

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10070

研究課題名(和文) 腫瘍随伴 Macrophageによる口腔癌化学療法耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the acquired chemotherapy resistance by tumor-associated macrophages in oral cancer

研究代表者

森田 祥弘 (Morita, Yoshihiro)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30590517

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)：腫瘍微小環境(TME)の概念が提唱され、現在活発に研究されている。TMEにおける細胞外マトリックス(ECM)の発達は線維形成として知られ、多くの固形腫瘍で観察される。また、予後不良や薬物療法に対する抵抗性と強く関連している。本研究の目的は、口腔扁平上皮癌における抗癌剤療法前後のTMEの線維形成様変化を調査し、TMEに対する抗癌剤の効果といくつかの炎症因子の関与の可能性を評価することであった。同系口腔癌移植マウスモデルを用いて、抗癌剤投与が癌組織に線維形成様変化を引き起こすことを確認し、これには炎症が関連していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では口腔癌の臨床検体や動物実験モデルを用いて腫瘍内への白血球の流入やTAMが引き起こす構造変化による化学療法耐性獲得のメカニズムを詳細に解明すると同時に、このメカニズムを臨床応用し、抗癌剤の治療効果の大幅な向上を目指すことを目的としており、抗癌剤による腫瘍微小環境の変化を抑えることにより抗癌剤の効果を増強させようとする新しい治療戦略による薬物療法を確立しうる研究である。

研究成果の概要(英文)：The concept of tumor microenvironment (TME) has been proposed and is currently being actively studied. The development of extracellular matrix in the TME, known as desmoplasia, is observed in many solid tumors. It is also strongly associated with poor prognosis and resistance to drug therapy. The aim of this study was to investigate desmoplasia-like changes in the TME before and after anticancer drug therapy in oral squamous cell carcinoma, and to evaluate the effect of anticancer drugs on the TME and the possible involvement of several inflammatory factors. Using a syngeneic oral cancer xenograft mouse model, we confirmed that anticancer drug administration caused desmoplasia-like changes in cancer tissues and showed that this was associated with inflammation.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 化学療法耐性 腫瘍微小環境 腫瘍随伴Macrophage

1. 研究開始当初の背景

癌組織に浸潤・集積している **Macrophage** は腫瘍随伴 **Macrophage (TAM: Tumor-associated Macrophage)** と呼ばれ、その多くは免疫活性能が高い **M1 macrophage** ではなく、免疫を抑制する **M2 macrophage** であることが知られ、癌細胞の増殖を促進することがわかっている。一方で、化学療法において腫瘍組織は損傷修復反応の結果として腫瘍間質の構造が大幅に変化することが知られており、化学療法への耐性獲得の要因となり、これには **M2 macrophage** が深く関与している。

2. 研究の目的

本研究では口腔癌の臨床検体や動物実験モデルを用いて腫瘍内への白血球の流入や **TAM** が引き起こす構造変化による化学療法耐性獲得のメカニズムを詳細に解明することを目的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌臨床検体を用いた評価

対象は、**2011** 年から **2019** 年の間に当科で **CDDP** を含む薬物療法を行った口腔癌患者のうち、生検および外科的切除の臨床病理標本において薬物療法前後での病理組織の比較が可能な **7** 症例とした(表 1)。**Picro-Sirius Red** 染色を行い、薬物療法前後での腫瘍組織内のコラーゲンの太さと量を評価した。

表 1
本研究で使用した臨床検体(病理組織)の一覧

Age	Gender	Region	Diagnosis	TNM *	Therapeutic Effect *
62	Female	tongue	scc	T4aN0M0	Grade3
58	Female	tongue	scc	T2N1M0	Grade2
71	Male	maxilla	scc	T3N1M0	unknown
56	Male	maxillary sinus	scc	T3N1M0	Grade2
68	Male	maxillary sinus	scc	T2N0M0	Grade2
73	Male	maxillary sinus	scc	T2N1M0	Grade1
71	Male	buccal mucosa	scc	T4N0M0	Grade2

* 口腔癌取り扱い規約(第 2 版)に準拠。

(2) 細胞および培養方法

実験にはマウス口腔扁平上皮癌細胞由来の細胞株、**NR-S1** 細胞を使用した。細胞を **37** °C、**5% CO₂** 気相下において、**10%** ウシ胎児血清(**FBS**: **Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX, USA**) および **100µg/ml** カナマイシン(**Meiji Seika** ファルマ株式会社, 東京, 日本)を含む **Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F-12** 培地(**D-MEM Ham's F-12**: 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本)で培養し、実験を行った。

(3) 担癌マウスへの CDDP 投与実験

全ての動物実験は事前に大阪大学大学院歯学研究科内動物実験委員会の審査を受け、承認を得た。**5~6** 週齢の雄性 **C3H** マウス(日本 **SLC**, 静岡, 日本)に、ミダゾラム(**4.0 mg/kg** 体重, **Dormicum®**: アステラス製薬株式会社, 東京, 日本)メドミジン(**0.3 mg/kg** 体重, **Domitor®**: 日本全薬工業株式会社, 東京, 日本)ブトルファノール(**5.0 mg/kg** 体重, **Vetorphale®**: **Meiji Seika** ファルマ株式会社)の **3** 種混合麻酔を行った。**NR-S1** 細胞(**1 × 10⁶/100µl**)を細胞培養液で懸濁し、**100µl** を舌尖中央に接種した。腫瘍の形成、増大を確認した後、**CDDP**(シスプラチン注 **10mg**, 日医工株式会社, 富山, 日本)を **10mg/20ml** の濃度で、尾静脈より **1** 回につき **200µl**、一週間おきに計 **2** 回投与した。対照群には、同じタイムコースで生理食塩水を投与した。最終投与より **3** 日後に腫瘍を摘出した。

(4) 免疫組織染色および免疫細胞染色による評価

臨床検体ならびに、マウス舌腫瘍組織は、免疫組織学的解析を行った。マウス舌腫瘍組織は、通法通りパラフィン包埋を施した後、厚さ **4µm** に薄切し、スライドガラスに載せ、伸展させた。キシレンにて脱パラフィンした後、エタノールを用いて水和した。沸騰した **1mmol/L**、**pH8.0** の **EDTA** 緩衝液(**NIPPON GENE Inc**, 東京, 日本)を使用し、加圧下で抗原賦活させた。**3%** 過酸化水素水を **15** 分作用させ、内因性ペルオキシダーゼを除去し、**1%** **BSA** を **60** 分作用させ、ブロッキングを行った。一次抗体を作用させ、**4** °C にて **12** 時間反応させた(表 2)。次に、マウス組織には、抗ウサギ **IgG** 抗体であるヒストファインシンプルステインマウス **MAX-PO(R)**(ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本)、ヒト組織には、抗ウサギ **IgG** 抗体ヒストファインシンプルステイン **MAX-PO(MULTI)**(ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本)を反応させ、ペルオキシダーゼ基質 **ImmPACT NovaRED (Vector Laboratories Inc, California, USA)** で可視化させた。マウス舌腫瘍組織切片は、染色後、倍率 **400** 倍で陽性領域の多い **5** 視野を撮影した。画像処理ソフトである **ImageJ (National Institutes of Health, USA)** を用いて **1** 画像あたりに占める陽性領域の割合を算出した。

表 2
本研究で免疫組織染色(IHC)に使用した抗体の一覧

Antibody	Dilution	Company
CD45	IHC (1:200)	Cell signaling
F4/80	IHC (1:250)	Cell signaling
CD163	IHC (1:500)	Abcam

(5) Picro-sirius red 染色による評価

Picro-sirius red 染色は、パラフィン包埋組織切片のコラーゲン線維を可視化する組織学的手法として一般的に使用されている。臨床検体ならびに、マウス舌腫瘍組織のパラフィン切片は、キシレンにて脱パラフィン後、エタノールで水和し、**Picro-Sirius Red Solution (ScyTek Laboratories, UT, USA)** を 1 時間作用させた。**0.5%の Acetic Acid Solution (ScyTek Laboratories, UT, USA)** で 2 回濯ぎ、最後に **MOUNT-QUICK**(大道産業株式会社, 東京, 日本) にて封入した。

染色後、臨床検体は **200 倍**、マウス舌腫瘍組織は **400 倍** で、腫瘍実質を含めたその周囲を偏光顕微鏡下でランダムに **5 視野** 撮影した。**imageJ** を用いて、黄色からオレンジ色に描出された太いコラーゲン線維を陽性領域とし、**1 画像** あたりに占める割合を算出し、評価した。

表 3

Inflammation Antibody Array で同時定量した **40 種類** のサイトカイン一覧レイアウト

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POB1	POB2	POB3	NEG	NEG	BLC	CD38LG	CCL11	CCL24	FASLG	CKOCL1	CSF3
2	POB1	POB2	POB3	NEG	NEG	BLC	CD38LG	CCL11	CCL24	FASLG	CKOCL1	CSF3
3	CSF2	IFN- γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
4	CSF2	IFN- γ	IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
5	IL-13	IL-17A	I-TAC	KC	Leptin	LIX	XCL1	MCP1	CSF1	MIG	MIP-1 α	MIP-1 γ
6	IL-13	IL-17A	I-TAC	KC	Leptin	LIX	XCL1	MCP1	CSF1	MIG	MIP-1 α	MIP-1 γ
7	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP1	TIMP2	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	NEG	NEG	NEG
8	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP1	TIMP2	TNF- α	sTNFR1	sTNFR2	NEG	NEG	NEG

(6) Inflammation Antibody Array

マウス舌腫瘍組織からタンパク質を抽出し、これを用いて **40 種** の炎症性サイトカインについての発現解析、**Inflammation Antibody Array (Mouse Inflammation Antibody Array G Series 1, RayBiotech Inc, GA, USA)** を行った。**Inflammation Antibody Array** は、複数の炎症性サイトカインを同時定量できる抗体アレイで、**40 種類** のサイトカインを測定した(表 3)。マウス舌腫瘍組織からタンパク質を抽出し、蛍光標識した後、**GenePix4100A (Axon Instruments Inc, CA, USA)** にて、蛍光発光画像をスキャンし、読み取った画像データから、スポット部分を数値データ化した。

(7) 統計分析

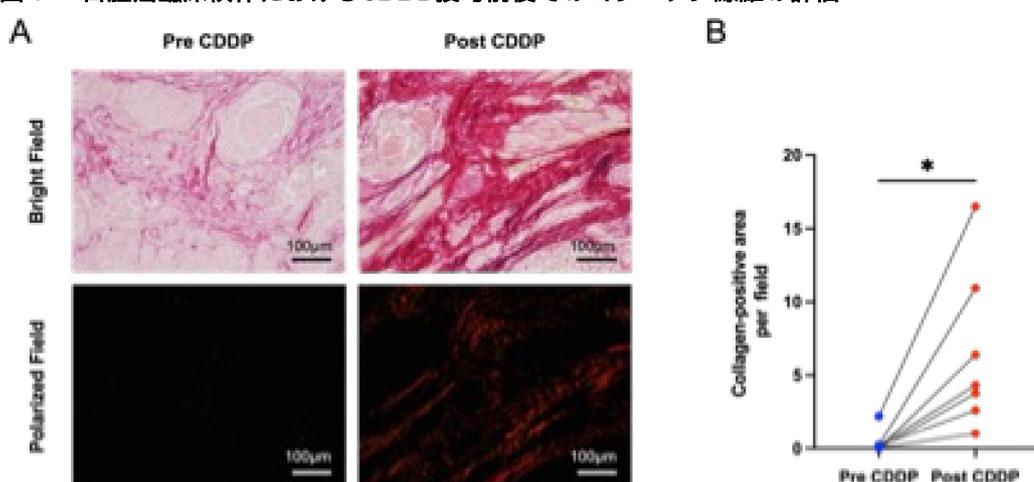
実験結果データは、**in vitro** 実験の平均 \pm SD および **in vivo** 実験の平均 \pm SEM としてそれぞれ提示した。独立した **2 群** の比較は **Student's t** 検定を、関連ある **2 群** の比較は **Paired t** 検定を、**2x2** 分割表の検定は **Fisher's exact probability** 検定を使用し、**3 群** 間の比較は一元配置 **ANOVA** と **Dunnnett** の多重比較検定を使用して評価した。統計学的に解析は **Prism 9** ソフトウェア (**GraphPad Software, La Jolla, CA, USA**) を使用した。**p** 値は **0.05** 未満を統計学的有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 臨床検体における CDDP 投与前後での微小環境の変化

抗癌剤投与前の生検検体と抗癌剤投与後の検体を、筋繊維とコラーゲン線維を特異的に染める **Picro-Sirius Red** 染色にて解析した。その結果、明視野顕微鏡下では、抗癌剤投与後の検体でコラーゲン線維がバンドル化した様子が観察された。さらに、偏光顕微鏡下で観察すると、バンドル化された太いコラーゲン線維は、黄色からオレンジ色に描出され、抗癌剤投与前の検体と比較

図 1 口腔癌臨床検体における CDDP 投与前後でのコラーゲン線維の評価



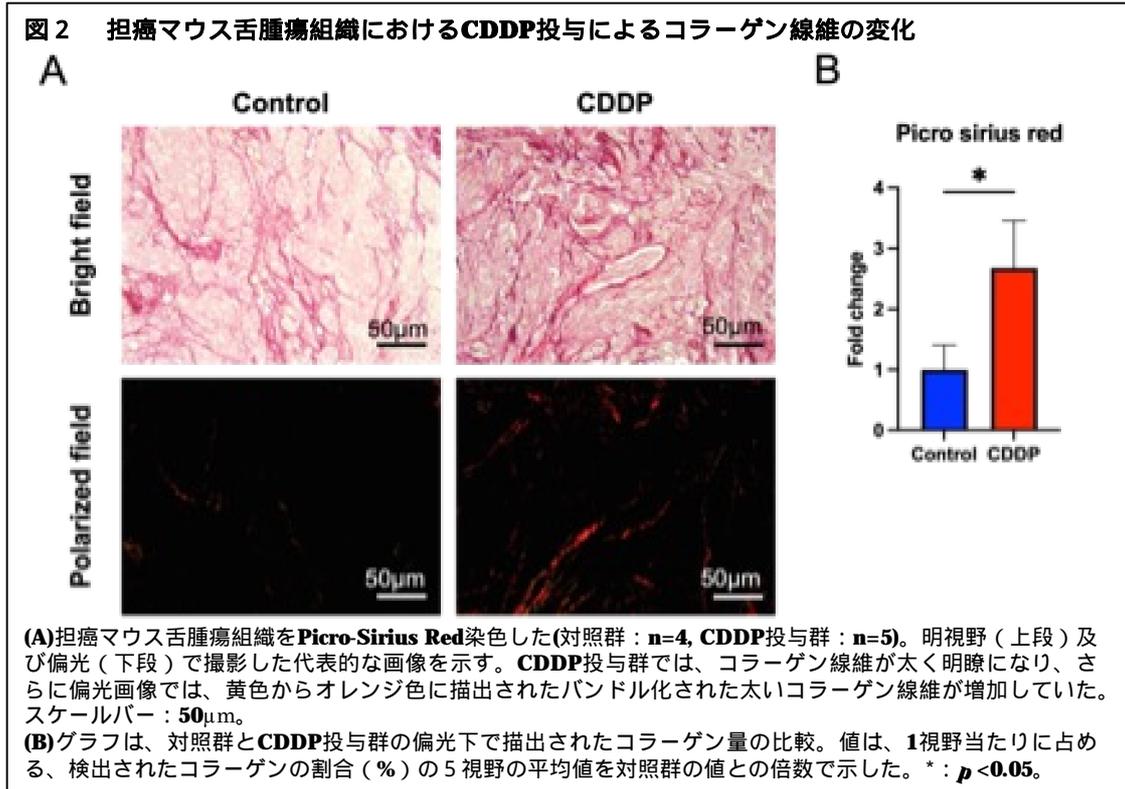
(A) 口腔癌臨床検体を **Picro-Sirius Red** 染色した ($n=7$)。明視野 (上段) 及び偏光 (下段) で撮影した代表的な画像を示す。**CDDP** を投与された後の切除検体では、投与前の生検検体と比較し、コラーゲン線維が太く明瞭となっていた。偏光画像では、黄色からオレンジ色に描出されたバンドル化された太いコラーゲン線維は、**CDDP** 投与後に増加していた。スケールバー：**100 μ m**。

(B) グラフは、個々のケースにおける **CDDP** 投与前後の偏光下で描出されたコラーゲン量の変化を示す。値は、**1 視野** あたりに占める、検出されたコラーゲンの割合 (%) の **5 視野** の平均値である。*：**p < 0.05**。

し抗癌剤投与後で、太いコラーゲン線維は有意に増加していた（図 1）。

(2) 担癌マウスの舌腫瘍組織における CDDP 投与による微小環境の変化

担癌マウスより摘出した舌腫瘍を **Picro-Sirius Red** 染色、免疫組織染色により評価した。臨床検体と同様にコラーゲン線維の評価を目的として **Picro-Sirius Red** 染色を行ったところ、明視野顕微鏡下では、**CDDP** 投与群でコラーゲン線維がバンドル化した様子が観察された。偏光顕微鏡で観察を行ったところ黄色からオレンジ色で描出される太いコラーゲン線維は、対照群と比較し、**CDDP** 投与群で有意に増加していた（図 2）。

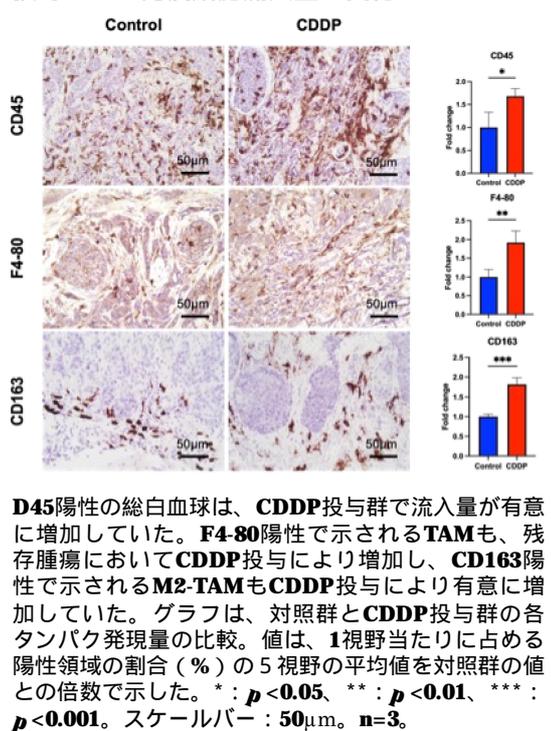


次に、**TME** に浸潤する免疫細胞を評価したところ、**CD45** 陽性で示される総白血球数は、対照群と比較して **CDDP** 投与群で有意に増加していた（図 3）。**F4-80** 陽性で示される **TAM** についても、対照群と比較し **CDDP** 投与群で有意に増加していた（図 3）。また、**CD163** 陽性の **M2** マクロファージ（**M2-TAM**）も、対照群に比して **CDDP** 投与群で有意に増加していたが、**TAM** はその局在が腫瘍細胞間にも浸潤していたのに対し、**M2-TAM** は腫瘍細胞間への浸潤はほとんど認めなかった（図 3）。これらの結果は、**CDDP** を投与することで **TME** にデスマプラジア様の構造変化と免疫細胞の浸潤を伴う炎症が起こり、これらが関連している可能性を示している。

(3) 担癌マウスの舌腫瘍組織における CDDP 投与による炎症性サイトカイン・ケモカインの発現変化

担癌マウス舌腫瘍組織の免疫組織学的な評価結果に基づき、**CDDP** 投与により、腫瘍組織に炎症が惹起されている可能性が示唆されたため、マウス舌組織から抽出したタンパク質を用いて 40 種の炎症性サイトカイン・ケモカインについて **Inflammation Antibody Array** により発現解析を行った。その結果、対照群と比較し、**CDDP** を投与した検体において 1.5 倍以上発現増加したタンパク質は、**RANTES(CCL5)**、**MIG(CXCL9)**、**sTNFR2**、

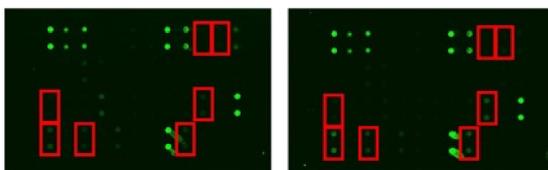
図 3 担癌マウス舌腫瘍組織における CDDP 投与による免疫細胞流入量の変化



TCA-3(CCL1)、Fractalkine(CX3CL1)、IL-13、IL-12p40p70、Fas Ligand の 8 種類であった (図 4、表 4)。これらのうち、**CCL5** と **IL-13** は、**M2-TAM** との関連が報告されている。今後は、これらのサイトカインを中心に解析を行う予定である。また、本研究では、腫瘍内に流入する **TAM** と **E-selectin** との関連性については解明できず、今後の研究課題となった。

図 4 マウス舌腫瘍組織における **Inflammation Antibody Array**の結果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS1	POS2	POS3	NEG	NEG	BLC	CD38LG	CCL11	CCL24	FASLG	CX3CL1	CSF3
2	POS1	POS2	POS3	NEG	NEG	BLC	CD38LG	CCL11	CCL24	FASLG	CX3CL1	CSF3
3	CSF2	IFN-γ	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
4	CSF2	IFN-γ	IL-1α	IL-1β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
5	IL-13	IL-17A	ITAC	KC	Leptin	LIX	XCL1	MCP1	CSF1	MIG	MIP-1α	MIP-1γ
6	IL-13	IL-17A	ITAC	KC	Leptin	LIX	XCL1	MCP1	CSF1	MIG	MIP-1α	MIP-1γ
7	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP1	TIMP2	TNF-α	sTNFR1	sTNFR2	NEG	NEG	NEG
8	RANTES	SDF-1	TCA-3	TECK	TIMP1	TIMP2	TNF-α	sTNFR1	sTNFR2	NEG	NEG	NEG



Control

CDDP

RayBiotech社製の **Mouse Inflammation Antibody Array G Series 1** を用いて網羅的な解析を行なった。上段に測定したサイトカイン一覧レイアウト、下段に蛍光スキャンデータ画像を示す。赤枠は、**Control** で示した生理食塩水投与と比較して、**CDDP** 投与で **1.5**倍以上の値を示した抗体。

表 4

Inflammation Antibody Array結果の一覧 **Saline**投与した舌腫瘍組織と比較し、**CDDP**投与した舌腫瘍組織で**1.5**倍以上の発現量を示した8つの因子の各サンプルにおける発現量を測定値で示している。

Description	Net intensity (median)	
	Control	CDDP
RANTES	1293.50	2892.08
MIG	702.50	1995.22
sTNF RII	797.00	1939.90
TCA-3	663.00	1152.68
Fractalkine	144.50	304.22
IL-13	138.50	281.50
IL-12p40p70	32.50	99.76
Fas Ligand	27.00	62.23

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 西村 遵也、森田 祥弘、西元 彩乃、高山 峻、北平 有紀子、岸本 聡子、松宮由香、今井智章、鶴澤成一
2. 発表標題 口腔癌細胞は癌薬物療法により老化現象が起こりSASP関連因子を発現する
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西元彩乃、森田祥弘、高山峻、西村遵也、鶴澤成一
2. 発表標題 マウス口腔扁平上皮癌細胞株を用いた頸部リンパ節高転移細胞株樹立と同種同所移植頸部リンパ節転移マウスモデルの検討
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西元彩乃、森田祥弘、西村遵也、高山峻、岸本聡子、松宮由香、武部克希、今井智章、鶴澤成一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌リンパ節転移における腫瘍関連マクロファージの検討
3. 学会等名 第67回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村遵也、森田祥弘、西元彩乃、高山峻、鶴澤成一
2. 発表標題 癌薬物療法により口腔組織の腫瘍微小環境では構造変化が誘導される
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2022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	鵜澤 成一 (Uzawa Narikazu) (30345285)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	

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