

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462855

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における腫瘍関連マクロファージの誘導機構ならびに機能解析

研究課題名(英文) The mechanism of development of tumor-associated macrophage in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

廣井 美紀 (HIROI, Miki)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：30419717

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)：口腔癌におけるマクロファージ(M)の局在を検討し、口腔癌組織にはCD163+MおよびTh1細胞が浸潤し、STAT1がCD163と共局在するという知見を得たため、口腔癌でのSTAT1+CD163+Mの発現機序の解明を目的とした。その結果、PMA刺激THP-1細胞をIFN またはIL-4にて刺激すると、それぞれM1、M2 Mへの分化が認められた。ヒト口腔ケラチノサイトにHPV E7およびテロメアの全長を遺伝子導入し、薬剤選択培養後、正常口腔粘膜細胞の特徴を有するクローンを得た。現在、作製した細胞株または口腔扁平上皮癌細胞株とPMA刺激THP-1細胞との共培養系を構築、解析を行なっている。

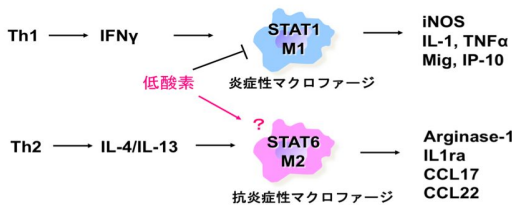
研究成果の概要(英文)：We examined the localization of macrophages (M) in oral cancer and found that CD163 + M and Th1 cells infiltrate into oral cancer tissues and that STAT1 co-localizes with CD 163. We investigated that the mechanism of development of STAT1 + CD163 + M in oral cancer. As a result, when PMA-stimulated THP-1 cells were stimulated with IFN or IL-4, differentiation to M1, M2 M was observed, respectively. The full length of HPV E7 and telomere was introduced into human oral keratinocytes, clones having the features of normal oral mucosal cells were obtained after drug selection. We are constructing coculture system in PMA-stimulated THP-1 cell and oral keratinocyte clone currently prepared or the oral squamous cell carcinoma cell line and analyzing the expression of surface antigen and genes.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍関連マクロファージ 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞は癌組織で多数認められ、癌の増殖・浸潤および血管新生に関与することが報告されている。癌組織に存在するマクロファージは特に腫瘍関連性マクロファージ(Tumor-associated macrophage: TAM)と言われ、癌におけるその役割が解析されつつある。マクロファージはその特性により大きく2種類に分類される。ヘルパー1型T細胞(Th1)由来 interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )により活性化されたマクロファージを M1 マクロファージ(classically activated macrophage)といい、一酸化窒素合成酵素(NOS2/iNOS)、ケモカイン CXCL9, CXCL10 および炎症性サイトカイン IL-1 といった遺伝子の発現を増強し、抗腫瘍活性を示す。一方、ヘルパー2型T細胞(Th2)由来 IL-4 および IL-13 により活性化されたマクロファージを M2 マクロファージ (Alternatively activated macrophage)といい、腫瘍の増殖因子や血管新生促進因子の発現を誘導し、IL-10 や TGF- $\beta$  などのサイトカインを産生することにより免疫反応を抑制する。



これまでに固形癌における腫瘍関連マクロファージの phenotype を検討した報告では、悪性黒色腫、乳癌、腎癌では腫瘍局所に M2 マクロファージの浸潤が多く認められ、M2 マクロファージの浸潤数が多い症例では、その予後が悪いことも報告されている。そのため、腫瘍関連マクロファージの phenotype を解析することは、腫瘍の増殖・浸潤、またその予後の評価にとって、極めて重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、これまでに口腔癌に局在するマクロファージの phenotype およびその役割については未だ十分には明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

我々は、前癌病変である白板症および口腔癌におけるマクロファージの局在について検討を行なった。M1 マクロファージのマーカーとして抗 CD80 抗体および M2 マクロファージのマーカーとして抗 CD163 抗体を用いて免疫染色を行なった結果、前癌病変部および腫瘍局所においてマクロファージの上皮下および上皮内浸潤が認められ、その多くは CD163 陽性細胞であった(Mori K, et al, Cancers, 3:3726-3739)。この部位には CD4 陽性T細胞の浸潤が見られ、興味深いことに、その多くは Th1 細胞であった。Th1 優位な局所においては IFN $\gamma$  のようなサイトカインが産生されている可能性が考えられたた

め、マクロファージを抗 CD163 抗体および IFN $\gamma$  で誘導される転写因子 STAT1 に対する抗体を用いて二重染色したところ、CD163 および STAT1 が共局在しているマクロファージの存在が明らかとなった。CD163<sup>+</sup> STAT1<sup>+</sup> マクロファージは、乾癬に浸潤しているマクロファージでも認められている (J. Invest. Dermatol. 130: 2412-2422, 2010)。これらの結果から、従来 CD163 は M2 マクロファージのマーカーとして使用されてきたが、CD163 陽性ではあるが M1 マクロファージの表現性を示すマクロファージが存在する可能性が考えられた (Mori, K, et al, BMC Cancer doi: 10.1186/s12885-015-1587-0.)。そこで本研究課題では、口腔癌における M1 マクロファージの発生機序を探ることにより癌細胞の浸潤・増殖における免疫細胞の役割について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞は、10% FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地にて培養を行なった。

ヒト口腔ケラチノサイト (ScienCell Res. Lab. CA, USA) は、Oral Keratinocyte Medium (ScienCell Res. Lab. CA, USA) を使い、poly-L-Lysine コートされたシャーレにて培養を行なった。

ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 細胞は、10% FBS、2mM L-グルタミンおよび 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地にて培養を行なった。THP-1 細胞を PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 200nM にて 3 日間刺激することにより、マクロファージ様細胞に分化させた。その後、PMA を除去した培地にて 5 日間培養した THP-1 細胞を実験に供試した。

### (2) 口腔扁平上皮癌細胞の培養上清

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 は、10% FBS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地にて培養を行なった。10cm シャーレに  $5 \times 10^5$  個の細胞を播種し、2 日後にコンフルエントになった時の細胞培養上清を採取した。培養上清は遠心することにより debris を除去し、実験に供試した。

### (3) レンチウイルスベクターの作製

口腔扁平上皮癌の発症には、ヒトパピロマウイルス (HPV) の関与が考えられているため、HPV の初期遺伝子である E7 ならびに human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子を口腔ケラチノサイトに遺伝子導入することにより不死化口腔ケラチノサイト株を樹立した。まず、HPV E7 および hTERT レンチウイルス発現系の構築を行なった。ウイルスベクターの構築には Gateway システムを用い、HPV E7 および hTERT cDNA を

destination vector にクローニング後、ウィルスパッケージングミックスとともに 293FT 細胞に遺伝子導入し、組み換えレンチウィルスを得た。なお本実験は明海大学歯学部遺伝子組換え実験安全委員会での承認を受けている。  
(承認番号 0084)

#### (4)不死化口腔ケラチノサイトの作製

ヒト口腔ケラチノサイトに HPV E7 および hTERT レンチウィルスを遺伝子導入後、10 μg/ml Blastcidin により薬剤選択培養を行った。出現してきた細胞を限界希釈法により希釈し、一定期間培養後、コロニーを単離した。

#### (5)遺伝子発現解析

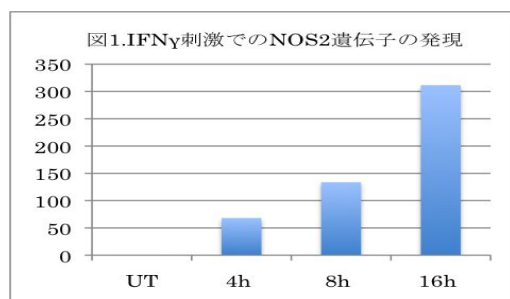
PMA 刺激 THP-1 細胞は、10 ng/ml hIFN $\gamma$  または 10 ng/ml hIL-4 にて 8 時間刺激、total RNA を調製した。抽出した RNA から cDNA を合成し、Universal Probe(Roche)を用いてリアルタイム定量 RT-PCR を行ない、18S rRNA を内在性コントロールとして用いて、mRNA の発現量(NOS2, Arg-1, CXCL9/Mig, IRF-4)を検討した。

#### (6)タンパク質発現解析

作製した不死化口腔ケラチノサイトから、Whole cell lysate を抽出し、SDS-PAGE にて分離、PVDF 膜にトランスファー後、抗 pan-Cytokeratin 抗体 (Santa cruz) を用いてウェスタンブロット法にて検討した。

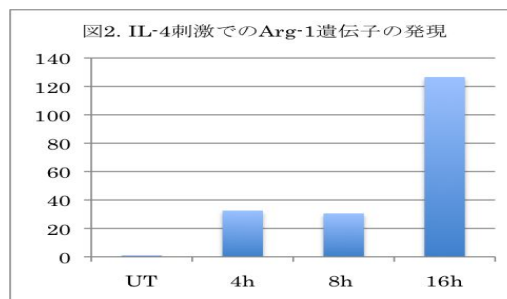
## 4. 研究成果

(1)マクロファージが IFN 刺激により M1 マクロファージへ、また IL-4 刺激により M2 マクロファージに分化するか否かを検討するために、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を IFN $\gamma$ あるいは IL-4 にて所定時間刺激後、Total RNA を抽出して Real Time PCR 法により検討を行った。M1 マクロファージの分化マーカーとして iNOS/NOS2 遺伝子を用い、その発現を検討した結果、IFN の刺激時間依存的にその発現の増強が認められた(図 1)。データには示さないが、IFN 刺激によりその他の M1 マーカーである CXCL9/Mig および CXCL10/IP-10 の発現も時間依存的に増加していた。



次に、M2 マクロファージの分化マーカーとして Arg-1 遺伝子を用い、その発現を検討した結果、IL-4 刺激 4 時間で発現が認められ、16 時間では Arg 遺伝子の発現発現の増強が認

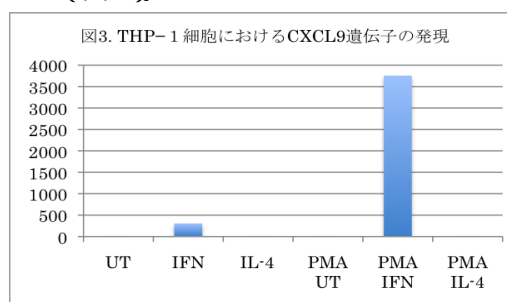
められた(図 2)。



これらの結果はこれまで報告されているように、RAW264.7 細胞を IFN または IL-4 で刺激をすると、それぞれ M1 マクロファージ、M2 マクロファージに分化することを示している。

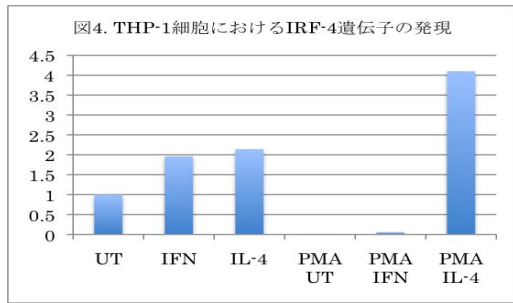
(2)THP-1 細胞は、PMA 処理によりマクロファージ様細胞に分化することが報告されている。そこで、PMA 処理した THP-1 細胞をそれぞれ IFN および IL-4 で刺激を行い、前述の RAW264.7 細胞と同様に M1 および M2 マクロファージに分化するか否かを検討するため、PMA 刺激した THP-1 細胞を IFN あるいは IL-4 にて所定時間刺激後、Total RNA を抽出して Real Time PCR 法により検討を行った。M1 マクロファージのマーカーとしては、活性化した T 細胞に対するケモカインである CXCL9/Mig を、M2 マクロファージのマーカーとしては M2 マクロファージへの調節因子として必要であることが報告されている IRF-4 を用いた。

PMA 刺激していない THP-1 細胞でも IFN により CXCL9 の発現は認められるが、PMA 刺激により、マクロファージ様細胞に分化させた細胞では、その発現の増強効果が認められた(図 3)。

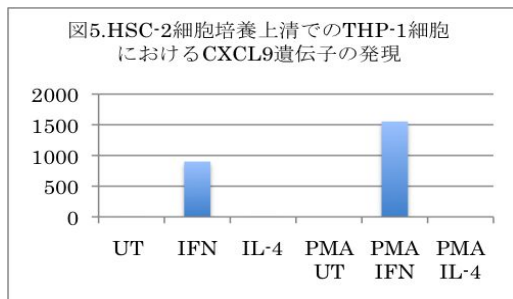


この結果から、PMA 刺激により THP-1 細胞を IFN で刺激すると、強力に M1 マクロファージに分化することが明らかとなった。

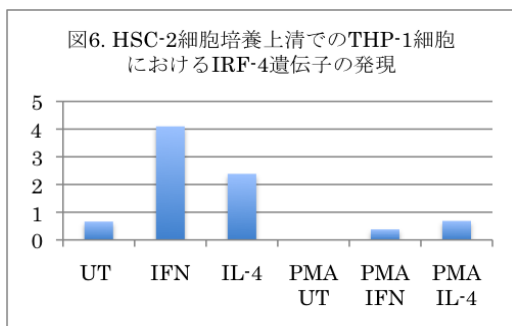
次に、M2 マクロファージへの分化を調節している IRF-4 の発現を検討した。PMA 処理により恒常的な IRF-4 の発現は抑制された(図 4; PMA UT)。興味あることに PMA 処理をしてマクロファージ様細胞に分化させた細胞では、IL-4 による IRF-4 の発現が顕著に増加した。一方、IFN による IRF-4 の発現はほとんど認められなかった(図 4)。これらの結果から THP-1 細胞を PMA 処理した細胞では IFN にて刺激を行なうと、M1 マクロファージに分化し、一方 IL-4 にて刺激すると M2 マクロファージに分化することを確認した。



(3) 腫瘍組織におけるマクロファージの分化誘導に口腔扁平上皮癌細胞が与える影響として、細胞が産生する液性因子の関与が考えられる。そこでM1あるいはM2マクロファージの表現性の誘導に口腔扁平上皮癌細胞が関与しているか否かを検討するために、口腔癌細胞の培養上清とTHP1細胞との共培養を行い遺伝子発現について検討した。口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2を48時間培養した後、培養上清を採取し、PMA非処理、およびPMA処理したTHP-1細胞に添加して培養を行った後、IFNおよびIL-4にて刺激し、CXCL9/Mig遺伝子の発現をReal Time PCR法により検討した。PMA処理しマクロファージ様細胞へ分化させたTHP細胞に口腔癌細胞の培養上清を添加し培養したTHP-1細胞では、CXCL9/Mig遺伝子発現が増強していた(図5)。



一方、M2マクロファージ極性化調節因子であるIRF-4遺伝子は、PMA非処理THP細胞ではIFN $\gamma$ またはIL-4にて刺激を行なうとその発現は増加した。一方、PMA処理THP1細胞では口腔癌細胞の培養上清を添加し培養を行った後、IFN $\gamma$ またはIL-4にて刺激を行なうと、IRF-4遺伝子発現の増加が認められず、逆にその発現は抑制された。(図6)。



以上の結果は、CXCL9/Mig遺伝子は、THP-1

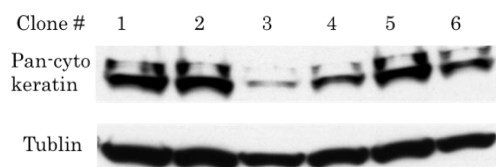
細胞の分化度に関わりなくIFNにより発現誘導され、その発現は口腔癌細胞の培養上清の添加により増強効果が認められた。一方、IRF-4遺伝子は未分化なTHP-1細胞ではIL-4、IFNいずれでも発現誘導が認められたがPMAにより分化したマクロファージ様細胞ではIL-4でのみ発現増強効果が認められた。さらにこの発現増強効果は口腔癌細胞の培養上清の添加により抑制された。これらの結果から、口腔癌細胞の培養上清はTHP-1細胞に対してM1マクロファージへの分化を促進する作用を有する可能性が示唆された。

上記結果は口腔癌細胞の培養上清中に産生された液性因子はM2ではなく、M1マクロファージにシフトさせる可能性を示唆している。しかしながら、M1マクロファージマーカーの発現は比較的早期に発現し徐々に減弱していくが、M2マクロファージマーカーの発現は遅発性であることから、時間軸を取ってその発現を詳細に検討すること、またその他のM1およびM2マクロファージの分化マーカーの発現も検討する必要がある。さらに、他の口腔扁平上皮癌細胞株の細胞培養上清でも同様の結果が認められるのか、実際にタンパク質発現も遺伝子発現と同様の結果が認められるのかを検討する必要もある。複数の口腔扁平上皮癌細胞株でも同様の現象が確認されたならば分化誘導に関わる液性因子の本体が何であるか単離、同定する必要がある。

(4) 不死化口腔ケラチノサイト細胞株の作製  
この分化誘導因子の産生が、癌化した口腔粘膜上皮細胞が持つ特性であるのか検討するために正常口腔粘膜上皮細胞(口腔ケラチノサイト)さらに不死化したケラチノサイトにおいても認められるのか解析する必要がある。そこで口腔扁平上皮癌の発症に関与していることが考えられているヒトパピロウイルス(HPV)の初期遺伝子E7を遺伝子導入した不死化した口腔ケラチノサイト細胞株を作製した。細胞の不死化には、HPV E7およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素(human telomerase reverse transcriptase: hTERT)発現ベクターをレンチウイルス発現系を用いて構築し、初代口腔ケラチノサイトに遺伝子導入を行なった。その後、Blasticidinにより薬剤選択培養を行い、増殖してきた細胞を限界希釈法により希釈し、一定期間培養後、複数のコロニーを単離した。単離した細胞がケラチノサイトの特性を示しているか否かを検討するために、細胞を所定期間培養後、細胞抽出液を作製し、SDS-PAGEにて分離、PVDF膜にトランスファー後、抗pan-Cytokeratin抗体を用いウェスタンブロット法にて検討した。その結果、得られたコロニーのうち、ほとんどがPan-Cytokeratin陽性を示していたことから、口腔粘膜上皮細胞の特徴を有する不死化口

## 腔ケラチノサイトのクローンが得られた(図7)

図7. 口腔粘膜上皮細胞クローンにおけるPan-cytokeratinの発現



現在、初代ケラチノサイト、不死化ケラチノサイトの培養上清にて培養した THP-1 細胞における M1 および M2 マーカー遺伝子発現の検討を行っているところである。

### 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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

森 一将、廣井美紀、嶋田 淳、大森喜弘  
口腔前癌病変における CD163 + 腫瘍関連マクロファージの分化誘導への浸潤ヘルパー1 型 T 細胞の関与  
第 57 回歯科基礎医学会学術大会  
2015 年 9 月 13 日、新潟市

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

廣井 美紀 (HIROI, Miki)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号：30419717

#### (2)研究分担者

大森 喜弘 (OHMORI, Yoshihiro)  
明海大学・歯学部・教授  
研究者番号：50194311

森 一将 (MORI, Kazumasa)  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号：80372902

#### (3)連携研究者

なし

#### (4)研究協力者

なし