

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462998

研究課題名(和文) 免疫抑制性細胞を標的とした口腔癌顎骨浸潤に対する新たな治療戦略の開発

研究課題名(英文) Therapeutic strategy against bone invasion by oral squamous cell carcinoma targeting immunosuppressive cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌組織における、制御性T細胞(Treg)を介した破骨細胞分化の制御機序を解析するため、マウス扁平上皮癌細胞株SCCVIIと同種マウスC3H/HeNを用いたマウス口腔癌モデルを用い解析を行った。その結果、1.腫瘍組織では、CD4陽性T細胞中にFoxP3陽性のTregが、50%以上の割合で浸潤していた。2.腫瘍組織から分離したTregは、骨髄前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制した。3.腫瘍際に浸潤していたTregは、細胞表面上にCTLA-4を強発現していた。4.腫瘍内のTregを介した破骨細胞分化抑制には、CTLA-4が重要な役割を果たしていたことが、中和抗体を用いた実験で確認された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the mechanism of interaction between Tregs and osteoclasts in a murine model of oral cancer to elucidate the role of Tregs in the bone invasion of oral cancer. SCCVII mouse oral squamous cell carcinoma cells were administered into the C3H/HeN mouse. Tregs were purified from the tumors and cocultured with bone marrow CD11b+ cells in the absence or presence of RANKL and M-CSF for 4 days. Secreted tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 5b was determined as a marker of osteoclast number. Results: Attenuation of osteoclast-derived TRACP5b was observed in the coculture of tumor derived Tregs and bone marrow CD11b positive cells, and this attenuation of TRACP5b was ameliorated by neutralization of CTLA-4. Conclusions: These results indicate that Tregs may play a protective role in bone invasion of oral cancer via suppression of osteoclast differentiation, and CTLA-4 may be a key regulator for the suppression of osteoclasts by Tregs in oral cancer.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 免疫抑制性細胞 抗腫瘍免疫 マウスモデル

### 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜に発生した扁平上皮癌は、早期に顎骨へと浸潤する。このため、顎骨を含めた顎口腔領域の広範な切除による極めて侵襲の高い治療が必要とされることが多く、顎口腔領域の器官や機能を大きく損なうという問題がある。そこで、口腔癌においては、顎骨浸潤のメカニズムに着目した研究による新たな治療戦略の開発が重要と考えられるが、口腔癌の顎骨浸潤については、いまだに解明されていない点が多い。

### 2. 研究の目的

申請者らは、口腔扁平上皮癌組織における顎骨浸潤のメカニズムを破骨細胞分化と免疫応答という観点から解明することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

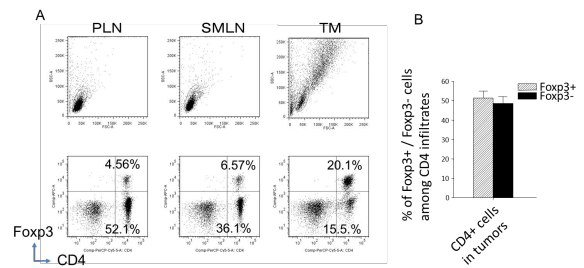
口腔扁平上皮癌組織における、制御性T細胞 (Treg) を介した破骨細胞分化の制御機序を解析するため、マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII と同種マウス C3H/HeN を用いたシンジェニックマウス口腔癌モデルを用い、担癌マウスより腫瘍組織、所属リンパ節や末梢リンパ節、脾臓などの組織を採取し、セルソーティングおよび磁器分離により各種免疫細胞を分離回収し in vitro での実験系による免疫学的解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 腫瘍組織では、CD4 陽性 T 細胞中に Foxp3 陽性の Treg が、50% 以上の割合で浸潤していた。

C3H/HeN マウスに SCCVII を移植し、移植後 14 日目の SCCVII 担癌マウスの末梢リンパ節 (PLN) 腫瘍灌流リンパ節 (SMLN) 腫瘍組織 (TM) における CD4 陽性細胞中の Foxp3 陽性細胞の割合をフローサイトメト

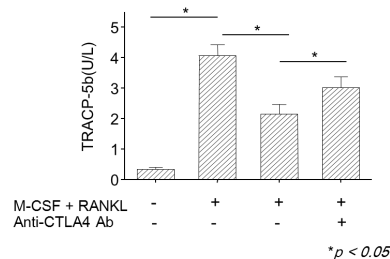
リーで解析した結果を以下に示す。



( PLN:リンパ節 SMLN:腫瘍灌流リンパ節  
TM:腫瘍組織 )

(2) 腫瘍組織から分離した Treg は、骨髄前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制した。また、腫瘍内の Treg を介した破骨細胞分化抑制には、CTLA-4 が重要な役割を果たしていたことが、中和抗体を用いた実験で確認された。

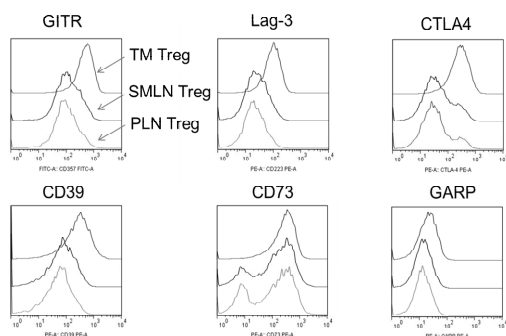
SCCVII 担癌マウスの腫瘍組織より Treg を磁気分離し、骨髄より分離した CD11b 陽性の前駆細胞と共培養し、CD11b 細胞からの破骨細胞への分化について TRACP5b を指標として評価した。グラフは左から、CD11b 単独群、M-CSF、RANKL 存在下での CD11b 単独群、腫瘍由来 Treg との共培養群、腫瘍由来 Treg との共培養に CTLA-4 の中和抗体を添加群。



(3) 腫瘍際に浸潤していた Treg は、細胞表面上に CTLA-4 を強発現していた。

SCCVII 移植後 14 日目の担癌マウスのリンパ節 (PLN) 腫瘍灌流リンパ節 (SMLN) 腫瘍組織 (TM) における CD4 陽性細胞中の Foxp3 陽性細胞の割合をフローサイトメト

腫瘍組織 ( TM ) における CD4 陽性細胞中の Foxp3 陽性細胞上における様々な分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍組織の Treg では、末梢リンパ節、腫瘍灌流リンパ節のものに比べて、GITR、Lag-3、CTLA-4、CD39、CD73、GARP の発現が増強していることが確認された。



以上の結果から、口腔癌腫瘍局所においては Treg が著しく増加傾向を示し、破骨細胞分化の抑制において中心的な役割を果たし、さらに CTLA-4 がその抑制機序にとって重要な役割をはたしていることが示唆される結果であった。

#### 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 4 件 )

- 1 . Takashina M, Inoue S, Tomihara K, Tomita K, Hattori K, Zhao QL, Suzuki T, Noguchi M, Ohashi W, Hattori Y. Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells. *Int J Oncol.* 2017;50:787-97.
- 2 . Fuse H, Tomihara K, Heshiki W, Yamazaki M, Akyu-Takei R, Tachinami H, Furukawa K, Sakurai K, Rouwan M, Noguchi M. Enhanced

expression of PD-L1 in oral squamous cell carcinoma-derived

CD11b(+)Gr-1(+) cells and its contribution to immunosuppressive activity. *Oral Oncol.* 2016;59:20-9.

- 3 . Inoue S, Arai N, Tomihara K, Takashina M, Hattori Y, Noguchi M. Extracellular Ca(2+)-dependent enhancement of cytotoxic potency of zoledronic acid in human oral cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:44-54.
- 4 . 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;50:457-67.

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

- 1 . Noguchi M, Tomihara K. CTLA4-mediated inhibition of osteoclastogenesis by regulatory T cells (Tregs) in oral cancer. 12th Asian congress on oral and maxillofacial surgery, 2016, Nov 12, Manila, Philippines.
- 2 . Noguchi M, Tomihara K. Oral cancer-induced regulatory T cells (Tregs) suppress osteoclast differentiation. International conference on oral, mouth and throat cancer, 2016, Aug 15-17, Portland, USA.

- 3 . Tomihara K, Noguchi M. PD-L1 expression in oral cancer-derived myeloid derived suppressor cells (MDSC) and its contribution to immunosuppressive activity. International conference on oral, mouth and throat cancer, 2016, Aug 15-17, Portland, USA.
- 4 . Noguchi M, Tomihara K. CTLA-4-mediated inhibition of osteoclastogenesis by regulatory T cell (Tregs) in oral cancer. 11th Asian congress on oral and maxillofacial surgery, 2014, Aug 22-25, Xian, China.
- 5 . Tomihara K, Arai N, Noguchi M. Chemotherapy induces phenotypic alteration of tumor cells that facilitate antitumor T cell responses in a mouse model of oral cancer. 11th Asian congress on oral and maxillofacial surgery, 2014, Aug 22-25, Xian, China.
- 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 (医学)・教授  
研究者番号 : 50208328