

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11684

研究課題名(和文) 前癌病変および扁平上皮癌における腫瘍関連マクロファージの分化誘導機構と機能解析

研究課題名(英文) Culture induction mechanism of tumor-associated macrophage and functionals analysis in precancerous lesions and squamous cell carcinoma

研究代表者

森 一将 (MORI, Kazumasa)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：80372902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：IFN誘導性ケモカインの抗腫瘍活性を検討するために、マウス扁平上皮癌細胞にCXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10)、CXCL11 (I-TAC)の発現ベクターを遺伝子導入し、安定発現細胞株を作製し、ヌードマウスに移植後、腫瘍形成に対する影響を検討した。ヌードマウスはT細胞が欠損していることから、CXCL9、CXCL11群において浸潤したNK細胞による細胞傷害作用、および血管内皮細胞の増殖抑制作用により腫瘍の増殖が抑制されたものと考えられる。CXCL9、CXCL11群ではF4/80陽性細胞の浸潤も認められることからマクロファージ系細胞も腫瘍の進展の抑制に関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白板症部はTh1優位な微少環境であり、ケモカインCXCL9によって浸潤したTh1がIFNを産生し、CD163+ M1マクロファージの分化誘導に関与していることが示唆された。このように上皮性異形成から癌腫へと進行するいわゆるdysplasia-carcinoma sequenceの経緯のなかで、マクロファージは発癌においてどのような役割があるかについて明らかにすることは、臨床的に発癌の前段階において疾患を予測する診断マーカーの確立および発癌予防に寄与するものとして大変意ある検討と考え本研究課題を申請した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the antitumor activity of interferon-inducible chemokines, we established stable cell lines transfected with expression vectors of CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), and CXCL11 (I-TAC) into the mouse squamous cell carcinoma cell line, SCCVII, and examined the effect of these chemokine-expressing cell lines on tumorigenesis after transplantation into nude mice. These results indicate that CXCL9 and CXCL11 suppressed tumor growth via the cytotoxic effect of infiltrated NK cells and growth inhibitory effect of vascular endothelial cells. In addition, infiltration of F4/80-positive cells was suggested to be involved in the suppression of tumorigenesis.

研究分野：口腔外科

キーワード：ケモカイン CXCL11 CD4 CD8 F4/80 CD163

1. 研究開始当初の背景

近年、マクロファージはその生物学的活性により機能的に異なる2つのサブセットが存在することが明らかにされている。ヘルパー1型T細胞(Th1)由来のinterferon-gamma (IFN)により活性化されたマクロファージは、M1マクロファージ(classically activated macrophages)と呼ばれ、抗細菌活性、抗腫瘍活性を示すことが知られている。M1マクロファージは一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS/NOS2)、抗腫瘍性ケモカイン CXC ligand 9 (CXCL9)、CXCL10や炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- (TNF)などの遺伝子の発現を増強し、炎症反応の増強や腫瘍細胞に対する細胞傷害性を示すことが明らかにされている。一方、Th2由来の抗炎症性サイトカイン interleukin-4 (IL-4)、IL-13により活性化されたマクロファージは、M2 マクロファージ(alternatively activated macrophages)に分類され、増殖因子や血管新生因子を発現し、またIL-10やtransforming growth factor- (TGF-)などのサイトカインを産生することにより炎症反応、免疫応答を抑制し、創傷治癒に関与していると考えられている。これらのマクロファージの細胞表面の細胞分化抗原群(cluster of differentiation: CD)の解析から、M1 マクロファージのマーカーとしてCD80、CD86が、またM2マクロファージのマーカーとしてCD163、CD204が同定され、固形腫瘍に浸潤している腫瘍関連マクロファージの表現型が次第に明らかにされてきている。CD163は、神経膠腫、卵巣癌、消化管間質腫瘍、メラノーマ、腎癌、乳癌、肺癌、ホジキンリンパ腫などの固形腫瘍における腫瘍関連マクロファージに発現している。これらの臨床症例におけるCD163⁺マクロファージの浸潤が多い症例では、腫瘍の組織学的悪性度が高く、予後や抗癌剤に対する治療成績が悪いことが示されており、腫瘍細胞の悪性化にCD163⁺マクロファージが関与していることが示唆されている。以前、申請者らは、口腔扁平上皮癌におけるCD163⁺マクロファージの局在について検討し、口腔癌の分化度の低下に伴い、CD163⁺マクロファージの数が有意に増加し、他の固形癌と同様に癌の発症および進展に関与する可能性について報告した。また口腔前癌病変である白板症における浸潤マクロファージのフェノタイプを明らかにし、口腔癌の発症、進展における腫瘍関連マクロファージの役割について考察した。その結果、白板症部でCD163⁺マクロファージの浸潤が認められ、CD163⁺マクロファージとCD4⁺T細胞の浸潤に正の相関関係が認められた。またTh1のマーカーであるケモカインレセプター CXCR3並びにCCR5陽性細胞が認められた。一方、CCR4陽性細胞(Th2)は認められなかった。Th1からはIFN が産生されることからIFN 誘導性遺伝子産物である転写因子STAT1及びTh1のケモカインであるCXCL9陽性細胞が認められ、活性型STAT1であるリン酸化STAT1の発現も認められた。さらに CD163⁺マクロファージとSTAT1との共局在が蛍光二重染色で確認された。これらの結果から白板症部はTh1優位な微少環境であり、ケモカインCXCL9によって浸潤したTh1がIFN を産生し、CD163⁺ M1 マクロファージの分化誘導に関与していることが示唆された。このように上皮性異形成から癌腫へと進行するいわゆるdysplasia-carcinoma sequenceの経緯のなかで、マクロファージは発癌においてどのような役割があるかについて明らかにすることは、臨床的に発癌の前段階において疾患を予測する診断マーカーの確立および発癌予防に寄与するものとして大変意ある検討と考え本研究課題を申請した。

2. 研究の目的

マクロファージは自然免疫において中心的役割を果たしており、細菌やウイルス感染といった病原体の侵入に対しそれらを排除するのに重要な細胞である。またマクロファージはその活性化がなされると抗腫瘍効果を示すM1マクロファージ(古典的マクロファージ)と腫瘍増殖および免疫抑制作用のあるM2マクロファージに大別され、最近の研究から固形癌組織の周囲にM2マクロファージが多数認められ癌の浸潤・転移などに寄与している可能性が明らかとなりつつある。しかし我々の先行研究の結果からは、前癌病変である白板症部はTh1優位な微少環境であり、ケモカインCXCL9によって浸潤したTh1がIFN を産生し、CD163⁺ M1 マクロファージの分化誘導に関与していることが示唆された。そこで本研究では、まず口腔前癌病変から早期浸潤癌に至る過程においてTh1ケモカイン CXCL9、CXCL10、CXCL11がどのような役割を演じているか検討するため、マウス扁平上皮癌細胞株(SCCVII)に上記ケモカインを過剰発現させた安定発現細胞株を作製し、ヌードマウスへ移植し、腫瘍形成に及ぼすこれらケモカインの役割、また浸潤マクロファージの表現型について検討した。当初の研究方法のなかで前癌病変から口腔癌病変への推移に伴う浸潤マクロファージならびにT細胞の性状や抗腫瘍作用について、発癌物質によるマウス白板症モデルの作成、解析については現在遂行中で今後その結果について公表予定である。

3. 研究の方法

1) IFN 刺激によるSCCVII細胞における*Cxcl 9, 10, 11*の発現解析

予備実験として、SCCVII細胞のIFN刺激による*Cxcl9*、*Cxcl10*、*Cxcl11*の発現をリアルタイムPCR(qRT-PCR)法により確認した。IFN の単独刺激により*Cxcl9*、*10,11*遺伝子の発現が誘導され、さらにTNF との共刺激によりこれら遺伝子の発現は相乗的に増強した(Fig1)。

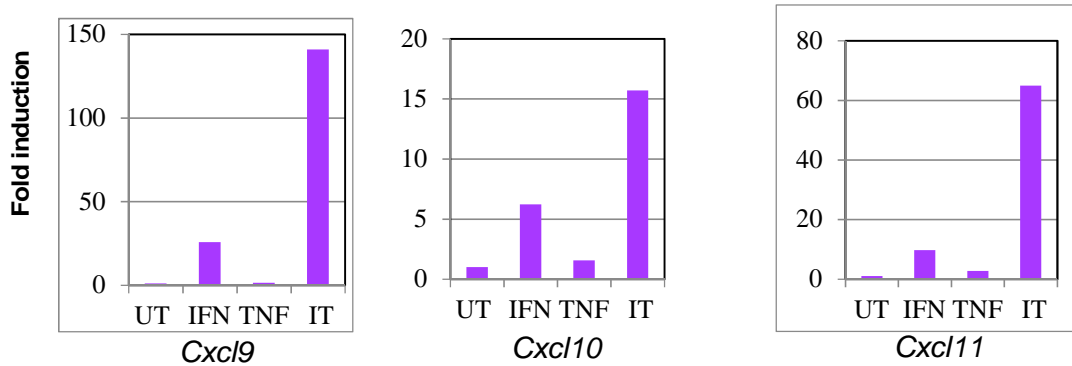


Fig1:SCCVII細胞におけるIFN誘導性ケモカイン遺伝子発現
 マウスSCCVII細胞について、未処理(UT)、またIFN およびTNF で24時間処理し、トータルRNAを調製し、qRT-PCRによる特異的mRNAレベルの分析を行った。

2) ケモカイン安定発現細胞株の構築

次に、上記3種のマウスケモカイン遺伝子を発現ベクターに組み込んだ発現ベクターを作製し、それぞれをマウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞に遺伝子導入し、Blasticidinにて薬剤選択を行った。増殖してきた薬剤耐性クローンについてクローニングリングを用いてそれぞれ5~7クローンを単離した。

3) IFN 誘導性ケモカインの安定発現細胞株におけるケモカインの産生

単離した細胞株は、24 wellに播種し、48時間後の培養上清を用いて、ケモカインの発現量をELISA法にて解析し、発現量の高い細胞株を以後の実験に使用した(Fig2)。なお、これらのケモカイン発現細胞の増殖能は、empty vector (NC)を導入した細胞株の増殖能と大きな違いは認められなかった。

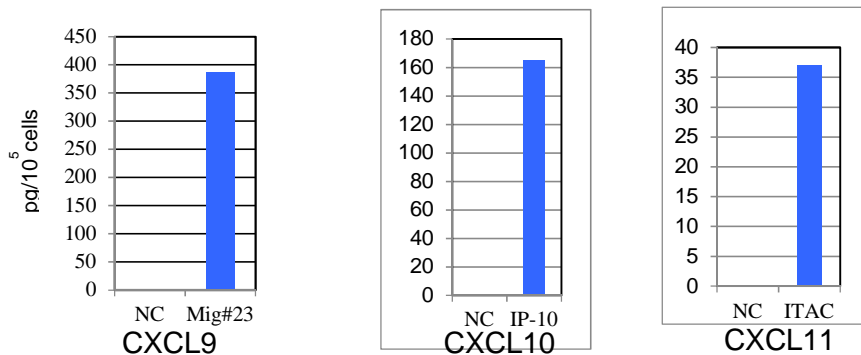


Fig2:安定細胞株におけるCXCL 9、CXCL10、およびCXCL 11ケモカインの産生
 安定した細胞株を48時間培養し、培養上清中のケモカインの量をELISA法で測定した。

4) 上記ケモカイン発現細胞株のヌードマウス背部への移植

ヌードマウスの背部に上記3)で作製したケモカイン安定発現細胞株を移植し、腫瘍形成に違いが認められるか検討した。対照群としてはベクターのみを導入した細胞株(NC)を用い、経日的に腫瘍の大きさを測定した。対照群において腫瘍の大きさが最大に達した時点で腫瘍病変部の摘出を行った。移植した細胞はNC (empty vector)、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCL11/I TAC、及び親株 SCCVIIの5種とした。

5) マウス腫瘍組織における血管内皮細胞、NK細胞マーカーの検討

腫瘍形成が認められた腫瘍組織から total RNA を調整し、血管内皮細胞マーカーである CD31 ならびにNK細胞のマーカーである Perforin の遺伝子発現を qRT-PCR を用いて検討した。

6) マウス腫瘍組織についての血管内皮細胞、NK細胞マーカーの免疫組織学的検討

マウス腫瘍組織について浸潤マクロファージ、リンパ球(NK細胞)の性状を明らかにするため腫瘍形成が認められた腫瘍組織の各種CD抗体(血管内皮細胞マーカーであるCD31ならびにNK細胞のマーカーでCD161)を用いて免疫組織学的検討ならびに各症例の病理組織学的検討を行った。また腫瘍組織内の腫瘍関連マクロファージの解析には、抗F4/80(マクロファージマーカー)抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

7) IFN 誘導性の NOS2 および Arginase-1 の発現

Th1またはTh2優位な腫瘍微小環境の検討では、IFN 誘導性のM1-マクロファージマーカーである一酸化窒素合成酵素 NOS2 陽性細胞とM2-マクロファージマーカーである Arginase-1 陽性細胞を免疫組織化学的解析により評価した。また、ケモカイン発現細胞を移植した腫瘍組織における Nos2 と Arginase-1(Arg-1)の転写レベルについて腫瘍組織から total RNA を調製し、遺伝子発現を qRT-PCR

を用いて検討した。

4. 研究成果

1) ノードマウス背部に移植したケモカイン発現細胞株の腫瘍形成

インターフェロン誘導性ケモカインの抗腫瘍活性を検討するために、マウス扁平上皮癌細胞 SCCVII に CXCL9 (Mig)、CXCL10 (IP-10)、CXCL11 (I-TAC) の発現ベクターを遺伝子導入し、安定発現細胞株を作製し、ノードマウスに移植後、腫瘍形成に対する影響を検討した (Fig1、2)。

その結果、empty vector 導入株 (NC 群) と比較してケモカイン安定発現細胞株、特に CXCL9 及び CXCL11 安定発現細胞株で顕著な腫瘍形成の抑制が認められた (Fig3)。

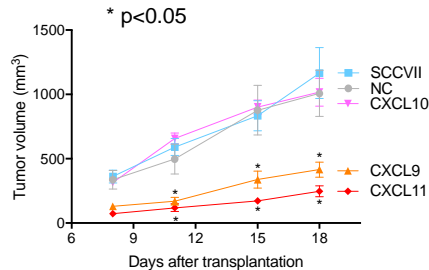


Fig3: ケモカインを発現する SCCVII 細胞を移植したノードマウスにおける腫瘍形成動態

IFN誘導性ケモカイン発現細胞を、 2×10^6 / マウスの用量で各マウスに皮下注射した。腫瘍の成長は、たて×よこの2つのクロス方向の腫瘍サイズを測定することによって計測した。NCと比較して腫瘍形成の阻害についての有意性が認められた (* $p < 0.05$, ANOVA)。この腫瘍形成の抑制機構を検討する目的で以下の解析を行った。

2) マウス腫瘍組織における Perforin および CD31 遺伝子発現の血検討

腫瘍組織から total RNA を調整し、NK 細胞のマーカーである *Perforin* ならびに血管内皮細胞マーカーである *CD31* の遺伝子発現を qRT-PCR を用いて検討した。その結果、CXCL9 及び CXCL11 発現細胞株では *Perforin* の発現が有意に上昇していた。また CXCL11 発現細胞株では *CD31* の発現は抑制傾向が認められた。

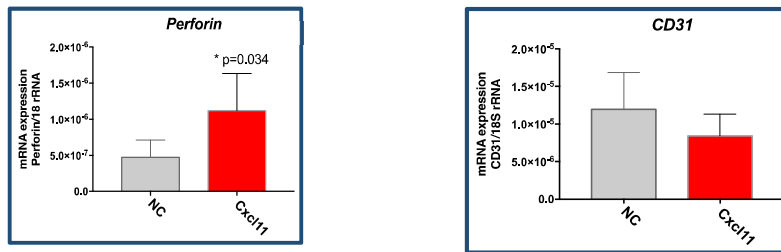


Fig4: マウス腫瘍組織における血管内皮細胞、NK 細胞マーカーの検討

Perforin の発現は、CXCL11 を発現する細胞を移植した腫瘍組織において有意に増強された。

また CXCL11 発現細胞株では *CD31* の発現は抑制傾向が認められた。

3) マウス腫瘍組織における NK 細胞マーカー CD161 および血管内皮細胞マーカー CD31 の免疫組織学的検討

CXCL11 を発現した腫瘍組織では、血管内皮細胞のマーカーである CD31 に対する陽性反応性の低下が観察された。一方、NK 細胞のマーカーである CD161 (NK1.1) の発現は CXCL11 を発現した腫瘍組織において陽性反応性の増加が観察された。CD161 (NK1.1) 陽性細胞は、主に腫瘍の間質と腫瘍実質全体に分布していた。

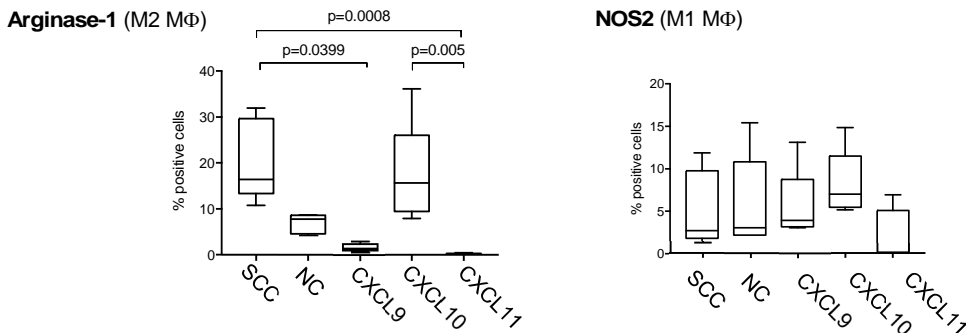


Fig5: NOS2 抗体および Arginase-1 抗体による腫瘍組織の免疫組織化学的染色

CXCL9 および CXCL11 発現細胞株を移植したマウスの腫瘍組織において、Arginase-1 陽性細胞の有意な減少が観察された。

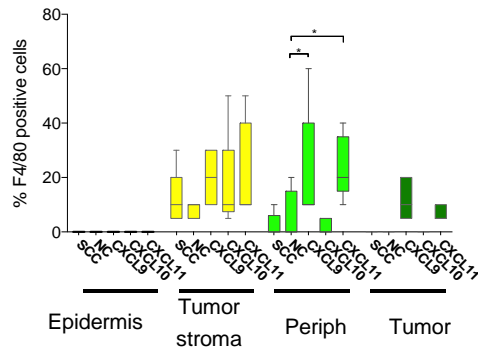


Fig6: 抗 F4/80 を用いた腫瘍組織の免疫組織化学的染色。

マクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞を免疫組織化学的解析により検討した。CXCL9 および CXCL11 を発現する細胞株を移植したマウスの腫瘍実質末梢部では、F4/80 陽性細胞の浸潤が増加していた (* $p < 0.05$ ANOVA)。

CXCL9, CXCL11 群では F4/80 陽性細胞の浸潤も認められることからマクロファージ系細胞も腫瘍の進展抑制に関与している可能性が示唆された。

4) IFN 誘導性の NOS2 および Arginase-1 の発現

M1 マクロファージマーカーである NOS2 陽性細胞、および M2 マクロファージマーカーである Arginase-1 陽性細胞を、免疫組織化学分析によって評価した。その結果、CXCL9 および CXCL11 発現細胞株を移植したマウスの腫瘍組織において、Arginase-1 陽性細胞の有意な減少が観察された (Fig. 5)。次に、ケモカイン発現細胞を移植した腫瘍組織における *Nos2* と *Arginase-1* の転写レベルについて腫瘍組織から total RNA を調製し、遺伝子発現をリアルタイム PCR を用いて検討した。その結果、CXCL9 および CXCL11 発現細胞株を移植したマウスの腫瘍組織において、*Arginase-1* 転写物の有意な減少が観察された。*Nos2* の発現については有意な差が認められていないことから現在、他の M1-マクロファージマーカーについても検討中である。

【まとめ】

1. IFN 誘導性ケモカイン、CXCL9、CXCL10、および CXCL11 を発現する安定した細胞株が、マウス扁平上皮癌細胞 SCCVII で確立された。
2. これらの安定した細胞株の増殖率は、*in vitro* で有意差はみられなかった。
3. IFN 誘導性ケモカイン発現細胞株をヌードマウスに移植したところ、コントロール細胞株 (NC) と比較して、腫瘍増殖の顕著な抑制が CXCL9 および CXCL11 発現細胞株で観察された。
4. 血管内皮細胞マーカーである CD31 の発現低下が、CXCL11 発現細胞を移植した腫瘍組織で観察され、また *Perforin* 遺伝子発現の有意な増加および CD161 陽性細胞 (NK 細胞) の浸潤がこれらの同じ組織で観察された。
5. F4 / 80 陽性細胞 (マクロファージ) は、CXCL9 および CXCL11 を発現する細胞株を移植した腫瘍実質の末梢領域で観察された。
6. これらのケモカイン発現細胞株を移植した腫瘍組織で M1 マクロファージマーカーである NOS2 発現の有意差は観察されなかったが、CXCL9 を移植した腫瘍組織で Arginase-1 タンパク質とその転写物の有意な減少が観察された。

【結論】

以上の結果から、ヌードマウスは T 細胞が欠損していることから、CXCL9, CXCL11 群にける腫瘍形成の抑制は、浸潤した NK 細胞による細胞傷害作用、および血管内皮細胞の増殖抑制作用によるものと考えられる。また CXCL9, CXCL11 群ではマクロファージの浸潤の増加もみられることから腫瘍形成の抑制に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 一将
2. 発表標題 Anti-tumor effects of interferon-inducible chemokines against mouse squamous cell carcinoma cells in mice
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 一将
2. 発表標題 口腔癌におけるインターフェロン誘導性ケモカインの機能解析
3. 学会等名 第62回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	廣井 美紀 (HIROI MIKI) (30419717)	明海大学・歯学部・講師 (32404)	