

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19157

研究課題名（和文）M1マクロファージに着目した口腔扁平上皮癌の新規予防法・病理診断法の開発

研究課題名（英文）The development of novel prevention and histological diagnosis methods for oral squamous cell carcinoma focusing on M1 macrophages

研究代表者

重岡 学（Shigeoka, Manabu）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：20778716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌は難治癌で、予防や早期診断・治療が重要となることから発癌メカニズムの解明が急がれる。本研究では口腔扁平上皮内腫瘍において基底膜直下に集簇するM2マーカーCD163陽性マクロファージが腫瘍免疫抑制を介し生物学的なプロモーターとして関与し、浸潤癌への進展に伴い間質のみならず腫瘍胞巣内や病巣周辺の上皮へと局在を変化させることを明らかにした。加えて、癌細胞は上皮内集簇マクロファージとの相互作用によりM1マクロファージ関連ケモカインであるCCL20の分泌を介してマクロファージのCD163発現を誘導すると同時に悪性形質を促進する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮の発癌過程は未だ解明されていない点が多く、さらには、これまでマクロファージに着目した検討は少数であった。本研究の学術的・社会的意義は、口腔の発癌段階におけるマクロファージはM1/M2理論のみでは答えの出せない多様な活性を示すことを見出し、マクロファージの分布や癌細胞との位置関係の変化、それに伴い微小環境中に誘導されるCCL20が口腔癌の予防や早期病変に対する診断の標的となる可能性を示したことである。

これらの成果は、癌進展への関与が注目される癌細胞-マクロファージ相互作用を基軸とした口腔扁平上皮「発癌」の新たな制御法開発への足がかりを提供するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an intractable cancer, and its prevention, early diagnosis, and early treatment are important. Therefore, the elucidation of oral carcinogenic mechanism is urgent. In this study, it was clarified that M2 marker CD163-positive macrophages accumulated beneath the basement membrane serve as a biological promoter via tumor immunosuppression in the progression of oral squamous intraepithelial neoplasia and that they accumulated not only to the cancer nest but also to its surrounding epithelium, depending on the presence of stromal invasion. In addition, we found that OSCC cell-derived CCL20, which is M1 macrophage-related chemokine, induced by interaction with intraepithelial macrophages enhance the CD163 expression of macrophages and enhance malignant phenotype of OSCC cells.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 マクロファージ 舌癌 舌白板症 CD163 IL-10 CCL20 発癌

1. 研究開始当初の背景

- 1) 口腔癌は、発癌段階では視診や触診のみで診断することは困難で、病理組織学的診断も容易ではないため、早期病変に対する精度の高い診断法の開発が望まれている。
- 2) マクロファージには免疫を活性化する M1 型と抑制する M2 型の二極の分化が知られている。癌の治療標的として注目される腫瘍関連マクロファージ (TAM)は主に M2 型の形質を獲得し、癌進展を促進すると考えられている。
- 3) 癌進展のみならず、発癌においてもマクロファージの関与が想定されており、そのメカニズムを解明することは新たな発癌予防法の開発につながると期待される。近年では、癌治療の標的として注目されている TAM は M2 型のみならず、M1 型も含めた混合集団と考えられ始めており、M1 マクロファージも腫瘍進展に寄与する可能性が言われ始めている。しかしながら、口腔扁平上皮の発癌段階におけるマクロファージの役割は不明であり、さらには M1 マクロファージに着目した詳細な研究はない。

2. 研究の目的

本研究では口腔癌の発生・進展における M1 マクロファージの役割を明らかにすることで、新たな発癌予防法や病理診断法の開発に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究責任者は以前の研究で、口腔癌前駆病変に相当する舌白板症を対象に、上皮異形成・上皮内癌の病変部直下の間質において、M2 マーカーCD163 を発現するマクロファージが上皮細胞の腫瘍免疫抑制因子 IL-10 の分泌誘導を介して悪性化に関与することを報告した。同時に、浸潤癌に進展した症例では CD163 陽性マクロファージは間質のみならず、病巣周囲上皮内や癌巣内にも多数集簇することを見出した。この所見は口腔の発癌段階でマクロファージの役割が劇的に変化することを示唆する。そこで、マクロファージの局在変化(癌細胞との位置関係の変化)を基軸としてマクロファージの M1 形質に焦点を当てた解析を実施した。

臨床検体を用いたマクロファージ局在と臨床病理学的因子の解析

舌白板症の生検標本において CD163 陽性マクロファージに着目した病理組織学的評価が悪性症例の鑑別に有用であるか検討を行った。舌白板症に対し生検および連続的に切除術が施行された 26 例を用いた。生検にて上皮内病変と診断されたが、術材標本にて扁平上皮癌と診断された 9 例(診断不一致群)と術材標本でも上皮内腫瘍と診断された 17 例(診断一致群)について臨床病理学的因子や CD163 陽性マクロファージ浸潤の程度を比較した。

実地病理診断への応用

口腔扁平上皮性病変で観察されるマクロファージの局在変化が、発癌過程に特異的であるか検証すべく、臨床的に口腔癌および前駆病変との鑑別が問題となる病変について臨床検体を用いてマクロファージの局在を検討した。

口腔扁平上皮の発癌過程においてマクロファージとの相互作用を媒介する重要分子の抽出

ヒト舌癌細胞株 SCC25 とヒト単球性細胞株 THP-1 由来 CD163 陽性培養マクロファージを用いてマクロファージの局在変化に着目した共培養系(直接共培養系[浸潤癌モデル]および間接共培養系[上皮内腫瘍モデル])を確立し、western blot-based cytokine array を用いて浸潤癌モデルから回収した培養上清中で特異的に分泌が亢進するサイトカイン・ケモカインを網羅的に解析した。

4. 研究成果

診断不一致群は診断一致群と比較し、色調や表面性状が不均一な症例が多かった。さらには、診断不一致群では多数の CD163 陽性マクロファージが病変部の上皮内に集簇することが明らかになった。一方で、異型度・増殖細胞マーカーKi-67 の発現異常・細胞骨格である Cytokeratin (CK) 13/CK17 の発現変動には有意な相関は認めなかった。

口腔白板症との鑑別が問題となるカンジダ症・扁平苔癬・アフタ性口内炎では、CD163 陽性マクロファージの上皮内集簇は観察されなかった。粘膜下固有層の泡沫マクロファージの増殖を特徴とする疣贅性黄色腫を対象とした検討では、病変部間質は正常部に比して微小血管密度が高く、間質に集簇する泡沫マクロファージは CD163 と血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を発現を示した。この結果は、反応性増殖病変においても M2 形質を示すマクロファージが病態の形成・進行に関与する可能性を示している。悪性形質を有する口腔苔癬様病変の手術検体および生検検体を用いた後ろ向き症例検討では、いずれの検体においても上皮内に集簇する CD163 陽性マクロファージが確認され、口腔扁平苔癬の悪性能にもマクロファージの上皮内集簇が関与する可能性が考えられた。

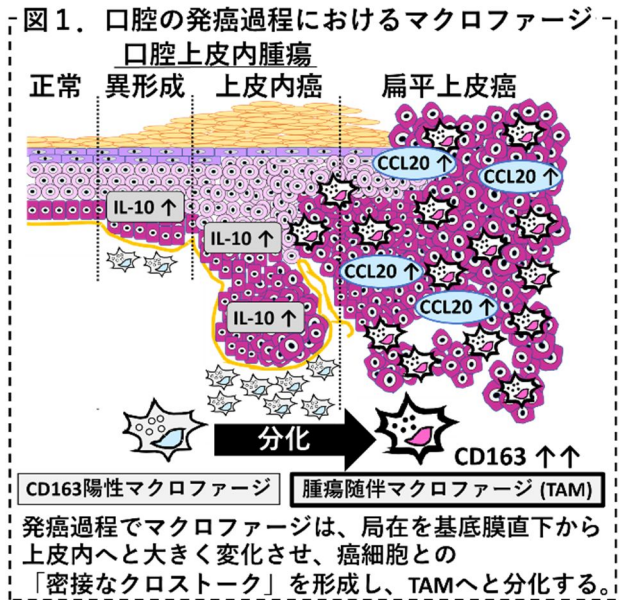
Cytokine array において、直接共培養(浸潤癌モデル)上清はそれぞれの単独培養および間接共培養(上皮内腫瘍モデル)上清に比して M1 マクロファージ関連ケモカインとされる CCL20 のシグナルが増強していた。そこで、舌癌細胞株とマクロファージの異種細胞間相互作用を媒

介する重要分子として CCL20 に着眼した解析を実施した。Cytokine array の結果を検証すべく、同じ培養上清を用いた ELISA を行うと、確かに直接共培養上清中では CCL20 の分泌が亢進していた。蛍光免疫染色では直接共培養後の SCC25 で CCL20 の蛍光強度が著しく増加しており、CCL20 の主な産生源が癌細胞であることがわかった。興味深いことに、CD163 陽性培養マクロファージは SCC25 に比較し CCL20 の唯一の受容体である CCR6 を高発現しており、ヒト舌癌組織における CD163 陽性マクロファージは CCR6 を発現していた。CCL20 と CCR6 を高発現する舌癌症例はリンパ管侵襲に正の相関を示すとともに CD163 陽性マクロファージ浸潤に有意に相関した。組換えヒト (rh)CCL20 を CD163 陽性培養マクロファージに作用させると ERK シグナルを介し CD163 発現を亢進させた。rhCCL20 で刺激した CD163 陽性培養マクロファージから調製した培養上清は SCC25 の生存能および運動能を促進した。以上からは、CCL20 が口腔癌の発生・進展にマクロファージを介して関与する可能性が考えられた。

本研究の要点を図 1 にまとめる。口腔の発癌段階におけるマクロファージは M1/M2 理論のみでは答えの出せない多様な活性を示すものと考えられた。さらには、「口腔癌の発生・進展におけるマクロファージの間質から上皮内への局在変化と、それに伴い惹起される腫瘍細胞との相互作用の変化」が治療や診断の新たな標的となる可能性が示された。これらの知見を体系立て、他臓器も含めた上皮性発癌におけるマクロファージの文献を網羅し、統合的考察を加えて総説論文として発表した。

今後は、癌細胞と上皮内集簇マクロファージの相互作用により特異的に誘導される CCL20 の癌細胞に対する直接的影響について検討すると同時に、マクロファージ以外の主要な間質細胞であるがん関連線維芽細胞 (CAF) も対象として癌細胞 - TAM - CAF のクロストークを解析し、間質との相互作用の観点から口腔扁平上皮の発癌機構について明らかにしていきたいと考えている。

以上の成果は高く評価され、令和元年度日本病理学会近畿支部人体病理学学術奨励賞 (2020 年 5 月) および第 80 回日本癌学会学術総会 JCA 若手研究者ポスター賞 (2021 年 10 月) を受賞した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Shigeoka M, Koma YI, Nishio M, Akashi M, Yokozaki H	4. 巻 11
2. 論文標題 Tongue cancer cell-derived CCL20 induced by interaction with macrophages promotes CD163 expression on macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 667174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2021.667174	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 Shigeoka M, Koma YI, Nishio M, Akashi M, Yokozaki H	4. 巻 88
2. 論文標題 Alteration of macrophage infiltrating compartment: a novel view on oral carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 327-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515922	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 Shigeoka M, Koma YI, Kanzawa M, Akashi M, Yokozaki H	4. 巻 10
2. 論文標題 Intraepithelial macrophage expressing CD163 is a histopathological clue to evaluate the malignant potency of oral lichenoid condition: A case report and immunohistochemical investigation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 624-624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics10090624	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 Shigeoka M, Koma YI, Kodama T, Nishio M, Akashi M, Yokozaki H	4. 巻 26
2. 論文標題 Intraepithelial CD163+ macrophages in tongue leukoplakia biopsy: promising tool for cancer screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 527-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13269	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 Shiegoka M, Koma YI, Kodama T, Nishio M, Akashi M, Yokozaki H	4. 巻 8
2. 論文標題 CD163+ Foamy Macrophages Are Associated with the Morphogenesis of Oral Verruciform Xanthoma through Angiogenesis by VEGF Expression: An Immunohistochemical Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj8010018	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 Shigeoka M, Koma YI, Nishio M, Komori T, Yokozaki H	4. 巻 5
2. 論文標題 CD163+ macrophages infiltration correlates with the immunosuppressive cytokine interleukin 10 expression in tongue leukoplakia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Resarch	6. 最初と最後の頁 627-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.228	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15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 重岡 学, 佐藤経雄, 塚本修一, 都 鍾智, 安積, 佑樹, 北村 優, 浦上 聡, 谷川航平, 清水将来, 市原有美, 児玉貴之, 西尾真理, 狛 雄一朗, 横崎 宏
2. 発表標題 Tongue cancer cell-derived CCL20 induced by interaction with macrophages promotes CD163 expression on macrophages
3. 学会等名 第80 回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重岡 学, 佐藤経雄, 塚本修一, 児玉貴之, 北村 優, 浦上 聡, 谷川航平, 清水将来, 西尾真理, 狛 雄一朗, 横崎 宏
2. 発表標題 舌癌の進展における癌細胞 / マクロファージ相互作用の変化
3. 学会等名 第30回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重岡 学, 佐藤経雄, 塚本修一, 児玉貴之, 市原有美, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 マクロファージに着目した口腔発癌における癌・間質相互作用の解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重岡 学
2. 発表標題 Intraepithelial CD163+ macrophages in tongue leukoplakia biopsy: A promising tool for cancer screening. (令和元年度近畿支部 学術奨励賞受賞者講演)
3. 学会等名 第90回日本病理学会近畿支部学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重岡 学, 佐藤経雄, 藤田知樹, 北村 優, 児玉貴之, 谷川航平, 清水将来, 坂本浩輝, 藤川正隆, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 舌白板症における上皮内CD163陽性マクロファージは悪性スクリーニングの有望なツールである
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重岡学, 塚本修一, 児玉貴之, 谷川航平, 清水将来, 坂本浩輝, 藤川正隆, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 口腔癌の発生におけるCD163陽性マクロファージの解析
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重岡 学, 藤田知樹, 児玉貴之, 谷川航平, 清水将来, 坂本浩輝, 藤川正隆, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 口腔の発癌段階におけるCD163陽性マクロファージの解析
3. 学会等名 第109回日本病理学会オンライン総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重岡 学, 藤田知樹, 谷川航平, 清水将来, 児玉貴之, 坂本浩輝, 藤川正隆, 市原 有美, 小平日実子, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 Intraepithelial CD163+macrophages in biopsy specimens are useful for the differential diagnosis of tongue leukoplakia.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重岡 学, 児玉貴之, 坂本浩輝, 藤川正隆, 市原有美, 小平日美子, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 口腔癌の発癌初期段階におけるCD163陽性マクロファージの意義
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重岡 学, 児玉貴之, 坂本浩輝, 藤川正隆, 東野展英, 小平日実子, 市原有美, 西尾真理, 狛 雄一郎, 横崎 宏
2. 発表標題 CD163陽性マクロファージに着目した舌白板症の病理組織学的評価
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.med.kobe-u.ac.jp/patho/index.html>

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
---------	---------