

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：22701  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17H04408  
研究課題名(和文)再発口腔癌に誘導されるCD206+細胞の予後マーカーおよび治療標的としての可能性

研究課題名(英文)Potency of recruited CD206+cells into recurrent oral cancer as a biomarker and treatment target

研究代表者  
來生 知(Kioi, Mitomu)  
横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30545059  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常組織の幹細胞が特定の微小環境下で幹細胞性を維持するのと同様に、がん幹細胞にもがん微小環境というニッチが存在し、がんの治療抵抗性や転移などの悪性化、免疫寛容などに貢献していることがわかりつつある。申請者は最近の研究で、脳腫瘍や口腔がんにおいて放射線照射によって局所血管からの血管新生が抑制された際に、骨髄由来細胞、特にCD11bを発現する単球系細胞が腫瘍内へ誘導され、その後M2マクロファージに分化し脈管形成が起こることを見出した。本研究では口腔がんにおいてそのM2マクロファージが再発の予後マーカーとなりうるか、またどのようにがん細胞とかがわっているのかを解析した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌治療において局所再発は頸部リンパ節転移と並んで予後を著しく低下させることから、その克服が喫緊の重要な課題である。そのため、再発の早期発見は非常に重要であり、予後を予測させるマーカーの開発は生存率の向上など重要な社会的意義があると言える。また本研究にて予後予測マーカーが確立されることにより、他領域のがんのバイオマーカー発明にもつながり、学術的意義も含まれている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the potency of recruited CD206+cells into recurrent oral cancer as a biomarker. In a xenograft mouse model, local irradiation caused vascular damage and hypoxia in the tumor and increased infiltration of CD11b+ myeloid cells. These infiltrating cells showed characteristics of M2 macrophages (M2Ms) and are associated with the promotion of vascularization. M2Ms promoted tumor progression in recurrence after irradiation. In addition, we found that CD11b+ myeloid cells, as well as CD206+ M2Ms, are increased during recurrence after radiotherapy in human OSCC specimens. We also found that monocytes were increased during the initial parts of the treatment in recurrent cases of oral cancer patients. Our findings indicate that CD11b+ cells has the potency of prognostic biomarker in oral cancer.

研究分野：口腔癌

キーワード：バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の標準治療は主に外科的療法で全体の5年生存率は約60%と比較的良好である。しかしながら全体の約4割強を占める進行口腔癌では、手術侵襲により嚥下・構音などの機能障害や審美障害が著しいことから放射線療法、化学療法による臓器温存を目指す保存療法を選択するケースが少なくない。しかし、治療技術の著しい進歩にも関わらず、治療後の再発がしばしば認められる。中でも、放射線療法後の再発症例において、その多くが照射野内からの再発であることは注目すべき点である。再発腫瘍の治療は困難になるため、治療後に再発したがん細胞の制御は口腔癌の予後を改善するために早急に克服すべき課題の一つとなっている。

癌組織において、がん細胞に分化し未分化性を維持する癌幹細胞の存在が明らかにされつつある。正常組織の幹細胞が特定の微小環境下で幹細胞性を維持するのと同様に、がん幹細胞にもがん微小環境というニッチが存在し、がんの治療抵抗性や転移などの悪性化、免疫寛容などに貢献していることがわかりつつある。申請者は最近の研究で、脳腫瘍や口腔がんにおいて放射線照射によって局所血管からの血管新生が抑制された際に、骨髄由来細胞、特にCD11bを発現する単球系細胞が腫瘍内へ誘導され、その後M2マクロファージに分化し脈管形成が起こることを見出した。悪性腫瘍において、再発の際に腫瘍血管の再生が不可欠である事が知られている。すなわち、放射線照射後に起こる腫瘍血管の再生は、既存の血管から起こるいわゆるangiogenesisではなく、腫瘍内に誘導される骨髄細胞中のある一群によって起こるvasculogenesisに起因する事が明らかにされた。

## 2. 研究の目的

本研究では口腔がんにおいてそのM2マクロファージが再発の予後マーカーとなりうるか、またどのようにがん細胞とかわっているのか、特にがん幹細胞による悪性化への関わりについて解析を行い、これらを標的とする新規治療戦略の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

次のテーマに沿って研究を進めていった。

M2マクロファージが口腔がんの化学放射線療法後の予後マーカーとなりうるか？

そこで以下の方法で実験を行った。

舌扁平上皮癌細胞株OSC-19移植マウスにおいて、骨髄、末梢血、照射後の腫瘍内に含まれるCD11b単球細胞についてFACS、免疫染色等で解析した。

次にSCC-VII細胞(マウス扁平上皮癌細胞)株を用いてBL6マウスの背部皮下に腫瘍を播種させ、その後放射線照射15Gyを施行した。腫瘍の縮小、およびその後の再増殖にかけて継続的に採血を行い、フローサイトメトリーを用いてCD11b、CD206、PD-1陽性細胞数を計測した。

さらに同一の口腔癌患者の治療前、中、後における末梢血中の上記マーカーの定量解析を同様にヒト抗CD11b、CD206、PD-1抗体を用いて行った。具体的には当科で化学放射線治療を行う口腔癌患者の末梢血液から単核球を分離し、蛍光標識したM2マクロファージの抗体と反応させフローサイトメトリーを用いて検出を行った。治療前後の変動が再発に関連するかどうか統計学的解析を行った。

#### 4．研究成果

OSC-19 担癌マウスでは骨髄，末梢血中の CD11b 単球細胞が増加していた．

SCC-VII 腫瘍は増殖速度が速く、また radio sensitivity がかなり低いため、再発モデルの作成が困難であった。

しかし化学放射線治療を行なっている口腔がん患者の血液より M2 マクロファージのマーカータンパクとして CD206, PD-1 抗体を用いてフローサイトメトリーを行ったが、抗体の感度の問題もあり発現量が少なく、治療前後での優位な変化は見られなかった。

患者組織標本では再発検体で CD11b 単球細胞の増加を認め、さらに再発症例では放射線治療期間中の末梢血単球細胞が有意に増加していた．放射線療法後の再発症例 9 症例と、非再発症例 13 症例において、治療期間中の単球細胞分画（単球 / 白血球 × 100 (%)）の変化を、治療期間を 4 つに区切り検討した。治療前、放射線治療前半（約 3 週 ~ 30 Gy）、放射線治療後半（約 3 週 30 ~ 60 Gy）の各期間における単球細胞分画の最大値を比較した結果、再発症例の方が非再発症例に比べて治療前半における単球細胞分画が有意に高い結果を得た。また、群内比較においては、再発症例において初診時から治療前半における単球細胞分画が有意に増加することが示された。

放射線治療前半での CD11b 単球細胞の増加と照射後再発との関与が示唆されることから、同細胞は放射線療法後の再発を予測するバイオマーカーとしての可能性を秘めていると思われた

#### 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）

〔学会発表〕（計 4 件）

Kioi M: Recent advances in molecular-targeted therapy for oral cancer.

Symposium, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, 2017, 3-4.

Kioi M: M2-Polarized Macrophages Contribute to Neovasculogenesis, Leading to Relapse of Oral Cancer Following Radiation. Symposium, 10th World Cancer Congress, Barcelona, Spain, 2017, 5.

來生 知. 口腔癌新規治療法の開発 微小環境ニッチを標的として . 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 指名報告, 愛媛, 2017, 4.

大久保牧子, 來生 知, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 吉井 遥. 光藤健司, 藤内 祝: 放射線療法後の微小環境ニッチにおける骨髄細胞の役割. 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 愛媛, 2017, 4.

大久保牧子, 來生 知, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 吉井 遥. 光藤健司, 藤内 祝: 口腔癌再発に関わる骨髄 CD11b 陽性単球細胞とバイオマーカーとしての検討. 第 41 回日本頭頸部癌学会, 京都, 2017, 6.

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

#### 6．研究組織

(1)研究代表者

來生 知 (KIOI, Mitomu) 横浜市立大学・医学部・准教授 研究者番号：30545059

(2)研究分担者

藤内 祝 (TOHNAI, Iwai) 横浜市立大学・医学研究科・教授 研究者番号：50172127

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki) 横浜市立大学・医学研究科・教授 研究者番号：70292555

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者 該当なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kioi M
2. 発表標題 Recent advances in molecular-targeted therapy for oral cancer.
3. 学会等名 Symposium, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kioi M
2. 発表標題 M2-Polarized Macrophages Contribute to Neovasculogenesis, Leading to Relapse of Oral Cancer Following Radiation.
3. 学会等名 Symposium, 10th World Cancer Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 來生 知
2. 発表標題 口腔癌新規治療法の開発 微小環境ニッチを標的として .
3. 学会等名 第71 回日本口腔科学会学術集会, 指名報告, (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大久保牧子, 來生 知, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 吉井 遥, 光藤健司, 藤内 祝
2. 発表標題 放射線療法後の微小環境ニッチにおける骨髄細胞の役割 .
3. 学会等名 第71 回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大久保牧子, 來生 知, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 吉井 遥, 光藤健司, 藤内 祝
2. 発表標題 口腔癌再発に関わる骨髄CD11b 陽性単球細胞とバイオマーカーとしての検討.
3. 学会等名 第41 回日本頭頸部癌学会,
4. 発表年 2017年

〔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
研究分担者	谷口 英樹  (Taniguchi Hideki)  (70292555)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	
研究分担者	藤内 祝  (Tonai Iwai)  (50172127)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	