

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293431

研究課題名(和文) 口腔癌再発を導く骨髄CD11b+単球細胞の分化機構とその役割

研究課題名(英文) The role of bone marrow-derived CD11b positive cells in recurrence of oral cancer

研究代表者

來生 知 (KIOI, Mitomu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30545059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線照射後に再発する口腔扁平上皮癌において誘導される骨髄由来 CD11b+細胞がどのような分子メカニズムにおいて腫瘍内に引き込まれ、血管を形成し、さらには再発を促進しているかについて、解析を行ってきた。またヒト臨床検体を用いた免疫組織学染色において同一患者より採取した未治療と放射線治療後の再発腫瘍において解析したところ、再発腫瘍において有意にCD11b細胞とCD206細胞の含有率が高いことがわかった。これまでの結果から放射線照射後の口腔がんにおいて腫瘍内に誘導された骨髄CD11b+単球細胞がM2マクロファージに分化し血管の再形成を誘導することで再発が促進されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of infiltrating CD11b+ myeloid cells in the vascularization and recurrence of oral squamous cell carcinoma (OSCC). In a xenograft mouse model, local irradiation caused vascular damage and hypoxia in the tumor and increased infiltration of CD11b+ myeloid cells. These infiltrating cells showed characteristics of M2 macrophages (M2Ms) and are associated with the promotion of vascularization. M2Ms promoted tumor progression in recurrence after irradiation. In addition, we found that CD11b+ myeloid cells, as well as CD206+ M2Ms, are increased during recurrence after radiotherapy in human OSCC specimens. Our findings indicate that polarization of M2Ms derived from recruited CD11b+ cells into tumor after irradiation contributes vascularization leading to recurrence of OSCC.

研究分野：口腔癌

キーワード：がん微小環境

1・研究開始当初の背景

口腔癌の治療は主に化学療法、放射線療法および外科的療法で全体の5年生存率は約60%と比較的良好である。しかしながら、全体の46%を占める進行口腔癌では、手術侵襲により嚥下・構音などの機能障害や審美障害が著しいことから放射線療法、化学療法による保存療法を選択するケースが少なくない。しかし、治療技術の著しい進歩にも関わらず、治療後の再発がしばしば認められる。中でも、放射線療法後の再発症例において、その多くが照射野内からの再発であることは注目すべき点である。再発腫瘍の治療は困難になるため、治療後に再発したがん細胞の制御は口腔癌の予後を改善するために早急に克服すべき課題の一つとなっている。

悪性腫瘍において、再発の際に腫瘍血管の再生が不可欠である事が知られている。申請者は以前に、悪性腫瘍の放射線治療後に骨髓細胞が腫瘍内に取り込まれている事を発見した。中でも抗原マーカーであるCD11bを有する骨髓単核細胞群が腫瘍血管の再形成に重要である。すなわち、放射線照射後に起こる腫瘍血管の再生は、既存の血管から起こるいわゆる angiogenesis ではなく、腫瘍内に誘導される骨髓細胞中のある一群によって起こる vasculogenesis に起因する事が明らかにされた。

2・研究の目的

本研究ではそのCD11b+骨髓単核細胞に注目し、癌再発に関わる役割および多様なマクロファージ(Mφs)への分化がどのようにして腫瘍血管の再形成に関わっているのか詳細な解析を行い、新たな治療戦略の可能性を探った。

3・研究の方法

初めに、OSC-19細胞(ヒト舌扁平上皮癌細胞株)をBalb/c nudeマウスの背部皮下に移植した。腫瘍が200mm³程度に増殖した時点で局所放射線照射後12Gyを施行し

照射後再発マウスモデルを作製した。このモデルを用いて、放射線照射により生じる腫瘍微小環境化について免疫染色で検討した。放射線照射後に時系列で腫瘍を摘出し免疫組織学的解析を加えることで、CD11b+単核細胞、M1およびM2Mφsが分化・誘導されるタイミング、腫瘍血管再形成のタイミングを解析した。また担癌動物末梢血液中のCD11b発現細胞数と腫瘍増殖の関連性も示唆されている事から、口腔癌担癌マウスの骨髓及び末梢血を採取し、免疫検査(ELISA)法またはフローサイトメトリー(FACS)法により末梢血液中の下記マーカー群の定量化と経時的変化を解析した。さらにソーティングした骨髓単核細胞を培養し、サイトカインによりM1、M2Mφsに分化誘導させた後、放射線照射または抗がん剤投与直後の担癌マウスに静脈注射し、再発腫瘍への影響や血管再形成への関与を検討した。最後に口腔扁平上皮癌患者の臨床検体を用いて、同一患者の原発腫瘍と放射線治療後の再発腫瘍における骨髓細胞、Mφsの発現に関して免疫染色で検討した。

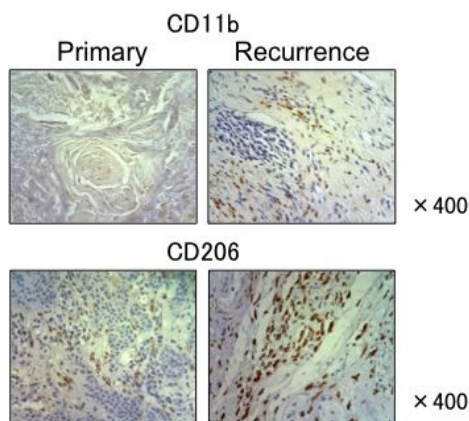
4・研究成果

放射線照射後に腫瘍内へ誘導されるCD11b⁺細胞の系統的解析を行った。CD11b抗体とF4/80, Gr-1, Tie-2, VEGFR2抗体で二重蛍光免疫染色を行ったところ、CD11b⁺F4/80⁺細胞が最も多い細胞集団であった。このことから誘導されるCD11b⁺細胞はMφs系統と深く関与していることが示唆された。腫瘍内の低酸素領域は照射2週間後より拡大し、一方でCD31⁺血管内皮細胞は有意に減少していた。その際に最もCD11b⁺細胞の腫瘍内への誘導が生じていた。これらの結果より、局所の放射線照射による血管損傷とそれによる低酸素が生じることによってCD11b⁺細胞が腫瘍内へ誘導される可能性が示唆された。

正常マウスと OSC-19 担がんマウスの末梢血および骨髄における CD11b⁺細胞の割合について FACS で検討した。その結果、共に OSC-19 担がんマウスの方が正常マウスよりも CD11b⁺細胞の割合が有意に高かった。これらの結果より、腫瘍が分泌するサイトカインやケモカインにより血球細胞だけでなく BMDCs まで変化している可能性が示唆された。

OSC-19 細胞と骨髄から誘導した M1 あるいは M2Mφs をマウスに共移植したところ、M2Mφs と共移植した腫瘍の増殖は、再発モデルで著明な腫瘍増殖の促進を認めた。BM-M2Mφs は特に放射線照射により周囲の血管内皮細胞が死滅した環境において、血管形成を促し腫瘍原性を高めていることが示唆された。

続いて、口腔扁平上皮癌患者の放射線治療前後の病理検体を用いて免疫染色を行ったところ、マウスモデルと同様に放射線治療後の再発腫瘍において CD11b⁺骨髄細胞の有意な増加を認めた。さらに CD206⁺マクロファージ (M2Mφs) の再発腫瘍内での増加を認めた。



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)

Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, Taniguchi H and Tohna I. M2-polarized macrophages contribute to

neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation, *Sci Rep*, 6:27548, 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

Kioi M: Recent advances in molecular-targeted therapy for oral cancer. Symposium, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong, 2017, 3-4.

Kioi M: M2-Polarized Macrophages Contribute to Neovasculogenesis, Leading to Relapse of Oral Cancer Following Radiation. Symposium, 10th World Cancer Congress, Barcelona, Spain, 2017, 5.

來生 知. 口腔癌再発・転移に関わる微小環境変化と骨髄細胞の役割. ワークショップ. 第34回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 横浜, 2016, 1.

來生 知. 口腔癌新規治療法の開発 微小環境ニッチを標的として. 第71回日本口腔科学会学術集会, 指名報告, 愛媛, 2017, 4.

大久保牧子, 來生 知, 中島英行, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 光藤健司, 藤内 祝: 口腔癌再発を導く骨髄 CD11b⁺単球細胞の分化機構とその役割. 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 千葉, 2016, 11.

大久保牧子, 來生 知, 杉浦 圭, 飯坂友宏, 吉井 遥. 光藤健司, 藤内 祝: 口腔癌の放射線治療後の再発に関わる骨髄 CD11b⁺細胞の役割とメカニズムの解明. 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 福岡, 2017, 1.

大久保牧子，來生 知，杉浦 圭，飯坂友宏，吉井 遥．光藤健司，藤内 祝：放射線療法後の微小環境ニッチにおける骨髄細胞の役割 第 71 回日本口腔科学会学術集会，愛媛，2017，4．

大久保牧子，來生 知，杉浦 圭，飯坂友宏，吉井 遥．光藤健司，藤内 祝：口腔癌再発に関わる骨髄 CD11b 陽性単球細胞とバイオマーカーとしての検討．第 41 回日本頭頸部癌学会，京都，2017，6．

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6・研究組織

(1)研究代表者

來生 知 (KIOI, Mitomu)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：30545059

(2)研究分担者

藤内 祝 (TOHNAI, Iwai)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50172127

谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70292555

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者 該当なし