

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11441

研究課題名(和文) 腫瘍転移モデルマウスを用いた前転移niche形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in premetastasis niche

研究代表者

長塚 仁 (Nagatsuka, Hitoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70237535

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)：CD31は血管内皮細胞に発現する代表的な膜接着因子である。しかし、腫瘍間質に浸潤する骨髄由来細胞の一部はCD31を発現しており、腫瘍の転移巣や浸潤部に特異的に観察された。これらの細胞は、腫瘍の浸潤や転移に関与している可能性が示唆された。また、一部は前転移niche形成への関与も考えられた。

CD11b, Gr-1 double positiveを示す骨髄由来細胞は、免疫抑制性骨髄由来細胞(Myeloid derived suppressor cells: MDSC)と考えられ、MDSCが前転移nicheの形成に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肺における骨髄由来細胞の前転移niche形成への関与に着目した研究である。中でもCD31陽性骨髄由来細胞が、前転移niche形成に関与することが明らかとなり、それらの細胞が転移促進的に働くことが示唆された。また、前転移niche形成には、MDSCの関与も重要であることが明らかとなり、これらの細胞が、転移成立前の肺において、結節状の病変を形成することを見出した。これらの細胞を抑制することが可能になれば、腫瘍細胞が転移しやすい環境が形成されることを事前に抑制することが可能となり、新たな転移抑制治療の開発に繋がられる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：CD31 is a representative membrane adhesion factor expressed on vascular endothelial cells, but its expression in floating cells in normal tissues has not been reported, and CD31 positive BMDC may be involved in tumor invasion and metastasis It was suggested. Some CD31 positive BMDCs were considered to be involved in premetastatic niche formation. Moreover, CD11b, Gr-1 double positive BMDC were considered to be immunosuppressive bone marrow-derived cells (Myeloid derived suppressor cells: MDSC), and it was considered that MDSC might be involved in the formation of pre-metastatic niche.

研究分野：口腔病理

キーワード：腫瘍微小環境 骨髄由来細胞 前転移niche

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍は「前転移 niche」と呼ばれる微小環境を遠隔臓器に形成し、事前に自らが転移しやすい環境を形成することが明らかになりつつある。

前転移 niche 形成には腫瘍の放出する様々な因子 (exosome、成長因子、サイトカインなど) や、骨髄由来細胞 (Bone marrow derived cell: BMDC) が大きな役割を果たしている。

例えば、腫瘍に影響された骨髄由来マクロファージは、肺の線維芽細胞など間質細胞に作用し、接着因子 (フィブロネクチンなど) を発現させ、腫瘍が生着しやすい足場を形成する。近年、BMDC の前転移 niche への関与を示す報告が、多数なされている。

しかし、BMDC は様々な細胞に分化するため、前転移 niche 形成における、BMDC の詳しい動態はまだ明らかになっていない。そこで、申請者らのグループは BMDC の動態を追跡するため、野生型マウスに GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植する実験系を確立した。このマウスを用いることで、BMDC のみが GFP でラベルされるため、免疫組織化学的に腫瘍部や各臓器における前転移 niche の BMDC の動態を視覚的、網羅的に追跡することが可能となった。我々は、この GFP 骨髄移植マウスに腫瘍を移植し、腫瘍原発巣と転移巣での BMDC の分布と動態を検討し、以下の結果を得た。

① 皮下原発モデル、肺転移モデルともに腫瘍組織内に GFP 陽性細胞が多数観察された。

② GFP 陽性細胞数は転移巣で有意に多かった。

これにより、BMDC が腫瘍部において様々な細胞へ分化し、特に転移に大きく関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

BMDC の腫瘍組織や前転移 niche 形成における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) GFP マウス由来骨髄細胞の移植

GFP マウスは 組織を構成する細胞の全てが GFP 蛋白を発現している。樹立した細胞の移植実験では、移植した細胞がどのような細胞に分化しても GFP 蛋白を有する為、分化誘導した細胞の追跡が可能である。

① GFP マウス由来骨髄細胞の調整

GFP マウスをイソフルランの過吸入により屠殺し、大腿骨から骨髄細胞を回収した。

② 細胞移植

GFP マウスと同系の 6 週齢(雌)に X 線照射(5Gray×2 Total 10Gray)を行った後、尾静脈から 1×10^7 個の細胞を移植した。

(2) 腫瘍細胞の移植

骨髄移植後 4 週間を待って、作製した GFP キメラマウスの背部皮下もしくは尾静脈からマウス由来肺癌細胞株 (Lewith Lung Cancer: LLC) 10×10^5 cells を移植し、28 日後に屠殺した。それぞれ背部皮下移植マウスを原発モデル、尾静脈注射モデルを肺転移モデルとした。また、原発モデルの転移巣のみられない肺を転移前状態の肺として前転移 niche の検討を行なった。コントロールは、骨髄移植のみ行ったマウスとした。

屠殺したマウスは、心臓より 4% paraformaldehyde を注入し、灌流固定を行なった。

固定後腫瘍組織を周囲組織を含めて摘出し、4% paraformaldehyde で固定、定法にてパラフィンブロックを作製した。

(3) 組織学的解析

① ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

切片をキシレンにて脱パラフィンし、100%から 70%エタノールおよび精製水にて再水和後、HE 染色を行った。70%から 100%エタノールおよびキシレンにて脱水・透徹を行った後、Entellan にて封入し組織学的観察を行った。

② 免疫組織化学的染色

組織切片の脱パラフィン後、室温で 30 分間 0.3%過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロックし、精製水で洗浄した。抗体は、GFP、CD31、CD11b、Gr-1 のモノクローナル抗体を用いた。

陰性対照は二次抗体のみで行い、すべて陰性であった。

③ 蛍光免疫二重染色

GFP、CD31、CD11b、Gr-1 抗体を用いて蛍光免疫二重染色を行った。各抗体の希釈は Can Get signal で行った。

二次抗体反応終了後、対比染色として DAPI $1 \mu\text{g/ml}$ を 3 分間反応させた。洗浄後に Fluorescence mounting medium で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) 細胞数の計測

作製した免疫染色標本を用いて GFP 陽性細胞、CD31 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、Gr-1 陽性細胞について細胞数の計測を行った。細胞質陽性像を陽性判定とし、染色を施した腫瘍組織内の無作為に選択した 10 か所について 400 倍視野中の陽性細胞数の平均値を算出した。結果は Student's T-Test により検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした

4. 研究成果

(1) BMDC の局在の検討

転移巣と原発巣では、BMDC の浸潤が異なり、転移巣で浸潤する BMDC 数が増加していた。また、原発巣においても腫瘍の浸潤部で有意に BMDC が増加していた。

浸潤する BMDC の形態は球形や樹状形の細胞で、様々な形態を示した。

また、原発モデルの転移成立前の肺においても、有意な BMDC の増加を認めた。これらの細胞は小型の球形の細胞が多く、肺胞壁に集簇し結節状の構造を形成していた。このような構造は、骨髄移植のみを行った正常マウスでは観察されなかった。

(2) CD31 陽性細胞の局在の検討

CD31 は、腫瘍血管、および腫瘍間質に存在する球形もしくは樹状形の細胞に、陽性であった。球形・樹状形の細胞は、転移巣や、原発巣浸潤部で有意に増加しており、一部転移前の肺においても観察された。これらの細胞は、腫瘍を移植していない骨髄移植マウスでは観察されなかった。

(3) CD31 骨髄由来細胞

CD31 と GFP の蛍光二重染色により、腫瘍間質内に存在する CD31 陽性細胞の多くは GFP と共局在を示すことが明らかとなった。

また、転移成立前の肺でみられた結節状の病変にも、少数の CD31 陽性細胞で GFP と共局在を示した。

(4) その他の因子の検討

転移成立前の肺でみられた結節病変は、多くの細胞が CD11b, Gr-1 陽性の細胞で、これらの細胞は GFP との共局在を示した。

CD11b, Gr-1 陽性細胞は通常の骨髄移植マウスでも少数観察されたが、転移成立前では有意に細胞数が増加していた。

まとめ

CD31 は血管内皮細胞に発現する代表的な膜接着因子であるが、正常組織における浮遊細胞での発現は報告されておらず、CD31 陽性 BMDC は腫瘍の浸潤や転移に関与している可能性が示唆された。また、一部は前転移 niche 形成への関与が考えられた。

また、CD11b, Gr-1 double positive を示す骨髄由来細胞は、免疫抑制性骨髄由来細胞 (Myeloid derived suppressor cells: MDSC) と考えられ、MDSC が前転移 niche の形成に関与している可能性が考えられた。

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 21 件)

- (1) Yoshida S, Nagatsuka H, Nakano K, Kogashiwa Y, Ebihara Y, Yano M, Yasuda M. **Significance of PD-L1 Expression in Tongue Cancer Development.** Int J Med Sci. 査読有り. 2018 22;15(14):1723-1730. doi: 10.7150/ijms.27860.
- (2) Matsuda H, Takabatake K, Tsujigiwa H, Watanabe S, Ito S, Kawai H, Hamada M, Yoshida S, Nakano K, Nagatsuka H. **Effects of the Geometrical Structure of a Honeycomb TCP on Relationship between Bone / Cartilage Formation and Angiogenesis.** Int J Med Sci. 査読有り. 2018 Oct 20;15(14):1582-1590. doi: 10.7150/ijms.28452.
- (3) Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T, Okui T, Obata K, Takabatake K, Kawai H, Ono K, Okamoto K, Nagatsuka H, Sasaki A. **Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma.** Int J Oncol. 査読有り. 2019 Jan;54(1):283-294. doi: 10.3892/ijo.2018.4631. Epub 2018 Nov 12.
- (4) Kawai H, Tsujigiwa H, Siar CH, Nakano K, Takabatake K, Fujii M, Hamada M, Tamamura R, Nagatsuka H. **Characterization and potential roles of bone marrow-derived stromal cells in cancer development and metastasis.** Int J Med Sci. 査読有り. 2018 Sep 7;15(12):1406-1414. doi: 10.7150/ijms.24370. eCollection 2018

- (5) Takeshita Y, Okada S, Hisatomi M, Matsuzaki H, Kawai H, Noda Y, Murakami J, Fujita M, Nagatsuka H, Yanagi Y, Asaumi J. **Oropharyngeal adenoid cystic carcinoma invading the mandibular bone through the mandibular foramen.** *Oral Radiol.* 査読有り. 2018 Nov 15. doi: 10.1007/s11282-018-0359-3. [Epub ahead of print]
- (6) Fushimi S, Nohno T, Nagatsuka H, Katsuyama H. **Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGFβ3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells.** *Genes Cells.* 査読有り. 2018 Jul;23(7):517-527. doi: 10.1111/gtc.12591. Epub 2018 May 9.
- (7) Takabatake K, Tsujigiwa H, Song Y, Matsuda H, Kawai H, Fujii M, Hamada M, Nakano K, Kawakami T, Nagatsuka H. **The Role of Bone Marrow-Derived Cells during Ectopic Bone Formation of Mouse Femoral Muscle in GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model.** *Int J Med Sci.* 査読有り. 2018 May 22;15(8):748-757. doi: 10.7150/ijms.24605. 2018.
- (8) Yoshida S, Shimo T, Murase Y, Takabatake K, Kishimoto K, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Nagatsuka H, Sasaki A. **The Prognostic Implications of Bone Invasion in Gingival Squamous Cell Carcinoma.** *Anticancer Res.* 査読有り. 2018 Feb;38(2):955-962.
- (9) Takada H, Ibaragi S, Eguchi T, Okui T, Obata K, Masui M, Morisawa A, Takabatake K, Kawai H, Yoshioka N, Hassan NMM, Shimo T, Hu GF, Nagatsuka H, Sasaki A. **Semaphorin 4D promotes bone invasion in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int J Oncol.* 査読有り. 2017 Aug;51(2):625-632. doi: 10.3892/ijo.2017.4050. Epub 2017 Jun 21.
- (10) Kozusko SN, Sánchez MA, Gutiérrez de Ferro MI, Sfer AM, Madrid APM, Takabatake K, Nakano K, Nagatsuka H, Rodríguez AP. **Antibacterial activity and biocompatibility of zinc oxide and graphite particles as endodontic materials.** *J Hard Tissue Biol.* 査読有り. 26(4): 311-318, 2017
- (11) Katase N, Nishimatsu SI, Yamauchi A, Yamamura M, Terada K, Itadani M, Okada N, Hassan NMM, Nagatsuka H, Ikeda T, Nohno T, Fujita S. **DKK3 Overexpression Increases Malignant Properties of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells.** *Oncol Res.* 査読有り. 2017 May 4. doi: 10.3727/096504017X14926874596386.
- (12) Takebe Y, Tsujigiwa H, Katase N, Siar CH, Takabatake K, Fujii M, Tamamura R, Nakano K, Nagatsuka H. **Parenchyma-stromal interactions induce fibrosis by secreting CCN2 and promote osteoclastogenesis by stimulating RANKL and CD68 through activated TGF-β/BMP4 in ameloblastoma.** *J Oral Pathol Med.* 査読有り. 2017 Jan;46(1):67-75. doi: 10.1111/jop.12467.
- (13) Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Takabatake K, Okafuji N, Shoumura M, Osuga N, Nagatsuka H, Kawakami T. **Overview of Cytological Dynamics of Periodontal Ligament Inflammatory Lesions.** *International Journal of Dentistry and Oral Science* 査読有り. 2017. ISSN:2377-8075
- (14) GA, Farahat M, Hara ES, Taketa H, Nagatsuka H, Kuboki T, Matsumoto T. **MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue.** *J Cell Sci.* 査読有り. 2017 May 1;130(9):1559-1569. doi: 10.1242/jcs.196907. Epub 2017 Mar 27.
- (15) Liu Han, Xia Shilin, Zhu Lei, Li Nan, Yang Qian, Dong Yan, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi, Xiao Jing. **Cytoplasmic ABCG2 and Podoplanin Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma Correlates with Lymph Node Metastasis.** *Journal of Hard Tissue Biology* 査読有り. (1341- 7649)26 卷 3 号 Page268-273(2017.07)
- (16) GA, Farahat M, Hara ES, Taketa H, Nagatsuka H, Kuboki T, Matsumoto T. **MCSF orchestrates branching morphogenesis in developing submandibular gland tissue.** *J Cell Sci.* 査読有り. 2017 May 1;130(9):1559-1569. doi: 10.1242/jcs.196907. Epub 2017 Mar 27.
- (17) Kuroda H, Kurio N, Shimo T, Matsumoto K, Masui M, Takabatake K, Okui T, Ibaragi S, Kunisada Y, Obata K, Yoshioka N, Kishimoto K, Nagatsuka H, Sasaki A. **Oral Squamous Cell Carcinoma-derived Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis.** *Anticancer Res.* 査読有り. 2017 Dec; 37(12): 6731-6737.
- (18) Obata K, Shimo T, Okui T, Matsumoto K, Takada H, Takabatake K, Kunisada Y, Ibaragi S, Nagatsuka H, Sasaki A. **Tachykinin Receptor 3 Distribution in Human Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Anticancer Res.* 査読有り. 2016 Dec;36(12):6335-6341
- (19) Siar CH, Rahman ZA, Tsujigiwa H, Mohamed Om Alblazi K, Nagatsuka H, Ng KH. **Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma.** *J Oral Pathol Med.* 査読有り. 2016 Sep;45(8):591-8. doi: 10.1111/jop.12417. Epub 2016 Jan 11.

- (20) Shimo T, Matsumoto K, Takabatake K, Aoyama E, Takebe Y, Ibaragi S, Okui T, Kurio N, Takada H, Obata K, Pang P, Iwamoto M, Nagatsuka H, Sasaki A. **The Role of Sonic Hedgehog Signaling in Osteoclastogenesis and Jaw Bone Destruction**. PLoS One. 査読有り. 2016 Mar 23;11(3):e0151731. Doi: 10.1371/journal.pone.0151731. 2016
- (21) Masui M, Okui T, Shimo T, Takabatake K, Fukazawa T, Matsumoto K, Kurio N, Ibaragi S, Naomoto Y, Nagatsuka H, Sasaki A. **Novel Midkine Inhibitor iMDK Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma**. Anticancer Res. 査読有り. 2016 Jun;36(6):2775-81.

〔図書〕(計 8 件)

- (1) 長塚 仁
第5章 消化器系 (1) 口腔
カラーアトラス 病理組織の見方と鑑別診断 第6版赤木忠厚・松原 修・真鍋俊明 監修；吉野正・小田義直・坂元亨宇・森井英一 編集. 発行年月：2018年9月10日 ISBN：978-4-263-73185-7 P161-180.
- (2) 中野 敬介
第5章 消化器系 (2) 唾液腺
カラーアトラス 病理組織の見方と鑑別診断 第6版赤木忠厚・松原 修・真鍋俊明 監修；吉野正・小田義直・坂元亨宇・森井英一 編集. 発行年月：2018年9月10日 ISBN：978-4-263-73185-7 P181-189.
- (3) 長塚 仁/中野敬介
Chapter 12 口腔癌・口腔潜在的悪性疾患と口腔上皮性異形成. 新口腔病理学 第2版 下野正基・高田隆・田沼順一・豊澤悟 編集. 医歯薬出版株式会社. 発行年月：2018年4月10日 ISBN：978-4-263-45815-0. P169-181
- (4) 中野 敬介, 長塚 仁
【頭頸部腫瘍I】粘膜腫瘍 口腔と舌可動域の腫瘍の分類と病理(解説/特集). 病理と臨床 (0287-3745)36巻3号(2018.03) Page211-215
- (5) 長塚 仁
3. 歯髄および根尖歯周組織の病変 p53-72
10. 歯源性腫瘍 p205-234
12. 口腔軟組織・顎骨の腫瘍および腫瘍状病変 p249-290
口腔病理アトラス (第3版) 2018年 2月21日 ISBN：978-4-8306-7004-6.
- (6) 長塚 仁. 第1章 顎骨・口腔の疾患 (2) 良性腫瘍または腫瘍類似疾患 Case Based Review 画像診断に強くなる 顎口腔領域の疾患読影ポイントから病理診断、治療方針まで 2017.4.7 第1版 P56-81,94-97.
- (7) Kawakami T, Tsujigiwa H, Takaya T, Kaneko K, Mimura H, Matsuda S, Muraoka R, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Nakano K and Nagatsuka H. Chapter 9. Injury and recovery of the periodontal ligament: From a view point of developmental biology. In Advances in Medicine and Biology, Vol 111. Berhardt LV ed., Nova Biomedical Publisher, NY, USA, 2017 pp173-220, January.
- (8) 中野敬介, 長塚仁. 監修 深山正久, 森永正二郎. V. 頭頸 2. 口腔・咽頭, 病理と臨床 2017 年臨時増刊号 (35 巻), 2017 p97-108

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 河合穂高、辻極秀次、信長ひかり、高嶋清文、中野敬介、長塚 仁. 腫瘍移植マウスの高転移臓器における骨髄由来細胞の局在と役割の検討 (ポスター). 第 29 回日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会、2018 年 8 月 26 日、東京
- (2) 河合穂高、辻極秀次、信長ひかり、高嶋清文、中野敬介、長塚 仁. 肺癌移植マウスを用いた高転移臓器における骨髄由来細胞の局在と役割の検討(口演・ポスター). 第 22 回日本がん免疫学会総会、2018 年 8 月 2 日、岡山

- (3) 河合穂高、辻極秀次、藤井昌江、高島清文、中野敬介、吉田沙織、浜田芽衣、長塚 仁. 肺癌移植マウス高転移臓器における骨髓由来細胞の局在と役割の検討 (ポスター). 第107回日本病理学会総会、2018年6月21日、北海道
- (4) 長塚 仁. ポスター発表 (一般): 頭頸部・唾液腺3 (座長). 第107回日本病理学会総会、2018年6月22日、北海道
- (5) 長塚 仁. 口腔前癌病変と扁平上皮癌 (講師). 第12回診断病理サマーフェスト・第1部、2018年8月18日、東京
- (6) 河合穂高、辻極秀次、藤井昌江、信長ひかり、高島清文、中野敬介、浜田芽衣、長塚 仁. 腫瘍移植により動員される骨髓由来細胞の局在と役割の検討. (口演). 第38回岡山歯学会総会・学術大会、2017年10月1日、岡山
- (7) 河合 穂高、辻極 秀次、信長 ひかり、高島 清文、中野 敬介、松田 寛之、伏見 滋子、長塚 仁. マウス肺癌移植モデルにおける骨髓由来細胞の全身的局在と役割 (ポスター). 第26回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2017年8月19日、岡山
- (8) 長塚 仁. 「口腔癌取扱い規約」病理学的記載事項について (ワークショップ). 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2017年1月27日、福岡
- (9) 長塚 仁. 口腔癌病理組織診断の展望—口腔癌取扱い規約改定の観点から. (基調講演). 第64回NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会、2016年10月29日、山口
- (10) 長塚 仁. 口腔癌診断の均霑化を目指して 口腔癌診断の均霑化—口腔癌取扱い規約改訂の観点から (JSOP 企画委員会指定セッション). 第27回日本臨床口腔病理学会 総会・学術大会、2016年8月12日、広島
- (11) 長塚 仁. 口腔癌の前駆・初期病変の病理診断標準化に向けて (シンポジスト). 第105回日本病理学会総会、2016年5月14日、宮城
- (12) 長塚 仁. 口腔の前癌病変と表在癌における病理診断の標準化に向けて (シンポジスト). 第70回NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2016年4月16日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究分担者

中野 敬介 (NAKANO Keisuke)
岡山大学 医歯薬学総合研究科 准教授
研究者番号: 10325095

辻極 秀次 (TUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学 理学部 教授
研究者番号: 70335628

山近 英樹 (YAMATIKA Eiki)
岡山大学 大学病院 講師
研究者番号: 10294422

高島 清文 (TAKABATAKE Kiyofumi)
岡山大学 医歯薬学総合研究科 助教
研究者番号: 70736537