

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462864

研究課題名(和文) 口腔病変における癌/上皮幹細胞への微小環境の作用

研究課題名(英文) Involvement of microenvironment with cancer/epithelial stem cell in oral lesions

研究代表者

藤田 修一 (FUJITA, Shuichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00181355

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)：口腔扁平上皮癌のリンパ節転移において、リンパ節の周辺洞での転移に適した微小環境の形成を解明することを目的に、CCL2-CCR2 axisの関与を免疫組織化学的に検討した。CCL2は癌細胞だけでなく、癌周囲に浸潤する癌関連好中球(TAN)にも発現し、TANはリンパ節周辺洞へも流入していた。周辺洞に集積している癌関連マクロファージ(TAM)はCCR2が発現しており、TAMの集積は癌実質だけでなく、TANに由来するCCL2に誘導されていると考えられる。TAMは小型の癌転移巣の周囲にも存在し、SMA陽性の紡錘形細胞への連続性も認められた。リンパ節転移において、周辺洞に微小環境の形成があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma (SCC) often metastasizes to cervical lymph nodes. We immunohistochemically examined the involvement of CCL2-CCR2 axis with construction of microenvironment suitable for metastasis in lymph nodes. Marginal sinus histiocytosis was frequently observed in metastatic cases. CCL2 was expressed in tumor-associated neutrophils (TANs) and moderately or poorly differentiated SCC was detected at primary tumor sites. TANs expressing CCL2 flowed into the marginal sinus in the lymph nodes. CCR2-positive macrophages and mesenchymal cells infiltrated the tumor stroma and were seen within the carcinoma nests. They were predominantly present in the marginal sinus of metastatic cases. In small metastatic foci, alpha-SMA-positive spindle cells resembling carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) were observed adjacent to the macrophages. The results indicate that the CCL2-CCR2 axis is associated with lymphatic metastasis from oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔病理学

キーワード：微小環境 扁平上皮癌 リンパ節転移 癌関連マクロファージ 癌関連好中球 癌関連線維芽細胞 CCL2 CCR2

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の浸潤、転移において、酸素・栄養の供給や足場としての機能を持つ間質が非常に重要な役割を果たしている。口腔癌でも間質に存在する微小環境は癌細胞の動態を制御していると思われる。転移に適した微小環境の誘導・形成は興味のある事象であり、口腔扁平上皮癌のリンパ節はこの現象の研究に適した材料でもあると考えた。

臨床的にも口腔扁平上皮癌はその進行と共に所属リンパ節である顎下・頸部リンパ節に転移する。転移の有無は病期決定に関係し、予後判定の要因となる。悪性腫瘍の腫瘍細胞そのものに、原発を離れ、リンパ管を破壊・侵入し、流入したリンパ節に定着・増殖する能力があることが考えられるが、同時にリンパ節転移に適した環境がリンパ節に形成され、癌細胞の定着を誘導していることも考えられる。頸部郭清例の病理診断において、転移のある症例とない症例に遭遇するが、これは腫瘍細胞の形質だけでなく、リンパ節での微小環境が異なっているのではないかと考え、扁平上皮癌のリンパ節転移に適した環境の形成について、ヒト材料を用いて解析することを立案した。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移において、リンパ節で転移に適した環境が作られているか、また、その微小環境がどのように形成されているかを究明することを目的とした。

癌患者のリンパ節では、周辺洞に組織球が集簇する marginal sinus histiocytosis が形成されることが知られている。これは癌組織に由来するメディエーターによるものと考えられている。近年になって癌関連マクロファージ(TAM)が周辺洞に集簇しているとする発表が相次いだ。本研究でも、扁平上皮癌のリンパ節転移に TAM がリンパ節でも微小環境の形成に関与していること、及び TAM のリクルートに関する CC chemokine receptor-2 (CCR2) とそのリガンドである CC chemokine receptor-2 ligand (CCL2) が癌転移に寄与していることを仮説として、免疫組織化学的に検索した。また、癌関連線維芽細胞(CAF)がこの微小環境に出現しているかも検討した。

3. 研究の方法

長崎大学病院で施行された口腔扁平上皮癌の頸部郭清を研究対象とした。このうち、リンパ節転移のない症例(13例)、転移のある症例(15例)、後発転移例(13例)の原発部位とリンパ節を検討した。いずれも術前の化学療法や放射線療法は受けていない症例である。非転移症例については、原発に最も近接しているリンパ節を用いた。また、転移により、構造が破壊されているリンパ節では近接するリンパ節を観察した。抽出した症例

のパラフィン切片を作成し、標本作製に供した。各症例で marginal sinus histiocytosis の頻度を検討し、抗 CCL2 抗体、抗 CCR2 抗体、抗 D2-40 抗体、抗 α -SMA 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

Marginal sinus histiocytosis は転移例のリンパ節で非転移例より有意に高頻度にみられた。Marginal sinus histiocytosis は転移例の転移を含まないリンパ節でも強く起こっている(写真1)。

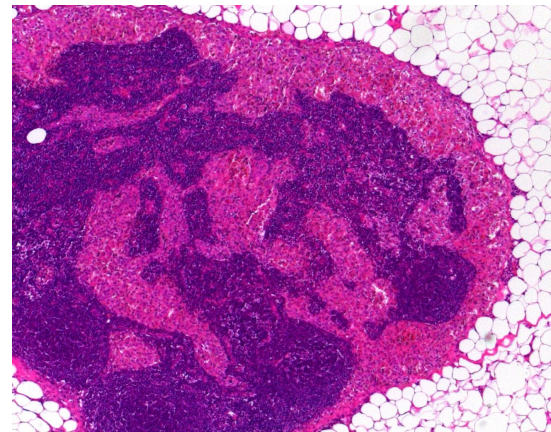


写真1 転移例で、癌転移を含まないリンパ節。Marginal sinus histiocytosis がみられる。

CCL2 は中等度ないし低分化の SCC の実質細胞だけではなく、原発の間質に浸潤している腫瘍関連好中球(TAN)に強く発現していた(写真2)。

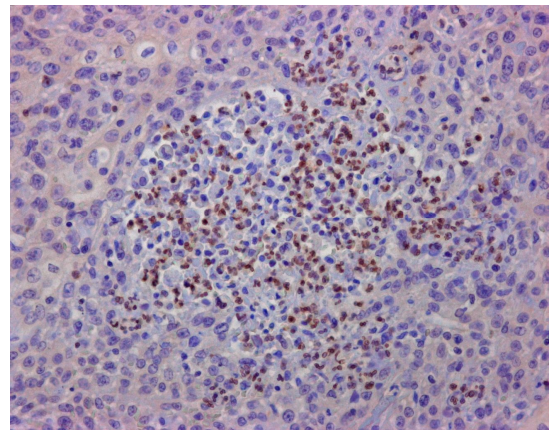


写真2 扁平上皮癌周囲に浸潤する TAN に CCL2 の発現がみられる。

D2-40 による検索では、TAN は原発でのリンパ管内にも認められ、転移の有無にかかわらず、頸部リンパ節の周辺洞に一致して存在していた。これは原発に浸潤した TAN が周辺洞に流入していることが考えられる(写真3)。

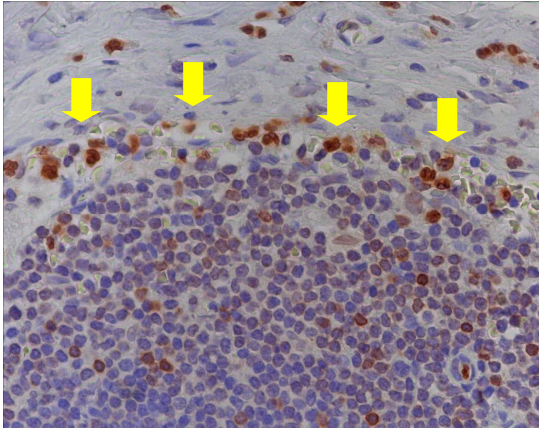


写真 3 転移を含まないリンパ節。周辺洞に CCL2 陽性の TAN が流入している (矢印)。

CCR2 は原発の腫瘍周囲や転移を含まないリンパ節の marginal histiocytosis のマクロファージに発現していた(写真 4)。また、間質の間葉細胞にも発現していた。

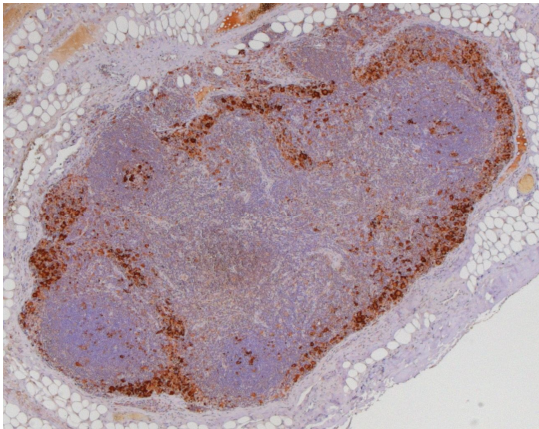


写真 4 転移例の転移を含まないリンパ節。Marginal sinus histiocytosis に一致して CCR2 陽性 TAM が集積している。

転移の初期と思われる小型の転移巣では、癌周囲に CCR2 陽性 TAM の集簇がみられる(写真 5)。

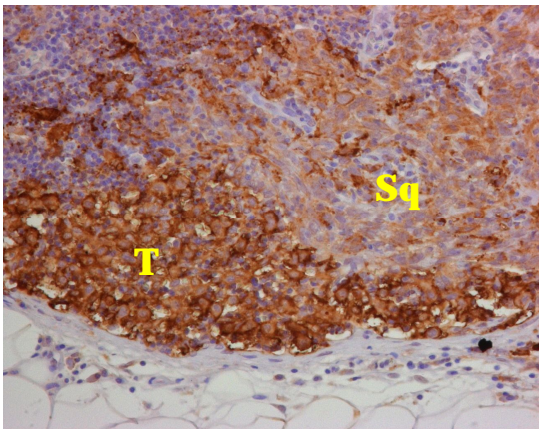


写真 5 周辺洞での CCR2 陽性 TAM (T) と扁

平上皮癌 (Sq)

また、TAM と移行するように紡錘形細胞にも CCR2 の発現がみられ、これらの細胞は α -SMA にも陽性であった (写真 6)。

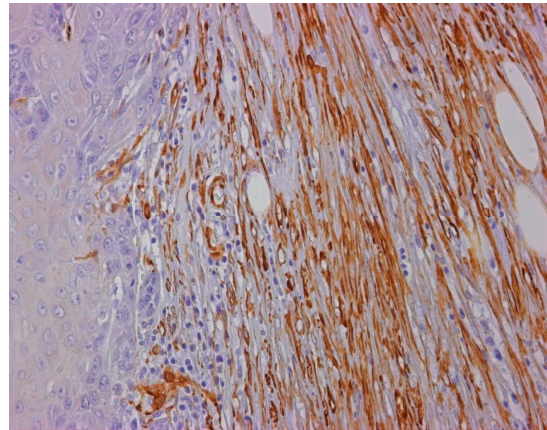


写真 6 周辺洞での扁平上皮癌の転移部。 α -SMA 陽性の線維芽細胞様細胞が腫瘍周囲にみられる。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移において、CCL2-CCR2 axis が深く関わっていることが示唆された。すなわち、転移が成立する以前に、原発の SCC 実質に由来する CCL2 だけでなく、CCL2 陽性 TAN がリンパ節の周辺洞に流入し、周辺洞内に CCR2 陽性の TAM をリクルートして、増加させる。さらに α -SMA 陽性の線維芽細胞様細胞が増加して、癌転移に適する微小環境を形成している。本研究はリンパ節転移が成立する以前に CCL2-CCR2 axis がリンパ節周辺洞に転移に適した微小環境である metastatic niche を形成する役割があることを示している。治療の上で、癌のリンパ節転移は放射線照射や郭清術などが必要となり、患者への負担が増大する。本研究では、リンパ節転移が起こる以前の変化をとらえたものであり、この CCL2-CCR2 axis の機構を抑制することでリンパ節転移を予防できることが期待される。

本研究での α -SMA 陽性の線維芽細胞様細胞が CAF に相当するものか不明であった。CAF は微小環境を構成する主要な細胞で、癌細胞や癌幹細胞の動態に深く関わっているとされている。今後、形態的だけでなく、機能的にも、間質中の CAF を同定させる必要がある。さらに、CAF の活性を制御できれば、口腔だけにとどまらず、悪性腫瘍の微小環境を標的とした治療が可能となる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujita S, Ikeda T. The CCL2-CCR2 Axis in Lymph Node Metastasis From Oral Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study. J Oral

Maxillofac Surg. 査読有り, 75 (4): 742-749, 2017.
DOI: 10.1016/j.joms.2016.09.052

〔学会発表〕(計 1 件)

名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
藤田修一、池田通 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移における腫瘍関連マクロファージと CCR2 陽性細胞の役割。第 104 回日本病理学会総会、2015 年 5 月 2 日

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 修一 (FUJITA, Shuichi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号：00181355

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山田 慎一 (YAMADA, Shin-ichi)
信州大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50380853

池田 通 (IKEDA, Tohru)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：00211029

柴田 恭明 (SHIBATA, Yasuaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師
研究者番号：80253673

(4) 研究協力者
なし