

令和元年6月2日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17247

研究課題名(和文) マクロファージを標的とした口腔前癌病変の新規治療法・病理診断法の開発

研究課題名(英文) The development of novel treatment and histopathological diagnosis methods for oral precancerous lesions targeting macrophages

研究代表者

重岡 学 (Shigeoka, Manabu)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：20778716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮の発癌段階にマクロファージが関与する可能性を検討するため、本研究では舌白板症の臨床検体を用いた免疫組織化学やヒト口腔ケラチノサイトおよびヒト単球系白血病細胞株を用いた培養実験による検討を行った。口腔上皮内病変ではCD163を発現するマクロファージ由来の液性因子により、上皮細胞のIL-10の発現が誘導され、腫瘍免疫抑制を介して発癌に関与する可能性が示された。さらには、口腔扁平上皮の発癌過程においてCD163陽性マクロファージの局在が変化することも明らかにし、この組織形態学的変化は日常の生検診断に応用できる可能性も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで口腔の発癌段階におけるマクロファージの役割に関する報告は少数であったが、本研究によりCD163を発現するマクロファージが腫瘍免疫回避を介し生物学的なプロモーターとして関与する可能性が示された。また、発癌過程においてCD163陽性マクロファージの局在が変化することを明らかにし、本結果が日常の病理診断(術前局所生検)に応用できる可能性も見出した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of macrophages in oral carcinogenesis, we conducted immunohistochemical analyses with tongue leukoplakia samples and in vitro assays with human oral keratinocytes and THP-1 human monocytic leukemia cells. Our results indicated that IL-10 induced by CD163-positive macrophages may contribute to the development of tongue leukoplakia via immunosuppression. Furthermore, it is showed that the distribution of CD163-positive macrophages differs during oral carcinogenesis. It was identified the evaluation of the distribution of CD163-positive macrophages is potentially useful for preoperative biopsy diagnosis of tongue leukoplakia.

研究分野：口腔前癌病変

キーワード：口腔前癌病変 発癌 白板症 口腔扁平上皮癌 早期発見 病理診断 マクロファージ

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

1. 研究開始当初の背景

- (1) 高齢人口の増加に伴い発症率の増加する口腔扁平上皮癌は罹患率は低いものの死亡率は高く、予防・早期発見が重要課題である。しかしながら、発癌初期段階である口腔前癌病変や口腔上皮内癌は視診や触診のみで診断することは容易ではなく、組織学的にも多種多様な像を呈し病理形態学的診断も困難である。
- (2) 常に外的刺激にさらされ、軽度の炎症性修飾の加わる口腔扁平上皮は、食道や子宮頸部とは異なり、従来の dysplasia-carcinoma sequence の考え方は適応できないとされている。
- (3) 近年、癌微小環境におけるマクロファージ (腫瘍関連マクロファージ; TAM) を標的とした治療法の開発が注目され、TAM の特異的マーカーである CD163、CD204 や CD206 も登場し、様々な癌において TAM の重要性が報告されている。
- (4) 口腔癌においては、腫瘍免疫回避に TAM の関与を示唆する知見が集積されつつあるが、口腔前癌病変の悪性化過程におけるマクロファージの役割はいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究計画ではマクロファージによる口腔前癌病変の悪性化における分子病理メカニズムを解明するとともに、口腔前癌病変の新規治療法や病理組織診断法の開発に役立つ知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 臨床検体を用いた免疫組織化学により、口腔前癌病変の悪性化におけるマクロファージ浸潤の臨床的意義を把握する：外科的に切除された正常口腔粘膜上皮を含む口腔前癌病変 (舌白板症) のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織切片に対し、マクロファージ全般を認識する抗ヒト CD68 抗体、および TAM を認識する抗ヒト CD163 抗体、抗ヒト CD204 抗体、抗ヒト CD206 抗体を用いた免疫組織化学を施行し、口腔前癌病変の悪性化に關与するマクロファージマーカーを把握する。
- 2) マクロファージ様細胞とヒト口腔ケラチノサイトを用いた培養実験により口腔上皮細胞の腫瘍性格の獲得について検証する：ヒト口腔由来ケラチノサイトとして、HOK (Human Oral Keratinocytes) を使用する。ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を TPA 処理にて分化誘導したマクロファージの培養上清を調整する。HOK にマクロファージ様細胞培養上清を 48 時間作用させ、HOK の腫瘍免疫抑制因子の発現誘導について検討する。
- 3) 1)2) で得られた知見について臨床検体を用いた検証を行う：上記で見出したマクロファージマーカーと腫瘍免疫抑制因子の発現について確認する。
- 4) マクロファージを標的とする口腔前癌病変の新規病理診断法の探索：舌白板症に対し生検および連続的に切除術が施行された 26 例を対象とする。生検にて上皮内病変と診断されたが、術材標本にて浸潤癌と診断された症例 (診断不一致群) と術材標本でも上皮内腫瘍と診断された症例 (診断一致群) について臨床病理学的因子および生検標本におけるマクロファージ浸潤について比較する。

4. 研究成果

- 1) 臨床検体を用いた免疫組織化学による口腔前癌病変の悪性化におけるマクロファージ浸潤の臨床的意義の把握：口腔前癌病変である舌白板症の病理組織標本を用いて TAM マーカー (CD163、CD204 および CD206) の免疫組織化学により病変上皮直下のマクロファージ浸潤数を計測し、口腔扁平上皮の悪性度に関与するとされる既知の因子との関連を検討したところ、高異型度の症例では上皮直下に CD163 陽性マクロファージの密な浸潤を認めた。また、Ki-67 の異常発現や cytokeratin 13 の発現減弱を伴う症例においても有意な浸潤数の増加を認めた。
- 2) マクロファージ様細胞とヒト口腔ケラチノサイトを用いた培養実験による口腔上皮細胞の腫瘍性格の獲得についての検証：CD163 陽性 THP-1 の上清で培養したヒト口腔ケラチノサイトにおいては腫瘍免疫抑制因子のうち、programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1)、programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2) および interleukin (IL)-10 の発現が誘導された。
- 3) 臨床検体を用いた 1)2) で得られた知見の検証：舌白板症組織を用いた免疫組織化学で

は、培養実験においてマクロファージ様細胞上清にて培養した HOK において誘導された免疫抑制因子のうち、IL-10 の高発現症例は低発現症例に比較し、CD163 陽性マクロファージおよび FOXP3 陽性の制御性 T 細胞の浸潤数が多かった。

- 4) マクロファージを標的とする口腔前癌病変の新規病理診断法の探索：舌白板症に対し生検および連続的に切除術が施行された 26 例を対象に、生検にて上皮内病変と診断されたが、術材標本にて浸潤癌と診断された症例（診断不一致群）は 9 例、術材標本でも上皮内腫瘍と診断された症例（診断一致群）は 17 例含まれていた。生検の施行から連続的切除術が行われるまでの平均期間は約 1.2 ヶ月であった。2 群間における臨床所見を比較したところ、診断不一致群は診断一致群に比較し、不均一型および紅斑混在型の症例が有意に多かった。病理組織学的所見の比較検討では、生検標本において上皮異型度や Ki-67、cytokeratin 13 および cytokeratin 17 の発現態度に有意な差は認めなかった。これに対し抗ヒト CD163 抗体を用いた免疫組織学では、興味深いことに、診断不一致群では多数の CD163 陽性マクロファージが病変部の上皮内に浸潤していた。一方で、診断一致群では上皮内への CD163 陽性マクロファージの浸潤はほとんどみられなかった。間質における CD163 陽性マクロファージでは 2 群間では有意な差は認めなかった。連続的切除により作製された病理標本における CD163 抗体を用いた免疫組織学検証を施行すると、診断一致群では上皮内に CD163 はほとんど見い出せず、上皮下のみ分布していた。一方で診断不一致群では上皮下のみならず病変上皮内にも多数の CD163 陽性マクロファージが浸潤しており、生検標本で得られた結果に矛盾しない結果となった。最後に、特異度の検証を目的に、日常臨床において口腔白板症と鑑別が問題となる口腔カンジダ症、口腔扁平苔癬、アフタ性口内炎に代表される炎症性疾患についても生検標本に対し CD163 抗体を用いた免疫組織学検証を施行したところ、いずれの疾患においても上皮内に陽性を示す細胞の浸潤は確認されなかった。

以上の結果より、口腔扁平上皮の発癌過程において CD163 を発現するマクロファージが腫瘍免疫回避を介して生物学的なプロモーターとして関与する可能性を示唆するものと考えられた。また、発癌過程において CD163 陽性マクロファージの局在が変化することを明らかにし、本結果が日常の生検診断に応用できる可能性も見出した。

これらの成果については複数の学会で発表し、現在 2 編の論文として投稿中または投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Kodaira H, Koma YI, Hosono M, Higashino N, Suemune K, Nishio M, Shigeoka M, Yokozaki H. ANXA10 induction by interaction with tumor-associated macrophages promotes the growth of esophageal squamous cell carcinoma. doi: 10.1111/pin.12771 Pathology International. 査読有, 69 巻, 2019, 135-147,

Higashino N, Koma YI, Hosono M, Takase N, Okamoto M, Kodaira H, Nishio M, Shigeoka M, Kakeji Y, Yokozaki H. Fibroblast activation protein-positive fibroblasts promote tumor progression through secretion of CCL2 and interleukin-6 in esophageal squamous cell carcinoma. Laboratory Investigation. 査読有, in press, 2019. doi: 10.1038/s41374-018-0185-6

Yokozaki H, Koma YI, Shigeoka M, Nishio M. Cancer as a tissue: The significance of cancer-stromal interactions in the development, morphogenesis and progression of human upper digestive tract cancer. Pathology International. 査読有 68 巻, 2018, 334-352. doi: 10.1111/pin.12674.

Hosono M, Koma YI, Takase N, Urakawa N, Higashino N, Suemune K, Kodaira H, Nishio M, Shigeoka M, Kakeji Y, Yokozaki. CXCL8 derived from tumor-associated macrophages and esophageal squamous cell carcinomas contributes to tumor progression by promoting migration and invasion of cancer cells. Oncotarget. 査読有, 8 巻, 2017, 106071-106088. doi: 10.18632/oncotarget.22526.

粕 雄一郎, 西尾 真理, 重岡 学, 横崎 宏. 消化管の慢性炎症 / 食道扁平上皮癌の進展や発がん初期段階におけるマクロファージの解析, 別冊 BIO Clinica. 査読有, 6 巻, 2017, 123-127.

〔学会発表〕(計 44 件)

重岡 学, CD163 陽性マクロファージに着目した舌白板症の病理組織学的評価. 第 108 回日本病理学会学術総会, 2019 年 5 月 9 日, 東京国際フォーラム (東京都)

重岡 学, 口腔扁平上皮癌の発癌初期段階におけるマクロファージ浸潤の意義. 第 107 回日本病理学会学術総会, 2018 年 6 月 21 日, ロイトン札幌 (札幌市)

重岡 学, 口腔癌の発癌初期段階におけるマクロファージの役割. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月 27 日, 大阪国際会議場(大阪市)

重岡 学, 食道扁平上皮癌微小環境における Cyr61 の重要性, 第 6 回神緑会 Young Investigate Award 発表会, 2018 年 10 月 27 日, 神戸大学医学部神緑会館 (神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

横崎 宏, 狛 雄一郎, 重岡 学, 狛 雄一郎, 西尾 真理. 金芳堂(株), 伊藤 智雄 編 免疫染色究極マニュアル 診断編 10 大腸, 2019, 147-156 頁.

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 重岡 学

ローマ字氏名 : SHIGEOKA Manabu

所属研究機関名 : 神戸大学

部局名 : 大学院医学研究科

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 20778716

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

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。