

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462684

研究課題名(和文) 舌癌動物モデルにおけるTAMの浸潤とCOX-2の関係

研究課題名(英文) Association between infiltration of TAM and COX-2 expression in the tongue cancer of mice

研究代表者

折田 頼尚(Orita, Yori-hisa)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90362970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：舌癌マウスモデルにおいて発生初期に抑制性T細胞(Treg)、interleukin 10(IL-10)が多く進行とともに減少し、transforming growth factor (TGF-)は初期に少なく進行とともに増加傾向であることがわかった。COX-2阻害薬は舌癌の発生・進行およびTregの浸潤を抑制しなかった。舌癌の治療には癌発生初期にTregを抑制することが重要だと予想された。

研究成果の概要(英文)：A mouse model of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)-induced-tongue squamous cell carcinoma (SCC) was established. The expression of Forkhead box P3 (Foxp3), interleukin 10 (IL-10), and transforming growth factor (TGF-) was determined using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). Foxp3 expression was also analyzed using immunohistochemistry. The results were compared with those of control mice and of 4NQO-treated mice treated with a Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor. Well to moderately differentiated tongue SCC was induced in all of the experimental mice. The amount of Tregs of the experimental mice was over 10 times as much as control mice at the early stage of tumor progression. COX-2 inhibitor did not prevent the progression of tongue SCC and did not reduce the total amount of Tregs. Tregs function at the early stage of the development of tongue SCC and it may be effective to suppress Tregs at the early stage of tumor progression for the treatment of tongue SCC.

研究分野：頭頸部腫瘍学、腫瘍免疫学

キーワード：舌癌 抑制性T細胞 COX-2阻害薬

1. 研究開始当初の背景

単核貪食細胞であるマクロファージは、本来抗腫瘍免疫に関わる細胞とされてきたが、近年、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages (TAMs)) の殆どが腫瘍抑制ではなく進行に寄与することが明らかとなった(1)。すなわち、抗原提示に関わる "activated" (M1) マクロファージが、ある環境下にあると癌の進行を促す "alternatively activated" (M2) マクロファージにその phenotype を変換すると言う考えである。また、抑制性 T 細胞 (regulatory T cells (Tregs)) は自己免疫を調整する働きを担い、他の免疫細胞の働きを抑制する(2、3)。その働きは自己免疫の調整には不可欠であるが、腫瘍免疫には不都合である。これまでに種々の癌において Tregs は CD8 陽性 T 細胞の抗腫瘍作用を阻害し、その癌微小環境への集積は予後不良因子と報告されてきた(4-7)。しかしながら、頭頸部癌領域においての研究は少なく、Tregs の集積が予後良好因子であるという通常とは逆の報告も散見された(8-10)。頭頸部癌領域の癌に関しての研究があまり進んでいない理由の一つとして、頭頸部癌の動物モデルが作りにくい点が挙げられた。免疫抑制マウスで発生させた癌では、それをそのまま通常のヒトに当てはめることができない。我々は、野性型マウス舌に 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) を投与することで舌癌を発生させる手法を用いた(11)。この方法で発生する舌癌は、喫煙によって生じるメカニズムに類似しており、前癌病変を経て癌へと進行していくという、通常の癌発生に近い経過をたどると言われている。また、口腔と食道にしか癌が発生しないのも実際の癌発生過程に近い状況と言える。我々は、このモデルマウスを作成し、癌の発生過程における TAM の浸潤、phenotype の変化、局所の microenvironment の観察、及び癌発生の予防・早期治療へのヒントを考

察する本研究を立案した。

2. 研究の目的

当初は舌癌動物モデルにおける TAM の浸潤をみる実験を計画した。この舌癌マウスモデルは発がん物質 4NQO の投与開始から 1クール最低 30 週を要する実験であるため、最終結果が出るまでにかなりの時間を要する。その実験の途中結果で、このモデルでは殆ど TAM の浸潤が見られず、その動向を観察することが困難であることが判明してきた。そのため、舌癌の発生・進行過程における Treg の動きを観察することにした。Cyclooxygenase (COX)-2 はプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生を誘導し、PGE2 はナイーブ CD4 陽性 T 細胞に Foxp3 (Foxp3) の発現を促し、Treg に分化させる働きがあることがわかっている(12、13)。そのため、舌癌発生過程において COX-2 阻害薬を同時投与し、癌の発生・進行、および Tregs の浸潤にいかなる影響が見られるか観察を行った。

3. 研究の方法

6 週齢の C57BL/6 マウス 80 匹を用いた。そのうち 60 匹に 4NQO を 200µg/ml で飲料水に混じり最長 20 週間まで投与しその後は純粋な飲料水を与えた。その 60 匹の発癌マウスのうち、20 匹には通常の餌を与え、40 匹には COX-2 阻害薬を混じた餌を与えた。今回用いた 20 グラム程度のマウスが一日に摂取する食事の量を 3 - 5 グラムと見積もり、62.5µg/g で COX-2 阻害薬を混じた餌 (ほぼヒト常用量に等しい) を 20 匹に、もう 20 匹には 187.5µg/g (ヒト常用量の 3 倍) の濃度で COX-2 阻害薬を混じた餌を与えた。残りの 20 匹のコントロールマウスには純粋な飲料水と通常の餌のみを与えた。この舌癌マウスモデルでは、15 週頃から severe dysplasia、20 週頃から扁平上皮癌 (SCC) が見られ、25 週ではほぼ 100% の動物に SCC が発生する。また、32 週ころか

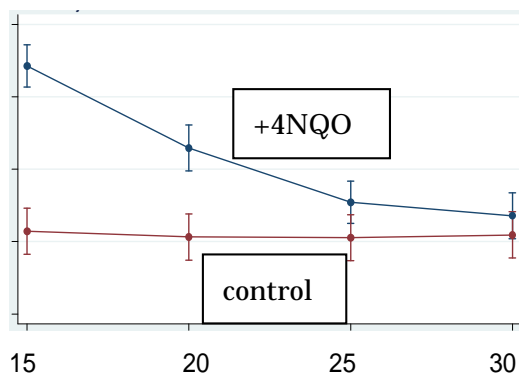
ら死亡するマウスが出始めるため、各群から 15、20、25、30 週から 5 匹ずつ無作為に取り出し屠殺し、舌組織を摘出した。舌組織の写真撮影した後正中で 2 分し、一つは 10%ホルマリンに保存、もう一つは real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR)用に 80 で保存した。ホルマリンで保存した標本はホルマリンに包埋し、3 μ m 薄切標本を作成し、まず各個体から数枚ずつ HE 染色を施行し、癌の進行具合を確認した。凍結標本は power masher ですり潰し、RNA を抽出後、Foxp3、IL-10、TGF- の RT-PCR を施行した。先ほどの薄切標本では、各標本の中心部の切片を各群から 1 枚ずつ選び、CD8、CD4、Foxp3 の免疫染色を行った。CD8 陽性細胞と Foxp3 陽性細胞の数を 200 倍(0.933mm²)の視野 5 か所でカウントし、各切片の平均値を算出した。RT-PCR の結果は、ANOVA にてまずコントロールマウスの結果と 4NQO のみ与えられたマウスの結果を比較し、続いて 4NQO のみ与えられたマウスと、2 種類の異なる濃度の COX-2 阻害薬を与えられた 2 群との比較を行った。そして CD8 陽性細胞数と Foxp3 陽性細胞数をこれら 4 群の間で比較を行った。

4 . 研究成果

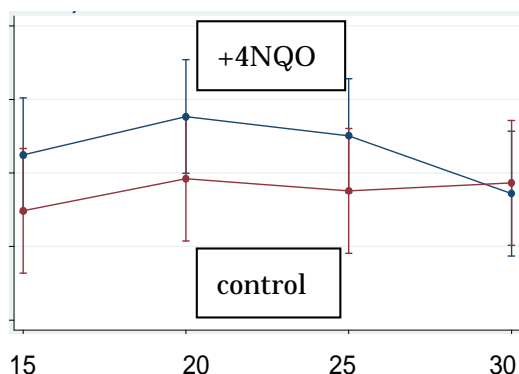
4NQO を投与されたマウスでは 10 - 15 週で moderate to severe dysplasia、15 - 20 週で severe dysplasia および SCC が、そして 25 週では 100%のマウスに SCC が発生した。COX-2 阻害薬を与えた群と与えなかった群の間で特に癌の進行具合や肉眼的な腫瘍のボリュームに差は見られなかった。RT-PCR では、癌発生初期において Foxp3 がコントロールに比べて有意に発現量が高く、癌発生・進行とともに癌マウスにおける Foxp3 の量は有意に減少した。IL-10 も同様に癌マウスにおいてコントロールマウスより多い傾向にあったが有意差は見られなかった。TGF- は癌発生初期において逆にコントロールマウスより

有意に少なく癌進行とともに増加する傾向にあった。

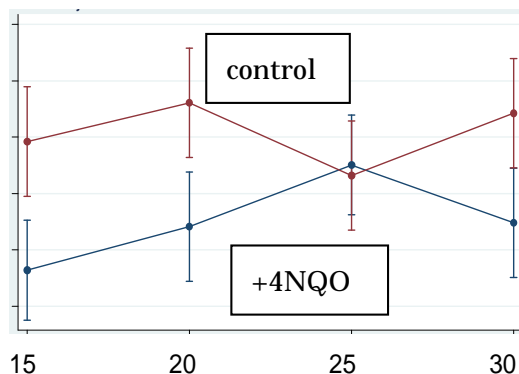
Foxp3



IL-10



TGF-



COX-2 阻害薬を投与 (投与量 2 種類) した群と投与していない群との間には有意差は見られなかった。

免疫染色において、CD8 陽性細胞はかなり少なく、1 視野に 1 個あるかないかであり、統計的解析の対象となりえなかった。Foxp3 陽性細胞は 4NQO のみ投与群で他の 3 群よりも癌発生初期に多く、進行とともに差が無くなった。Foxp3 陽性細胞は癌浸潤部尖端付近に多く見られた。

考察：今回の実験で、Treg は舌癌発生初期に

においてコントロールに比べて 10 倍以上多く浸潤していた。我々は、Treg は舌癌発生初期に発癌に大きく関わっていると予想した。ヒト舌癌切除標本における研究で Treg が多いほど予後が良い傾向にあったという過去の報告は、ひょっとするとまだ進行が初期段階にある舌癌に Treg が多かっただけかもしれないと考えた。IL-10 は MHC Class II の発現を抑制し抗原提示を弱め、腫瘍免疫を抑制すると考えられている (14)。IL-10 は Treg と腫瘍細胞の両方から分泌され (15)、Treg は癌の進行とともに減り、腫瘍は増大していくためお互いの効果が相殺し、結果として Treg よりなだらかな減少傾向をたどると考察した。TGF- β は癌の発生過程・癌の種類によって促進的に働くか抑制的に働くかその役割は変化する (16)。SCC においては、early stage の進行を抑制し、late stage の進行を助長するといわれている (17)。その機序までは不明だが、我々は何らかの作用で、舌 SCC 発生初期には TGF- β の発現が抑制され、癌の発生に好都合な環境が作られるのではないかと考えた。我々は COX-2 阻害薬の投与により Treg が減少し舌癌の進行が抑制されることを期待した (12、13)。肺癌においては COX-2 阻害薬投与により生命予後が改善する (18)。しかし、今回の実験では COX-2 阻害薬の明らかな効果は認められなかった。腫瘍防御の主たる働きをなすのが CD8 陽性 T 細胞であり、腫瘍への CD8 陽性細胞の浸潤は予後良好因子とされている (19、20)。今回の実験では CD8 陽性 T 細胞を殆ど認めなかったため検討できなかったが、これは今回のマウス舌癌モデルにあまり炎症が起きていないせいではないかと考えた。我々は今回の実験結果から、Treg は舌癌発生初期に関与し、初期段階で Treg を抑制することがそれ以上の進行を抑制することにつながるのではないかと考えた。

<引用文献>

Noy R, Pollard JW, Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy, *Immunity*, 41, 2014, 49-61

Roncarolo MG, Bacchetta R, et al, Type 1 T regulatory cells, *Immunol Rev* 182, 2001, 68-79

Weiner HL, Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182, 2001, 207-214

Curiel TJ, Coukos G, et al, Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival, *Nat Med*, 10, 2004, 942-949

Hiraoka N, Onozato K, et al, Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions, *Clin Cancer Res*, 15, 2006, 5423-5434

Katz SC, Bamboat ZM, et al, Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases, *Ann Surg Oncol*, 20, 2013, 946-955

Viguier M, Lemaitre F, et al, Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overexpressed in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells, *J Immunol*, 173, 2004, 1444-1453

Bron L, Jandus C, et al, Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma, *Int J Cancer*, 132, 2012, E85-E93

Badoual C, Hans S, et al, Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck

cancers, *Clin Cancer Res*, 12, 2006, 465-472

Shang B, Liu Y, et al, Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis, *Sci Rep*, 5, 2015, 15179

Vitale-Cross L, Czerninski R, et al, Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-targeted prevention and treatment of oral cancer, *Cancer Prev Res (Phila)*, 2, 2009, 419-422

Baratelli F, Lin Y, et al, Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells, *J Immunol*, 175, 2005, 1483-1490

Mahic M, Yaqub S, et al, FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism, *J Immunol*, 177, 2006, 246-254

Mannino MH, Zhu Z, et al, The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer, *Cancer Lett*, 367, 2015, 103-107

Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, et al, A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor- β mediates suppression in the tumor microenvironment, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 4345-4354

Massagué, J, Blain SW, Lo RS, TGF- β signaling in growth control, cancer and heritable disorders, *Cell*, 103, 2000, 295-309

Han G, Wang XJ, Roles of TGF- β signaling Smads in squamous cell carcinoma, *Cell Biosci*, 1, 2010, 41

Edelman MJ, et al, Eicosanoid modulation in advanced lung cancer: cyclooxygenase-2 expression is a positive predictive factor for celecoxib + chemotherapy-Cancer and Leukemia Group B Trial 30203, *J Clin Oncol*, 26, 2008, 848-855

Kawai O, Ishii G, et al, Predominant infiltration of macrophages and CD8+ T cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 113, 2008, 1387-1395

Naito Y, Saito K, et al, CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer, *Cancer Res*, 58, 1998, 3491-3494

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

(1) Tachibana T, Orita Y, et al, Glottic cancer in patients without complaints of hoarseness. *Head Neck*, 査読有, Suppl 1, 2016, E316-20

(2) Orita Y, Sugitani I, et al, Prospective evaluation of zoledronic acid in the treatment of bone metastases from differentiated thyroid carcinoma, *Ann Surg Oncol*, 査読有, 22, 2015, 4008-13

(3) Hirai M, Orita Y, et al, How long should we continue S-1 as adjuvant chemotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck?, *Acta Otolaryngol*, 査読有, 135, 2015, 1079-85

(4) Tachibana T, Orita Y, et al, Prognostic factors and effects of early surgical

- drainage in patients with peritonsillar abscess, J Infect Chemother, 査読有, 20, 2014, 722-5
- (5) Hanakawa H, Orita Y, et al, Yoshino T, Does HMGB1 predict occult neck lymph node metastasis in early tongue carcinoma? A case-control study of 26 patients, J Laryngol Otol, 査読有, 128, 2014, 926-31
- (6) Hanakawa H, Orita Y, et al, Yoshino T, Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma, Acta Otolaryngol, 査読有, 134, 2014, 859-64
- (7) Tachibana T, Orita Y, et al, Time-lag between symptom onset and laboratory findings in patients with subacute thyroiditis, Auris Nasus Larynx, 査読有, 41, 2014, 369-72
- (8) Orita Y, Ogawara T, et al, Leriche operation for parotid gland pathology, Acta Otolaryngol, 査読有, 134, 2014, 413-5
- (9) Hanakawa H, Orita Y, et al, Novel and simple prognostic index for nasal natural killer/T-cell lymphoma, Head Neck, 査読有, 36, 2014, 551-6
- (10) Orita Y, Sato Y, et al, Characteristic ultrasound features of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the salivary and thyroid gland, Acta Otolaryngol, 査読有, 134, 2014, 93-9

[学会発表](計 6件)

Orita Y, Marunaka H, et al, Kikuchi-Fujimoto disease; evaluation of the prognostic factors and analysis of the pathologic findings, 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dec 3-4, 2015, Tokyo, Japan

Miki K, Orita Y, Tachibana T, et al, COX-2 inhibition may suppress the Treg infiltration into tongue squamous cell carcinoma, The joint meeting of 4th congress of Asian society of head and neck oncology & 39th annual meeting of Japan society for head and neck cancer. June 3-6, 2015, Kobe, Japan

Orita Y, Tachibana T, et al, Human papillomavirus infection may be associated with local recurrence of tongue SCC in young adults, The joint meeting of 4th congress of Asian society of head and neck oncology & 39th annual meeting of Japan society for head and neck cancer. June 3-6, 2015, Kobe, Japan

折田 頼尚、三木 健太郎、橘 智靖、丸中 秀格、花川 浩之、西崎 和則、他、舌癌発症・進行過程における癌微小環境の研究、日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(第116回) 2015年、5月21~23日 (東京)

折田 頼尚、三木 健太郎、他、舌癌発生・進行過程におけるマクロファージの浸潤、日本頭頸部癌学会、(第38回) 2014年、6月12・13日 (東京)

三木 健太郎、折田 頼尚、他、舌癌発生過程における Foxp3 の発現、日本頭頸部癌学会、(第38回) 2014年6月12・13日 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

折田 頼尚 (ORITA, Yori-hisa)

岡山大学・耳鼻咽喉頭頸部外科学・講師

研究者番号：90362970