

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11854

研究課題名(和文) 口腔がん微小環境内のがん幹細胞と腫瘍関連マクロファージの機能解析と新たな治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategies and functional analysis of cancer stem cells and tumor-associated macrophages in the oral cancer microenvironment

研究代表者

里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：70276921

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)：colony stimulating factor-1(CSF-1)/CSF-1Rシグナルを抑制するCSF-1R阻害剤を用いて腫瘍関連マクロファージ(TAM)からがん幹細胞(CSC)へ間接的に抑制する効果と、もう一方のPI3K/Akt/mTOR経路を直接阻害するmTOR阻害剤によるCSCへの抑制効果の双方から、CSCを標的にした新たな口腔癌治療法を検討した。その結果、この併用療法は、再発、転移や治療抵抗性を制御する可能性があり、口腔癌治療全体に与える影響は極めて大きいと思われた。今後、口腔癌に対する従来からの殺細胞抗がん剤に併用する新たな治療法になりう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

局所再発能や転移能が高く治療抵抗性を示す口腔癌に対して、がん幹細胞(CSC)におけるPI3K/Akt/mTOR経路と腫瘍関連マクロファージ(TAM)におけるCSF-1/CSF-1Rシグナル経路からアプローチする治療を検討した報告はない。本研究結果は、口腔癌マウスモデルにおいてCSF-1R阻害剤投与にてTAM活性が抑制され、間接的にCSC活性が抑制され、さらにmTOR阻害剤投与にてCSCのPI3K/Akt/mTOR経路を直接阻害したと考えられた。CSCを標的とした口腔癌の新たな治療法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of the new treatment of oral cancer targeting cancer stem cells (CSCs), focusing on both the indirect inhibitory effect of tumor associated macrophage (TAM) to CSCs using the colony stimulating factor-1 receptor (CSF-1R) inhibitors, which suppress CSF-1/CSF-1R signaling, and the inhibitory effect of mTOR inhibitors, which directly inhibit the PI3K/Akt/mTOR pathway. The results suggest that this combination therapy using CSF-1R inhibitors and mTOR inhibitors has the potential to control recurrence, metastasis and resistance to treatment, and its impact on overall oral cancer treatment appears to be very significant. We aimed to link our study to the development of a new treatment for oral cancer in combination with conventional cell-killing anticancer agents.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 腫瘍関連マクロファージ がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma: OSCC)における再発・転移のメカニズムは未だ不明な点が多い。がん幹細胞(Cancer stem cell: CSC)は少数存在するだけで元の腫瘍組織を再現する能力をもち、さらに抗癌剤や放射線への抵抗性を有しているため、再発・転移の最大原因と考えられている。CSCが発見される以前の癌治療は、癌細胞の増殖を抑制することを目的として開発されてきたため、静止期に維持されているCSCには効果を発揮できない。従って、CSCを標的とした治療法を確立することが求められている。CSCを標的とした治療はCSCの治療抵抗性を破綻し、癌根治に直結する治療になる筈である。CSCが存在する腫瘍微小環境内で癌細胞の産生した colony stimulating factor-1(CSF-1)などにより、単球がM2マクロファージに分化し、癌細胞の遊走・増殖などの悪性進展に深く関与する腫瘍関連マクロファージ(Tumor-associated macrophage: TAM)に変化するとされている。CSF-1RはTAM表面にCD115として発現しており、CSF-1をリガンドすることでTAMが活性化される。近年、CSCがCSF-1を産生し、ニッチ内でTAMを高発現させるとともに、マクロファージ内のSTAT3とsonic hedgehog経路の協調作用によりTAMが活性化されることでIL-6およびMFG-E8が発現し、これらがCSCを活性化することで、腫瘍の浸潤や転移を促進するだけでなく、治療抵抗性にも関与していることが報告された。(Jinushi et al. Am J Cancer Res, 2012) TAMは、NF- κ BやIL-1、TNF- α などを発現し、腫瘍のVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)の発現をup-regulateし、腫瘍血管、さらにリンパ管を新生すると言われ、TAMの過剰発現は腫瘍微小環境の形成を促進し、予後不良である。

そこで本研究は、CSCとCSCを静止期から増殖期に移行させる重要な鍵を握るTAMとの相互作用を解析し、局所再発能や転移能が高く治療抵抗性を示す口腔癌に対して、CSCにおけるPI3K/Akt/mTOR経路とTAMにおけるCSF-1/CSF-1Rシグナル活性経路の双方からアプローチする新たな治療法を検討することとした。

2. 研究の目的

口腔癌の微小環境内におけるCSCとCSCを静止期から増殖期に移行させる重要な鍵を握るTAMの相互作用およびTAMと癌細胞の血管新生や破骨細胞分化・骨吸収の相互作用を解析する。TAM表面に、CSF-1RはCD115として発現しており、CSF-1がリガンドすることでTAMが活性化することが知られており、TAM活性の制御は、CSF-1/CSF-1 receptor(CSF-1R)シグナルをブロックすることである。従ってCSF-1R阻害剤は、TAM活性をdown-regulateさせ、腫瘍血管の新生を抑制し、癌細胞の増殖・浸潤を抑制する。本研究では、CSF-1/CSF-1RシグナルをCSF-1R阻害剤を用いて遮断し、TAM活性を抑制(hedgehog経路阻害)することで、リンパ管新生や癌浸潤が抑制され、CSC activationが抑制される効果について検討し、また一方で、CSCのPI3K/Akt/mTOR経路を直接阻害するmTOR阻害剤を使用して、CSCのapoptosisを誘導する腫瘍増殖抑制効果についても*in vivo*の実験系で病理学的解析および遺伝子発現解析を行う。CSCにおけるPI3K/Akt/mTOR経路とTAMにおけるCSF-1/CSF-1Rシグナル活性経路の双方からアプローチし、局所再発能や転移能が高く治療抵抗性を示す口腔癌の新たな治療法の開発を目指した研究である。

3. 研究の方法

(1) マウス扁平上皮癌におけるCD44発現の検討(*in vitro*)

マウスSCCVII細胞株を用いて、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)に10% fetal bovine serum (FBS)とペニシリン G 100U/mlとストレプトマイシン 100 μ g/mlを加えた培地を用いて、37°C 5% CO₂の条件下で培養した。口腔癌のがん幹細胞のマーカーであるCD44の発現について、酵素処理して細胞解離剤で単一細胞化し、フローサイトメーター(FACS)を用いて検討し、その後、SCCVII細胞を培養下に酵素処理して細胞解離剤で単一細胞化し、FACSを用いてCD44(+)細胞とCD44(-)細胞の分取を行った(図1)。

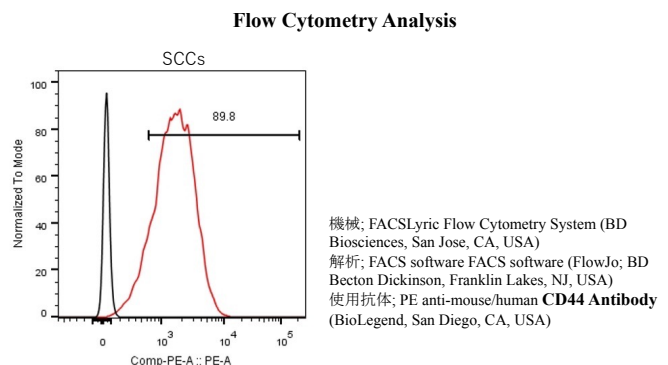


図1: マウスSCCVII細胞のFACS

(2) CD44 陽性 SCCVII細胞移植の担癌モデルの作製と薬物投与(*in vivo*)

体重 20 g 前後の雄性C3H/HeN マウスに、CD44陽性SCC VII細胞 (1×10⁷ cells/ml) をマウスの左側咬筋内に0.1ml 注入移植した (図2)。

実験動物の取り扱いには日本歯科大学動物実験指針に従った。CSCに対する治療として、CSF-1/CSF-1Rシグナルをターゲットに、CSF-1R阻害剤(PLX3397 : PLX)を用いてTAM活性を抑制した効果とPI3K/Akt/mTOR経路をmTOR阻害剤(Temsirolimus : Tem)で直接抑制した効果、さらに、mTOR阻害剤とCSF-1R阻害剤の併用効果について検討を行った。

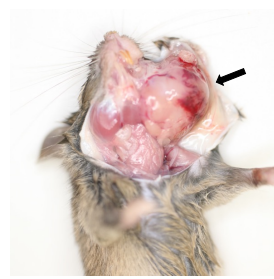


図2：マウスCD44陽性SCC VII細胞移植
矢印：移植腫瘍

・ mTOR 阻害剤、CSF-1R 阻害剤の投与

Tem 10mg/kg は腫瘍移植後 2 日目から 12 日間腹腔内投与し、PLX3397 は 20mg/kg に調整した 0.1ml 懸濁液を腫瘍移植後 2 日目から 12 日間経口投与した。Control 群は生理食塩水を腫瘍移植後 2 日目から 12 日間投与した。実験群は、control 群(n=10)、Tem 投与群(n=10)、PLX 投与群(n=10)、Tem+PLX 投与群(n=10) の 4 群に分類して、腫瘍増殖抑制効果、CSC activation 抑制効果について比較検討を行った。

(3) 腫瘍増殖抑制効果の評価

経時的な体重変化と腫瘍体積を算出した。腫瘍体積は (長径) × (短径)² × 0.5 で求めた。

(4) 病理組織学的検討と real-time PCR による mRNA の発現解析

通常法の H-E 染色を行った。また、抗マウス mTOR, RANKL, CSF-1R, CD163(TAM, M2 マクロファージ)モノクローナル抗体と LSAB kit (DAKO 社製) を用いて免疫組織化学的染色を行った。CD163 陽性率を解析した。その後、腫瘍微小環境内における RANKL, CSF-1R, VEGFR, mTOR, GAPDH の mRNA の発現量を real-time PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) マウス扁平上皮癌のCD44発現の評価 (*in vitro*)

口腔癌のがん幹細胞のマーカーであるCD44の発現について、酵素処理して細胞解離剤で単一細胞化し、FACSを用いてCD44(+)細胞を分取した。

(2) CD44陽性SCC VII細胞移植の担癌マウスモデルの確立と薬剤投与効果 (*in vivo*)

CD44陽性SCC VII細胞移植の口腔癌浸潤モデルを作製し、4群に分け薬剤投与実験を行った。

● 体重変化

体重変化に関して、各実験群間において有意差は認められなかった (図3)。

● 腫瘍増殖抑制効果

腫瘍体積は、移植12日目の平均でControl群 4022.26 mm³、Tem投与群 2813.73 mm³、PLX群 2480.55 mm³、Tem+PLX投与群 1291.72 mm³であった。

Tem+PLX投与群が、他の群に比較して腫瘍増殖の抑制効果が認められた (図4)。

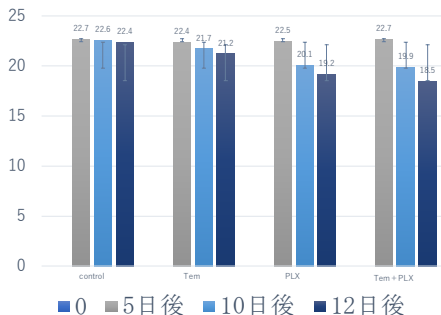


図3：各群の体重変化

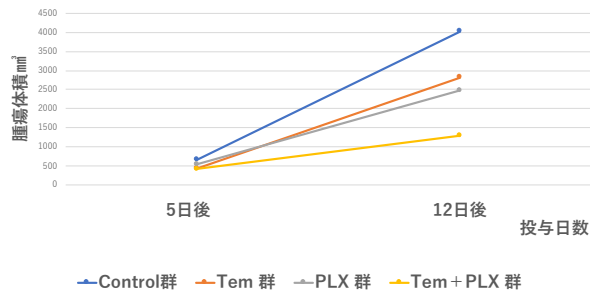


図4：各群の腫瘍体積

(3) TAN の局在と RANKL, CSF-1R, VEGFR, mTOR の mRNA 発現量の比較

病理組織学的所見では、Control群で顎骨内に腫瘍細胞が索状に浸潤し、鋸歯状の骨吸収像を示していた (図5)。また、免疫組織化学的染色によるmTOR, RANKL, CSF-1R, CD163の陽

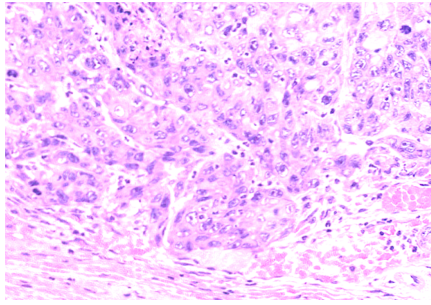


図 5 : H-E染色像

性率は、Control群において、20%、60%、60%、30%であった。CD163の陽性率は、Control群で35%、Tem投与群で30%、PLX投与群で20%、Tem+PLX投与群で20%であった（図6）（図7）。

RANKLのmRNAの発現量は、Control群に比べてTem投与群、PLX投与群、Tem+PLX投与群で著明に減少した。CSF-1RのmRNAの発現量は、Control群とTem投与群に比べて、PLX投与群、Tem+PLX投与群で著明に減少した。

CSF-1R阻害剤投与で、RANKLの発現量は著明に減少した。VEGFRのmRNAの発現量は、Control群とPLX投与群に比べて、mTOR阻害剤を投与したTem投与群、Tem+PLX投与群で減少した。VEGFRのmRNA量は、mTOR阻害剤の投与で減少した（図8）。

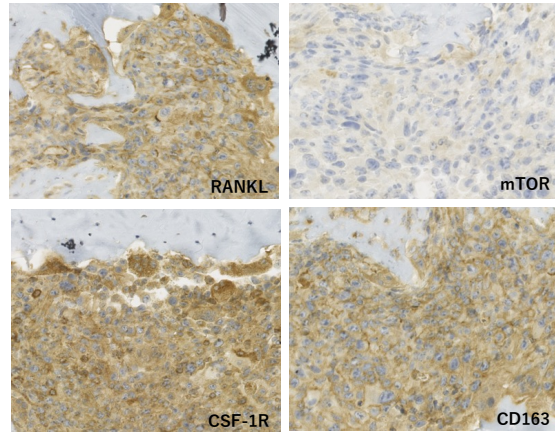


図 6 : 免疫組織化学的染色像 (×200 original magnification)

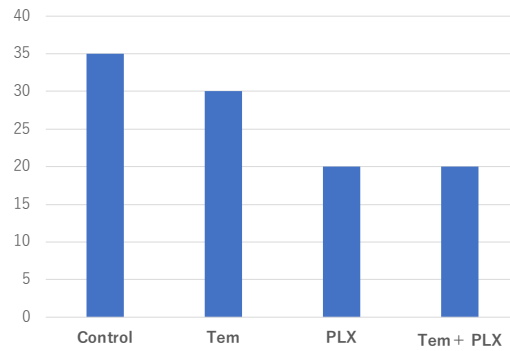


図 7 : 各群のCD163陽性率

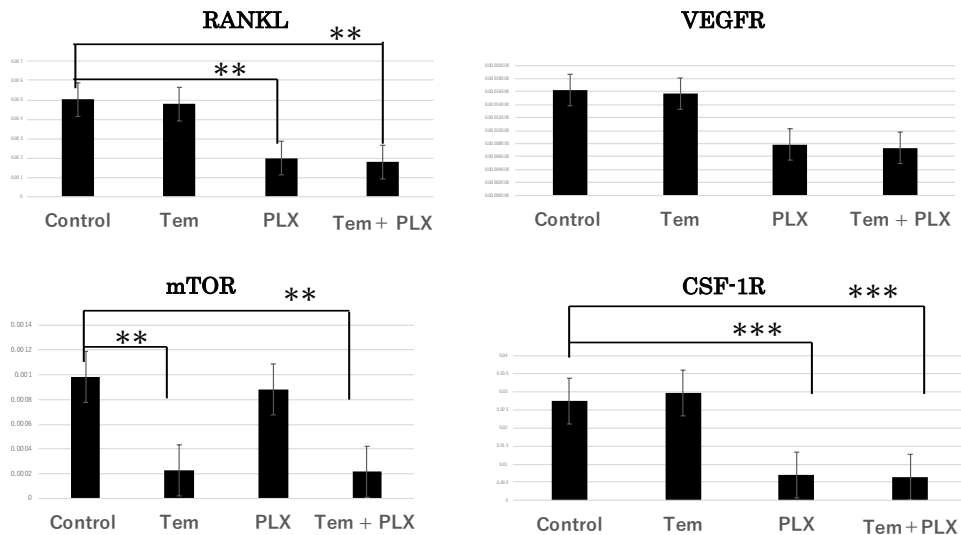


図 8 : 各群のRANKL, VEGFR, mTOR, CSF-1RのmRNA発現量

* ; 群間内に統計学的有意差がある、 $p < 0.05$

以上の結果から、CSF-1R阻害剤の投与は、腫瘍増殖の抑制には至らないものの、骨破壊を抑制し、破骨細胞関連サイトカインであるRANKLの発現量を著明に減少させることが判明した。また、CSF-1R阻害剤の投与は、CD163陽性細胞（TAM, M2マクロファージ）数も減少したことから、CSF-1R阻害剤を用いることで、TAMの活性が阻害されることでCSCの活性化も抑制され、また、マクロファージから成熟破骨細胞への分化が制御されたと考えられた。CSF-1R阻害剤とmTOR阻害剤の併用投与は、口腔癌の局所浸潤および顎骨浸潤を抑制したことで、今後、口腔癌に対する従来からの殺細胞抗がん剤に併用する新たな治療法になりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 多田昌功、里見貴史、藤居泰行、古賀陽子、近津大地	4. 巻 78(2)
2. 論文標題 口腔癌の顎骨浸潤に対するm-TOR阻害薬とCSF-1R阻害薬の抑制効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東医大誌	6. 最初と最後の頁 189-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川温、河野通秀、菅野勇樹、里見貴史、近津大地
2. 発表標題 当科における再発・転移口腔がんに対するペンプロリズマブの使用経験
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪俣徹、田中惇平、里見貴史、辺見卓男、柳下寿郎、黒崎弘正
2. 発表標題 ニボルマブを使用した口腔癌症例の臨床的検討
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 里見貴史
2. 発表標題 口腔がん~最新の治療法と薬物療法~
3. 学会等名 令和3年度歯科医師・歯科医療従事者研修会 東京都立心身障害者口腔保健センター（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 里見貴史
2. 発表標題 知っていますか？ 口の中のがんのこと
3. 学会等名 東京都歯科医師会 都民向けフォーラム2023「口腔がんフォーラム」（招待講演）
4. 発表年 2023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	河野 通秀 (Kohno Michihide) (00421066)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	古賀 陽子 (Koga Yoko) (10392408)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	近津 大地 (Chikazu Daichi) (30343122)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	渡辺 正人 (Watanabe Masato) (40349460)	東京医科大学・医学部・兼任准教授 (32645)	
研究分担者	長谷川 温 (Hasegawa On) (50424619)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	

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 分 担 者	長尾 俊孝 (Nagao Toshi taka) (90276709)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

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