

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463047

研究課題名(和文)リンパ節転移機構の解明による新規口腔癌治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of the new oral cancer treatment strategy by elucidation of the lymph node metastasis mechanism

研究代表者

合田 啓之 (Goda, Hiroyuki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00464371

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)：センチネルリンパ節生検対象症例であるcStage1-2の口腔癌患者のリンパ節および原発組織を用いて検討を行った。非センチネルリンパ節に比較しFoxp3やCD68およびCD163がセンチネルリンパ節において発現量の亢進が認められ、VEGF-Cもセンチネルリンパ節においてより発現量の亢進が認められた。また、原発組織の検討においては、PDL1の発現は、転移陰性症例に対し転移陽性症例で発現量の亢進が認められた。術前血清を用いた予後予測因子バイオマーカーの探索では、DFSにおいてIL-6、IL-8の2つのサイトカインが予後予測因子としてのバイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the sentinel lymph node expression of VEGF-C, Foxp3, CD68 and CD163 are higher than non-sentinel lymph node. And the expression of PDL1 in primary tumor with metastatic lymph node patients was higher than non lymph node metastasis patients. And we examined sera derived from OSCC patients for multiple cytokines by using a multiplexed measurement system, and the results showed that the serum IL-6 and IL-8 level tended to negatively correlate with favorable outcome in these patients disease-free survival (DFS) was significantly longer in the Stage I/II OSCC patients with low serum IL-6/8 levels compared to those with high levels.

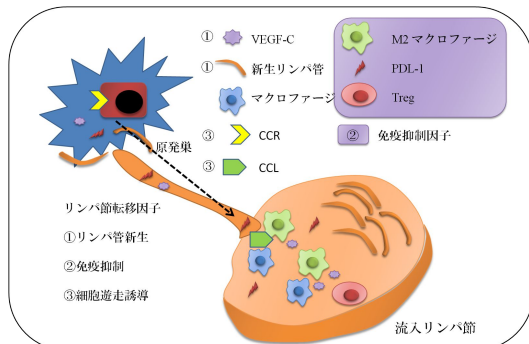
研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 癌免疫 リンパ節転移

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌において血行性転移は稀であり、予後を左右する最も重要な因子はリンパ節転移の有無である。近年、早期発見・診断や、様々な放射線化学療法が考案され、実地臨床で行われてきたが、機能温存の点では有用性が認められたものの、過去 30 年間、生存率の向上は認められていない (*N Engl J Med* 349:2091-98, 2003)。これらの事実は、リンパ節転移の制御に起因するものが多く、新しい治療法の確立の必要性を強調するものである。リンパ節転移に対する治療が進まない原因として、リンパ節転移機構の解明が十分でないことがあげられる。他方、血行性転移による遠隔転移に対しては、VEGF-A を主体とする血管新生因子を腫瘍細胞が産生し、新生血管を介し、腫瘍は栄養と酸素を受け取り増殖し、形質転換を来し浸潤能を獲得し、この新生血管を介して遠隔転移をきたす。このような分子機構の解明より 2007 年にはわが国において、転移性結腸癌に対する VEGF-A に対する中和抗体である bevacizumab が認可され目覚ましい発展をとげてきた。

リンパ節転移に関するこれまでの報告をまとめると、2001 年にマウスの系において癌組織周囲間質にリンパ管新生が生じること



が報告され、ついでこのリンパ管新生が所属リンパ節転移を促進することが報告された (*Nature Med* 7:192-98, 2001)。また、癌組織におけるリンパ管新生に中心的な役割を果たす分子として VEGF-C が同定され、VEGF-D および VEGFR3 とともに重要な因子として同定された。その後、臨床的なリンパ管新生の評価がはじまり皮膚悪性黒色腫においてはじめてリンパ管新生が患者予後因子として報告された (*Am J Pathol* 162:1951-60, 2003)。その後さらに、マウスの系において腫瘍原発巣で産生された VEGF-A,C がリンパ流を介して流入リンパ節を介して流入リンパ節に運搬され、リンパ管新生を生じることが示唆され、結果、流入リンパ節への転移が促進される可能性が報告された (*Blood* 109:1010-17, 2007)。また、別の視点より報告されたものとして、癌免疫の分野においては、ラットの系においてリンパ節転移初期においてリンパ節内のマクロファージから産生された tumor

necrosis factor (TNF) や interleukin-1,2 は転移初期には著明に増加するものの、転移腫瘍の増大に従い経時的に抑制されることを報告し (*Cancer Res* 64:8239-48, 2004)、腫瘍から産生された interleukin-10 がリンパ節における樹状細胞の活性を抑制していることも報告されている。さらには、免疫抑制性のリンパ球である Treg や M2 マクロファージおよび免疫抑制物質である PDL-1 の発現がリンパ節転移との相関があると報告されている (*J Transl Med* 11:43 2013)。さらに、細胞遊走誘導活性で重要な役割を果たすケモカイン・ケモカインレセプターネットワークにおいて、CCR4/CCL22 の系が頭頸部癌のリンパ節転移の一因となっていること (*Int J Cancer* 132:2755-66, 2013)、マウスの悪性黒色腫の系においては CCR7/CCL21 の系がリンパ節転移の重要なネットワーク経路として報告されている。

口腔癌治療においてリンパ節転移の制御、つまり転移を早期に発見、治療することは重要であるが、CT, MRI や PET をはじめとする画像検査のリンパ節転移に対する正診率は 70% 前後と満足できるものではない。そこでわれわれは 2001 年よりセンチネルリンパ節生検を行ってきており、発転移リンパ節転移発現の抑制、生存率の向上とその有用性を報告してきた。センチネルリンパ節とは領域リンパ節の中で腫瘍組織から最初にリンパ流を受けるリンパ節であり、領域リンパ節のなかで最初に転移が起こるとされているリンパ節である。当施設では radioisotope を用いて正確にセンチネルリンパ節を同定し、また、遺伝子診断を応用しその転移の有無について正確な診断を行ってきた。その過程において当院倫理委員会の承認のもと、われわれは、患者血清、原発組織の total RNA、蛋白、センチネルリンパ節およびその近傍の非センチネルリンパ節の検体等をサンプリングしており、今後、その解析が可能である。冒頭に述べた、リンパ節転移に関する知見は大部分がマウスやラットの実験系であり臨床検体における知見は十分ではない。画像診断では明らかではない臨床検体における転移の初期モデルを用い、リンパ管新生、免疫抑制、ケモカインネットワークの解析を行うことによりリンパ節転移機構を解明し、さらに治療標的分子を同定することによりあらたな、口腔癌治療のプロトコールを作成することは、口腔癌の治療成績を飛躍的に向上することにつながると考えられる。

### 2. 研究の目的

癌の主な転移経路である血行性転移とリンパ行性転移のうちリンパ行性転移についての理解は、現在、きわめて乏しい状態にあると言わざるを得ない。口腔癌におけるリンパ節転移の有無は予後を左右する最も重要な因子である。近年、リンパ節転移に関して腫瘍随伴リンパ管新生の状態、癌免疫、特に抑制性リンパ球を中心としたリンパ節内の動

態の変化、ケモカインネットワークによる細胞遊走誘導活性等についての報告が散見されるようになってきた。しかしながら、これらのデータを網羅的に解析した報告はない。本研究では、リンパ管新生、全身および局所癌免疫の状態、ケモカインネットワークを網羅的に解析し、リンパ節転移機構を解明することによる口腔癌患者の予後を飛躍的に改善する新たな治療戦略の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) リンパ節転移機構の解析:
  - )リンパ管新生の検討：原発組織、センチネルリンパ節および非センチネルリンパ節における LYVE1 を用いた新生リンパ管に対する評価を行う。また、原発およびリンパ節の RNA を用いて VEGF をはじめとするリンパ管新生因子の検討を行う。
  - )免疫抑制因子の検討:Treg、PDL-1 をはじめとする免疫抑制因子について、免疫組織化学染色、表面マーカーを用いた PCR 等で原発およびリンパ節の発現解析を行う。
  - )細胞遊走誘導：ケモカインネットワークを中心に原発およびリンパ節における発現を PCR、免疫組織化学染色にて評価を行う。
  - )その他の評価としてリンパ節転移の有無による原発組織での遺伝子発現の差異をマイクロアレイにて解析する。また、血清を用いてリンパ節転移の有無による全身的免疫状態の評価をサイトカイン、ケモカイン、増殖因子を中心に multiplex array system にて評価する。単変量および多変量解析にて転移の有無、センチネルおよび非センチネル間での各項目を解析し、リンパ節転移機構を解明する。
- (2) (1) で得られた結果より、リンパ節転移に関する key molecule を同定し、*in vitro*にて阻害薬、siRNA 等を用いて転移に関する分子の挙動について検討を行う。

以上から、リンパ節転移の制御を目的とした新たな口腔癌治療を確立し、口腔癌患者の生存率向上を目指す。

### 4. 研究成果

まず、原発巣、センチネルリンパ節および非センチネルリンパ節における免疫学的な特異性について検討を行った。対象は、当科にてセンチネルリンパ節生検を行い病理組織診断および分子診断においても転移陰性と診断された、2 症例のセンチネルリンパ節および非センチネルリンパ節、およびセンチネルリンパ節生検対象症例である cStage1-2 の口腔癌患者 10 症例の原発組織を用いて検討を行った。方法は、RT-PCR 法にて VEGF-C, Foxp3, CD68, CD163, PDL1 を対象に発現量を定量化し検討した。結果、非センチネルリンパ節に比較し、制御性 T 細

胞である、Foxp3 や、マクロファージのマーカーである CD68 および M2 マクロファージのマーカーである CD163 がセンチネルリンパ節において発現量の亢進が認められ、リンパ管新生のマーカーである VEGF-C もセンチネルリンパ節においてより発現量の亢進が認められた。また、原発組織の検討においては、免疫抑制性分子である PDL1 の発現は、転移陰性症例に対し転移陽性症例で発現量の亢進が認められた。以上のことより、センチネルリンパ節においては新生リンパ管の増生による母床形成と、癌転移に有利に働く Th2 優位な免疫環境が整えられ、かつ、原発巣においては免疫抑制分子の高発現が認められ転移形成に向けた準備が進んでいる可能性が示唆された。

次に、センチネルリンパ節生検症例における術前血清を用いて予後予測因子としてのバイオマーカーの探索を行った。

対象は、2006 年から 2012 年までに当科にて口腔扁平上皮癌 (cStage I & II, cT1-2 N0) と診断され、センチネルリンパ節生検および根治的手術を施行した 42 症例を対象とした。センチネルリンパ節の同定は放射性同位元素スズコロイドを用いて行い、リンパ節転移の評価は迅速病理診断及び one step nucleic acid amplification (OSNA 法) を用いた。また、前述した 42 症例のうち、26 症例の術前血清を用いて、multiplex suspension array 法にて IL2, 4, 6, 8, 10, GM-CSF, IFN, TNF 値を測定した。disease-free survival (DFS) を主要評価項目として、Fisher's exact test, Log-rank test を行った。P < 0.05 を有意差ありと判断した。センチネルリンパ節生検を施行した口腔扁平上皮癌患者 42 例において、転移陰性患者群は陽性患者群に比較して DFS は有意に延長していた (P=0.02)。また、multiplex suspension array では、DFS において 36 ヶ月以上の追跡調査が可能であった 26 症例において、Fisher's exact test で IL-6 (P=0.03), IL-8 (P=0.01) の 2 つのサイトカインが予後予測因子としてのバイオマーカーとなりえる可能性が示唆された。口腔癌においてセンチネルリンパ節生検は、DFS の延長に有用であり、術前血清 IL-6, IL-8 値が有効な予後予測因子となりうることもおよび、治療標的因子としての可能性が示唆された。

### 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 6 件)

Goda H, Okamoto M, Nakashiro K, Hino S, Murase R, Hamakawa H. Prognostic impact of preoperative serum interleukin-6 levels in early stage oral squamous cell carcinoma patients strictly defined by sentinel node biopsy. *Oncol Lett.* 査読有

in press

合田啓之、中城公一、日野聡史、村瀬隆一、  
浜川知大、浜川裕之 口腔癌におけるセンチ  
ネルリンパ節生検の現状と課題  
口腔腫瘍、査読有 28(3):2016, 71-75

Oka R, Nakashiro K, Goda H, Iwamoto K,  
Tokuzen N, Hamakawa H. Annexin A8 is a  
novel molecular marker for detecting lymph  
node metastasis in oral squamous cell  
carcinoma. *Oncotarget*. 査読有  
26;7(4):2016, 4882-4889

Nakashiro KI, Tanaka H, Goda H, Iwamoto K,  
Tokuzen N, Hara S, Onodera J, Fujimoto I,  
Hino S, Hamakawa H. Identification of Akt1  
as a potent therapeutic target for oral  
squamous cell carcinoma.  
*Int J Oncol*. 査読有 47;2015, 1273-1281

Murase R, Tanaka H, Hamakawa T, Goda H,  
Tano T, Ishikawa A, Hino S, Sumida T,  
Nakashiro K, Hamakawa H. Double sentinel  
lymph node mapping with indocyanine green  
and 99m-technetium-tin colloid in oral  
squamous cell carcinoma.  
*Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有 44;2015,  
1212-1217

Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T,  
Nakashiro K, Sugita A, Fujita T, Koido S,  
Homma S, Kawakami Y, Hamakawa H.  
Prognostic significance of interleukin-8  
and CD163-positive cell-infiltration in  
tumor tissues in patients with oral  
squamous cell carcinoma.  
*PLoS One*. 査読有 9(12):2014, e110378

〔学会発表〕(計 4 件)

合田啓之、中城公一、日野聡史、村瀬隆一、  
浜川知大、浜川裕之 口腔癌におけるセンチ  
ネルリンパ節の現状と課題  
第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会  
シンポジウム 2、2016 (横浜市開港記念会  
館、神奈川県横浜市)

Goda H, Okamoto M, Nakashiro K, Tokuzen N,  
Hamakawa H. Anti-interleukin-6 receptor  
antibody suppressed oral squamous cell  
carcinoma by inhibiting tumor-stroma  
interaction.  
ESMO in Asia 2015 Congress (Suntec  
Singapore convention & exhibition centre,  
Singapore)

Goda H, Okamoto M, Nakashiro K, Tano T,  
Fujita Y, Hamakawa H. Clinical implication  
of interleukin-6 and angiogenesis in cNO  
oral cancer strictly defined by sentinel

node biopsy

96<sup>th</sup> AAOMS Annual Meeting, 2014 (Hawaii  
convention center, Honolulu, Hawaii, USA)

合田啓之、中城公一、岩本和樹、日野聡史、  
村瀬隆一、浜川裕之口腔癌における SNNS の  
現状と今後の展望  
第 16 回 SNNS 研究会学術集会 シンポジ  
ウム 1、2014 (城山観光ホテル、鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

合田 啓之 (Goda, Hiroyuki)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 00464371

### (3) 連携研究者

岡本 正人 (Masato Okamoto)  
北里大学・薬学部・教授  
研究者番号: 10243718