

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463024

研究課題名(和文) 腫瘍関連マクロファージによる口腔癌の顎骨浸潤メカニズムの解明と新たな治療法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of tumor associated macrophage in mandibular bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells and a research for new treatment

研究代表者

里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)

東京医科大学・医学部・臨床准教授

研究者番号：70276921

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)：サイトカインのcolony stimulating factor-1(CSF-1)は、腫瘍関連マクロファージ(TAM)の進化や分化を促す重要な因子であり、CSF-1 receptor(CSF-1R)のターゲット薬は、癌においてTAM活性を制御する。CSF-1R阻害剤投与では、腫瘍増殖は抑制せず、mTORとの併用投与で腫瘍増殖の抑制がみられた。口腔癌の顎骨浸潤部で、mTORはVEGFRのmRNA量を減少させ、CSF-1R阻害剤は、RANKLやCSF-1RのmRNA量を減少させ、破骨細胞数を減少させた。CSF-1R阻害剤は、mTORと併用することで新たな顎骨浸潤の治療に応用可能であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cytokine colony stimulating factor-1(CSF-1) is an important factor of tumor associated macrophage (TAM) recruitment and differentiation and several pharmacological agents targeting the CSF-1 receptor (CSF-1R) have been developed to regulate TAM in solid cancers. Although single CSF-1R inhibition only modestly delayed tumor growth, combination with mTOR promoted the control of tumor outgrowth. The mTOR decreased VEGFR mRNA expression and the mRNA expressions RANKL and CSF-1R decreased in CSF-1R inhibition in bone invasion by oral squamous cell carcinoma (OSCC). CSF-1R inhibition can suppress osteoclast mediated bone invasion by OSCC. We suggest that combination treatment of mTOR with CSF-1R inhibition might be expected to be a therapeutic target to prevent bone invasion by OSCC. Our data support further development of treatments combining mTOR with TAM targeting agents.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎骨浸潤 腫瘍関連マクロファージ 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の増殖浸潤によって引き起こされる顎骨の骨破壊において、癌細胞は破骨細胞の分化や骨吸収を直接的、間接的に促進する。破骨細胞による骨吸収は癌増殖に必要な物理的空間を供給し、また同時に骨に含まれる様々なサイトカインや成長因子を放出する。一方、顎骨破壊部の血管新生は、癌細胞に酸素や栄養を供給すると共に、癌細胞の播種経路となり、癌細胞の増殖・浸潤を強力に促進する。しかし、現状では顎骨の骨破壊における血管新生と破骨細胞分化・骨吸収の間の相互作用については未だ解明されていない。

一般的にマクロファージは、炎症応答ネットワークのなかで免疫を活性化する M1 型と抑制する M2 型の二極に分化することが知られている。近年、腫瘍微小環境内で単球が癌細胞の産生した colony stimulating factor-1(CSF-1)や IL-4, IL-10, IL-13 などにより、M2 マクロファージに分化し、癌細胞の遊走・増殖などの悪性進展に深く関与する腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) に変化するとされている。CSF-1 receptor(CSF-1R)は TAM 表面に CD115 として発現しており、CSF-1 をリガンドすることで TAM が活性化する。TAM は、NF- κ B や IL-1、TNF- α などを発現し、腫瘍の Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現を up-regulate し腫瘍血管新生を促進する。また、別経路で COX-2 を発現させ、プロスタノイドである PGE2-EP3-EP4 を介して VEGF を発現し、血管新生を促進するとも言われている (Watari et al. Biochem Biophys Res Commun 2008)。近年の知見で TAM は血管新生だけではなく、リンパ管新生も確認されており、TAM の過剰発現は腫瘍微小環境の形成を促進し、予後不良と報告されている (Fujiwara et al. Am J Pathol 2011)。Ewing 肉腫ファミリーにおいて、TAM による VEGF の過剰発現は、腫瘍

血管新生と骨破壊を促進し、さらに TAM 自身も破骨細胞に分化することによって、骨浸潤・破壊を強力に促進していたとも報告されている (Fujiwara et al. Am J Pathol 2011)。そこで、血管新生や破骨細胞の分化/骨吸収の相互作用に密接に関連すると考えられる TAM の役割とその腫瘍性骨破壊部における微小環境の病態を詳細に解明し、TAM の分化誘導を抑制する colony stimulating factor-1 (CSF-1) / CSF-1 receptor (CSF-1R) シグナルによる新たな顎骨浸潤・骨破壊に対する新たな治療法の開発に必要な分子細胞生物学的基盤を構築する。

2. 研究の目的

口腔癌の顎骨浸潤部微小環境内において、TAM と癌細胞の血管新生や破骨細胞分化・骨吸収の相互作用を解析する。TAM 表面に、CSF-1R は CD115 として発現しており、TAM 活性制御は、CSF-1 / CSF-1R シグナルをブロックすることである。従って CSF-1R 阻害剤は、TAM 活性を down-regulate させ、腫瘍血管の新生を抑制し、癌細胞の増殖・浸潤を抑制する。また、CD115 は前破骨細胞にも発現していることから、CSF-1R 阻害剤は前破骨細胞から成熟破骨細胞への分化も同時に抑制し、骨破壊を直接的に阻止すると考えられる。

本研究は、TAM の分化誘導を抑制する CSF-1 / CSF-1R シグナルによる顎骨浸潤・骨破壊に対する新たな治療法の開発を目指す研究である。口腔癌顎骨浸潤における細胞性因子として TAM、液性因子では VEGF が腫瘍性骨破壊を制御する重要な因子であると推測しており、今回、細胞性因子とし TAM 活性を阻害する CSF-1R 阻害剤と液性因子では VEGF 活性を抑制し、血管内皮細胞の増殖を抑制する mTOR を併用投与し、顎骨骨破壊における血管新生の強力な抑制と破骨細胞分化・骨吸収の抑制をもたらす新たな治療法の開発を目的にした研究である。

3. 研究の方法

(1) 2種類のマウス扁平上皮癌の比較

マウス扁平上皮癌である NR-S1 細胞株と SCCVII細胞株を Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)に 10% fetal bovine serum (FBS)とペニシリン G 100U/mlとストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えた培地を用いて、37°C 5%CO₂ の条件下で培養して、PTHrP mRNA の発現量を比較検討した。

(2) マウス扁平上皮癌移植の顎骨浸潤モデルの作製と薬物投与

体重 20g 前後の雄性 C3H/HeN マウスに、SCCVII細胞を 1×10^7 cells/ml に調整した SCCVII細胞をマウスの左側咬筋内に 0.1ml 注入し、3 週間通常飼育を行った。実験動物の取り扱いは東京医科大学動物実験指針に従った。

・ mTOR (Rapamycin) 投与

mTOR 10mg/kg を腫瘍移植後 2 日目から 12 日間の腹腔内投与を行った。

・ CSF-1R inhibitor (PLX3397) 投与

CSF-1R inhibitor (PLX3397) を 20mg/kg に調整した 0.1ml 懸濁液として腫瘍移植後 2 日目から 12 日間の経口投与を行った。

同様に Control 群は生理食塩水を腫瘍移植後 2 日目から 12 日間投与した。実験群は、control 群(n=10)、mTOR 投与群(n=10)、CSF-1R inhibitor 投与群(n=10)、mTOR + CSF-1R inhibitor 投与群(n=10)とした。

(3) 抗腫瘍効果

経時的な体重変化と腫瘍体積を算出した。腫瘍体積は(長径) × (短径)² × 0.5 で求めた。

(4) 病理組織学的検討と破骨細胞数、破骨細胞関連サイトカインの mRNA の発現解析

通法の H-E 染色および Tartrate-Resistant Acid Phosphatases (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色は 10% EDTA 水溶液で脱灰した後パラフィン包埋し、TRAP Kit (和光純薬社製) を用い

て行った。その後、画像解析システム (Tissue Studio Ver3.5; Definiens 社製) を用いて顎骨浸潤部における破骨細胞数を計測した。また、抗マウス mTOR, RANKL, CSF-1R, CD163 (TAM, M2 マクロファージ)モノクローナル抗体と LSAB kit (DAKO 社製) を用いて免疫組織化学的染色を行った。その後、RANKL, osteoprotegerin, CSF-1R, VEGFR, GAPDH の mRNA の発現量を real-time PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) 2種類のマウス扁平上皮癌のPTHrP mRNAの発現量

マウス扁平上皮癌である NR-S1細胞株と SCCVII細胞株を培養して、PTHrP mRNAと COX-2 mRNAの発現量を比較検討した結果、NR-S1細胞株はSCCVII細胞株より、約3倍の PTHrP mRNAを発現した。(図1) 以上より、PTHrP mRNAの発現が少ないSCCVII細胞株をin vivoのマウス顎骨浸潤モデル実験に使用することにした。(図1)

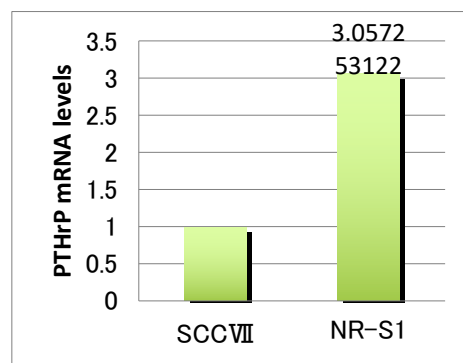


図1 PTHrP mRNA発現

(2) 体重変化と抗腫瘍効果

体重変化に関して、各実験群間において有意差は認められなかった。(図2)

腫瘍体積は、移植15日目の平均でControl群 2442.04 mm³、mTOR投与群 1070.16 mm³、CSF-1R inhibitor群 2012.26 mm³、mTOR + CSF-1R inhibitor投与群 1681.68 mm³であった。

CSF-1R inhibitor を投与した群においては、腫瘍増殖の抑制効果はみられず、mTOR 投与した群において抗腫瘍効果が認められた。
(図3)

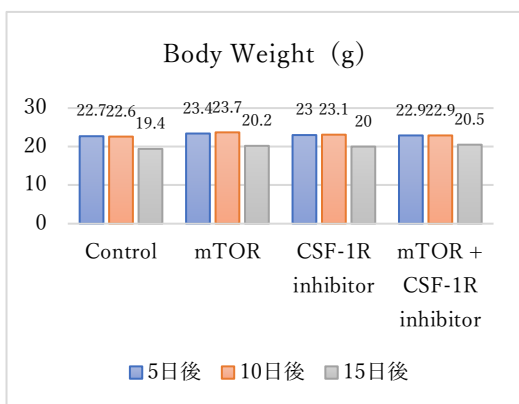


図2 各群の体重変化

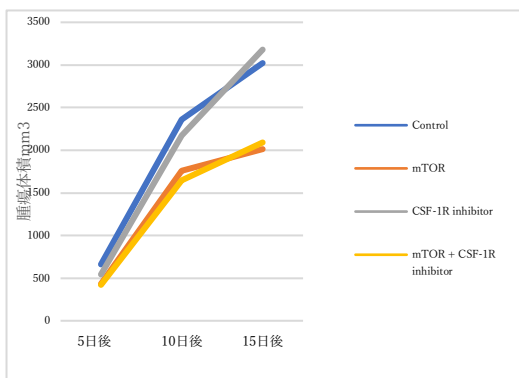


図3 各群の腫瘍体積

(3) 病理組織学的検討と破骨細胞数および破骨細胞関連サイトカインの mRNA 量
病理組織学的所見では、すべての腫瘍移植群で顎骨内に腫瘍細胞が索状に浸潤し、鋸歯状の骨吸収像を示していた。TRAP 染色による破骨細胞数 (破骨細胞数/62500 μ m²) を比較すると Control 群 15.13 cells、mTOR 投与群 11.17 cells、CSF-1R inhibitor 群 4.25 cells、mTOR + CSF-1R inhibitor 投与群 3.11 cells であった。CSF-1R 阻害剤投与した群で破骨細胞数が減少した。(写真1) (図4)

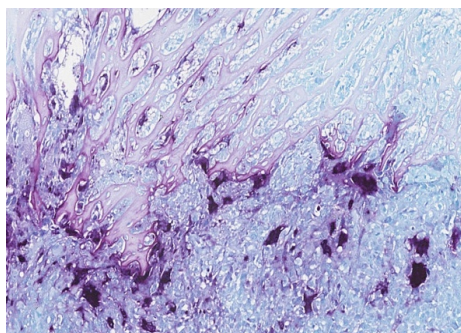


写真1 TRAP染色

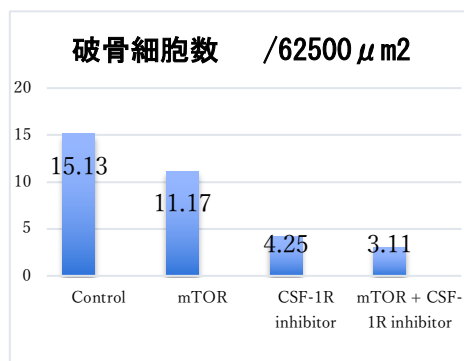


図4 各群の破骨細胞数

免疫組織化学的染色 (mTOR, RANKL, CSF-1R, CD163) の結果は、Control 群において、mTOR, RANKL, CSF-1R, CD163 の陽性率は、0%, 60%, 80%, 70% であった。(写真) mTOR の投与で、mTOR 投与群、mTOR + CSF-1R inhibitor 投与群とも陽性率 40% まで上昇し、CSF-1R inhibitor の投与で、CSF-1R inhibitor 投与群、mTOR + CSF-1R inhibitor 投与群で、RANKL の陽性率が 20%, CSF-1R の陽性率が 10% まで低下した。CD163 の陽性率は、mTOR 投与群で 40%、CSF-1R inhibitor 投与群で 50%、mTOR + CSF-1R inhibitor 投与群で 15% であった。(写真2)

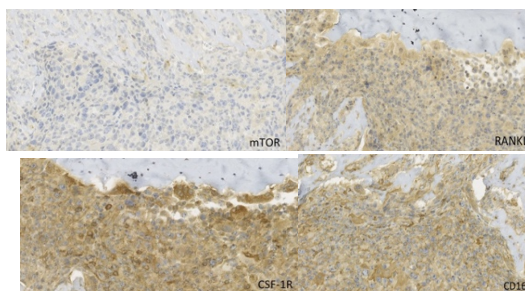


写真2 免疫組織化学的染色 (mTOR, RANKL, CSF-1R, CD163)

OsteoprotegerinのmRNA発現量は、Control群に比べて mTOR投与群、CSF-1R inhibitor投与群、mTOR+CSF-1R inhibitor投与群でやや増加した。RANKLのmRNAの発現量は、Control群に比べて mTOR投与群、CSF-1R inhibitor投与群、mTOR+CSF-1R inhibitor投与群で著明に減少した。CSF-1R の mRNAの発現量は、Control群とmTOR投与群に比べて、CSF-1R inhibitor投与群、mTOR+CSF-1R inhibitor投与群で著明に減少した。CSF-1R inhibitorの投与で、破骨細胞関連サイトカインであるRANKL の発現量は著明に減少し、破骨細胞に対して抑制的に働くOsteoprotegerinにも大きな影響を与えなかった。VEGFRのmRNAの発現量は、Control群とCSF-1R inhibitor投与群に比べて、mTORを投与したmTOR投与群、mTOR+CSF-1R inhibitor投与群で減少した。VEGFRのmRNA量は、mTORの投与で減少した。

(図5)

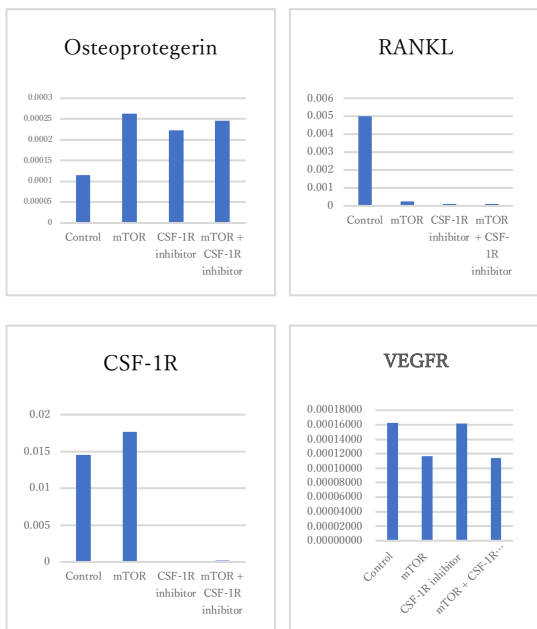


図5 各群のmRNA発現量 (osteoprotegerin, RANKL, CSF-1R, VEGFR)

以上の結果から、mTORの投与は、VEGFRのmRNA量を減少させ、一方、CSF-1R inhibitorの投与は、腫瘍増殖の抑制には至らないものの、骨破壊や骨吸収を抑制し、破骨

細胞数を減少させ、さらに破骨細胞関連サイトカインであるRANKL の発現量も著明に減少させることが判明した。また、CSF-1R inhibitorの投与は、破骨細胞に対して抑制的に働くOsteoprotegerinに大きな影響を与えなかった。また、CD163陽性細胞 (TAM, M2マクロファージ) 数も著明に減少したことから、口腔癌の顎骨浸潤を抑制する治療法を確立するには、TAMと破骨細胞のサイトカインネットワークを解明することが極めて重要であると示唆された。また、TAMの分化誘導を抑制するCSF-1/CSF-1Rシグナルによる治療は、口腔癌の顎骨浸潤・骨破壊に対する新たな治療法になりうると考えられた。

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) (査読有)

1. Ikehata N, Takanashi M, Satomi T, Watanabe M, Hasegawa O, Kono M, Enomoto A, Chikazu D, Kuroda M : Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development. *Biochem Biophys Res Commun* 495:2227-2234, 2017.
2. Satomi T, Kohno M, Hasegawa O, Enomoto A, Abukawa H, Chikazu D, Yoshida M, Matsubayashi J, Nagao T : Adenosquamous carcinoma of the tongue: clinicopathologic study and review of the literature. *Odontology*; 105: 127-135, 2017.
3. Watanabe M, Tada M, Satomi T, Chikazu D, Mizumoto M, Sakurai H : Metastatic rectal adenocarcinoma in the mandibular gingiva: a case report. *World J Surg Oncol*;14(1): 199-203, 2016.
4. Satomi T, Kaneko T, Abukawa H, Hasegawa

O, Watanabe M, Matsubayashi J, Nagao T, Chiba H, Chikazu D : Chondrosarcoma of the maxilla extending to the pterygomandibular space: A case report and review of the literature. J Maxillofac Oral Surg; 14(1) : 133-7, 2015.

[学会発表] (計 4 件)

1. 池畑直樹、河野通秀、長谷川温、里見貴史、渡辺正人、近津大地 : 口腔内細菌による TLR2 の活性化は口腔癌細胞の増殖及び抗癌剤抵抗性の獲得を誘導する 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (京都) 2017.10
2. 長谷川温、河野通秀、里見貴史、渡辺正人、近津大地 : FDG PT/CT 検査と生物学的特性の相関における口腔扁平上皮癌の悪性度と予後を検討する 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (千葉) 2016.11
3. Kohno M, Satomi T, Hasagawa O, Chikazu D : The clinicopathological study of M2 macrophages expression in oral squamous cell carcinoma. 23rd Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. (London, UK) 2016.9
4. 河野通秀、里見貴史、長谷川温、渡辺正人、近津大地 : 口腔扁平上皮癌におけるマクロファージ発現様式の臨床病理学的検討 第 40 回日本頭頸部癌学会 (埼玉) 2016.6

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
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
里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)
東京医科大学・医学部・臨床准教授
研究者番号 : 70276921

(2) 研究分担者
河野 通秀 (KOHNO, MICHIHIDE)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 00421066

虻川 東嗣 (ABUKAWA, HARUTSUGI)
明海大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 50453717

藤川 考 (FUJIKAWA, KO)
東京医科大学・医学部・兼任助教
研究者番号 : 60322468
2016年3月17日 研究分担者から削除

渡辺 正人 (WATANABE, MASATO)
東京医科大学・医学部・臨床講師
研究者番号 : 40349460

長尾 俊孝 (NAGAO, TOSHITAKA)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号 : 90276709

近津 大地 (CHIKAZU, DAICHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30343122

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()