

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24094

研究課題名（和文）CXCR4を標的とした口腔扁平上皮癌の新規抗腫瘍血管治療法の構築

研究課題名（英文）To build new method of angiogenesis inhibitor for oral squamous cell cancer targeting CXCR4

研究代表者

大森 悠加（Omori, Haruka）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：30850424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：CXCR4-SDF1(stromal cell derived factor 1) axisは、血管新生に関与し腫瘍の増殖や生存に寄与することが報告されている。臨床検体を用いて口腔の高分化扁平上皮癌にCXCR4を発現する腫瘍血管が存在することを明らかにした。さらに、高分化型ヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株（HSC2）をマウスの背部皮下に移植し、CXCR4阻害剤であるAMD3100の腹腔内投与を行った。コントロール群と阻害群で組織学的に比較するとともに血管の走行および形態の比較を行ったところ、CXCR4阻害群では、腫瘍の血管形成が阻害され、低酸素に陥り、腫瘍の壊死を引き起こすことがわかった

研究成果の学術的意義や社会的意義

CXCR4-SDF1 axisの血管新生経路は、既存の血管新生阻害薬として知られているVEGFによる血管新生の経路とは異なるため、腫瘍血管におけるCXCR4の役割が明らかとなれば、新たなアプローチの抗腫瘍血管治療の開発につながる可能性がある。また、CXCR4阻害剤であるAMD3100はFDA（アメリカ食品医薬品局）、EMA（欧州医薬品庁）により、「造血幹細胞を末梢血に動員する薬剤」として承認を受けた薬剤である。本研究で抗腫瘍効果が認められれば、既存の抗癌剤や分子標的剤との併用療法や、VEGF阻害剤への薬剤耐性化患者に対する新たな治療の選択肢として、臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：CXCR4-SDF1(stromal cell derived factor 1) axis is reported it played a role in growth and survival with angiogenesis. We discovered well differentiated oral squamous cell carcinoma had blood vessels express CXCR4. Furthermore, we transplanted well differentiated human oral squamous cell carcinoma cell line (HSC2) to under the skin in the back of the mouse and administer AMD 3100 is CXCR4 inhibitor intraperitoneally. We compared group inhibited CXCR4 with control histologically and measured running and shape of blood vessel so we discovered group inhibited CXCR was inhibited angiogenesis of tumor, became hypoxia and made tumor necrosis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：扁平上皮癌 口腔癌 癌微小環境 腫瘍血管 CXCR4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CXCR4-SDF1(stromal cell derived factor 1) axis は、胚形成時に遠隔臓器の形成に深く関与し、免疫調節や血管新生の経路としても知られている。また、乳癌や前立腺癌、口腔癌など複数の癌で、CXCR4-SDF1 axis が腫瘍の浸潤や転移に重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。さらに、glioblastoma や膵臓癌では、CXCR4-SDF1 axis が血管新生に関与し、腫瘍の増殖や生存に寄与することが報告され、新たな腫瘍血管新生経路として注目されている。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌に CXCR4 を発現する腫瘍血管が存在することを明らかとし、CXCR4 陽性腫瘍血管が腫瘍の増殖に関与すると仮説を立て、口腔癌の腫瘍血管における CXCR4 の発現を詳細に検討する。さらに、CXCR4 阻害剤の口腔扁平上皮癌への影響を検討する。以上により、口腔扁平上皮癌の抗腫瘍血管治療の構築を目指すことを目的とする。

口腔癌の治療は現在でも手術による切除が第一選択で、切除に伴う QOL の低下(顔貌の変容、術後の発話・摂食の不自由など)が問題となっている。抗 CXCR4 分子標的治療により腫瘍の大きさを縮小することができれば、切除部位も縮小することが可能となり、患者の QOL に寄与することができる。現在、臨床における抗腫瘍血管治療は、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor: 血管内皮増殖因子) をターゲットとした分子標的治療が一般的で、大腸癌や一部の肺癌、乳癌などで治療が行われている。しかし、一定の効果がある一方で治療奏功期間が比較的短期で、腫瘍の薬剤耐性化や抵抗性が生じることが問題となっている。CXCR4-SDF1 axis の血管新生経路は、VEGF による血管新生の経路とは異なることが知られており、腫瘍血管における CXCR4 の役割が明らかとなれば、新たなアプローチの抗腫瘍血管治療の開発につながる可能性がある。

また、CXCR4 阻害剤である AMD3100 は FDA(アメリカ食品医薬品局)、EMA(欧州医薬品庁)により、「造血幹細胞を末梢血に動員する薬剤」として承認を受けた薬剤である。本研究で抗腫瘍効果が認められれば、既存の抗癌剤や分子標的剤との併用療法や、VEGF 阻害剤への薬剤耐性化患者に対する新たな治療の選択肢として、臨床応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1)手術検体を用いた口腔扁平上皮癌における CXCR4 陽性腫瘍血管の分布の検討

高分化型扁平上皮癌間質において、CXCR4 陽性の腫瘍細胞及び腫瘍血管の分布を検討した。材料は、岡山大学口腔外科の手術検体 10 例を用い、免疫組織化学染色を用いて検討した。さらに腫瘍部と非腫瘍部について CD34 を用いて免疫組織学的検討を加え、血管の CXCR4 陽性率について比較を行った。

切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングするために 0.3%過酸化水素メタノール溶液に 30 分浸漬した。抗原賦活化のために加熱処理を行い、1 次抗体を 4 下にて 1 晩反応させた。(表参照)200 倍希釈 2 次抗体を 30 分室温で反応させた後、55 倍希釈アビジン-ビオチン複合体を 30 分室温で反応させた。なお、希釈には 0.05M トリス塩酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)を用いた。発色基質は、0.01%H₂O₂ 加 0.02%3,3-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩(0.05M トリス塩酸緩衝液)を用いた。発色後、Mayer のヘマトキシリンで核染色を行い、光顕的に観察した。

(2)CXCR4 阻害剤の効果の検討

1. AMD3100 溶液の作成

AMD3100(Plerixafor, ChemScene)は CXCR4 のアンタゴニストである AMD3100 10mg を生理食塩水 20 ml に溶かして AMD3100 溶液を作成した。溶液は 4 下で保管した。

2. 癌細胞株移植マウスの作製および AMD3100 の投与

高分化型ヒト由来口腔扁平上皮癌細胞株(HSC2)をヌードマウス(BALB/c-nu/nu)の背部皮下に 10×10⁵cells / 匹ずつ移植した。1 週間後に腫瘍着を確認してから、21 日間 AMD3100(50ug/day)の腹腔内投与を行った。対照群として同数の腫瘍細胞を背部皮下に移植したマウスに、1 週間後から生食を腹腔内投与した。

3. 腫瘍移植マウスの組織学的検討

AMD3100 溶液あるいは生理食塩水を 21 日間投与した後、10%中性緩衝ホルマリンを用いてマウスを灌流固定した。腫瘍を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン浸漬固定後、常法に従い、アルコール系列で脱水、パラフィン包埋した。厚さ約 3 μm のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡的に観察した。

4. 壊死領域の測定方法

1 症例につき無作為に 5 視野/x400 ずつ選び、imageJ を用いて壊死領域を計測した。

AMD3100 溶液投与群 (以下 CXCR4 阻害群とする)と対照群とで壊死領域を比較した。

5. 免疫組織化学的検討

CD34 と HIF-1 α を用いて(1)と同様の方法で免疫組織学的検討を行った。(表 1 参照)

6. 血管走行の比較および長さの測定

CD34 を用いて、薬剤投与群と対照群での血管の走行や分布の違いを検討した。1 腫瘍につき 5 視野/x200 ずつ無作為に選び、imageJ を用いて CD34 陽性の血管の長さを計測した。CXCR4 阻害群と対照群を血管の長さの合計で比較した。

7. HIF1- α 陽性領域の測定

HIF1- α を用いて、CXCR4 阻害群と対照群での低酸素濃度領域を検討した。1 腫瘍につき 5 視野/x400 ずつ無作為に選び、ImageJ を用いて HIF-1 α 陽性領域を計測した。CXCR4 阻害群と対照群とで HIF1- α 陽性領域の合計を比較した。

一次抗体	メーカー	希釈倍率	抗原賦活化処理
CD34	Abcam	x100	Microwave
HIF-1 α	Abcam	x200	Cooker

表

4. 研究成果

(1)手術検体を用いた口腔扁平上皮癌における CXCR4 陽性腫瘍血管の分布

臨床検体では腫瘍細胞が陽性を示すほか、腫瘍周囲の血管が CXCR4 陽性となった。CD34 を用いて、腫瘍部と非腫瘍部で血管数の比較を行うと腫瘍部と非腫瘍部での血管数に有意な差はみられなかったが、CXCR4 陽性血管数を比較すると腫瘍部が非腫瘍部よりも優位に陽性血管数が多かった。

(2)CXCR4 阻害剤の効果

CXCR4 の発現を確認すると腫瘍部では血管に陽性を示し、非腫瘍部では陰性であったことから臨床検体と同様の発現傾向を示した。また、CXCR4 阻害群ではコントロール群と比較して優位に壊死面積が広いことが分かった。壊死周囲の組織を観察すると、血管周囲の一層の腫瘍組織を残し、その周囲が脱落したような特徴的な壊死像を示した。これは臨床検体で認められる一般的な腫瘍壊死の像とは異なり、CXCR4 阻害に伴い特異的な腫瘍環境が形成された可能性が考えられた。

HIF-1 α 陽性細胞数を検討するとコントロール群よりも CXCR4 阻害群の方が陽性細胞数が多かった。また、血管の長さの平均値、合計、長さ別にコントロール群と CXCR4 阻害群で比較すると、どの項目でも CXCR4 阻害群が低いことから、阻害群では短い血管が多いという結果が示唆された。

以上の結果から、CXCR4 は腫瘍の血管形成の役割があり、CXCR4 阻害薬によって腫瘍の血管形成が抑えられ壊死を引き起こすと考えられた。よって、CXCR4 の阻害は口腔扁平上皮癌治療における有効な抗腫瘍血管形成治療戦略となり得るとことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Kawai Hotaka, Omori Haruka, Qiusheng Shan, Oo May Wathone, Sukegawa Shintaro, Nakano Keisuke, Tsujigiwa Hidetsugu, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Impact of the Stroma on the Biological Characteristics of the Parenchyma in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7714 ~ 7714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Anqi Chang, Takabatake Kiyofumi, Kawai Hotaka, Oo May, Yoshida Saori, Fujii Masae, Omori Haruka, Sukegawa Shintaro, Nakano Keisuke, Tsujigiwa Hidetsugu, Jinhua Zheng, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Differentiation and roles of bone marrow derived cells on the tumor microenvironment of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6628 ~ 6638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.11045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Shimo Tsuyoshi, Murakami Jun, Anqi Chang, Kawai Hotaka, Yoshida Saori, Wathone Oo May, Haruka Omori, Sukegawa Shintaro, Tsujigiwa Hidetsugu, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5779 ~ 5779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Haruka Omori, Keisuke Nakano, Yuki Nagata, Kiyofumi Takabatake, Hotaka Kawai, Eiki Yamachika, Hitoshi Nagatsuka, Seiji Iida	4. 巻 5
2. 論文標題 Schwannoma of Floor of the Mouth: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology: Open Access	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大森悠加、河合穂高、吉田沙織、藤井昌枝、Qiusheng Shan、高嶋清文、中野敬介、長塚 仁
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるCXCR4の腫瘍血管での役割
3. 学会等名 第31回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河合 穂高、メイ・ワト ウ , 辻極 秀次、高嶋 清文、大森 悠加、藤井 昌江、中野 敬介、長塚 仁
2. 発表標題 口腔癌間質細胞が骨髄由来細胞の動員に与える影響
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森 悠加、高嶋 清文、河合 穂高、吉田 沙織、メイ・ワト ウ , 浜田 芽衣、中野 敬介、長塚 仁
2. 発表標題 エナメル上皮腫開窓術の適応に関する組織学的検討
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高嶋 清文、河合 穂高、大森 悠加、Oo May Wathone、吉田 沙織、中野 敬介、長塚 仁
2. 発表標題 Patient-derived xenograftモデルを用いた腫瘍間質による腫瘍実質の生物学的性格制御の検討
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島 清文, 河合 穂高, Oo May Wathone, 吉田 沙織, 大森 悠加, 中野 敬介, 辻極 秀次, 長塚 仁
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の腫瘍微小環境における骨髄由来細胞の分化と役割
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------