

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592957

研究課題名(和文) 口腔癌顎骨浸潤の免疫学的機序の解明と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) A novel strategy against bone invasion of oral cancer

研究代表者

野口 誠 (Noguchi, Makoto)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50208328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔癌の顎骨浸潤の免疫学的機序の解明と新たな治療戦略の開発を目的とし、口腔癌の顎骨浸潤過程における破骨細胞(OC)の分化に着目した。リウマチなどの炎症性疾患においては、破骨細胞の分化過程においては、CD4陽性ヘルパーT細胞(Th)が関与していることが示唆されているが、腫瘍局所におけるTh反応系とOCとの相互作用は未だ不明である。われわれは、マウス口腔癌モデルを用いた解析で、腫瘍内に浸潤しているCD4陽性T細胞のうちで、50%以上がFoxP3陽性のTregであり、さらに、腫瘍内のTregはCTLA-4を強発現し、このCTLA-4を介してOC分化を有意に抑制していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Despite CD4+T cells have been demonstrated to play an important role for bone destruction in the microenvironment of inflammatory diseases, very little work has been done to demonstrate the contribution of these cell types to cancer bone invasion. In the present study, we investigated the mechanism of interaction between regulatory T cells (Tregs) and osteoclasts in a murine model of oral cancer to elucidate the role of Tregs in the bone invasion of oral cancer. Tregs were purified from the tumor of mouse oral cancer model and then cocultured with bone marrow cells. Secreted tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 5b was determined as a marker of osteoclast number. Attenuation of osteoclast-derived TRACP5b was observed in the coculture of tumor derived Tregs and bone marrow cells, and this attenuation of TRACP5b was ameliorated by neutralization of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigens-4 (CTLA-4).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔とくに歯肉、歯槽粘膜に発生する扁平上皮癌は、発生の早期から骨組織を浸潤、破壊し、他部位の上皮性悪性腫瘍にはみられない極めてユニークな特徴を有する。歯肉歯槽粘膜癌における顎骨浸潤の様態は、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おり、顎骨を虫食い状に吸収し浸潤する腫瘍の予後は不良である。これらの癌における顎骨浸潤の制御は、予後成績の向上の観点から極めて重要な課題となっている。

扁平上皮癌の顎骨浸潤のメカニズムについては不明な点が多い。他臓器癌の骨転移巣などにおける骨破壊においては、破骨細胞 (osteoclast、以下 OC) が重要な役割を果たすことが知られている。

申請者らは、口腔癌の顎骨浸潤の様態とそのメカニズムに関する検討を行い、虫食い状の顎骨浸潤する例では発育先進部において OC 数が多い傾向を見出した。さらにそのような例では MMP9 の発現が強いことが示唆された。また、OC 分化に関連するサイトカインの免疫染色では、腫瘍細胞には明らかな陽性所見は見出されなかった(基盤(C)20592356: 口腔癌の顎骨浸潤の様態とそのメカニズムの解明-分子診断への応用-)。

以上より、扁平上皮癌の骨浸潤において腫瘍局所における OC の分化過程をさらに詳細に探ることが、そのメカニズムの解明と治療法の開発に有意義と考えた。OC の分化に関する近年の研究成果では、ヘルパー I 型 T 細胞 (以下、Th1)、ヘルパー II 型 T 細胞 (以下、Th2) および制御性 T 細胞 (以下、Treg) などは OC の分化を制御し、逆に インターロイキン 17 産生ヘルパー T 細胞 (以下、Th17) は OC の分化を促進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における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 Th 反応系と OC の相互作用に関する研究成績はみられない。

2. 研究の目的

そこで申請者らは、口腔癌組織における T 細胞免疫応答と OC の分化について検討を行い、口腔扁平上皮癌組織における顎骨浸潤のメカニズムを解明し、新たな治療戦略開発に役立てることを本研究の目的とした。

リウマチなどの炎症性疾患では、破骨細胞分化に対して regulatory T cell (Treg) が破骨細胞分化を抑制し、炎症性骨破壊を抑制していることが確認されている。しかし、腫瘍局所における Treg を介した破骨細胞分化に対する影響については、現在のところ解明されていない。

そこで、本研究では口腔癌組織の Treg が破骨細胞分化にどのような影響を与えているか検討を行った。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌組織における免疫反応と破骨細胞 (OC) 分化のメカニズムを解明するために、本研究においては、マウス由来口腔扁平上皮癌細胞株 SCCVII と同種マウス C3H/HeN を用いたシンジェニックマウス口腔癌モデルを作成し、担癌マウスの腫瘍組織、腫瘍所属リンパ節である顎下リンパ節、コントロールとして末梢リンパ節における Treg の分布を解析。さらにそれぞれの組織より Treg を含めた各種免疫細胞の分布について解析を行い、さらにそれらを細胞分離により回収して、invitro での実験系による各種の免疫学的解析により、Treg の口腔癌組織における破骨細胞分化に与える影響について機能解析を行った。

4. 研究成果

研究成果であるが

1. マウス口腔癌細胞株 SCCVII (1×10^6 個) をレシピエントマウスである C3H/HeN の咬筋部に移植すると、移植したマウスではおよそ 14 日後には、同部で 100 mm² の腫瘍塊が形成された。
2. マウス腫瘍塊を酵素処理し、腫瘍内に浸潤している細胞の解析を行ったところ、腫瘍内の CD4 陽性 T 細胞中、50%以上の割合で FoxP3 陽性の regulatory T cells (Tregs) が浸潤していることが確認された。
3. 担癌マウスの腫瘍組織以外の末梢リンパ節、顎下リンパ節での総白血球数および CD4、CD8 陽性 T 細胞の割合について解析を行ったところ、担癌マウスの顎下リンパ節では、コントロールマウスに比べて総白血球数が増加していた。しかし、CD4、CD8 陽性 T 細胞の割合には変化が認められなかった。
4. 腫瘍組織、末梢リンパ節、顎下リンパ節のそれぞれの Treg 上での各種細胞表面マーカーの発現を解析したところ、腫瘍内の Treg 上では、末梢リンパ節や顎下リンパ節内の Treg に比べて細胞表面上の CTLA-4 の発現が増強していた。

5. 腫瘍組織、末梢リンパ節、顎下リンパ節のそれぞれより Treg を採取して、それぞれの Treg の機能解析を行った結果、いずれの部位の Treg もレスポンダーの T 細胞の増殖を抑制することが確認された。

6. 腫瘍組織、末梢リンパ節、顎下リンパ節のそれぞれより採取した Treg と骨髄由来 CD11b 陽性細胞を GM-CSF、RankL の存在下で共培養し、骨髄由来 CD11b 陽性細胞からの破骨細胞への分化を TRACP5b の ELISA 法で解析し、それぞれ Treg が破骨細胞分化に対してどのように影響するかについて検討を行った結果、末梢リンパ節や顎下リンパ節由来の Treg に比べて、腫瘍組織由来の Treg は、破骨細胞分化を強く抑制することが確認された。

7. GM-CSF、RankL 存在下での骨髄 CD11b 陽性細胞と Treg との共培養に、CTLA-4 の中和抗体を添加したところ、Treg による CD11b 陽性細胞の破骨細胞分化の抑制効果が減弱することが確認された。

以上の結果から、口腔癌においては、Treg を介して破骨細胞分化が抑制されており、そのメカニズムの一つが、Treg 上の CTLA-4 であることが確認された。

すなわち、口腔癌顎骨浸潤過程では、Treg は抑制的に働くことが明らかとなり、本研究は、腫瘍組織における Treg の新たな働きを示唆する結果となった。この結果をもとに、現在 Treg が口腔癌組織において、どのような役割をはたしているのかについてさらに詳細に検討を行っている。

以下に、本研究で得られたデータの一部を示す。

図 1 . 担癌マウスにおける Treg の分布

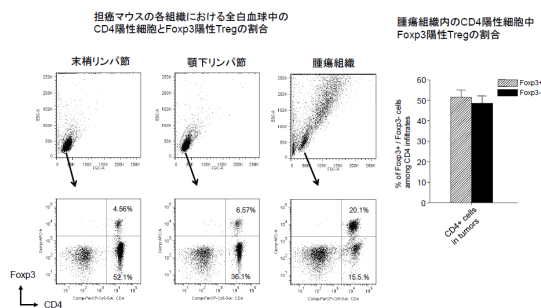


図 2 . 担癌マウス上の Treg 上での CTLA-4 の発現

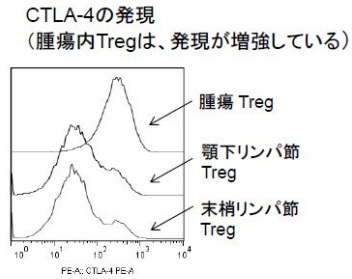
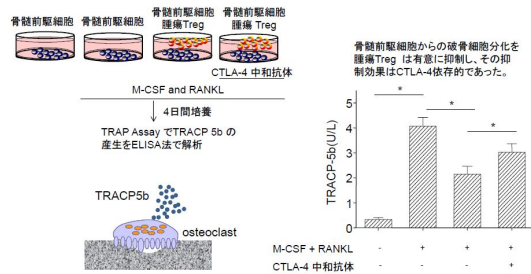


図 3 . 骨髄由来 CD11b 陽性細胞からの破骨細胞分化に与える Treg の影響を、担癌マウスの各種組織より分離した Treg と CD11b 陽性細胞の共培養で解析。



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)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Tomihara K, Fuse H, Heshiki W, Takei R, Zhang B, Arai N, Nakamori K, Noguchi M. Gemcitabine chemotherapy induces phenotypic alterations of tumor cells that facilitate antitumor T cell responses in a mouse model of oral cancer. *Oral Oncol.* 2014;50:457-467. 査読有

2. Noto Z, Yoshida T, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno H, Tomihara K, Arai N, Noguchi M, Nikaido T. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. *Oral Oncol.* 2013;49:787-795. 査読有

- 3 . Tomihara K, Curriel TJ, Zhang B. Optimization of immunotherapy in elderly cancer patients. Crit Rev Oncog. 2013;18(6):573-583. 査読有
- 4 . Arai N, Inoue S, Tomihara K, Tsuno H, Noguchi M. In vitro synergistic effects of zoledronic acid and calcium on viability of human epithelial cells. Oral Dis. 2013;19:200-205. 査読有
- 5 . Tomihara K, Shin T, Hurez VJ, Yagita H, Pardoll DM, Zhang B, Curriel TJ, Shin T. Aging-associated B7-DC+ B cells enhance anti-tumor immunity via Th1 and Th17 induction. Aging Cell. 2012;11:128-138. 査読有

[学会発表](計 7件)

- 1 . Noguchi M, Tomihara K. CTLA 4-mediated inhibition of osteoclast differentiation by regulatory T cells (Tregs) in oral cancer. 21th International conference on oral and maxillofacial surgery (ICOMS); 2013 Oct 21-24; Balcelona.
- 2 . Tomihara K, Noguchi M. CTLA 4-mediated inhibition of osteoclast differentiation by regulatory T cells (Tregs) in oral cancer. 21th International conference on oral and maxillofacial surgery (ICOMS); 2013 October 21-24; Balcelona.
- 3 . Tomihara K, Noguchi M. CTLA 4-mediated inhibitory effect on osteoclastogenesis by Tregs in oral cancer. The American Association of Immunologists AAI Annual Meeting; 2013 May 3-7; Honolulu.
- 4 . Tomihara K, Inoue S, Takei R, Imaue S, Arai N, Noguchi M. Characterization of regulatory T cells (Tregs) in oral cancer. 10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery; 2012 November 15-18; Bali.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 誠 (NOGUCHI Makoto)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：50208328

(2)研究分担者

新井 直也 (ARAI Naoya)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80323723

(3)研究協力者

富原 圭 (TOMIHARA Kei)
富山大学・大学院医学薬学研究部・講師
研究者番号：70404738