

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791960

研究課題名(和文) 微小環境からみた遅発性リンパ節転移巣形成機構の解明

研究課題名(英文) Role of tumor microenvironment in formation of late-onset lymphnode metastasis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞は、進行癌に至る過程で、炎症細胞、線維芽細胞といった様々な癌細胞以外の細胞との相互作用により新たな形質を獲得していると考えられる。本研究では、癌細胞と周囲細胞の相互作用の解析に有効な病態モデルとして、自然発生腫瘍に近似した化学発癌による舌扁平上皮癌形成モデルを確立した。本研究において同時に作製した基底細胞特異的蛍光タンパク発現遺伝子改変マウスを、この発癌モデルに使用することで蛍光タンパクを発現する癌細胞と様々な間質細胞との相互作用が解析可能となる。またヒト組織を用いた解析においては、癌細胞と腫瘍内マクロファージが接触することで浸潤転移に関わる形質が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer cells are exists with various non-cancerous stromal cells including in inflammatory cells, and fibroblasts, and such stromal cells are referred as tumor microenvironment. It is thought that the cancer cell acquires some malignant phenotype through the cancer cell-stromal cell interactions in the microenvironment. To obtain the new material to evaluate the cancer cell-stromal cell interactions in the mouse model, we created the modified carcinogenesis model using chemical carcinogen. We also created the transgenic mouse that expresses fluorescent protein in the basal cells. Using this transgenic mouse in the carcinogenesis mouse model, it would be able for us to obtain the fluorescence protein expressing abnormal cells. In the immunohistochemical study using human tongue cancer tissue specimens, we revealed the up-regulation of invasion related protein in the cancer cell-macrophage direct interaction.

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 舌癌 マクロファージ 癌微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

癌は癌細胞を取り巻く、線維芽細胞、炎症細胞、血管といった多彩な細胞により形成される癌微小環境中に存在しており、様々な細胞群が癌の形成、維持、進展に関与している。近年、癌細胞自身を標的とする化学療法に加え、血管新生といった微小環境を標的とする化学療法も出現し、癌微小環境における癌細胞と周囲細胞との相互作用の解明・癌の進展への関与を明らかにすることが期待される。

本研究では、口腔癌の予後不良因子であるリンパ節転移巣の形成、特に早期口腔癌の予後不良因子である遅発性リンパ節転移に注目し、癌細胞と間質細胞との相互作用を通じてリンパ節転移巣形成に及ぶメカニズムを解析することを研究当初の目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究申請後、リンパ節転移モデルを作製するにあたり、異種間移植による転移モデルでは腫瘍間質に期待される変化が起きない可能性を考え、本件研究では、自然発症した腫瘍に類似した病態モデルを作成すること、また癌細胞と間質細胞の細胞間相互作用に着目し研究すること、を目的とし、実験計画に若干の変更を加え、自然発生腫瘍に類似した(1)病態モデルの作製、ヒト組織切片、ヒト癌細胞を用いた(2)癌細胞と間質細胞との相互作用の解析、病態モデルから癌細胞の分離・採取を可能とする(3) K14GFP 遺伝子改変マウスの作製の3項目を柱として研究を行った。

### (1) 病態モデルの作製

口腔前癌病変を経て進行癌の形成に至る病変を形成する事が知られている発癌物質 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) を用いて進行癌に至る前段階である早期癌、さらにその前段階である前癌病変の獲得が可能な実験モデルを作製する。

### (2) 癌細胞と間質細胞との相互作用

癌微小環境中には多彩な間質細胞が存在するが、液性因子を介する腫瘍促進性の特性が知られているマクロファージ(腫瘍関連マクロファージ)に着目し、解析を行う。

### (3) K14GFP 遺伝子改変マウスの作製

これらの実験の際、細胞の識別、病変部からの腫瘍細胞採取を容易にする目的で、基底細胞特異的 cytokeratin-14(K14)GFP マウスを作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) 病態モデルの作製

今までの報告(Xiao-Han ら、Clinical Cancer Research, 2004)に従い、propylene glycol(Wako)を溶媒として 5 mg/ml の 4NQO(Wako)ストックを作製し、4 遮光にて保存した。1 週間に 1 度、4NQO ストックを飲料水中に希釈し 10mg/100ml 飲料水として、生後 6 週の雄マウス(C57BL/6, 日本クレア)に自由飲水として与えた。飲用開始より 16 週後に 4NQO の添加を中止し、それより 3 週間毎に Pentobarbital Sodium Salt(Wako)の過剰投与による安楽死の後、検体の採取を行った。なお、全ての動物実験は大阪大学歯学部動物実験委員会の承認のもとに行っている(動歯-24-017-0、動歯-24-028-0)。

### (2) 癌細胞と間質細胞との相互作用

#### 免疫組織化学

大阪大学歯学部附属病院において採取された 47 例の舌扁平上皮癌および 43 例の早期病変を用いて免疫組織学的検索を行った。なお、早期病変として、上皮過形成(epithelial hyperplasia)、8 例、軽度異形成(mild epithelial dysplasia)、16 例、中等度異形成(moderate epithelial dysplasia)、12 例、高度異形成(severe epithelial dysplasia)、と非浸潤癌(carcinoma in situ)、7 例を検索した。なお、臨床検体の使用に関しては大阪大学歯学部倫理委員会の承認のもと、同意書を得て使用している。免疫染色は、1 次抗体として、抗 CD163 抗体(Leica)、抗膜型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT1-MMP)抗体(Millipore)を用いた。

#### 癌細胞-マクロファージ様細胞の共培養

ヒト口腔癌細胞株(SAS)と、ホルボール 12-ミリスタート 13-アセテート(PMA、Wako)により分化させたマクロファージ様細胞株 THP-1-PMA を用いて細胞学的解析を行った。

癌細胞単独培養群、微小な孔の存在するメンブレンを用いた液性因子を介する共培養群および両細胞を混合の上、直接共培養する直接共培養群を作製した。

一定条件での培養後、両細胞は磁気的に分離し、mRNA の採取後、real time-RT-PCR 法にて解析した。

### (3) K14GFP 遺伝子改変マウスの作製

Vaezi A. らの報告(Developmental Cell, 2002: 367-381)に従い、cytokeratin-14(K14)プロモーターの下流にエンハンサーとして-globin のイントロンを、蛍光物質として EGFP 蛍光タンパクをコードする遺伝子を挿入し、遺伝子改変マウスを作製した。なお、これらの動物実験は大阪大学歯学部動物実

験委員会の承認、および大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会のもとに行っている(動歯-24-017-0、動歯-24-028-0、3316)。また遺伝子組換えマウス作製において第一世代の組換えマウス獲得までを外部受託にて作製した(ユニテック)。

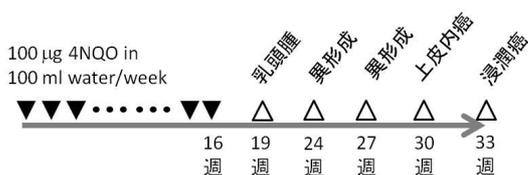
#### 4. 研究成果

##### (1) 病態モデルの作製

過去の報告に若干の変更を加え、3週間毎に標本を採取し、顕微鏡的に解析したところ、乳頭腫、異形成、上皮内癌(非浸潤癌)、浸潤癌にいたる病変の獲得が可能であった。

しかしながら、いずれの時期における病変でも、小さな範囲内に過形成-異形成-癌が連続的に発生するため、細胞採取から培養にいたるプロセスには工夫が必要であり、検討する必要があることが明らかとなった。

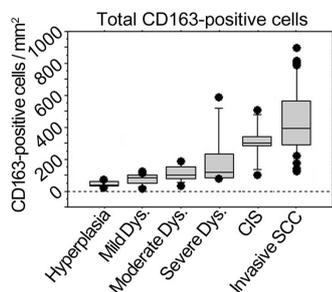
以下に本研究により明らかにすることが出来た発癌プロトコルを示す。



##### (2) 癌細胞と間質細胞との相互作用

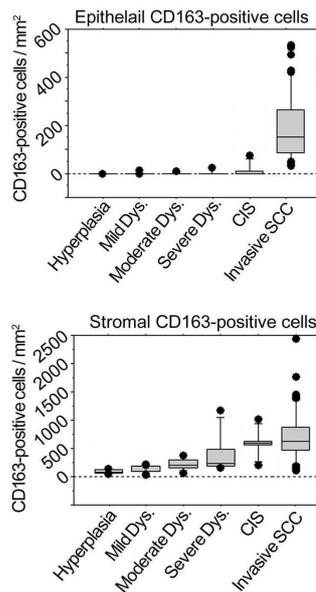
ヒト舌癌および早期病変における CD163 陽性マクロファージの出現

上皮過形成 (Hyperplasia)、軽度異形成 (Mild Dys)、中等度異形成 (Moderate dysplasia (Dys))、高度異形成 (Severe Dys)、と非浸潤癌 (Carcinoma *in situ* (CIS)) における CD163 陽性のマクロファージの出現を早期病変として、間質浸潤を伴った浸潤癌 (Invasive squamous cell carcinoma (SCC)) と比較したところ、病変の進展とともにマクロファージの出現が多く見られることを明らかにした(下図、縦軸は 1mm<sup>2</sup> における CD163 陽性マクロファージ数、横軸は病変の進展を示す)。



また異常上皮細胞とマクロファージの直接的な接触による相互作用を検討するため、上皮内(上皮とマクロファージが接触)マク

ロファージおよび、間質(上皮と接触しないマクロファージ)マクロファージを算出したところ、ほぼ浸潤癌のみで上皮内に CD163 マクロファージが出現していることが明らかになった(下図、上図は上皮内における CD163 陽性マクロファージ、下図は間質内 CD163 陽性マクロファージ数を示す。縦軸は 1mm<sup>2</sup> における CD163 陽性マクロファージ数、横軸は病変の進展を示す)。



このことは、上皮とマクロファージが接触することにより何らかの変化を癌細胞ないしマクロファージが起こしている可能性があり、かつ浸潤に関与している可能性が示唆された。

浸潤癌における CD163 陽性マクロファージの出現と腫瘍進展

近年、様々な腫瘍において腫瘍内に浸潤するマクロファージと浸潤、転移といった臨床病理学的因子との相関が報告されている。申請者は以前の研究において報告した浸潤先端において、マクロファージが多く見られるという仮説を検証するため、腫瘍全体と浸潤先端に分けて評価を行った。結果を下表に示す(上表は CD163 陽性マクロファージの浸潤と舌癌浸潤の比較、下表は CD163 陽性マクロファージと舌癌リンパ節転移との比較。Whole は腫瘍全体より無作為に抽出した部位での CD163 陽性マクロファージ数を、Invasive front は腫瘍先端での CD163 陽性マクロファージ数を示す。P < 0.05 を有意差ありと解釈。)

Evaluated area	< 5 mm (n = 27)		≥ 5 mm (n = 20)		P value
	Average	S.D.	Average	S.D.	
Whole					
Intraepithelial	69.6	208.8	82.1	47.7	0.767
Stromal	472.7	214.9	590.3	320.2	0.165
Total	281.3	98.2	319.5	119.2	0.249
Invasive front					
Intraepithelial	133.5	103.6	279.1	138.0	<0.001
Stromal	702.2	530.2	739.6	309.1	0.763
Total	360.0	194.3	545.1	170.5	0.001

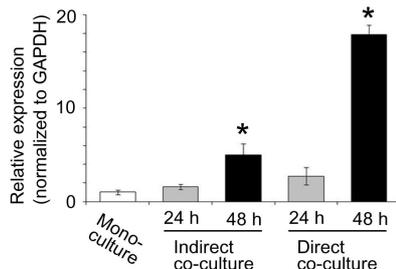
Correlation between CD163-positive cells and lymph node metastasis

Evaluated area		Negative (n = 36)		Positive (n = 11)		P value
		Average	S.D.	Average	S.D.	
Whole	Intraepithelial	76.2	181.4	70.7	50.9	0.872
	Stromal	460.4	222.9	726.8	311.5	0.020
	Total	287.3	113.8	331.1	82.8	0.175
Invasive front	Intraepithelial	172.0	138.9	272.3	111.5	0.023
	Stromal	603.1	394.1	1094.7	408.6	0.003
	Total	360.2	147.6	696.1	146.4	<0.001

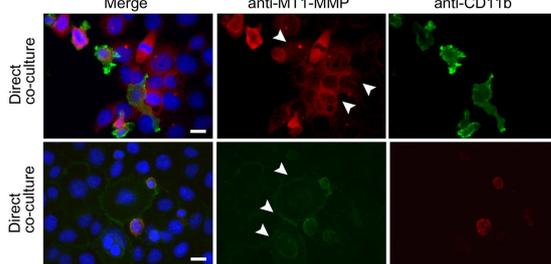
上記免疫染色の結果から浸潤先端における CD163 陽性マクロファージ数が腫瘍の浸潤、リンパ節転移に相関している事が明らかになった。更に腫瘍浸潤先端における上皮内 CD163 陽性マクロファージ数が腫瘍浸潤、リンパ節転移に関わっている可能性が示唆される。

マクロファージ様細胞と癌細胞株の直接接触による膜型マトリックスメタロプロテアーゼ発現の亢進

先の免疫組織学的検討で、マクロファージと癌細胞の接触が浸潤に関与している可能性が示唆されたため、共培養実験にて検討が可能。膜型マトリックスプロテアーゼ (MT1-MMP) の発現を、共培養実験より磁気的に分離した癌細胞より抽出した mRNA を用いて real time-RT-PCR 法にて検討した(下図、縦軸は GAPDH 遺伝子に対する MT1-MMP 発現の相対比、横軸は実験群を示す。癌細胞単独での培養(Mono-culture)、液性因子を介する共培養系 (Indirect co-culture)、癌細胞と THP-1-PMA マクロファージ様細胞とが接触可能な共培養(Direct co-culture)、灰色は培養後 24 時間、黒色は培養後 48 時間。)



Real time RT-PCR 法にて MT1-MMP 遺伝子発現の上昇が見られたため、同様の条件下で免疫組織学的検討を行った(下図)。上段は



MT1-MMP の hinge 部分に対する抗体、下段は MT1-MMP の catalytic ドメインに対する抗体を使用。マクロファージは CD11b 抗体で示す。

免疫染色の結果よりマクロファージと接触している癌細胞では MT1-MMP 発現が周囲の非接触癌細胞と比較して発現上昇を示している(上図、MT1-MMP を白矢頭で示す)。

切除切片における癌細胞とマクロファージの接触による MT1-MMP 発現の変化

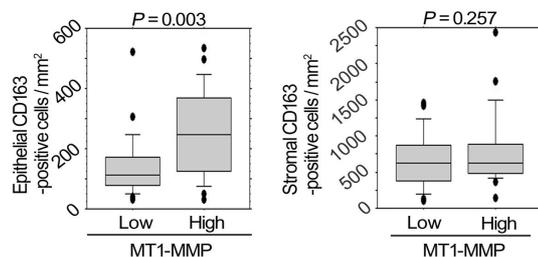
先の癌細胞株とマクロファージ様細胞株を用いた検証では、癌細胞とマクロファージの接着により癌細胞の膜に発現する MT1-MMP 発現が亢進する事が確認されたため、実際に切除切片でも同様の変化が認められるか、を検討した。

まず、CD163 抗体を用いた免疫染色に使用したうちの浸潤癌 47 例の連続切片に対して、MT1-MMP 抗体を用いて免疫染色を行った。浸潤先端を評価部位とし、浸潤胞巣に MT1-MMP 発現が見られるものを High、浸潤胞巣の辺縁のみ、あるいは発現が見られないものを Low とし、臨床病理学的因子との相関を調べたところ、浸潤先端での MT1-MMP 発現は腫瘍浸潤およびリンパ節転移と相関する事が確認された(下表)。

Correlation between MT1-MMP expression and clinico-pathological factors at the invasive front

	Low (n = 25)	High (n = 22)	P value
Differentiation			
Well (n = 32)	20	12	0.163
Moderate (n = 10)	3	7	
Poorly (n = 5)	2	3	
Depth			
< 5 mm (n = 27)	19	8	0.006
≥ 5 mm (n = 20)	6	14	
Lymph node metastasis			
Positive (n = 11)	3	8	0.049
Negative (n = 36)	22	14	

さらに、MT1-MMP 発現と CD163 陽性マクロファージの浸潤を統計学的に検討したところ、舌癌浸潤先端の上皮内における CD163 陽性マクロファージの浸潤と腫瘍胞巣における MT1-MMP 発現が相関していることが明らかになった(下図)。



以上の結果より、舌扁平上皮癌において、癌細胞は上皮内に侵入する CD163 陽性マクロファージとの接触を介して、癌細胞の MT1-MMP 発現を亢進し、腫瘍の浸潤およびリンパ節転移に関わっている可能性が示唆された。MT1-MMP は膜型マトリックスメタロプロテアーゼの一つであり、MT1-MMP の活性化を示す細胞周囲の基質分解による細胞浸潤のみならず、様々な細胞活動に関与することが知られている。今日まで、癌細胞とマクロファージの接触による癌細胞の形質

変化に関してはほとんど知られておらず、腫瘍関連マクロファージの新たな機能として今後の解析が必要である。

大阪大学・歯学部附属病院検査部・助教  
研究者番号：80444579

### (3) K14GFP 遺伝子改変マウスの作製と解析

基底細胞特異的遺伝子改変マウスにおける GFP タンパクの発現を免疫組織学的に解析したところ、GFP タンパクは口腔粘膜上皮基底細胞に発現している事が確認された。本研究の当初の予定では、作製された K14GFP 発現マウスにおいて、化学発癌により GFP 発現癌細胞を獲得予定であったが、本期間中に実験を行うことはできなかった。今後の課題とした。

## 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)

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Usami Y, Ishida K, Sato S, Kishino M, Kiryu M, Ogawa Y, Okura M, Fukuda Y, Toyosawa S.  
Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage / cancer cell adhesion.  
査読有  
133 巻, 2013 年, 5668-578 頁  
DOI: 10.1002/ijc.28066.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 宇佐美 悠,  
口腔扁平上皮癌の進展におけるマクロファージの働き、  
第 102 回 日本病理学会総会、  
2013 年 6 月 8 日、ロイトン札幌・北海道
- (2) 宇佐美 悠,  
口腔扁平上皮癌はマクロファージとの接着を介して膜型 MMP 発現を亢進する、  
第 24 回 日本臨床口腔病理学会総会・  
学術大会、  
2013 年 8 月 29 日、日本大学・東京
- (3) 宇佐美 悠,  
口腔扁平上皮癌はマクロファージとの接着を介して膜型 MMP 発現を亢進する、  
第 10 回 日本病理学会カンファレンス、  
2013 年 8 月 2 日、六甲山ホテル・兵庫

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇佐美 悠 (USAMI, Yu)