

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592841

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の発生・進展における炎症の役割と制御法の開発

研究課題名(英文) Role of inflammation in the initiation and development of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

水口 純一郎 (Mizuguchi, Junichiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20150188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：気道炎症を有している野生型マウスに腫瘍細胞を移入すると、対照群に比べて肺転移が増強していたが、炎症反応を調節しているサイトカインIL-10を欠損マウスでは著明に抑制されていた。この作用機序として、炎症細胞、抗体産生、およびサイトカイン・ケモカイン等を介した仕組みが示唆された。次に、浮遊細胞塊形成法を用いて扁平上皮癌細胞から癌細胞を生み出すと考えられている癌幹細胞(様)の亜集団を純化し、癌遺伝子Aktが癌幹細胞の機能発現に関わっていることを示した。さらに、腫瘍抗原やサイトカインによって腫瘍増殖を調節できることを示した。以上より、これらの事実は癌の制御を検討する上で有用であろう。

研究成果の概要(英文)：Metastasis of tumor cells into lung was increased in mice with bronchial inflammation compared with control mice, while the lung metastasis was severely reduced in IL-10-deficient mice with bronchial inflammation. The cellular and molecular mechanisms underlying these events involve inflammatory responses, antibody responses, and interaction of chemokine and chemokine receptors. Next, we enriched cancer stem cells (CSCs) from the squamous cell carcinoma cell lines using a sphere-forming assay and cell surface markers, and have demonstrated that Akt played a crucial role in the function and maintenance of CSCs. Furthermore, we demonstrated that tumor growth was prevented by preadministration of modified tumor antigen and cytokine. Thus, these findings might be important for understanding of regulation of tumor growth and metastasis.

研究分野：免疫学、腫瘍学

キーワード：扁平上皮癌 炎症 転移 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

遺伝要因と環境要因の影響の基に、口腔扁平上皮癌は複数のステップを経て自律的な細胞増殖能を獲得し、一部の癌はリンパ節や肺へ転移することが知られている。近年、癌の発生や進展における炎症反応の役割が注目されている。炎症反応はサイトカイン産生やケモカインの発現を介して、癌の発達段階の種々のステップで影響を与えていると推測されているが、その詳細については不明の点が多い。さらに、癌細胞の発生や維持における癌遺伝子や炎症反応の役割が注目されており、その解明が待たれている。

2. 研究の目的

扁平上皮癌の発生、増殖および転移は遺伝子および環境要因によって調節されている。環境要因として炎症反応に着目した。肺・気道炎症を特徴とする気管支喘息の病態をマウスレベルで解析してきたが、今回気道・肺の炎症が腫瘍の肺転移にどのような影響を与えるかを明らかにしたい。さらに、炎症反応を負に制御している IL-10 を欠損している (IL-10^{-/-}) マウスにおける腫瘍の転移機序を細胞、分子レベルで検討したい。最後に、炎症反応に種々の影響を与えていることが知られている癌遺伝子 Akt の癌幹細胞の維持および機能発現における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物の維持:

実験動物用の IL-10^{-/-} マウスを購入し、マウスは東京医科大学実験動物センターで維持された。動物実験は東京医科大学の実験倫理委員会によって承認されている。

(2) 卵白アルブミン (OVA) 投与によって誘導される気道炎症

マウスの腹腔内および鼻腔内にアレルゲンとして OVA を複数回投与することによって気道炎症を誘発した。アレルゲン投与後 24 時間目に、気道過敏、サイトカイン産生、および抗体産生能を評価した。気道過敏症は

非浸潤法を用いて計測した。

(3) 気道肺胞洗浄液の採取と分析

マウスの気道を洗浄し、その洗浄液を採取した。シスメックス自動分析計を用いて、洗浄液中のマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球などの細胞数を計測した。サイトカインレベルは自動測定装置を用いて検討した。

(4) 酵素抗体法を用いた抗体産生能の評価

アレルゲンを投与されたマウスから血液を採取し、血清を分離した。標準的なサンドイッチ法を用いて血清中の抗体レベルを測定した。

(5) フローサイトメーターを用いた細胞表面マーカーの解析

蛍光色素で標識した抗体で細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて、細胞表面分子の発現レベルを検討した。

(6) 癌幹細胞の純化および性状分析

浮遊細胞塊形成法を用いて、口腔扁平上皮癌細胞株から癌を生み出すと考えられている癌幹細胞の純化を試みた。浮遊細胞塊形成法では、細胞株を非付着性シャーレに分注し、2~3 週間培養すると、細胞塊が形成されてくる。

細胞塊から細胞浮遊液を作成し、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーを評価した。また、化学療法剤による感受性をチェックした。さらに、種々の抑制剤の存在下に浮遊細胞塊の形成を検討した。

(8) 活性化型 Akt を高発現している扁平上皮癌細胞株の樹立

活性化型遺伝子および対照遺伝子が挿入されている発現ベクターを扁平上皮癌細胞へトランスフェクトし、高発現している細胞株を純化した。Akt の発現レベルはウエスタンブロット法を用いて確認した。

(9) PI3-キナーゼ (PI3-K) 抑制剤と化学療法剤の併用による効率的な腫瘍細胞死の誘導

種々の濃度の PI3-K 阻害剤、化学療法剤、および両者の存在下に扁平上皮癌細胞を培養し、扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 気道炎症反応を有している IL-10^{-/-} マウスでは腫瘍細胞の肺転移が抑制されている

炎症反応の誘発が腫瘍の転移に与える影響を実験的に検討するため、マウスの静脈に腫瘍細胞を投与し、肺転移の有無を検討した。気管支喘息を発症している IL-10^{-/-} マウスでは、対照とする野生型マウスに比べて腫瘍の肺転移が抑制されていた。一方、気道炎症を

有している野性型マウスでは、対照とする健常マウスに比べて肺転移が増加傾向を示した。炎症反応を有しない健常マウスでは、野生型と IL-10^{-/-}マウスの間に優位の差は認められなかった。これらの結果より、気道炎症反応が腫瘍の肺転移に影響を与え、さらに IL-10 がこの肺転移を制御していることが示された。

(2) アレルゲン投与された IL-10^{-/-}マウスでは炎症反応が亢進している。

鼻腔内にアレルゲンを投与した翌日に肺胞洗浄液を採取し、気道に浸潤している免疫細胞をカウントした。IL-10^{-/-}マウスでは肺胞に浸潤している好酸球、好中球、マクロファージなどの細胞が対照に比べて増加していたが、アレルゲン投与によりこれらの浸潤細胞はさらに増加した。IL-10^{-/-}マウスではアレルゲン投与により炎症細胞の浸潤が亢進することが明らかとなった。

(3) OVA 特異的な抗体産生

抗原特異的な抗体産生は CD4 陽性 T 細胞およびサイトカインによる調節を受けていることが知られている。OVA を投与された IL-10^{-/-}マウスでは、Th2 タイプサイトカインによって誘導される OVA 特異的な IgG1 および IgE 抗体産生が比べて亢進していた。さらに、IgG2a および IgG2b 抗体産生も増強されていた。つまり、OVA および腫瘍細胞を投与された IL-10^{-/-}マウスでは、全てのクラスの抗体産生が増強されていたことになる。

(4) 肺組織におけるケモカイン CXCL10 の発現レベルと肺転移の相関

腫瘍細胞にはケモカイン受容体 CXCR3 が発現しているので、対応するケモカインの発現と肺転移との関連性を検討した。ケモカインとは白血球の遊走を介して炎症を引き起こす物質である。

OVA 誘導性のアレルギー喘息を発症している IL-10^{-/-}マウスに腫瘍を投与されたグループでは、対照グループに比べて CXCL10 発現レベルの低下が観察された。つまり、CXCL10 発現レベルと肺転移が相関することから、ケモカイン・ケモカイン受容体相互作用が腫瘍細胞の肺転移に関わっていると推測された。

IL-10^{-/-}マウスにアレルゲンを投与すると、Th2 サイトカインを主体とする気管支喘息反応が亢進する。また、アレルゲン投与によって誘導される気管支喘息マウスでは腫瘍の肺転移が亢進していることから、OVA 誘導性気管支喘息が増悪している IL-10^{-/-}では、肺転移が亢進すると予想した。しかしながら、アレルゲン誘導性の気管支喘息が亢進している IL-10^{-/-}マウスでは、対照に比べて腫瘍の肺転移が著明に減弱していた。

炎症反応が転移に与える細胞・分子機序として次のような仕組みが推測された。CD4 陽

性 Th1 細胞が IFN- γ を産生すると、次に IFN- γ がケモカイン CXCL-10 の発現を誘導し、Th1 細胞をリクルートし、正の増幅回路が作動する。さらに、IFN- γ は CD8 陽性キラー T 細胞の分化・成熟を促す。気道炎症を有している IL-10^{-/-}マウスでは、腫瘍細胞に対して特異的に作用する CD8 陽性キラー T 細胞の割合は対照に比べて低かった。

以上の事実より、腫瘍細胞は免疫細胞の遊走の際に用いられているケモカイン・ケモカイン受容体相互作用をハイジャックし、原発巣から異なる場所へ転移しているものと推測された。炎症反応は炎症細胞の誘導およびサイトカイン産生などを介して、腫瘍細胞の転移に影響を与えていると考えられる。これらのループ形成に介入することができる薬剤を適切に使用することによって、癌の転移を制御することが可能になると期待できる。

(5) 扁平上皮癌幹細胞の純化

癌を生み出すと見なされている癌幹細胞は転移や化学療法剤に対する抵抗性の獲得などに関わっていると推測されている。癌細胞から癌幹細胞を浮遊細胞塊形成法によって純化し、フローサイトメーターを用いて細胞表面分子を検討したところ、CD24 陰性 CD44 陽性であった。この細胞集団は対照細胞群に比べて、化学療法剤処理に対して抵抗性を示した。以上より、CD24 陰性 CD44 陽性細胞亜集団は癌幹細胞(様)細胞であると結論できる。

(6) 浮遊細胞塊形成における PI3-K および Akt シグナル伝達経路の役割

種々の抑制剤を添加し、扁平上皮癌細胞の浮遊細胞塊形成を検討したところ、PI-3K の抑制剤によって浮遊細胞塊形成が阻害された。

PI3-K および Akt シグナル伝達系の浮遊細胞塊形成に及ぼす影響をさらに検討するために、活性化型 Akt を高発現している扁平上皮癌細胞株を樹立したところ、浮遊細胞塊形成が促進されていた。すなわち、PI-3K/Akt シグナル伝達経路が癌幹細胞の形成・維持に関わっていると推測された。

(7) PI-3K 阻害剤と化学療法剤の併用による効率的な細胞破壊効果

PI-3K/Akt シグナル伝達経路が癌幹細胞の生成・維持に関わっていると推測されたことから、PI3-K 阻害剤と化学療法剤の併用療法を検討した。併用療法により、対照群に比べて効率よく腫瘍の増殖を阻害できたことから、両者の併用療法は有効な治療法として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Harada M, Kato Y, and Mizuguchi J. (2015) Vaccination with OVA-bound nanoparticles enhancing IL-7 inhibits the growth of OVA-expressing E.G7 tumor cells in vivo. *Oncol Rep* 33:292-6 (査読あり) DOI:10.3892/or.2014.3603

Toyota H, Sudo K, Kojima K, Yanase N, Nagao T, Takahashi RH, Iobe H, Kuwabara T, Kakiuchi T, and Mizuguchi J. (2015) Thy28 protects against anti-CD3-mediated thymic cell death in vivo. *Apoptosis* 20:444-54 (査読あり) DOI: 10.1007/s10495-014-1082-0

Yanase N, Toyota H, Hata K, Yagyu S, Seki T, Harada M, Kato Y, and Mizuguchi J. (2014) OVA-bound nanoparticles induce OVA-specific IgG1, IgG2a, and IgG2b responses with low IgE synthesis. *Vaccine* 32:5918-24 (査読あり) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.08.059>

Takada E, Furuhashi M, Nakae S, Ichijo H, Sudo K, and Mizuguchi J. (2013) Requirement of apoptosis-inducing kinase 1 for the induction of bronchial asthma following stimulation with ovalbumin. *Int Arch Allergy Immunol* 162:104-14 (査読あり) DOI: 10.1159/000353240

Hata K and Mizuguchi J. (2013) Arginine methylation regulates antibody responses through modulating cell division and isotype switching in B cells. *Microbiol Immunol* 57:185-92. (査読あり) DOI:10.1111/1348-0421.12019

Chiba Y, Mizoguchi I, Mitobe K, Higuchi K, Nagai H, Nishigori C, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. (2013) IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanoma and inhibits their growth in the cooperation with a TLR agonist poly(I:C) partly in a TRAIL-dependent manner. *PLoS One* 8:e76159 (査読あり) DOI: 10.1371/journal.pone.0076159

Toyota H, Jiang XZ, Asakura H, and Mizuguchi J. (2012) Thy28 partially prevents apoptosis induction following engagement of membrane immunoglobulin in WEHI-231 B lymphoma cells. *Cell Mol Biol Lett* 17:36-48 (査読あり) DOI: 10.2478/s11658-011-0034-8

Yanase N, Hayashida M, Kanetaka-Naka Y, Hoshika A, and Mizuguchi J. (2012) PKC-delta mediates interferon-alpha-induced apoptosis through c-Jun N-terminal kinase activation. *BMC Cell Biol* 13:7-15 (査読あり) DOI:10.1186/1471-2121-13-7

〔学会発表〕(計9件)

Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Harada M, and Mizuguchi J. (2014) Nanoparticles function as adjuvant to enhance anti-tumor immune response as well as humoral antibody response in vivo. 第43回日本免疫学会総会学術総会 12月10-12日(京都)

Takada E, Furuhashi M, Sudo K, Nakae S, Shimo K, and Mizuguchi J. (2014) Decreased OVA-induced asthma response mediated by the induction of regulatory B cells in JNK2-deficient mice. 第43回免疫学会総会学術集会 12月10-12日(京都)

Mizuguchi J, Toyota H, Yanase N, Yoshimoto T, Harada M, and Kato Y. (2014) Antigen on nanoparticles enhances anti-tumor immune responses as well as humoral antibody responses. 4th International Conference on Vaccine & Vaccination November 24-26 (Valencia, Spain)

Chiba Y, Mizoguchi I, Hisada M, Tsuchida A, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. (2014) Regulation of anti-tumor immune responses through differentiation and mobilization of hematopoietic stem cells by IL-27. 第73回日本癌学会学術総会 9月25-27日(横浜)

Hata K, Yanase N, and Mizuguchi J. (2013) Participation of arginine methyltransferase 1 in B cell development and differentiation. 第42回日本免疫学会総会学術集会 12月11-13日(千葉)

Yoshimoto T, Mizoguchi I, Hisada M, and Mizuguchi J. (2013) New approach for DC-mediated cancer vaccine using IL-27-expanded myeloid progenitor cells. 第72回日本癌学会学術総会 10月3-5日(横浜)

Toyota H, Yanase N, and Mizuguchi J. (2012) Thy28 regulates anti-CD3-induced thymocyte death in vivo. 第41回日本免疫学会総会学術集会 12月5-7日(神戸)

Shimizu M, Mizoguchi I, Mizuguchi J, and Yoshimoto T. (2012) Induction of nitric oxide by macrophages stimulated with IL-27 and lipopolysaccharide through STAT1, NF-kappaB and MAPKs. 第41回日本免疫学会総会学術総会 12月5-7日(神戸)

Takada E, Furuhashi M, Katahira T, Sudo K, and Mizuguchi J. (2012) Regulation of JNK2 in the induction of ovalbumin-induced bronchial asthma in mice. 第41回日本免疫学会総会学術総会 12月5-7日(神戸)

〔図書〕(計 件)
〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水口 純一郎 (MIZUGUCHI, Junichiro)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：20150188

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高田 栄子 (TAKADA Eiko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：50110903

里見 貴史 (SATOMI Takafumi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70276921

矢那瀬 紀子 (YANASE Noriko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10210303

秦 喜久美 (HATA Kikumi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：30287156

豊田 博子 (TOYOTA Hiroko)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80468660

古畑 昌枝 (FURUHATA Masae)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：90468661

片平 高史 (KATAHIRA Takashi)

東京医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：20626642