N, Kameyama K, Ogawa K.	4．巻 22
2．論文標題 Cyclooxygenase-2 expression is associated with chemoresistance through cancer stemness property in hyphopharyngeal carcinoma.	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Oncol Lett	6．最初と最後の頁 533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12794.	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 Mikoshiba T, Ozawa H, Watanabe Y, Sekimizu M, Saito S, Yoshihama K, Nakamura S, Imanishi Y, Kameyama K, Ogawa K.	4．巻 131
2．論文標題 Prognostic value of the lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with parotid gland carcinoma.	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Laryngoscope	6．最初と最後の頁 864-869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.28934	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 Mikoshiba T, Ozawa H, Watanabe Y, Kawaida M, Sekimizu M, Saito S, Yoshihama K, Nakamura S, Nagai R, Imanishi Y, Kameyama K, Ogawa K.	4．巻 132
2．論文標題 Pretherapeutic Predictive Factors for Histological High-Grade Parotid Gland Carcinoma	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Laryngoscope	6．最初と最後の頁 96-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.29728	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 －

〔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
研究協力者	御子柴　卓弥 (Mikoshiba Takuya)	慶應義塾大学・医学部耳鼻咽喉科・助教 (32612)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究協力者	永井　遼斗 (Nagai Ryoto) (32612)	慶應義塾大学・医学部耳鼻咽喉科・助教	

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