

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791765

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌における癌細胞 - 間質細胞間の接触による相互作用

研究課題名（英文） Cross-interaction induced by direct adhesion between carcinoma cell and stromal cell in oral cancer

研究代表者

宇佐美 悠 (USAMI YU)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80444579

研究成果の概要 (和文) : 本研究では舌癌における接着分子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) の発現に着目し、免疫組織学的、細胞生物学的解析を行った。癌細胞における ICAM-1 発現は、舌癌の浸潤やリンパ節転移に関わるとともに、癌浸潤部における血管、リンパ管新生や、腫瘍に対し促進的に働くと考えられる間質細胞であるマクロファージの浸潤に関わることが明らかとなった。また癌細胞は ICAM-1 を介し、マクロファージと接着し、癌細胞の新たな性質の獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we evaluated the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). ICAM-1 expression was correlated with the invasiveness, lymph node metastasis, increased blood and lymphatic vessels, and macrophage infiltration. Moreover, macrophage/OSCC-cell adhesion via ICAM-1 molecules was revealed. These findings indicate that ICAM-1 plays an important role in OSCC progression, which may result from the ICAM-1-induced the OSCC-cell activity and macrophage/OSCC-cell adhesion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学、口腔癌、扁平上皮癌、浸潤、転移、癌微小環境、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

癌は癌細胞を取り巻く、細胞外基質、線維芽細胞、血管、炎症細胞といった癌細胞以外の間質細胞により支持されており、これらの組織環境は、癌微小環境と呼ばれている。これまで、多くの研究により、癌細胞と微小環

境中の間質細胞との相互作用が、癌細胞自身の増殖、分化、浸潤に関わっており、組織全体としての癌の予後に関与していることが、明らかになりつつある。

我々これまで、腫瘍の最浸潤部（浸潤先端）において、細胞間接着タンパクの発現低下と

ともに、上皮細胞が間質細胞（間葉系細胞）としての形質を発現することを明らかにしており、この癌細胞の上皮・間葉形質転換が癌の生物学的態度に関与する事を示した。上皮・間葉形質転換は、細胞増殖因子など、様々な液性因子により誘導されることが知られており、これらの液性因子の産生に間質細胞が関わっている可能性も指摘されている。しかしながら、癌細胞には、液性因子を介する間質細胞との相互作用のみならず、癌微小環境中の間質細胞との直接的な接触による相互作用も存在していると考えられるが、間質細胞と癌細胞との接着により誘導される癌細胞の形質変化には依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

癌は、癌細胞とそれらを取り囲む間質細胞から構成されている。癌微小環境において、癌細胞と間質細胞は液性因子を介する非接触性の相互作用のみならず、細胞間接着分子を介しての、直接的な接着による相互作用も癌微小環境の形成に重要であると思われる。

そこで、本研究では、様々な細胞に低レベルに発現し、炎症性刺激などにより発現が上昇し、異種の細胞（血管内皮細胞/炎症性細胞など）との接着を介するとされる intercellular adhesion molecule-1（以下、ICAM-1）に着目し、接着分子 ICAM-1 を介する口腔扁平上皮癌細胞と間質細胞との相互作用を明らかにする。

また、癌微小環境に存在する間質細胞として、ICAM-1 のカウンターレセプターである、接着分子 CD11b/CD18 を細胞膜に発現するマクロファージに着目する。マクロファージは、近年、癌微小環境中に存在し、癌進展に関わる重要な細胞として、研究の対象となっている。癌組織中のマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ（tumor-associated macrophage、以下 TAM）と呼ばれ、血管新生作用、基質分解作用などを通じて、腫瘍の進展に促進的役割を果たしていることが明らかにされている。癌微小環境における TAM の果たす役割に関して、液性因子を介する癌細胞との相互作用は明らかにされつつある。しかし、癌細胞との直接的な接着を介する癌細胞/マクロファージの相互作用に関しては数件の報告を見るのみであり、癌細胞と間質細胞の接着による相互作用を解析するにあたり、良い標的細胞となると考えた。

本研究では、舌扁平上皮癌における接着分子 ICAM-1 発現の意義を以下の視点から解明

する。

- (1) 舌扁平上皮癌における ICAM-1 発現が癌細胞に及ぼす変化
- (2) 舌扁平上皮癌における ICAM-1 発現が癌細胞とマクロファージの接着に寄与するか
- (3) 口腔扁平上皮癌細胞とマクロファージの接着により癌細胞に引き起こされる変化

3. 研究の方法

(1) 舌癌における ICAM-1 発現の意義

① 大阪大学歯学部附属病院において採取された 50 例の舌癌組織切片を用い ICAM-1 抗体 (Leica Microsystems) を使用し、免疫組織化学的 (LSAB2 キット、DakoCytomation) に解析する。なお、臨床検体の使用に関して、倫理委員会の許可、同意書を得ている。また、免疫組織化学にて得られた結果と臨床病理学的因子との関連を統計的に明らかにする。

② 組織切片を用いた解析により得られた結果をヒト口腔癌細胞株 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手) を用いて検証する。細胞増殖能試験 (Dojindo Laboratory)、微小な孔の存在する膜を用いて運動能、浸潤能 (Becton Dickinson Biosciences) の解析を行う。

(2) 舌癌における ICAM-1 発現と微小環境の解析

舌癌組織切片を用いて、CD31 陽性の血管数 (DakoCytomation)、podoplanin 陽性のリンパ管数 (DakoCytomation)、Leukocyte Common Antigen (LCA, DakoCytomation) 陽性の白血球浸潤、CD163 陽性のマクロファージ浸潤 (Leica Microsystems) に関して免疫組織学的に解析する。

(3) ICAM-1 を介する口腔癌細胞/マクロファージの接着の解析

① 舌癌組織切片上で蛍光免疫組織化学により癌細胞とマクロファージを検出し、ICAM-1 を介する相互の接着を解析する。また THP-1 細胞株 (急性単球性白血病細胞株、ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手) から、ホルボール 12-ミリストート 13-アセタート (以下、PMA, Wako) 刺激により分化させたマクロファージ様細胞 (以下、THP-1-PMA) と、口腔癌細胞株との共培養により ICAM-1 を介する相互の接着を解析する。

② 口腔癌細胞と THP-1-PMA の共培養条件下

で、ICAM-1 モノクローナル抗体 (R&D Systems)、CD11b モノクローナル抗体 (eBioscience) を用いて接着阻害実験を行うことで、ICAM-1 依存性、癌細胞/マクロファージ間の接着を解析する。

(4) マクロファージとの接着により口腔癌細胞が獲得する形質の解析

口腔癌細胞株と THP-1-PMA とを、液性因子を介する非接触状態での共培養、および直接接触状態での共培養条件下で培養し、口腔癌細胞を磁気ビーズ法 (Miltenyi Biotec) により分離し、網羅的遺伝子解析 (HG U133plus2.0、Affymetrix) を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト舌癌組織における ICAM-1 の発現

正常舌組織において免疫組織化学的に ICAM-1 の発現を検討したところ、上皮細胞での ICAM-1 発現は認められなかった。粘膜固有層内の血管内皮細胞には ICAM-1 が発現しており、内因性陽性コントロールとして以下の免疫組織化学に使用した。舌扁平上皮癌において ICAM-1 は癌細胞の細胞膜に発現し、多くの症例において、腫瘍の浸潤先端の癌細胞に発現していた (図 1)。

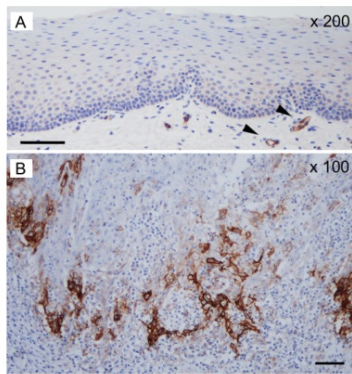


図1. ヒト舌切除検体における ICAM-1 発現
(A) 正常舌扁平上皮における ICAM-1 発現。矢頭、血管内皮細胞。
(B) 舌扁平上皮癌における ICAM-1 発現。浸潤先端で突出する発現が見られる。

(2) 舌癌組織浸潤先端における ICAM-1 発現と臨床病理学的因子との関わり

舌扁平上皮癌の浸潤先端に ICAM-1 発現が見られたため、免疫組織化学の評価を浸潤先端に絞り、臨床病理学的因子との相関を解析した。浸潤先端において、10%以上の癌細胞が ICAM-1 陽性を示す症例を ICAM-1 陽性舌扁平上皮癌として、評価・解析したところ、腫瘍浸潤とリンパ節転移に統計学的有意差が得られた (表)。

	n	ICAM-1 陽性 [†]	ICAM-1 陰性 [‡]	P value [§]
Total	50	26	24	
Histology [‡]				.1423
Well	29	12	17	
Moderate	12	9	3	
Poorly	9	5	4	
Tumor thickness [§]				.0246
< 5 mm	21	7	14	
≥ 5 mm	29	19	10	
Tumor depth [§]				.0486
< 5 mm	24	9	15	
≥ 5 mm	26	17	9	
Tumor invasion				.0318
Submucosa	12	3	9	
Muscle layer	38	23	15	
Lymph node metastasis				.0054
Negative	33	12	21	
Positive	17	14	3	

略語: Well, 高分化型扁平上皮癌; Moderate, 中分化型扁平上皮癌; Poorly, 低分化型扁平上皮癌。癌細胞における ICAM-1 発現は、10%以上の癌細胞の細胞膜に ICAM-1 が発現する症例を陽性、10%未満の癌細胞に発現する症例を陰性とした。全ての評価は舌扁平上皮癌浸潤先端で行った。[†] 統計学的解析はカイ二乗検定により行われ、p 値 0.05 未満を有意差有りとした。[‡] WHO に従い分類。[§] 口腔癌取り扱規約に従い分類。

(3) ICAM-1 遺伝子の導入による口腔扁平上皮癌細胞株の形質変化

舌扁平上皮癌組織における ICAM-1 の免疫組織化学的解析により得られた結果を検討するため、内因性の ICAM-1 を発現しない口腔扁平上皮癌細胞株、Ca9-22 細胞を使用し、ICAM-1 遺伝子の遺伝子導入を試みた。遺伝子導入後、十分な発現が得られ、これらの細胞を用いて細胞増殖試験、運動能・浸潤能の解析を行った。ICAM-1 遺伝子を導入した Ca9-22 細胞株 (以下、Ca9-ICAM-1) は、ベクターのみを導入した Ca9-22 細胞株 (以下、Ca9-empty) に比べて細胞増殖能の亢進が見られ、さらに、癌細胞が通過可能な孔の形成された膜を通過する運動能の亢進、また、同膜の表層を基底膜様物質でコートされた膜を癌細胞が通過する浸潤能の亢進が見られた (図 2)。

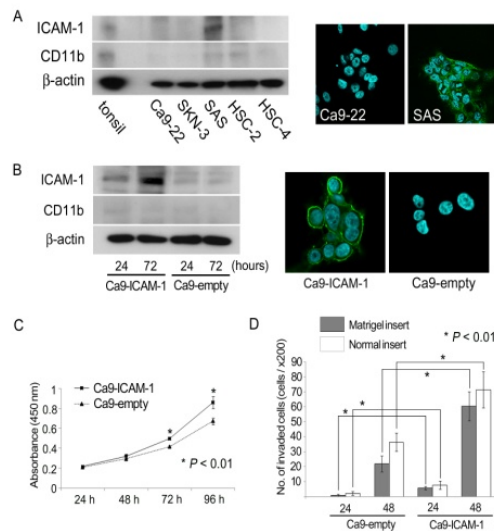


図2. 口腔扁平上皮癌細胞株における ICAM-1 発現の解析
(A) 口腔扁平上皮癌細胞株 (Ca9-22, SKN-3, SAS, HSC-2, HSC-4) における ICAM-1 と、ICAM-1 のカウンターレセプターである CD11b 発現。扁桃は陽性コントロール。左、ウエスタンブロット法。右、ICAM-1 抗体を用いた蛍光免疫組織化学。(B) 内因性 ICAM-1 を発現しない Ca9-22 細胞株への ICAM-1 遺伝子導入。ICAM-1 導入 Ca9-22 細胞株、Ca9-ICAM-1、空ベクター導入 Ca9-22 細胞株、Ca9-empty。(C) 細胞増殖能試験。(D) 浸潤能 (灰色)、運動能試験 (白)。

(4) ICAM-1 陽性舌癌における癌微小環境の免

疫組織学的解析

細胞株における遺伝子導入実験のみでは、臨床病理学的因子の解析で得られたリンパ節転移能の亢進を説明できない。そのため、浸潤先端でのリンパ節転移に関わるとされる、血管数およびリンパ管数を血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞特異的に検出する抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。浸潤先端で ICAM-1 を発現する舌扁平上皮癌では浸潤先端における血管密度およびリンパ管密度が高いことが明らかとなった (図 3)。

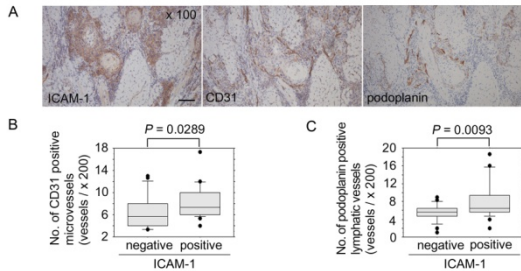


図3. ICAM-1発現舌扁平上皮癌における血管数およびリンパ管数 (A) 血管内皮細胞を特異的に検出するCD31およびリンパ管内皮細胞を特異的に検出するpodoplanin抗体を用いた免疫組織化学。(B) 浸潤先端におけるCD31陽性血管数およびpodoplanin陽性リンパ管数とICAM-1発現舌扁平上皮癌の解析。

また、ICAM-1 のカウンターレセプターである CD11b を発現する白血球、およびマクロファージの浸潤を免疫組織学的に解析し、癌細胞の発現する ICAM-1 との相関を検討した。

浸潤する白血球全般およびマクロファージの浸潤を解析したところ、統計学的に浸潤先端で ICAM-1 を発現する舌扁平上皮癌では浸潤先端における白血球数 (白血球の占める面積を計測) との相関は見られなかったが、浸潤先端に浸潤するマクロファージの数が ICAM-1 発現舌癌では多いことが明らかとなった。また浸潤先端部で撮影した顕微鏡画像の画像上で、癌胞巣および胞巣周囲間質に分け、それぞれに浸潤するマクロファージを解析した。すると、ICAM-1 陽性舌扁平上皮癌では癌胞巣内にマクロファージの浸潤が多い事が明らかとなった (図 4)。

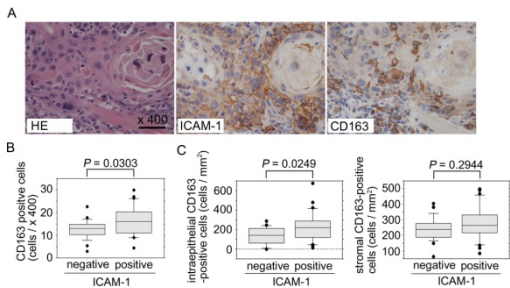


図4. ICAM-1発現舌扁平上皮癌におけるマクロファージ浸潤 (A) マクロファージを特異的に検出するCD163抗体を用いて免疫組織化学にてマクロファージを検出した。(B) 舌扁平上皮癌浸潤先端におけるマクロファージの計測。(C) 舌扁平上皮癌浸潤先端におけるマクロファージを癌胞巣内、間質それぞれについて解析した。

(5) ICAM-1 を介する癌細胞/マクロファージ間の接着

マクロファージの免疫組織化学的解析により、癌細胞とマクロファージが接着している可能性が示唆されたため、ICAM-1 と、マクロファージが発現する ICAM-1 のカウンターレセプターである CD11b に着目し、口腔扁平上皮癌細胞株と THP-1-PMA マクロファージ様細胞株との共培養、および、舌癌切除検体にて、蛍光免疫組織学を用いて解析した。ICAM-1 および CD11b 抗体を用いての、2重蛍光免疫組織化学染色により、舌癌組織および細胞株いずれにおいても癌細胞の発現する ICAM-1 とマクロファージの発現する CD11b が共局在し、ICAM-1/CD11b 間の結合により両細胞が接着している可能性が示唆された (図 5)。

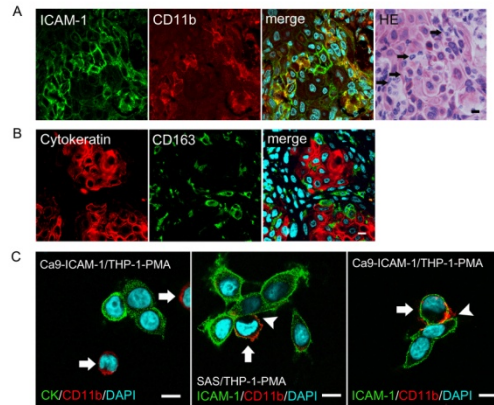


図5. ICAM-1/CD11bを介する癌細胞/マクロファージ接着 (A) 舌扁平上皮癌組織においてICAM-1(緑)とCD11b(赤)を蛍光免疫組織化学により検出した。同じ切片をHE染色し、マクロファージを確認。(B) 舌扁平上皮癌組織におけるCD163陽性マクロファージ(緑)とサイトケラチン陽性癌細胞(赤)を確認。癌細胞とマクロファージは接着する様に見える。(C) ICAM-1遺伝子を導入した内因性ICAM-1陰性細胞株(Ca9-ICAM-1)および内因性ICAM-1を発現する口腔癌細胞株SASをPMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化させた細胞(THP-1-PMA)と共培養し、ICAM-1(緑)とCD11b(赤)抗体を持ちて免疫組織化学により解析。DAPIは核を示す。

そこで、ICAM-1 および CD11b 依存性の接着であるかを検討するため、両タンパクに対するモノクローナル抗体を口腔癌細胞株と THP-1-PMA (マクロファージ様細胞) の共培養下に添加したところ、癌細胞/マクロファージ間接着が阻害された。以上より、口腔癌細胞は ICAM-1/CD11b 依存性にマクロファージと結合する事が明らかにされた (図 6)。

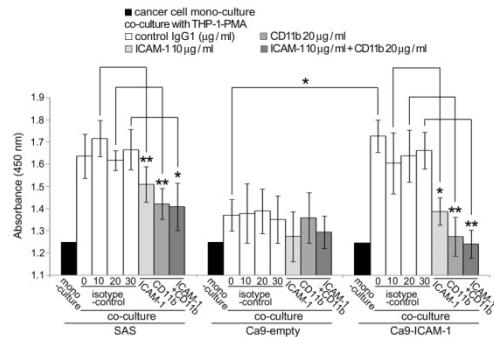


図6. ICAM-1/CD11b抗体による癌細胞/マクロファージ接着阻害実験 (A) ICAM-1遺伝子を導入した内因性ICAM-1陰性細胞株(Ca9-ICAM-1)、空ベクターを導入した内因性ICAM-1陽性細胞株(Ca9-empty)および内因性ICAM-1を発現する口腔癌細胞株SASを96ウェルプレート上にコンフルエントまで培養し、PMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化させた細胞(THP-1-PMA)をICAM-1、CD11bモノクローナル抗体および両者の混合の存在下で共培養し、1時間後に非接着細胞を洗浄除去した。その後、テトラゾリウム塩WST-8を添加し、吸光度計を用いて細胞数を計測した。黒グラフは各細胞の単独培養。ICAM-1発現細胞株ではICAM-1およびCD11b依存性の癌細胞/マクロファージ接着がみられた。

(6) 口腔癌細胞/マクロファージ間接着により癌細胞に起こる形質変化

口腔癌細胞/マクロファージ間の接着により癌細胞に惹起される形質変化に関して網羅的遺伝子解析により検討した。

癌細胞/マクロファージ間の直接接着による癌細胞に引き起こされる変化を明らかにするため、癌細胞単独、マクロファージ由来の液性因子により刺激された癌細胞、およびマクロファージと直接接着し、刺激された癌細胞を分離した。分離した口腔癌細胞より mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ法を用いて網羅的遺伝子解析を行った (図 7)。

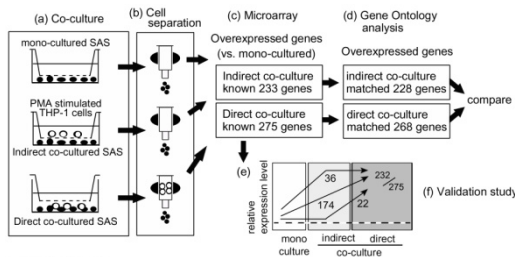


図7. 網羅的遺伝子解析
(a) 内因性ICAM-1発現口腔扁平上皮癌細胞株であるSASをPMA刺激によりマクロファージ様細胞に分化させたTHP-1細胞株を因ごとくに、単独、非接触下での共培養、直接接触させた共培養下で培養し、(b) 磁気ビーズ法にて癌細胞のみを分離採取した後、mRNAを抽出し、(c) cDNAマイクロアレイにて解析した。その後、発現上昇遺伝子を抽出し、(d) Gene Ontology解析および (e) 興味ある遺伝子に関しては (f) 定量的PCR法にて検証実験を行った。

マイクロアレイより得られた網羅的な遺伝子の発現量より、統計学的に有意に2倍以上の発現を示す遺伝子を抽出し、Gene Ontologyに従い解析した。すると、液性因子を介しマクロファージにより刺激された癌細胞に比べて、マクロファージとの直接的な接着により刺激された癌細胞では、細胞膜局在タンパク、接着タンパクに関連する遺伝子に発現の有意な集中が見られ、さらにサイトカイン関連の遺伝子発現にも有意な集中が認められた (図 8)。

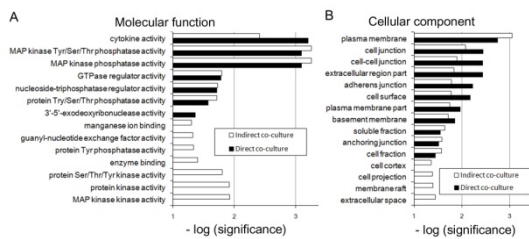


図8. 口腔扁平上皮癌細胞とマクロファージ様細胞の直接的な接着により発現が上昇する遺伝子群
cDNAマイクロアレイ法により得られた発現の上昇した遺伝子群に関して、液性因子を介するマクロファージの刺激を受けたSAS細胞株で、単独培養SAS細胞株に比べて発現している遺伝子群を白棒、マクロファージとの直接接触による刺激を受けたSAS細胞株で、単独培養SAS細胞株に比べて発現している遺伝子群を黒棒で示す。横軸は有意差。(A) 分子機能に着目したGene Ontologyでは、液性因子を介する刺激を受けたSAS細胞株に比べ、マクロファージの接触刺激を受けたSAS細胞株ではサイトカイン産生に遺伝子の集中が見られる。(B) 細胞内局在に着目したGene Ontologyでは、液性因子を介する刺激を受けたSAS細胞株に比べ、マクロファージの接触刺激を受けたSAS細胞株では細胞間結合分子、膜タンパク関連分子の発現に関わる遺伝子に発現の集中が見られる。

以上より、癌細胞はマクロファージとの直接的な接着により、液性因子を介するマクロファージによる刺激とは異なった形質を示す事が明らかとなった。また、直接的な口腔癌細胞/マクロファージ間接着は接着タンパ

クを介して、細胞内シグナルを経て、サイトカインの産生上昇に至る可能性が示唆された。

本研究により、舌扁平上皮癌細胞に発現する ICAM-1 は、癌細胞自身の増殖能、運動能、浸潤能の亢進のみならず、周囲間質に働きかけることにより、血管新生、リンパ管新生、マクロファージの誘導に関わっていることが示唆された。

また癌細胞に発現する ICAM-1 は、浸潤したマクロファージとの接着に関わっており、癌細胞とマクロファージの接着により、液性因子を介する相互作用とは異なる形質を癌細胞に発現せしめることが示された。

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 3 件)

①宇佐美悠、石田健、大家香織、岸野万伸、佐藤淳、小川裕三、豊澤悟、口腔扁平上皮癌における ICAM-1 発現は浸潤能、転移能とマクロファージの浸潤に関与する、日本歯科基礎医学会学術大会・総会、2011. 10. 2、岐阜県・長良川国際会議場

②宇佐美悠、福田康夫、石田健、岸野万信、佐藤淳、小川裕三、豊澤悟、口腔扁平上皮癌における intercellular adhesion molecule 1 発現は転移能と腫瘍関連炎症細胞浸潤に関与する、日本病理学会総会、2011. 4. 30、神奈川県・パシフィコ横浜

③宇佐美悠、口腔扁平上皮癌における intercellular adhesion molecule 1 発現は転移能と腫瘍関連炎症細胞浸潤に関与する、日本癌学会学術総会、2010. 9. 22、大阪府・大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇佐美 悠 (USAMI YU)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80444579