

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17218

研究課題名(和文) 腫瘍会合性マクロファージによる口腔扁平上皮癌の増殖・浸潤・転移機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the growth and metastasis mechanism of oral squamous cell carcinoma by tumor-associating macrophages

研究代表者

久保田 恵吾 (Kubota, Keigo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50800835

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)：腫瘍会合性マクロファージ(TAM)は、癌微小環境においてその役割が徐々に明らかになりつつある。本研究では、まずCD163、CD204、CD206のTAMマーカー(発現タンパク)の違いによる癌の浸潤能や増殖能に関する関与を、腫瘍細胞と共培養することにより検討した。本研究では、ヒトの病理検体による評価を行った上で、その細胞動態を検索するために細胞レベルでの実験を行なった。各種実験結果と臨床病理組織学的な評価にて、CD206発現TAMは、腫瘍の増殖に関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、免疫組織学的手法を用いてヒト口腔扁平上皮癌の検索を行なっている。その手法は、マウスレベルの実験ではないため、ダイレクトに治療に関与する因子を検索することができるものである。本研究では、CD206発現マクロファージが癌の増殖や転移に関連する可能性があると公表した。本研究のようにCD206発現マクロファージの細胞増殖や組織浸潤機構が明らかにすることは、病態制御のための創薬に結びつくものであり、今後も引き続き各種マーカーで定義されるマクロファージの発現や癌との関連は検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associative macrophages (TAMs) are gradually elucidating their role in the cancer microenvironment. On the other hand, although macrophages infiltrating around cancer tissues have been pointed out for some time, they have not been linked to treatments such as anticancer drugs that kill so-called cancer cells. The reason is that there are many unclear points regarding the origin of cells (born or resident in bone marrow), local infiltration mechanism, and various roles of macrophages. In this study, we first investigated the involvement of CD163, CD204, and CD206 in terms of TAM markers (expressed proteins), especially infiltration and proliferation, by co-culturing with tumor cells. In this study, after evaluation using human pathological specimens, we are conducting experiments at the cellular level to search for the cell moving bodies. Various experimental results and pathological evaluations have revealed that CD206-expressing TAM is involved in tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫学 口腔扁平上皮癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん病巣内には多数のマクロファージ (MΦ) が存在していることが知られているが、その役割は抗腫瘍作用と考えられてきた。しかし近年、乳癌や前立腺癌では、がんの発症や悪性化の促進に関与することが報告されており、このような特異な MΦ は「腫瘍会合性マクロファージ (TAM)」と言われている。現在、TAM のマーカーとしてはスカベンジャー受容体である CD163 や CD204 が用いられているが、これらは M2 MΦ のマーカーとしても広く用いられているが、TAM の表現型 (マーカー) と機能は不明な点が多い。われわれはこれまでの研究で、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織における CD163 と CD204 の発現と局在について検討を行い、OSCC の宿主免疫回避機構に CD163+CD204+TAM が最も重要であることを明らかにした (*Sci Rep* 2017.)。本研究では、近年新たな TAM のマーカーとして報告されている CD206 を加えて、TAM を特異的に同定できる検索方法を確立し、OSCC との共培養することで、TAM による OSCC の増殖・浸潤・転移能を検討し、TAM を標的とした新規治療の樹立を目指すことを最終目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、下記の研究手法によってさらに詳細な検討を行うことで、TAM による口腔扁平上皮癌の増殖・浸潤・転移に関する病態解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OSCC 組織における CD163, CD204, CD206 発現細胞の EGF 発現細胞の同定と定量化 (免疫組織化学染色、蛍光二重染色、フローサイトメトリー)

OSCC 組織およびコントロールに隣接口腔粘膜上皮を用いて TAM サブセットの局在を検索、定量化し臨床病理学的な悪性度と臨床予後の関連を検索した。

(2) OSCC 患者 PBMC から分化培養 MΦ の抽出、機能解析

(MACS 法、フローサイトメトリー)

MΦ は複数の受容体を持ち、異なるサイトカイン産生を行い、機能が分かれている可能性が示唆されている。近年の TAM 研究ではマーカーとしてとして CD163, CD204, CD206 が用いられているものの、詳細なサブセット解析は行われていない。またいずれのマーカーを持つ TAM が、EGF を発現するかも不明なままである。FCMにてマーカーによる EGF 発現量の違いを検討した。

(3) 分化培養 MΦ と OSCC 細胞の共培養における OSCC 細胞の活性化マーカーの発現解析

(MACS 法、フローサイトメトリー、real-time PCR 法)

各マーカーを発現した分化培養 MΦ をソーティングし、OSCC 細胞と共培養を行い、OSCC 細胞の活性化マーカーである STAT3 や幹細胞マーカーである CD44 の発現を FCM にて測定する。また TAM と癌細胞は細胞間接触による癌細胞の活性化も示唆されており、細胞間接触有無による OSCC の活性化能の違いも明らかにする。さらに中和抗体を用いることで、いずれの TAM サブセットが最も OSCC の増殖や活性化に関与するか検索した。

4. 研究成果

(1) 臨床病理学的な悪性度と臨床予後の関連

TAM サブセットと OSCC 患者の臨床予後との相関を評価するために、Kaplan-Meier 法を使用して生存率を推定した。TAM サブセットの平均数に従って、OSCC 患者を低発現グループと高発現グループに分けたところ、PFS と DDS では、CD163 + と CD204 + の低発現と高発現に有意差はありませんでした。ただし、CD206+ 発現が高い患者は、発現が低い患者よりも有意に予後不良な結果を示した。以上の結果から、CD206 は OSCC の悪性度を表す指標となる可能性があるかと推測され、臨床予後の ROC 曲線による統計解析を行った。CD163+, CD204+, CD206+ 発現の DFS 関連 ROC 曲線の AUC 面積はそれぞれ 0.542, 0.534, 0.659 であり、CD163+, CD204+, CD206+ 発現の DSS 関連 ROC 曲線の AUC 面積は 0.570, 0.570, 0.615。これらの結果は、予後不良に対する CD206+ 発現の感度と特異性が高いことを示しています。さらに、単変量分析により、PFS および DSS は YK 基準および CD206+ 細胞数と関連していることが明らかになった。

当初予定していた IL-6 は次に行う細胞実験で発現を認めることができなかつたため、臨床予後との関連を示すことの信頼性が確保できなかつたため、IL-6 に関しては今後の課題とした。

(2) 単球のマクロファージ分化誘導サブセットの EGF 発現解析

下記図 1 に示すような結果となった。CD206+ が最も EGF 発現細胞数と蛍光強度 (MFI) が高いことを確認した。

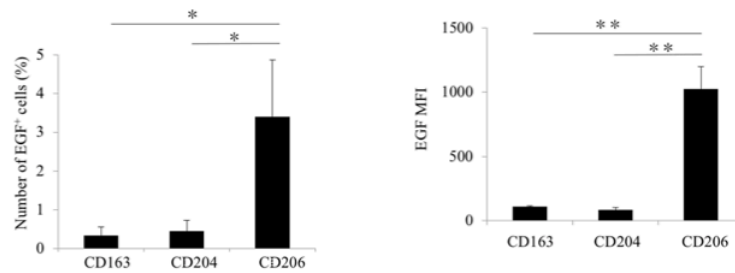


図 1. 各 TAM マーカー陽性細胞におけ EGF 発現細胞数 MFI (flow cytometry: FCM)。

(3) HSC-2 cells (OSCC) と、各 TAM 上清との EGF を介した関連の検討

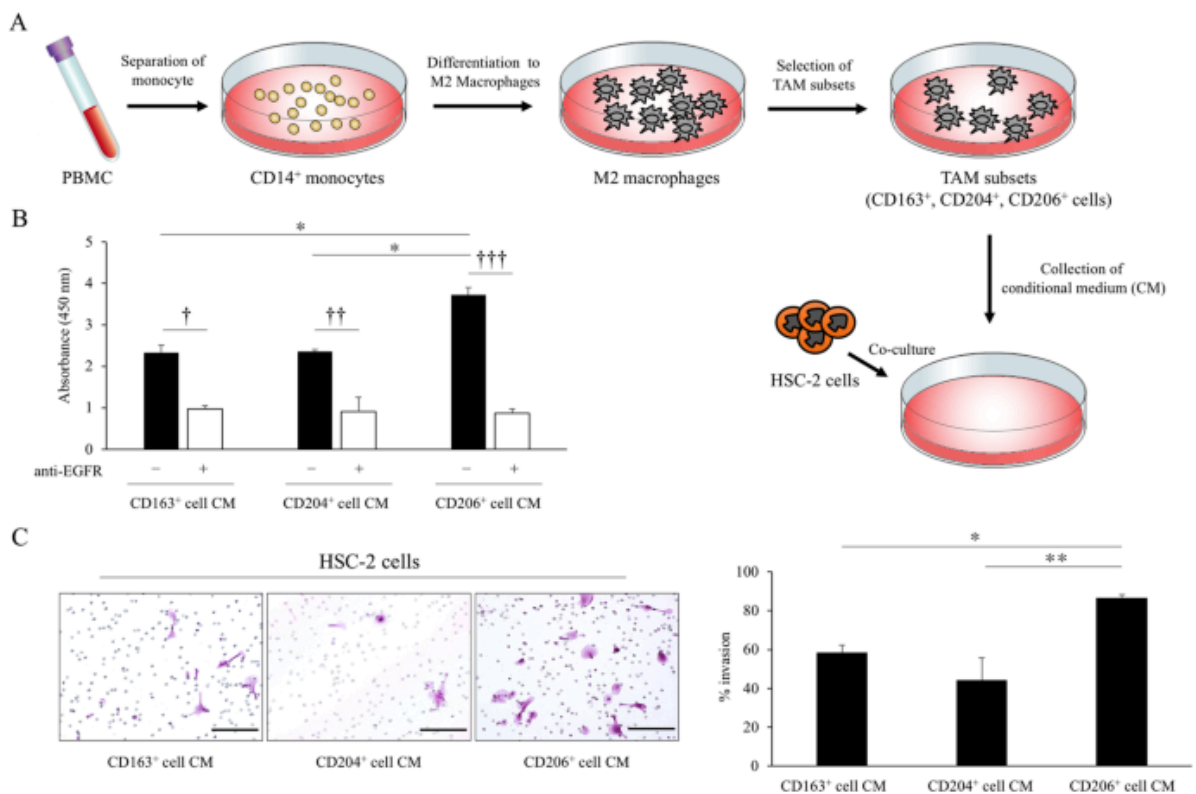


図 2 A. 患者 PBMC から TAM 培養し各種上清を用いて OSCC 細胞を培養した実験系
 B. 抗 EGFR 抗体添加群と非添加群における HSC-2 細胞の生存率
 C. 各 TAM 上清との共培養した HSC-2 細胞の浸潤能

図 2 に示すように、上清による共培養系を用いて、EGF との関連を検討した結果。CD206+上清は、最も HSC-2 cells の生存率を高めた (B)。さらに浸潤能試験を行ったところ、CD206+cells の上清を用いた HSC-2 cells が最も浸潤能が高いことが明らかになった。顕微鏡像も同時に示す。

以上の結果から、CD206 は OSCC に対して細胞増殖能と浸潤能を EGF を介して高めていることが明らかとなった。本研究成果は、Scientific Reports に 2019 年公表され、国際的に評価されている。

今後の展望としては、TAM の細胞外マトリックスの再構成への関与や T 細胞との関連を PD-1/PD-L1 以外の免疫チェックポイント分子を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haque A. S. M. Rafiul, Moriyama Masafumi, Kubota Keigo, Ishiguro Noriko, Sakamoto Mizuki, Chinju Akira, Mochizuki Keita, Sakamoto Taiki, Kaneko Naoki, Munemura Ryusuke, Maehara Takashi, Tanaka Akihiko, Hayashida Jun-Nosuke, Kawano Shintaro, Kiyoshima Tamotsu, Nakamura Seiji	4. 巻 9
2. 論文標題 CD206+ tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via EGF production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51149-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 宮本 祥行, 久保田 恵吾, 中村 和貴, 小松 紀子, 安部 貴大, 星 和人	4. 巻 66
2. 論文標題 上顎骨に腫瘍形成を認めたエルドハイム・チェスター病の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 637-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.66.637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村和貴, 小松紀子, 久保田恵吾, 宮本祥之, 安倍貴大, 星和人
2. 発表標題 顎骨に発生した極めて稀なエルドハイムチェスター病関連腫瘍の1例.
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2019.1.24-25 長崎ブリックホール, 長崎
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山雅文, 久保田恵吾, 柿添乃理子, 坂本瑞樹, 鎮守晃, 坂本泰基, 川野真太郎, 清島保, 中村誠司
2. 発表標題 CD206陽性腫瘍随伴性マクロファージはEGFを介して口腔扁平上皮癌の増殖と浸潤を促進する.
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会 2019.10.25-27. 札幌コンベンションセンター, 札幌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ASM Rafiul Haque, 森山雅文, 久保田恵吾, 石黒乃理子, 坂本瑞樹, 鎮守晃, 望月敬太, 坂本泰基, 金子直樹, 宗村龍祐, 田中明彦, 前原隆, 林田淳之將, 川野真太郎, 中村誠司
2. 発表標題 CD206+tumor-associated macrophages promote cancer cell proliferation.
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keigo Kubota	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Japanese Stomatological Society	5. 総ページ数 9
3. 書名 Oral Science in Japan 2020	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------