

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11691

研究課題名(和文) 口腔がん幹細胞の転移巣形成機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of metastasis development mechanism in oral cancer stem cell

研究代表者

梅村 直己 (Umemura, Naoki)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：80609107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来免疫抑制細胞(MDSCs)と腫瘍関連マクロファージ(TAMs)は双方とも免疫能を抑制し結果腫瘍が増大すると考えられる重要な免疫抑制細胞群である。しかしながら、それらの細胞群が腫瘍の増大に伴いどのように相互作用し、腫瘍免疫を抑制しているのかは明らかでない。そこで我々は担癌マウスモデルにおいて腫瘍浸潤マクロファージと脾臓内MDSCsを比較するため、両細胞群に共通のCD11b+細胞を分取し、担がんマウス腫瘍内CD11b+細胞と脾臓内CD11b+細胞を腫瘍接種早期と後期にそれぞれ採取し、各々の細胞膜抗原と免疫抑制機能、細胞内代謝が代謝がどのように変化しているのかをメタボローム解析にて確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の増大に伴う、主要な免疫抑制細胞である、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSCs)と腫瘍関連マクロファージ(TAMs)の解析を詳細に行なった。

その結果、腫瘍増大に伴い細胞形態、細胞表面マーカーに大きな変化を認めなかったが、その一方で、TAMsの細胞内代謝では解糖系が更新し、メチオニン回路の亢進、グルタミン、グルタミン酸の蓄積が明らかになった。これにより、免疫抑制に関わるTAMsの腫瘍増大に伴う細胞内代謝変化を標的とした免疫治療の礎となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and tumor-associated macrophages (TAMs) are both key immunosuppressive cells that contribute to tumor growth. Metabolism and immunity of tumors depends on the tumor microenvironment (TME). However, the intracellular metabolism of MDSCs and TAMs during tumor growth remains unclear. Here, we characterized CD11b+ cells isolated from a tumor-bearing mouse model to compare intratumoral TAMs and intrasplenic MDSCs. Intratumoral CD11b+ cells and intrasplenic CD11b+ cells were isolated from tumor-bearing mice at early and late stages (14 and 28 days post-cell transplantation, respectively).

研究分野：生化学

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍関連マクロファージ 骨髄由来免疫抑制細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんの発症数は全がんの約5%ではあるが、頭頸部は摂食、嚥下、呼吸など生命の維持に欠かすことのできない多くの機能を有しており、癌治療において根幹治療と Quality of life の維持の両立が重要である。しかしながら初回治療後、局所再発率は60~70%、遠隔転移率が20~30%で死因は遠隔転移よりも局所再発に起因することが知られている。一方、2006年アメリカがん学会 (American Association for Cancer Research: AACR)により「がん幹細胞仮説」の提唱から現在までの多くの研究により、腫瘍組織内に潜む2~5%のがん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) は悪性腫瘍の形成及び増殖を促進させ、化学療法や放射線療法への抵抗性を保持し、腫瘍の再発・転移に深く関与していることが明らかになっている。したがって、がん幹細胞を標的とした治療法を確立することで再発・転移を効率的に抑制するがん治療へとつながることが期待される。申請者は自らの研究成果より、頭頸部扁平上皮癌がん幹細胞マーカーである CD44 に注目し、がん幹細胞マーカーである CD44 の薬剤耐性獲得における役割の解明を試みてきた。その研究の一環として、申請者はヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC-3 から多剤耐性を獲得した細胞株を作成し、多剤耐性獲得株が「がん幹細胞」の特徴を有しているのか、また親株と比較して多剤耐性獲得に伴い、どのような特徴を有するようになったかを詳細に研究した。その結果、多剤耐性獲得株 (R HSC-3) は薬剤排出能を有し、上皮間葉転換 (EMT: Epithelial- Mesenchymal Transition) の特徴を持ち、幹細胞マーカーである転写因子 Nanog とがん幹細胞マーカーである CD44 が高発現しており、化学療法剤によるアポトーシス誘導に対して抵抗性を有していることを明らかにした。これらの事より多剤耐性獲得株 (R HSC-3) はがん幹細胞の特徴を有していることを明らかにした。

さらに DNA microarray 解析により、新たに幹細胞関連遺伝子 PAX8, SOX9, NOG, MMP24 が薬剤耐性獲得株では有意に増加していること、さらに、全く予測していなかった Endocytosis 関連遺伝子や接着因子関連遺伝子においてもいくつか有意に変化しているのが分かった。

このように、申請者の今までの研究により、頭頸部扁平上皮がん幹細胞の薬剤抵抗性獲得に関わる新たな因子が明らかになるとともに、microarray 遺伝子解析結果より、接着因子関連遺伝子の変化に注目した。つまり、申請者は頭頸部扁平上皮がん幹細胞の細胞接着因子が、転移・転移巣形成機構に深く関与しているのではないかと仮説に至った。そこで申請者は、頭頸部扁平上皮がん幹細胞の転移・転移巣形成機構を解明する為の方策として、がん幹細胞に超高光度発光タンパク質を遺伝子導入し、マウス舌に移植することで、がん幹細胞の転移を蛍光イメージングで観察し、さらに転移組織から細胞を取り出し、フローサイトメトリーで解析することで、がん幹細胞がどのように変化したのかを容易に観察できるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞、主要組織の特徴を解析し、腫瘍の遠隔転移、増大を抑える新たな方策を模索することである。

## 3. 研究の方法

我々は口腔がん細胞の多剤耐性獲得株 (R HSC-3) を作成し、その特徴を解析していた。しかしながら、計画していた R HSC-3 のマウス舌への移植モデルの作成がうまくいかず、研究計画を大きく変更せざるを得なかった。そこで我々は腫瘍免疫を抑制する骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSCs) と腫瘍関連マクロファージ (TAMs) の解析に大きく舵を切った。MDSCs と TAMs は腫瘍免疫を抑制するのに大きく関わっていることが知られている。そこで我々は担癌マウスモデルにおいて

腫瘍浸潤マクロファージと脾臓内 MDSCs を比較するため、両細胞群に共通の CD11b+細胞を分取し、担がんマウス腫瘍内 CD11b 陽性細胞と脾臓内 CD11b を腫瘍接種 early stage(14日目)と late stage(28日目)にそれぞれ採取し、各々の細胞膜抗原と免疫抑制機能、細胞内代謝がどのように変化しているのかを確認した。

#### 4. 研究成果

(1)腫瘍内 CD11b 陽性細胞は CD8 細胞の増殖を抑制する。

腫瘍内から CD11b 陽性細胞

を分取し、そのフェノタイプ

を解析した。腫瘍摂取後

14 日目の腫瘍から分取した

CD11b 陽性細胞は

$F4/80^{hi}, Gr-1^{lo}, IL-4R^{hi}$  で

あり late stage において

も、脾臓内 CD11b では late

stage に IL-4R が陰性から

陽性になるとの変化があ

ったが変化を認めなかつ

た(図 1)。細胞形態は

early stage でも late

stage においても CD11b 陽性細胞は細胞の多くは類円形の核を持ち、胞体の豊富なマクロファージで多くを占め、もしくは空胞をもつがマクロファージより胞体の少ない単球であった。さらに脾臓内 CD11b 陽性細胞とは違い、腫瘍内 CD11b 陽性細胞は early stage の段階で抗原非特異的に活性化された CD8 細胞の増殖を抑制するのが確認された。また TNF KO mice の腫瘍内 CD11b 陽性細胞には CD8 細胞の抑制が見られないことから、腫瘍内 CD11b 陽性細胞の CD8 細胞の抑制には TNF が重要であることがわかった

脾臓内 CD11b 陽性細胞は late stage でも CD8 細胞を抑制しない。

(2)脾臓内 CD11b 陽性細胞は late stage でも CD8 細胞を抑制しない。

腫瘍の増殖に伴う脾細胞と脾細胞内の CD11 陽性細胞の細胞数との関係を確認した(図 2)。

通常のマウスにおいて総脾細胞数は約  $48 \times 10^6$  個でその中で CD11b 陽性細胞は  $6.4 \times 10^6$  であった。しかしながら、腫瘍が増大するとともに、腫瘍摂取 21 日目には総細胞数が  $95 \times 10^6$  個と正常マウスの総脾細胞数に比べて有意に増加した。腫瘍摂取後 28 日目、腫瘍体積が  $750 \text{mm}^3$  を超える頃には総脾細胞数は  $213 \times 10^6$  個と激増し、CD11b 陽性細胞数も  $26.6 \times 10^6$  個と有意に増加しているが確認された。次に腫瘍増殖に伴う脾臓内 CD11b+ cells の形態を確認した。Early stage である腫瘍接種後 14 日目

図 1 腫瘍内 CD11b 陽性細胞

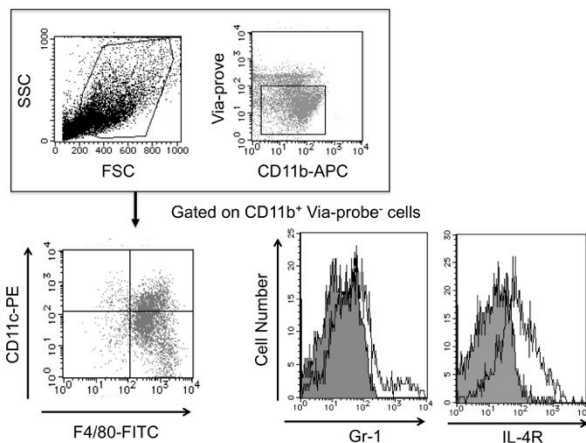
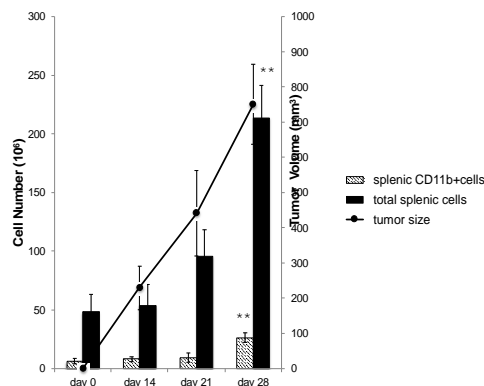


図 2 脾臓内 CD11b 陽性細胞の変化



腫瘍増殖に伴う脾臓内 CD11b+ cells の形態を確認した。Early stage である腫瘍接種後 14 日目

と late stage である腫瘍接種後 28 日目の脾臓内 CD11b 陽性細胞は双方ともに分葉核をもつ好中球と楕円形の核を有する単球とが散在する分画であり、細胞形態だけでは、early stage と late stage における CD11b 陽性細胞の違いを見分けるのは困難であった。その一方、脾臓内 CD11b 陽性細胞は Gr-1 強陽性であり、さらに early stage では IL-4R が陰性であったものが、late stage では陽性になっており、late stage では MDSCs のフェノタイプを有していた。しかしながら、その late stage の脾臓内 CD11b 陽性細胞には抗原非特異的に刺激した CD8 細胞の増殖を抑制する機能は確認できなかった。

(3) 腫瘍関連マクロファージは腫瘍の増大に伴い解糖系が亢進する。

MDSCs と TAMs の腫瘍増大に伴うフェノタイプのなマーカーの変化を認めることができなかった。そこで我々は、メタボローム解析により、腫瘍増大に伴い TAMs の代謝がどのように変化したのか解析した。その結果、非常に多くの示唆されるデータを得れた。膨大なデータであるが、MDSC 単独で腫瘍の増大に伴い増加もしくは減少しているものはないが、TAM 単独で増加し、代謝が亢進している部位が確認できた。まずは TAMs において解糖系が亢進しており、グルコース 6リン酸 ( glucose6-phosphate:G6p )、フルクトース -1,6-ビスリン酸 ( fructose 1,6-bisphosphate:F1.6P )、3-ホスホグリセリン酸 ( glycerate 3-phosphate:3PG )、ホスホエノールピルビン酸 ( phoshoenolpyruvic acid:PEP ) が顕著に増加していた。また TAMs において解糖系の 3PG が腫瘍に伴い増大し、そこから分岐したメチオニン回路において S-アデノシルメチオニン ( S-adenosylmethionine:SAM ) と S-アデノシルホモシステイン ( S-adenosyl-L-homocysteine:SAH ) が増加しておりメチオニン回路の亢進していることがわかった。またグルタミンとグルタミン酸が蓄積し TCA 回路はしっかり回っており尿素回路も動いている、いわゆるグルタミノーシスが生じていた。以上のことから腫瘍の増大に伴い、TAMs において解糖系が亢進していた。さらに TAMs では解糖系から分岐してメチオニン回路の亢進、グルタミンとグルタミン酸の蓄積を認めた。

(4) 結論

腫瘍の増大に伴い、腫瘍関連マクロファージ ( TAMs ) の細胞内代謝では、解糖系の亢進、メチオニン回路の亢進、グルタミン、グルタミン酸の蓄積を認めた。腫瘍免疫の抑制に大きく関わる TAMs の細胞内代謝変化を標的とした新たな免疫療法の礎となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sumi S, Umemura N, Adachi M, Ohta T, Naganawa K, Kawaki H, Takayama E, Kondoh N, Sumitomo S.	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 The luminance ratio of autofluorescence in a xenograft mouse model is stable through tumor growth stages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical nad experimental dental research	6. 最初と最後の頁 174-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.126.	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 Nanbu T, Umemura N, Ohkoshi E, Nanbu K, Sakagami H, Shimada J.	4. 巻 39(1)
2. 論文標題 Combined SN-38 and gefitinib treatment promotes CD44 degradation in head and neck squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology reports	6. 最初と最後の頁 367-375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2017.6105. Epub 2017 Nov 21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemura N, Sugimoto M, Kitoh Y, Saio M, Sakagami H	4. 巻 -
2. 論文標題 Metabolomic profiling of tumor-infiltrating macrophages during tumor growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer immunology, immunotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02622-8DOI: 10.1007/s00262-020-02622-8	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷲見成紀、梅村直己、足立誠、太田貴久、長縄綱亮、川木晴美、高山英次、近藤信夫、住友伸一郎
2. 発表標題 口腔がん診断の自然蛍光画像診断の輝度比率は腫瘍の増大に影響せず安定してる
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術総会（九州大学）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鷲見茂紀、梅村直己、長縄鋼亮、村木智則、足立誠、江原雄一、太田貴久、住友伸一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における口腔粘膜観察装置の解明
3. 学会等名 第62回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会（京都）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅村直己、高山英次、川木晴美、神谷真子、近藤信夫
2. 発表標題 ヒアルロン酸の歯科応用の可能性
3. 学会等名 第37回日本歯科薬物療法学会・学術大会(名古屋)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅村直己、上野恭平、川木晴美、高山英次、近藤信夫
2. 発表標題 腫瘍内浸潤マクロファージの細胞内代謝は腫瘍の増大に伴い解糖系が亢進する
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術総会（東京）
4. 発表年 2019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	大越 絵実加  (Ohkosi Emika)  (10287667)	青森大学・薬学部・准教授   (31101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	足立 誠 (Adachi Makoto) (10468192)	朝日大学・歯学部・講師  (33703)	
研究分担者	近藤 信夫 (Kondoh Nobuo) (40202072)	朝日大学・歯学部・教授  (33703)	
研究分担者	高山 英次 (Takayama Eiji) (70533446)	朝日大学・歯学部・准教授  (33703)	