様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１２６０２

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：１６Ｋ２０４１０

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞によるリンパ節転移制御機構の解明

研究課題名（英文）The role for cancer-associated fibroblasts in lymph node metastasis

研究代表者

栢森　高（KAYAMORI, Kou）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：１０５６９８４１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌における癌微小環境が腫瘍の進展に及ぼす役割を研究して、以下の結果が得られた。（１）癌関連線維芽細胞の出現は、「腫瘍の浸潤深さ」と患者の生命予後との間に有意な関連を示したが、「リンパ管侵襲」や「リンパ管密度」、「リンパ節転移」との間には有意な関連は認められなかった。（２）癌細胞により刺激された癌関連線維芽細胞が発現するLIFが、癌細胞に作用して、その浸潤を促進している。（３）CD163陽性腫瘍関連マクロファージが産生するVEGF-Cが、リンパ管新生を促進し、その結果頸部リンパ節転移に寄与している。以上の結果から、口腔癌における新たな治療ターゲットとしての癌間質の重要性が示された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the role for tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma (OSCC) progression. The following results were obtained in this research. (1) Immunohistochemical studies using OSCC samples revealed that the presence of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in OSCC were significantly correlated with tumor invasion depth and poor prognosis in patients with OSCC. But there was no correlation between CAFs and lymphatic vessel density, lymphatic vessel invasion or lymph node metastasis. (2) Leukemia inhibitory factor (LIF) produced by fibroblasts within tumor stroma in response to cancer cells promoted cancer cell invasion in OSCC. (3) CD163(+) tumor-associated macrophages promoted lymphangiogenesis through VEGF-C expression, which contributed to cervical lymph node metastasis in OSCC. These results indicate the importance of tumor microenvironment as a new therapeutic target in OSCC.

研究分野：口腔病理学

キーワード：癌微小環境　癌関連線維芽細胞　リンパ節転移　腫瘍関連マクロファージ　口腔扁平上皮癌

１．研究開始当初の背景
口腔癌は近年増加傾向にある悪性腫瘍であり、組織学的には扁平上皮癌（以下、SCC）が大半を占めている。手術方法や化学・放射線療法の改善がなされているものの、いまだにその5年生存率は約50～60%と低く、新たな治療法の開発が期待される予後不良の疾患である。
近年様々な癌腫において、浸潤部の癌周囲間質で形成される「微小環境」が、腫瘍の増殖進展、転移に関与していることを示唆する研究結果が報告されてきている。癌微小環境は、線維芽細胞、血管・リンパ管内皮細胞や炎症細胞（マクロファージなど）といった様々な細胞や、細胞外マトリックスから構成される。中でも主要な構成要素として線維芽細胞（特に癌関連線維芽細胞 Cancer Associated Fibroblast:CAF と呼ばれる）が挙げられ、多くの悪性腫瘍においてその役割が解明されてきてはいるが、口腔癌におけるその重要性はいまだ十分には分かってはいないのが現状である。

２．研究の目的
口腔 SCC の予後を左右する重要な因子として頸部リンパ節転移がある。しかし、リンパ節転移を制御する詳細な分子機構は十分に解明されていない。本研究では、口腔癌の微小環境がこのリンパ節転移制御に関与しているか否かを、とくに癌関連線維芽細胞である CAF に注目して解析する事を目的とする。また、癌微小環境の構成細胞として腫瘍関連マクロファージ(Tumor Associated Macrophage:TAM)も注目されている。TAM とリンパ節転移制御機構との関連も解析する。

３．研究の方法
(1)癌関連線維芽細胞に関して
①本学歯学部付属病院顎顔面外科学分野、顎口腔外科学分野において、SCC の診断のもと、外科手に切除された検体(舌癌 113 症例)を用いて、癌浸潤巣における CAF の有無をα-SMA 抗体を用いた免疫組織化学的検討により検討した。また、CAF の有無と各種臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

②CAF と癌細胞の浸潤との関連を検討するために in vitro での実験を行った。具体的には cell culture insert を用いて、upper chamber にヒト口腔 SCC 株(HSC3,HO1N1)、lower chamber にヒト皮膚線維芽細胞 NHDF を播種して、癌細胞の migration, invasion の様子を解析した。

③癌細胞との相互作用により線維芽細胞で発現が亢進する遺伝子群を抽出するために、マイクロアレイ解析(Affymetrix)を行った。具体的には、HO1N1 細胞株と NHDF を直接共培養したのち、anti-Fibroblast microbeads(Miltenyi Biotec)で NHDF を単離し、単独培養した場合の NHDF と比較して発現上昇している遺伝子群をアレイ解析した。

④口腔癌が線維芽細胞の Leukemia inhibitory factor(以下 LIF)の発現を亢進させるかを検討した。具体的には、各種口腔 SCC 株 (HSC3, HSC4, Ca9-22, HO1N1) 由来の conditioned medium (CM) を NHDF に添加して、NHDF における LIF(Leukemia inhibitory factor)の mRNA 発現を定量リアルタイム PCR 法で解析・検討した。

⑤癌細胞により刺激された NHDF が発現する LIF が癌細胞の migration, invasion に関与するか否かを、上記②で述べた cell culture insert を用いた Migration, Invasion Assay 系に LIF 中和抗体を添加する事によって検討した。

⑥実際のヒト口腔癌における LIF の発現分布を免疫組織化学的に検討した。上記①における舌扁平上皮癌 113 症例のうち、免疫染色による十分な検討が可能な 112 症例を用いて、CAF マーカーのα-SMA, および LIF 抗体を用いた通常の免疫染色と蛍光二重染色法で解析・検討した。

⑦各種ヒト口腔 SCC 株の LIF mRNA 発現を PCR 法にて解析した。また、線維芽細胞と共培養する事により癌細胞自体の LIF 発現に変動があるか否かを、HSC3 と NHDF を共培養後に anti-fibroblast microbeads により各々を positive, negative selection で単離してきて、各細胞における LIF mRNA 発現を定量リアルタイム PCR で解析した。

⑧口腔癌における LIF 陽性 CAF の意義を検討するために、LIF 陽性 CAF と各種臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

⑨口腔癌における CAF の出現、また CAF における LIF の発現が、患者の overall survival と関連があるかをカプラン・マイヤー法により解析・検討した。

(2)腫瘍関連マクロファージに関して
①本学歯学部付属病院顎口腔外科学分野にて、舌 SCC の診断の元切除された 70 症例の検体を用いて、腫瘍浸潤部における TAM の分布を CD68,および CD163 と CD204（ともに M2 型マクロファージのマーカー）抗体で免疫組織化学的に検討した。また、各抗体に陽性を示すマクロファージの密度を計測して、各密度に違いがあるのか否かも検討した。

②上記①で測定した中央値にて、TAM を CD68/CD163/CD204-High 群、Low 群の２つに分類し、TAM の密度と各種臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。

③各症例の腫瘍浸潤部におけるリンパ管密度(LVD)を計測して、リンパ節転移の有無との関連を統計学的に解析した。更に、LVD と TAM の密度との関連も検討した。

④CD163 陽性 TAM がリンパ管新生促進因子である VEGF-C を発現しているか否かを、ヒト舌 SCC 検体を用いた蛍光二重染色法で検討した。

⑤ヒト口腔 SCC 株(HO1N1, HSC4)由来の conditioned medium(CM)をマウス単球性白血病細胞株由来である RAW264.7 細胞に添加して、M2 型マクロファージで発現が高い IL-10, CCL22, VEGF-A、および M1 型マクロファージで発現の高い IL-12 の mRNA 発現に及ぼす影響を定量リアルタイム PCR で解析した。また、VEGF-C の発現も検討してみた。

４．研究成果

(1)癌関連線維芽細胞に関して

①ヒト舌癌手術材料を用いた免疫組織化学的検討の結果、113 症例中 74 例で浸潤する癌胞巣周囲にα-SMA 陽性を示す CAF の出現が確認された。39 例は CAF 陰性であった。次にこれら CAF の有無と各種臨床病理学的因子との関連を統計学的に検討した結果、癌の大きさ、リンパ節転移（後発転移を含む)、癌の浸潤様式との間に有意な関連は指摘できなかった。一方で、CAF は癌の分化度および癌の浸潤深さ(invasion depth)に有意な相関が認められた。
その他、癌周囲の血管密度(micro-vessel density:MVD)とリンパ管密度（lymphatic vessel density:LVD）との相関も検討した結果、CAF 陽性群では陰性群と比較して MVD が有意に高かったものの、LVD に関しては両者の間に有意な差は認められなかった。また、癌によるリンパ管侵襲との関連も解析したが、両者の間に有意な関連は指摘できなかった。

②cell culture insert を介してヒト口腔 SCC 株(HSC3, HO1N1)と NHDF を共培養すると、SCC 株単独培養群と比較して、共培養群では癌細胞の migration, invasion は有意に促進された。この結果、共培養によって NHDF から産生される液性因子が癌細胞に作用して、その migration, invasion を促進しているのではないかと示唆された。

③マイクロアレイによる解析を行った結果、単独培養した NHDF と比較して、HO1N1 と共培養後に単利してきた NHDF では 246 個の遺伝子の発現が亢進(>2-fold)していた。Control と比較して 5 倍以上の発現亢進を示した遺伝子は 23 個あり、最も高いものは TGFb2（transforming growth fator-b2, 18.28 倍）であった。2 番目は EDNRA(endotherin receptor type2, 12.58 倍)で、3 番目が LIF(leukemia inhibitory factor, 12.31 倍)であった。

④各種口腔 SCC 株由来の CM を NHDF に添加した結果、いずれの癌細胞株由来の CM も NHDF における LIF の mRNA 発現を有意に上昇させた。

⑤上記②で述べた Migration, Invasion Assay 系に、LIF 中和抗体を添加した結果、HSC3 と NHDF の共培養で誘導される HSC3 の migration, invasion は有意に抑制された。これらの結果から、NHDF が産生する LIF が HSC3 の migration, invasion に関与している事が示唆された。

⑥112 症例中、73 症例でα-SMA 陽性を示す CAF が認められた。LIF 抗体を用いた免疫染色では、多くの癌周囲の線維芽細胞に LIF 陽性を確認できた。結果、73 症例中 44 症例で LIF 陽性を示す CAF が認められた。一方で、癌細胞にも LIF 陽性所見は認められたものの、その intensity は弱陽性であった。

⑦各種ヒト口腔癌細胞株(HSC3, HSC4, Ca9-22, HO1N1)における LIF mRNA 発現は非常に低いレベルであった。また、NHDF と共培養しても、HSC3 癌細胞における LIF mRNA の発現は HSC3 単独培養群と比較しても、有意な差は認められなかった。
⑥、⑦の結果から、口腔癌微小環境では LIF 発現の主な source は CAF であることが示された。

⑧112 症例中、LIF(+)CAF は 44 例、LIF(-)CAF は 29 例であった。これら CAF における LIF の発現と各種臨床病理学的因子との関連を解析した結果、LIF(+)CAF 症例群では LIF(-)CAF 症例群と比較して、癌の invasion depth が有意に深いことが示された。

⑨CAF 陽性症例群は陰性群と比較すると、生存率が有意に低いことが示された。
一方で、LIF(+)CAF 症例群と LIF(-)CAF 症例群との間に有意な差は確認できなかった。

(2)腫瘍関連マクロファージに関して

①免疫組織化学的検討の結果、いずれの症例においても腫瘍間質内には CD68(中央値：73 個/mm^2), CD163(中央値：73 個/mm^2)および CD204(中央値：76 個/mm^2)に陽性を示す TAM がびまん性に確認された。各抗体に陽性を示すマクロファージの密度の中央値はほぼ同等であった。この結果から、口腔癌においては腫瘍間質に誘導される CD68 陽性 TAM の殆どは M2 型 TAM であることが示唆された。

②臨床病理学的因子との関連を検討した結果、CD68-High 群の割合が有意に高い因子は、

「腫瘍分化度」と「リンパ節転移」であった。CD163-High 群の割合が有意に高かった因子は「静脈侵襲」と「リンパ節転移」であった。CD204-High 群の割合が高かった因子は、「性差」と「リンパ節転移」であった。

③LVD は、リンパ節転移陰性症例群よりも、リンパ節転移陽性症例群で有意に高いことが示された。さらに、CD163-High 群は CD163-Low 群と比較して、LVD が有意に高値を示した。一方で、CD68/CD204 に陽性を示す TAM の密度と LVD との間には有意な関連は認められなかった。

④蛍光二重染色を施行したところ、70 症例中 52 症例で、VEGF-C 陽性を示す CD163(+)TAM が確認された。

⑤HSC4 由来の CM は RAW264.7 における IL-10 の発現を有意に上昇させた。また、CCL22 および VEGF-A に関しては、いずれの癌細胞株由来の CM 添加でも有意に上昇させた。一方で、IL-12 の発現に関してはいずれの癌細胞株由来の CM 添加でも発現レベルに有意な差は認められなかった。VEGF-C の発現に関しては、いずれの癌細胞株由来の CM 添加でも有意な発現上昇が認められた。

癌微小環境が口腔 SCC の進展に果たす役割に関して、特に CAF に焦点を置いて上記研究を行った。Overall survival の結果からも、CAF は患者の予後と深く関連しており、その重要性が示唆された。本研究では口腔癌の予後に関わる因子としてリンパ節転移に着目し、CAF がその転移形成に関与していないかをヒト口腔癌手術検体を用いて検討した。リンパ節転移に関わる因子として、特に癌周囲間質のリンパ管密度やリンパ管侵襲と CAF に有意な関連があるかを検索したが、統計学的に有意な差は見出されなかった。
しかしながら、本研究過程において、CAF 陽性症例群では、癌周囲の血管密度(MVD)が有意に高い事、癌の invasion depth が有意に深い事が示された。前者に関しては、本研究代表者は CAF が NOTCH3 シグナルを介して口腔癌の血管新生を促進している事を見出しており(Kayamori et al, *PLOSONE*, 2016)、それを支持する結果である。後者に関しては新たに得られた知見であり、ヒト口腔癌材料を用いた免疫染色による検討、in vitro での実験系とマイクロアレイ解析から、CAF が産生する Leukemia inhibitory factor(LIF)が、癌の浸潤と関連している事が示された。LIF は IL-6 family に属し、細胞の増殖や分化に関与している。いくつかの癌腫ではその overexpression が報告されているが、口腔癌における LIF に関する報告例は殆どない。本研究で、口腔癌においては微小環境中の CAF が LIF の主な産生源であること、その LIF が癌細胞に作用して、その浸潤能を促進している事が示され、口腔癌の新たな治療ターゲットとしての間質の重要性を提示できた。
一方、本研究では口腔 SCC では M2 型腫瘍関連マクロファージ TAM が癌細胞の刺激により VEGF-C を産生し、リンパ管新生が促進される事、これにより頸部リンパ節転移が亢進されている可能性が示された。この結果から、CAF だけではなく、TAM もまた新たな治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

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　2　件）

① Yae Ohata, Maiko Tsuchiya, Hideaki Hirai, Satoshi Yamaguchi, Takumi Akashi, Kei Sakamoto, Akira Yamaguchi, Tohru Ikeda, Kou Kayamori, ‘Leukemia inhibitory factor produced by fibroblasts within tumor stroma participates in invasion of oral squamous cell carcinoma’, ***PLoS ONE***, 査読有, 2018 Feb 14;13(2): e0191865, doi:10.1371/journal.pone.0191865.

② Yuko Yamagata, Hirofumi Tomioka, Kei Sakamoto, Kiyoshi Sato, Hiroyuki Harada, Tohru Ikeda, Kou Kayamori, ‘CD-163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma’, ***J Oral Maxillofac Surg***, 査読有, 2017 Oct;75(10):2144-2153, doi:10.1016/j.joms.2017.03.009.

〔学会発表〕（計　2　件）

① 大畑八重、栢森高、平井秀明、土谷麻衣子、山口聰、原田浩之、坂本啓、池田通、「口腔扁平上皮癌における癌関連線維芽細胞の生物学的重要性」、第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2017 年 8 月 23-25 日

② 山形優子、栢森高、富岡寛文、佐藤潔、坂本啓、原田浩之、「口腔扁平上皮癌進展におけるマクロファージの役割」、第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25-27 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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
栢森 高（KAYAMORI, Kou）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：10569841

(2)研究分担者
(　　　)

研究者番号：

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：

(4)研究協力者
(　　　)