

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09741

研究課題名(和文) ミエロイド系細胞を介した口腔癌の浸潤促進機序の解明と新規標的化治療の開発

研究課題名(英文) Novel strategy targeting myeloid cells-mediated invasion of oral cancer

研究代表者

野口 誠 (Noguchi, Makoto)

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：50208328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌担癌マウスを用いた解析によって、腫瘍局所におけるPDGFR 発現陽性の細胞が著しく増加していることが明らかとなり、それらの細胞はCD11bおよびGr-1の発現が陽性であり、MDSCとの関連が強く示唆される結果であった。さらに口腔癌担癌マウスの腫瘍組織から分離したMDSCは、他の臓器から分離したMDSCと比べて有意に破骨細胞への分化能が増強していることも明らかとなった。以上の結果より、口腔癌の局所進展、特に骨浸潤過程においては、腫瘍局所で増加するMDSCからの癌関連線維芽細胞を介した浸潤過程、さらにMDSCからの破骨細胞分化による顎骨浸潤促進の機序の可能性を示唆する結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤を誘導する破骨細胞も、MDSC同様にCD11b陽性の骨髄系由来の細胞である。また、腫瘍の浸潤には、腫瘍組織内の線維芽細胞である、いわゆる癌関連線維芽細胞cancer associated fibroblast (以下CAF) が重要な役割を果たすことも示唆されている。腫瘍浸潤過程におけるMDSCの果たす役割を解明することを目的とした本研究は、極めて新規性の高い研究と考えられる。以上、本研究により、口腔扁平上皮癌の浸潤局所における免疫応答からみたCAF発生、破骨細胞分化機序の一端が解明されれば、これを標的とした標的化治療の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish novel strategy to target myeloid derived suppressor cell (MDSC)-mediated invasion of oral cancer. Osteoclast differentiation is crucial for bone invasion of oral cancer and one of the cell surface marker for osteoclast is CD11b which is also the marker of MDSC. Therefore, the similarity of osteoclast and MDSC have been suggested. Moreover, the cancer-associated fibroblasts are also important for tumor invasion in various cell types of cancer. We observed that PDGFR-alpha positive cells were accumulated in oral cancer-bearing mice and these cells also expressed CD11b and Gr-1, suggesting that association between CAF and MDSC. Moreover, we purified these CD11b+, Gr-1+ cells from spleen, peripheral blood, and tumor tissue, and evaluated the capacity for osteoclast differentiation. CD11b+, Gr-1+ cells from tumor tissue exhibited significantly increased capacity for osteoclast differentiation compared to those from other sites.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 局所浸潤過程 癌関連線維芽細胞 破骨細胞分化 免疫抑制性細胞

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は浸潤性が強く、また発生部位の解剖学的特徴から比較的早期に周囲組織に進展するものが多い。そのため、癌の根治性から、口腔機能が大きく損なわれることもしばしばで、患者のQOLの面から問題となり、口腔の機能温存に資する新規治療法が求められる。口腔粘膜や歯肉歯槽粘膜に発生する扁平上皮癌は、発生の早期から粘膜下組織から骨組織を浸潤、破壊し、他部位の上皮性悪性腫瘍にはみられない極めて特異な浸潤性増殖をする性質を有する。癌細胞の浸潤様式も様々であり、特に、びまん性の浸潤形態をとる腫瘍は悪性度が高く、治療の予後および生命予後と密接に関連することが知られている。また、歯肉歯槽粘膜癌における顎骨浸潤の様態も、顎骨を虫食い状に吸収し浸潤する腫瘍の予後は極めて不良であり、口腔扁平上皮癌の浸潤の制御機構の解明は、治療成績や予後の向上の観点から極めて重要な課題である。顎骨の浸潤過程においては、破骨細胞が重要な役割を果たすことが知られている。この破骨細胞分化の制御においては、Th1、Th2、Th17、制御性T細胞(以下、Treg)などCD4陽性ヘルパー型T細胞の関与が示唆され、特にTh1、Th17は破骨細胞分化を促進し、逆にTh2、Tregは破骨細胞分化を抑制することが示唆されている。しかしながら、これらの報告はリウマチ性疾患など炎症反応系での研究成果であり、上皮性悪性腫瘍浸潤局所における癌の浸潤と免疫反応系に関する研究結果の報告はない。また、腫瘍局所においては、強い免疫抑制機能を有するミエロイド系抑制性細胞(myeloid derived suppressor cell、以下MDSC)が腫瘍局所の免疫反応系において極めて重要な役割を果たすことが知られている。しかし、このMDSCを含むミエロイド系細胞を介した癌の骨浸潤については未だ不明であり、この機序の解明は、顎骨浸潤を来す口腔扁平上皮癌の新たな標的化治療法の開発に著しく寄与すると考える。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌の浸潤機序の一端を、ミエロイド系細胞を中心とした免疫応答の相互作用に着目して解明を試みるものである。口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤を誘導する破骨細胞も、MDSC同様にCD11b陽性の骨髄系由来の細胞であるが、それぞれの分化過程における関連性については関連性が示唆されているものの未だに不明なままである。また、腫瘍の浸潤には、腫瘍組織内の線維芽細胞である、いわゆる癌関連線維芽細胞 cancer associated

fibroblast (以下 CAF) が重要な役割を果たすことも示唆されている。しかし、その細胞の形質や機能については不明な点が多く、またその発生機序についても未だに不明なままである。腫瘍局所で著しく集簇するミエロイド系抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cell、以下 MDSC) の機能については、未だに不明な点が多く、腫瘍浸潤過程における MDSC の果たす役割を解明することを目的とした本研究は、極めて新規性の高い研究と考えられる。以上、本研究により、口腔扁平上皮癌の浸潤局所における免疫応答からみた CAF 発生、破骨細胞分化機序の一端が解明されれば、これを標的とした標的化治療の開発に繋がることが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究は、C3H/HeN マウス由来の口腔扁平上皮癌 NR-S1K と同マウスを用いたシージェニックマウス口腔癌モデルを用い、担癌マウスの腫瘍組織、脾臓、末梢血より MDSC をセルソーティングにより分離し、① MDSC と CAF 発生、破骨細胞分化の機序について免疫学的解析により検証する。MDSC、CAF、破骨細胞の標的化と抗腫瘍効果について治療実験により検証する。

NR-S1K 担癌マウスの腫瘍組織より MDSC をセルソーティングで回収し、NR-S1K とトランスウェルチャンバーを使用して共培養し、形態的变化の観察、形質変化として、CAF のマーカーとされる FAP、SMA と、今回、特に注目している血小板由来増殖因子受容体の PDGFR (CD140) の発現をフローサイトメトリーで解析する。

MDSC からの破骨細胞分化の検討として、NR-S1K 担癌マウスの腫瘍組織より MDSC を回収し、GM-CSF、IL-4 添加の破骨細胞分化培地で培養し、破骨細胞への分化の有無を TRACP-5b アッセイで検討する。

### 4. 研究成果

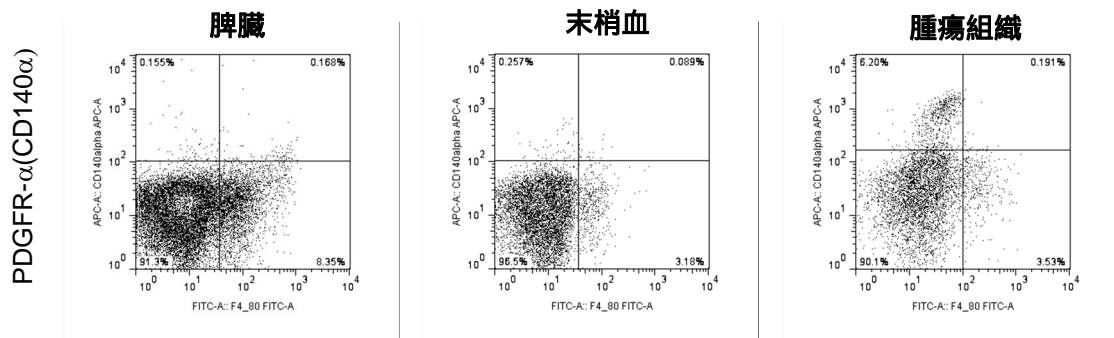
その結果、口腔癌担癌マウスにおける脾臓、末梢血、腫瘍組織の各部位における PDGFR 陽性細胞の出現頻度について解析したところ、脾臓、末梢血に比べて、腫瘍組織において PDGFR 陽性細胞が有意に高い頻度で出現することが明らかとなった。さらに PDGFR 陽性細胞は MDSC のマーカーである CD11b、Gr-1 とともに陽性であり、MDSC との関連性が示唆された。

また、PDGFR 陽性細胞のその他の表面抗原に発現について解析したところ、間葉系マーカーである CD90 や CD105 は陰性で、造血幹細胞マーカーである CD45 や CD34 の発現は陰性、さらにミ

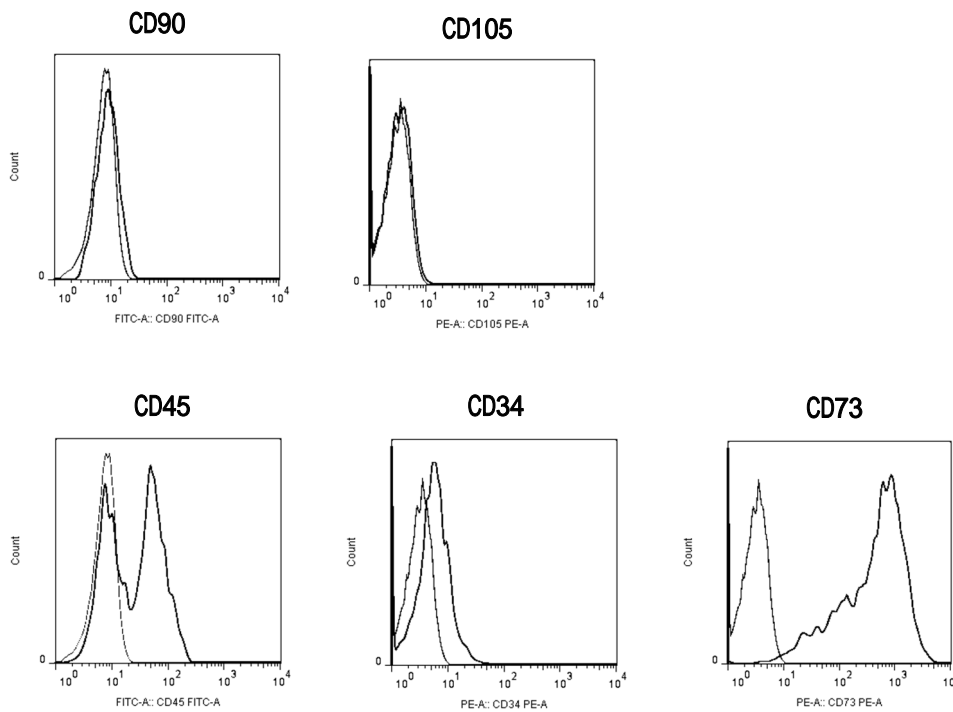
エロイド系マーカーである CD73 が高い発現レベルであることが明らかとなった。

マウス口腔癌モデルの各部位より磁器分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞の破骨細胞への分化誘導について解析したところ、腫瘍から分離した CD11b、Gr-1 陽性細胞が、その他の部位より分離したものに比べて著しく破骨細胞への分化能が高いことが明らかとなった。

**【口腔癌担癌マウスの各部位における PDGFR 陽性細胞の割合】**



**【PDGFR 陽性細胞における各種表面抗原の発現】**



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Noguchi M
2. 発表標題 A new trend in cancer therapy: Immunotherapy for advancer oral cancer
3. 学会等名 2nd International Conference on Biophysical Technology in Dentistry(ICoBTD2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石戸克尚, 富原 圭, 平識 亘, 櫻井航太郎, 野口 誠
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の破骨細胞分化との関連
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立浪秀剛, 西井 直人, 加島 義久, 富原 圭, 野口 誠, 東 みゆき
2. 発表標題 腫瘍に集積するミエロイド系細胞の違いはPD-L1阻害剤との併用免疫療法効果に影響を与える
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachinami H, Tomihara K, Noguchi M
2. 発表標題 Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictable biomarker for response to nivolumab in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 78th J Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石戸克尚, 立浪秀剛, 櫻井航太郎, 平識 亘, 富原 圭, 野口 誠
2. 発表標題 老齡口腔癌マウスを用いた免疫細胞および抗腫瘍免疫応答に関する研究
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立浪秀剛, 富原 圭, 石戸克尚, 池田篤司, 藤原久美子, 野口 誠
2. 発表標題 口腔癌におけるnivolumab投与による 好中球数/リンパ球数比の変化
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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	山崎 学 (Yamazaki Manabu)  (10547516)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	笹原 正清 (Sasahara Masakiyo)  (20154015)	富山大学・学術研究部医学系・教授  (13201)	
研究分担者	藤原 久美子 (Fujiwara Kumiko)  (60404737)	富山大学・学術研究部医学系・助教  (13201)	

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	富原 圭  (Tomihara Kei)  (70404738)	富山大学・学術研究部医学系・准教授    (13201)	

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