

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861978

研究課題名(和文) 口腔癌頸部リンパ節転移に対するCOX-2・TAMをターゲットにした新たな治療戦略

研究課題名(英文) The new treatment strategy for lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma - Targeting COX-2 and TAM

研究代表者

河野 通秀 (Kono, Michihide)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：00421066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は、口腔扁平上皮癌におけるリンパ節転移の新たな治療戦略を画策することを目的として、口腔癌微小環境内における腫瘍関連マクロファージ(M2マクロファージ)に着目して検討を行った。結果は、M2マクロファージ強発現群は、有意に局所進行とリンパ節転移および予後に関連性を認めた。また、M2マクロファージ強発現群において腫瘍細胞におけるCOX-2・VEGF-C発現の間には、統計学的有意差を認めなかったものの、高値を示す傾向を認めた。口腔癌微小環境内におけるM2マクロファージは、腫瘍の増殖・転移を抑制する治療ターゲットになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to propose new treatment methodology for lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma(OSCC). Especially we focused on tumor associated macrophage (M2 macrophage) in the tumor microenvironment in OSCC. Our data showed that M2 macrophage strong expression group was significantly related to locally progressive, lymph node metastasis, and prognosis. Moreover, this group showed the tendency that highly expression rate in COX-2 and VEGF-C. In conclusion M2 macrophage in the tumor microenvironment in OSCC might be become the treatment target for prevent the locally progressive, lymph node metastasis.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 リンパ節転移 腫瘍関連マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC)は、20-40%に頸部リンパ節転移を起こす。このリンパ節転移は、口腔癌の予後不良因子として認識されているものの、癌リンパ節転移のメカニズムは未だ不明な点が多く、これらの予測および予防は現時点では極めて困難である。近年癌細胞が血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) familyである VEGF-C・Dを分泌してリンパ管内皮に存在する受容体(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR3)に結合することにより、腫瘍内あるいは腫瘍周囲に新生リンパ管を誘導し、癌細胞が侵入する機会を増やすことが、明らかにされた(STACKER SA et al. Nature reviews Cancer, 2002)。この結果、癌のリンパ節転移を促進するという概念が提唱され、VEGFC・D/VEGFR3 シグナルは癌リンパ節転移のメインシグナルと考えられている。近年、VEGF-C・D 発現プロモーターとして、Cyclooxygenase-2(COX-2)の関与が、血管新生でよく知られる Prostaglandin E₂ (PGE₂) およびその受容体の EP1、EP4 経路を介して、VEGF-C 発現を up-regulate としリンパ管新生およびリンパ節転移を促進することが示唆されている(Timoshenko AV et al. Br J Cancer, 2006)。Iwataらは、胃癌担癌マウスに生じるリンパ管新生に対して COX-2 阻害剤である etodolac が抑制作用をもち、VEGF-C の発現量を低下させ、リンパ管新生を抑制することにより、所属リンパ節転移も軽減することを報告している。(Iwata et al. Cancer research, 2007)

腫瘍微小環境における炎症応答は、腫瘍の発育や浸潤に関与することが知られている。近年、生体防御機構において重要な働きをするマクロファージに M1 と M2 の 2 種存在することが明らかになり、腫瘍微小環境における M2 マクロファージ発現が癌細胞の遊走・

増殖などの、腫瘍の進展に深く関与する腫瘍関連マクロファージとして注目されている。(Watarai et al. Biochem Biophys Res Commun, 2008)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に対する新たな治療戦略を確立するために、口腔扁平上皮癌微小環境内におけるマクロファージ発現様式の検討、炎症環境とリンパ管新生・リンパ節転移および臨床病理学的因子との関連性について解析することである。

3. 研究の方法

方法は、ホルマリン固定パラフィン包埋された 60 例の手術切除検体に、通常の H-E 染色に加え、通常のマクロファージマーカーである CD68、M2 マクロファージマーカーである CD163、VEGF-C、COX-2、リンパ管マーカーである D2-40 の免疫組織化学染色を施した。スライド画像を NanoZoomer-XR®(Hamamatsu Photonics)でデジタル化し、Tissue Studio®(Definiens)を用いて、200~400 倍視野下で腫瘍最浸潤部のホットスポットにおける以下の項目について、測定を行った。

測定項目は、

1. 腫瘍間質におけるリンパ管発現個数。(Lympha vessel Density, LVD)
2. 腫瘍細胞における COX-2、VEGF-C の発現率。
3. 腫瘍間質における各陽性マクロファージの任意の単位面積あたりの発現個数。
4. CD163 陽性マクロファージの腫瘍内の単位面積あたりの発現個数。

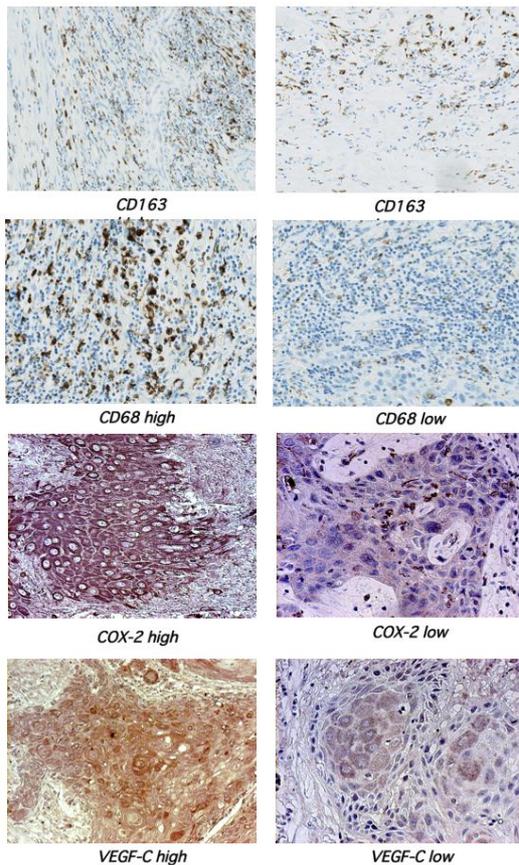
とし、3 視野の測定値を平均化し解析を行った。

臨床病理学的因子は、性別、年齢、原発部位、T分類、ステージ、リンパ節転移、再発、組織分化度、Brain 分類に基づいた角化度、核異型、浸潤形態、リンパ球浸潤とし

た。また、各項目の疾患特異的 5 年生存率について検討した。

4. 研究成果

免疫組織化学染色結果



LVD の平均値は、10.83(3-24.5)個/Field であった。VEGF-C は、主に腫瘍細胞質に発現を認めた。平均値は、19.19% (0 - 50.1%) であった。COX-2 発現は、腫瘍の細胞質に発現を認め、平均 23.86%(5- 51.3%) であった。CD68 陽性マクロファージの単位面積発現個数は、15.6(1.3~41)個/Field であった。CD163 陽性マクロファージの腫瘍間質単位面積発現個数は、20.1 個(4.4~45.9) 個/Field であった。腫瘍内単位面積発現個数は、11.5 個 (0.2-35.3) 個/Field であった。

マクロファージ発現様式と臨床病理学的因子との関連性

CD163 陽性マクロファージ (腫瘍間質および腫瘍内)・CD68 陽性マクロファージ発現と臨床病理学的因子との関連性について検討した。

Figure 1.

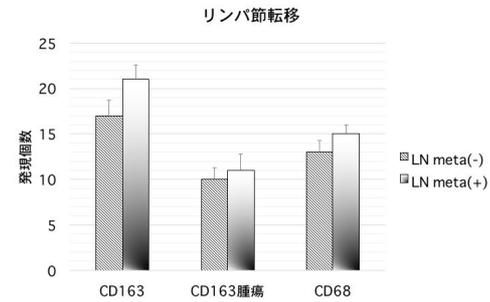


Figure 2.

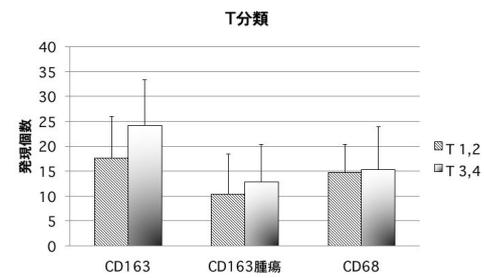


Figure 3.

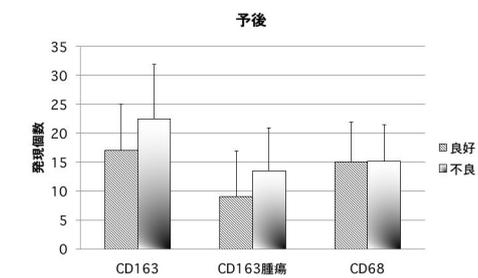


Figure 4.

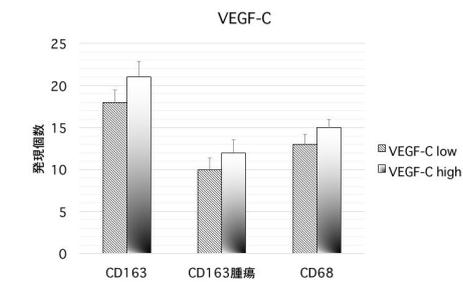
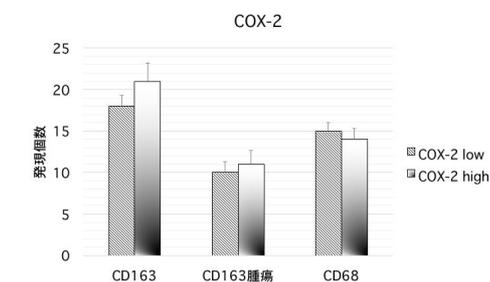


Figure 5.

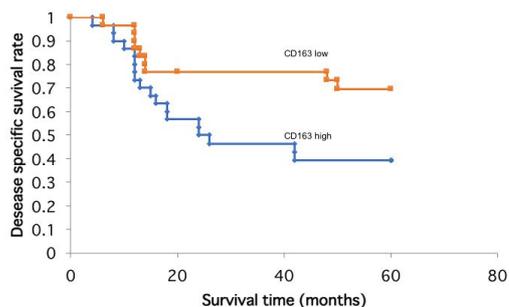


CD163 陽性マクロファージおよび CD68 マクロファージのリンパ節転移 (なし vs あり) T 分類 (1,2 vs 3,4) 予後 (良好 vs 不良) における発現値を student-T 検定で検討し

たところ、CD163 マクロファージ腫瘍間質発現では、リンパ節転移 (17.7vs 22.8, $p=0.03$)、T 分類 (17.6 vs 24.2 $p=0.02$)、予後 (17.1 vs 22.5, $p=0.02$) と有意に T 進行例、リンパ節転移例、予後不良例で高値を示した。CD163 マクロファージ腫瘍内発現では、リンパ節転移例 (9.5 vs 22.8, $p=0.03$)、予後不良例 (17.1 vs 22.5, $p=0.03$) で有意に高値であった。臨床病理学的因子との関連性について 二乗検定を用いて検討したところ、CD163 腫瘍間質発現で、T 進行例 ($p=0.002$)、ステージ進行例 ($p=0.01$)、リンパ節転移例 ($p=0.03$) に有意な関連性を認めた。

また、予後について、log-rank 検定を用いて疾患特異的 5 年生存率について検討したところ、CD163(低発現 vs 高発現、69% vs 39%、 $p=0.02$)、と CD163 マクロファージ腫瘍間質高発現群で有意に予後不良であった。

Figure 6.



口腔扁平上皮癌における腫瘍最浸潤部での CD163 陽性マクロファージ発現は、臨床病理学的因子との検討において局所進行例とリンパ節転移例および予後不良例で有意に高値を示し、統計学的有意に関連を認めた。

腫瘍包巣内での CD163 陽性マクロファージ発現は、リンパ節転移群および予後不良例で有意に高値を示した。

予後の検討では、CD163 陽性マクロファージ高発現群で疾患特異的 5 年生存率が、有意に低く予後不良であった。(低発現 vs 高

発現、69% vs 39%、 $p = 0.02$)

口腔扁平上皮癌における M2 マクロファージの高発現は、局所進行と頸部リンパ節転移に関連し、予後不良因子であることが示唆された。

従来のマクロファージマーカーである、CD68 高発現群においては臨床病理学的因子および予後との関連に有意性は認めなかったものの、CD163 高発現群において局所進行と頸部リンパ節転移に関連し、予後不良を呈していたことから、口腔扁平上皮癌においても CD163 陽性マクロファージは、腫瘍関連マクロファージを見ているものと推察される。

口腔扁平上皮癌微小環境における M2 マクロファージ発現と癌細胞における COX-2 発現および VEGF-C 発現の関連性について検証した。腫瘍最浸潤部の任意単位面積あたりの腫瘍間質における、CD163 陽性マクロファージ発現数と腫瘍細胞における COX-2、VEGF-C 発現には、統計学的有意差を認めなかったものの、CD163 陽性マクロファージ強発現群において高値を示す傾向を認めた。リンパ節転移との関連性については、CD163 陽性マクロファージ強発現、VEGF-C 強発現、COX-2 強発現で有意な関連性を認め、CD163 陽性マクロファージ強発現群において腫瘍周囲リンパ管数が多い傾向を示したことから、口腔癌微小環境内における M2 マクロファージ発現は、腫瘍の増殖・転移を抑制する治療ターゲットになることが示唆された。

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 12 件)

1. Abukawa H, Kono M, Hamada H, Okamoto A, Satomi T, Chikazu D. Indications of Potassium Titanyl Phosphate Laser Therapy for Slow-Flow Vascular Malformations in Oral Region. J Craniofac Surg. 2017

- May;28(3):771-774.
doi: 10.1097/SCS.0000000000003445.
査読有
2. Abukawa H, Ogawa T, Kono M, Koizumi T, Kawase-Koga Y, Chikazu D.
Intravenous Dexamethasone Administration Before Orthognathic Surgery Reduces the Postoperative Edema of the Masseter Muscle: A Randomized Controlled Trial. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Jan 9. pii: S0278-2391(17)30001-0.
doi: 10.1016/j. 査読有
 3. Abukawa H, Kono M, Hamada H, Okamoto A, Satomi T, Chikazu D. Indications of Potassium Titanyl Phosphate Laser Therapy for Slow-Flow Vascular Malformations in Oral Region. *J Craniofac Surg.* 2017 Jan 30. doi:10.1097/SCS.0000000000003445.
査読有
 4. Kono M, Satomi T, Abukawa H, Hasegawa O, Watanabe M, Chikazu D. Evaluation of OK-432 Injection Therapy as Possible Primary Treatment of Intraoral Ranula. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Feb;75(2):336-342.
doi: 10.1016/j.joms. 査読有
 5. Satomi T, Kohno M, Hasagawa O, Enomoto A, Abukawa H, Chikazu D, Yoshida M, Matsubayashi J, Nagao T. Adenosquamous carcinoma of the tongue: clinicopathologic study and review of the literature. *Odontology.* 2017 Jan;105(1):127-135.
doi: 10.1007/s10266-016-0261-6.
査読有
 6. Abukawa H, Matsuo A, Watanabe M, Kono M, Satomi T, Chikazu D. A randomized trial to identify the most effective dose of remifentanil during Le Fort I osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Jun;73(6):1073-7.
doi: 10.1016/j. 査読有
 7. 河野 通秀, 渡辺 正人, 浜田 勇人, 藤川 考, 里見 貴史, 近津 大地. 若年者のびまん性硬化性下顎骨骨髓炎にパミドロネートが著効した 1 例, *日本口腔外科学会雑誌* (0021-5163)61 巻 7 号 Page368-373(2015.07) 査読有
 8. 浜田 勇人, 古賀 陽子, 蛇川 東嗣, 河野 通秀, 藤川 考, 近津 大地. ナンセンス変異による PTCH1 遺伝子を伴った母斑基底細胞症候群の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌* (0021-5163)61 巻 2 号 Page120-124(2015.02) 査読有
 9. Satomi T, Hasegawa O, Abukawa H, Kohno M, Enomoto A, Chikazu D, Matsubayashi J, Nagao T. Exceptionally large solitary fibrous tumor arising from the cheek: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. *Med Mol Morphol.* 2014 Jun;47(2):108-16.
doi: 10.1007/s00795-013-0054-8. 査読有
 10. Satomi T, Kohno M, Enomoto A, Abukawa H, Fujikawa K, Koizumi T, Chikazu D, Matsubayashi J, Nagao T. Solitary myofibroma of the mandible: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. *Med Mol Morphol.* 2014 Sep;47(3):176-83.
doi: 10.1007/s00795-013-0062-8.
査読有
 11. 長谷川 温, 里見 貴史, 渡辺 正人, 蛇川 東嗣, 河野 通秀, 近津 大地, 口腔癌頸部郭清術後難治性リンパ漏に対して胸腔鏡下胸管結紮術が有効であった 1 例, *日本口腔腫瘍学会誌* (0915-5988)25 巻 3 号 Page115-121(2013.09) 査読有
 12. Kono M, Watanabe M, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Chikazu D. Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Oct;71(10):1694-702.
doi: 10.1016/j. 査読有
- [学会発表](計 8 件)
1. Michihide Kono, Takafumi Satomi, On Hasegawa, Harutsugi Abukawa, Masato Watanabe, Yoko Koga, Daichi Chikazu : The clinicopathological study of M2

macrophages expression in oral squamous cell carcinoma. The 23rd European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery Congress, 2016.9.12-16. London. UK

2. 河野 通秀, 里見 貴史, 長谷川 温, 渡辺 正人, 池畑 直樹, 榎本 愛, 虻川 東嗣, 古賀 陽子, 近津 大地: 口腔扁平上皮癌におけるマクロファージ発現様式の臨床病理学的検討. 第 40 回 日本頭頸部癌学会, 2016 年 6 月 9-10 日. 大宮
3. 河野 通秀, 里見 貴史, 長谷川 温, 渡辺 正人, 池畑 直樹, 榎本 愛, 虻川 東嗣, 古賀 陽子, 近津 大地: 口腔扁平上皮癌におけるマクロファージ発現様式の臨床病理学的検討. 第 177 回東京医科大学医学会総会, 2016 年 6 月 4 日. 東京
4. Michihide Kono, Takafumi Satomi, On Hasegawa, Harutsugi Abukawa, Yoko Koga, Akira Matsuo, Daichi Chikazu: Evaluation of OK-432 (Picibanil) injection therapy for intraoral ranula. 22ND International conference on oral and maxillofacial surgery, 2015. 10. 27-30, Melbourne, Australia
5. 河野通秀, 里見貴史, 長谷川温, 渡辺正人, 池畑直樹, 榎本愛, 虻川東嗣, 古賀陽子, 近津大地: 口腔扁平上皮癌における M2 マクロファージ発現の臨床病理学的検討. 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015 年 10 月 16-18 日. 名古屋国際会議場, 愛知
6. 河野通秀, 里見貴史, 長谷川温, 榎本愛, 虻川東嗣, 古賀陽子, 松尾朗, 近津大地: 当科における口腔扁平上皮癌 NO 症例の検討. 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2015 年 1 月 29-30 日. 奈良県新公会堂, 奈良
7. Michihide Kono, Takafumi Satomi, On Hasegawa, Harutsugi Abukawa, Daichi Chikazu: Evaluation of polyglycolic acid sheets with fibrin glue technique for after resection of buccal mucosa; 21st International conference on oral and maxillofacial surgery. 2013.10.21-24 (Barcelona, Spain)
8. 河野通秀, 里見貴史, 渡辺正人, 長谷川温, 榎本 愛, 池畑直樹, 虻川東嗣, 小泉敏之, 松尾 朗, 近津 大地: 口腔扁平上皮癌 N0 後発リンパ節転移症例における COX-2 および VEGF-C 発現の臨床病理学的検討; 第 58 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013 年 10 月 11-13 日, 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 通秀 (KONO Michihide)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00421066

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()