

令和元年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11449

研究課題名(和文) 口腔悪性腫瘍の微小環境における癌関連線維芽細胞(CAF)と細胞外基質の役割

研究課題名(英文) Role of cancer associated fibroblast and extracellular matrices in the microenvironment of oral carcinoma

研究代表者

藤田 修一 (FUJITA, Shuichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00181355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：頸部郭清術を行った口腔扁平上皮癌(OSCC)を対象として、ECM変化に關与するLOX、MT1-MMP、S100A8、TIMP-1の原発部やリンパ節での局在を免疫組織化学的に観察した。原発部では、TIMP-1の実質細胞及び間質細胞での発現、LOX、MT1-MMPの実質細胞での発現がリンパ節転移と相關しており、リンパ節転移の予測に有用である。また、リンパ節では転移例でmarginal sinus histiocytosisが高頻度に形成され、ここに、LOX、MT1-MMP陽性マクロファージが有意に増加していた。これらの細胞はSCC細胞の定着しやすい微小環境を構築していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は口腔扁平上皮癌のリンパ節転移は原発部位での細胞外基質の改変と相關性があることを示している。従って、リンパ節転移のない段階での生検材料を用いて、LOX、MT1-MMP、TIMP-1の発現を検査することによって、将来、転移するリスクが予想できる。また、転移にはリンパ節の周辺洞での細胞外基質の改変が關連していることが示唆されたことから、周辺洞でのマクロファージのLOXやMT1-MMPの発現を抑制したり、LOXやMT1-MMP陽性のマクロファージの流入を減少させることでリンパ節転移を予防できることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：We studied immunohistochemical expression of LOX, MT1-MMP, S100A8 and TIMP-1, as regulators of extracellular matrix remodeling, in primary tumor and lymph nodes of oral squamous cell carcinoma patients. These factors were expressed not only in primary tumor cells but in stromal cells, such as cancer associated fibroblast, macrophage, dendritic cell and other inflammatory cells. The positive rates in tumor cells and/or stromal cells of LOX, MT1-MMP and TIMP-1 were correlated with lymphatic metastasis. The expressions of these factors are thought to be useful to predict lymphatic metastasis. Marginal sinus histiocytosis (MSH) was more frequently observed in the lymph nodes of metastatic cases than metastasis-free cases. The rates of MSH containing macrophages positive for LOX and MT1-MMP in metastatic cases were significantly higher than in metastasis-free cases. These findings suggested LOX and MT1-MMP participate to construct the suitable microenvironment for colonization of SCC cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 リンパ節転移 微小環境 細胞外基質 基質改変 免疫組織化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は口腔病理医として、顎口腔疾患の病理診断、細胞診にも従事しているが、口腔領域の悪性腫瘍として頻度の高い扁平上皮癌(OSCC)の病態の研究も行ってきた。腫瘍の悪性度は腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移などの活性によって決定される。これらの悪性度の指標は腫瘍細胞だけでなく、腫瘍細胞と間質に存在する微小環境との相互作用によって制御されている。このことから、OSCCの微小環境の構築や癌細胞と微小環境の相互作用に焦点をあてて解析してきた。

癌のリンパ節転移においては、微小環境がないリンパ節周辺洞に新しく微小環境が形成されて、癌細胞の定着が起こるので、微小環境の研究のためには、よいモデルとなると考えている。研究代表者はOSCC症例の原発部位を含めて、リンパ節の周辺洞における微小環境、特に癌細胞の定着に適した pre-metastatic niche の解析を発想した。

2. 研究の目的

OSCCは進行とともにしばしば頸部リンパ節に転移する。リンパ節転移の有無は予後推測因子の1つであり、病期の決定と病期に基づく治療方針に関係している。OSCCの転移の成立に先立って、リンパ節の反応として周辺洞に免疫担当細胞が集簇する marginal sinus histiocytosis (MSH)が現れることが知られているが、我々は、このMSHがSCC細胞の定着しやすい微小環境の形成に関係しているのかを、微小環境の構成要素の一つである細胞外基質のリモデリングに着目して免疫組織学的に解析を行った。

3. 研究の方法

長崎大学病院口腔外科にて、2011年1月～2016年12月に頸部郭清術を行った口腔扁平上皮癌で、術前に化学療法及び放射線療法を受けていない97症例(M:F=63:34、初診時平均年齢68.8歳)を対象とした。郭清時にリンパ転移が認められた59例(M:F=41:18)と転移の無かった38例(M:F=23:15)の2群に分け、それぞれ原発巣とリンパ節に対してHE染色と免疫染色を施した。免疫染色で標的とした抗原はLOX (lysyl oxidase)、MT1-MMP (membrane-type matrix metalloproteinase-1, or MMP14)、S100A8 (S100 calcium-binding protein A8)及びTIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1)である。なお、研究にあたっては、長崎大学病院臨床研究倫理委員会の審査及び研究許可を受けている。

LOXはコラーゲンおよびエラスチンのリシン残基の酸化作用によって、膠原線維と弾性線維を安定化および強化する働きがあり、悪性腫瘍においては間質の細胞外基質のリモデリングに関係しているとみなされている。MT1-MMPは膜型マトリックスメタロプロテアーゼであり、細胞外基質のコラーゲンの分解作用がある。S100A8はS100A9とともに複合体calprotectinを形成し、calprotectinはMMP-2の発現を抑制する機能がある。TIMP-1はMMPsと複合体を形成し、MMPの機能を抑制することでMMPのコラーゲンの分解を減弱させ、線維化を生じさせる。

観察にあたって、原発部では腫瘍実質細胞と線維芽細胞や免疫細胞を含む間質細胞を分けて観察した。リンパ節は非転移例では原発に近接する区域に位置するリンパ節を対象とし、転移例でSCCにより構造が破壊されているリンパ節では転移リンパ節と同じ区域の転移を含まないリンパ節を用い、MSHを構成する細胞で検討した。

統計解析にはchi-square独立性検定を用いた。

4. 研究成果

(1) MSH

HE染色からMSHの有無を検索した。MSHは組織学的にリンパ節の被膜下に主にマクロファージの集簇を示していた(図1)。97例中81例にMSHがみられ、転移例より転移のない症例で有意にMSH形成の頻度は高かった($P < 0.01$)。

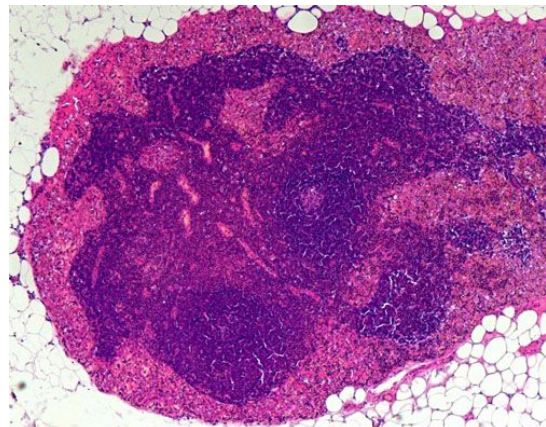


図1

(2) 免疫染色

LOX

原発腫瘍では LOX は SCC 胞巣の辺縁細胞や浸潤部の索状配列の腫瘍細胞に強く発現していた。上皮間葉転換 (EMT) を示唆する、充実性胞巣から間質に個在性に浸潤する腫瘍細胞にも高頻度に発現が認められた。間質細胞には陽性細胞はあまりみられなかった (図 2A)。転移例と非転移例間の比較では腫瘍実質細胞の陽性率は転移例で有意に高かった ($p < 0.05$) が、間質細胞の陽性率には有意な差はみられなかった ($P > 0.05$)。

リンパ節では高頻度に MSH のマクロファージに陽性がみられた (図 2B)。MSH を有するリンパ節の中では、転移例は非転移例より MSH での LOX の陽性頻度は有意に高かった ($P < 0.01$)。

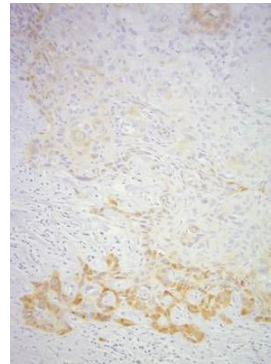


図 2A

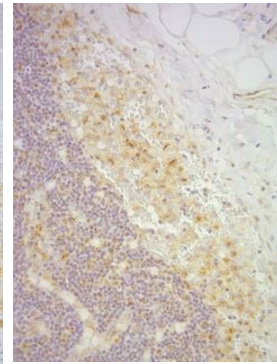


図 2B

MT1-MMP

MT1-MMP は主に細胞膜に発現していた。原発部では MT1-MMP は SCC の辺縁の浸潤部で強い発現がみられた。間質では多くのマクロファージ、好中球、線維芽細胞に陽性像が認められた (図 3A)。実質細胞陽性率は転移例より非転移例で有意に高かった ($p < 0.01$) が、間質細胞では陽性率の有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

リンパ節では MSH のマクロファージに発現がみられた (図 3B)。MSH を伴うリンパ節では転移例は非転移例より MSH での MT1-MMP の陽性率が有意に高かった ($P < 0.05$)。

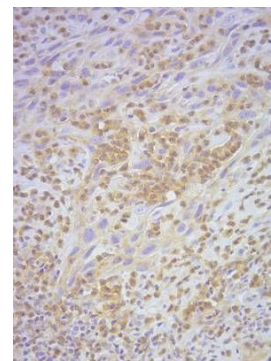


図 3A

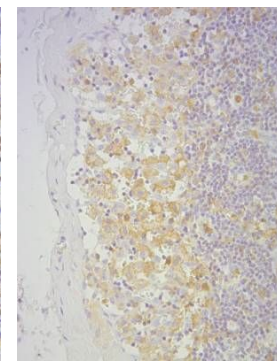


図 3B

S100A8

原発腫瘍の実質では胞巣辺縁より内部の細胞が強く発現していた。浸潤部の索状配列または散在する実質細胞にも陽性がみられた。間質ではマクロファージ、線維芽細胞、樹状細胞に局在が認められ、線維芽細胞では腫瘍に近接する細胞が遠位の細胞より強く発現していた (図 4A)。転移例と非転移例間では腫瘍実質及び間質細胞の陽性率に有意な差はみられなかった ($P > 0.05$)。

リンパ節の MSH でもマクロファージが陽性であり (図 4B)、転移例の MSH と非転移例の MSH における S100A8 の陽性率には有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

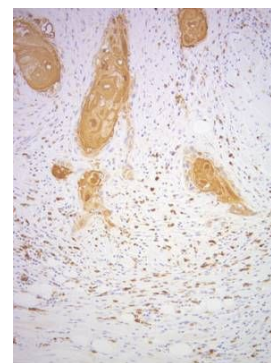


図 4A

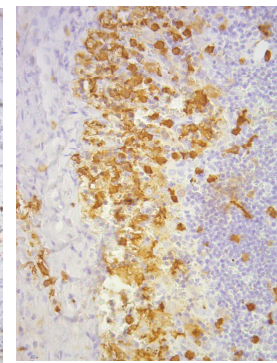


図 4B

TIMP-1

原発においては実質の陽性例では、胞巣周囲や EMT を示す腫瘍細胞で局在し、間質のマクロファージや線維芽細胞にも発現を認めた (図 5A)。転移例では非転移例と比較して、腫瘍実質及び間質細胞共に陽性率は有意に高かった (共に $P < 0.01$)。

リンパ節では転移例では、節外浸潤での腫瘍細胞や間質細胞での発現が高頻度にみられた (図 5B)。MSH を有するリンパ節では、周辺洞に陽性マクロファージを含む症例がみられたが、転移例と非転移例のリンパ節では MSH の陽性率に有意な差はみられなかった ($p > 0.05$)。



図 5A

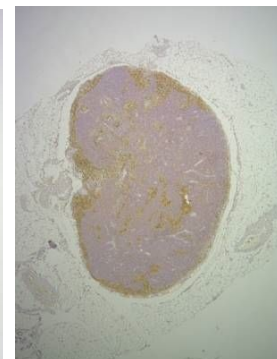


図 5B

多くの悪性腫瘍において、腫瘍の浸潤・増殖には細胞外基質の改変が必要である。本研究の指標である LOX, MT1-MMP, S100A8, TIMP-1 は腫瘍間質の細胞外基質の構築や破壊に関係する因子である。この研究では、OSCC の原発部の腫瘍実質、特に浸潤先端部にこれらの因子が発現し、MT1-MMP, S100A8, TIMP-1 は周囲の炎症性細胞、線維芽細胞様細胞、樹状細胞などにも高率に発現しており、細胞外基質のリモデリングが腫瘍の浸潤に関与していることを示している。

原発部の腫瘍では TIMP-1 の実質細胞及び間質細胞での発現、LOX, MT1-MMP の実質細胞での発現がリンパ節転移と相関していることが示された。これらの因子はリンパ節転移の予測因子となり得ることが考えられる。S100A8 は腫瘍に隣接する線維芽細胞が特に強く発現していることから、腫瘍関連線維芽細胞(CAF)の良いマーカーになることが考えられる。

リンパ節では非転移例と比較して、転移症例での転移リンパ節やそれに近接する転移巣を含まないリンパ節でも MSH で LOX, MT1-MMP の陽性細胞が有意に増加していた。この所見は LOX, MT1-MMP が OSCC のリンパ節転移の成立に先立って、周辺洞の微小環境の細胞外基質を改変し、SCC 細胞が定着しやすい微小環境の構築に関与していることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

藤田修一、片瀬直樹 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移における微小環境の形成 基質改変因子の免疫組織学的解析 第 60 回歯科基礎医学会学術大会、九州大学医学部百年講堂(福岡市) 2018 年 9 月 7 日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：池田 通
ローマ字氏名：IKEDA, Tohru

研究協力者氏名：柴田 恭明
ローマ字氏名：SHIBATA, Yasuaki

研究協力者氏名：鳴瀬 智史
ローマ字氏名：NARUSE, Tomofumi

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、研究者個人に帰属されます。