



Title	口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた上皮間葉転換と腫瘍微小環境の検討
Author(s)	西元, 彩乃
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91843
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた
上皮間葉転換と腫瘍微小環境の検討

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学

顎口腔腫瘍学（口腔外科学第二教室）

西元 彩乃

目 次

I . 緒 言

II . 材 料 と 方 法

- i. 細胞および培養方法
- ii. 口腔癌頸部リンパ節転移動物実験モデル
- iii. 頸部リンパ節高転移細胞株の樹立
- iv. 細胞増殖能の評価 (Proliferation Assay)
- v. 細胞遊走能の評価 (Migration Assay)
- vi. 細胞浸潤能の評価 (Invasion Assay)
- vii. 遺伝子発現の評価 (RT-qPCR 法)
- viii. タンパク発現の評価 (Western-Blot 法)
- ix. 免疫細胞染色法
- x. 免疫組織染色法
- xi. IL-6 および STAT3 阻害剤添加実験
- xii. 統計分析

III . 結 果

- i. 頸部リンパ節高転移細胞株 Sq1979-LM4 細胞の樹立
- ii. LM4 細胞と EMT の関連
- iii. 口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた腫瘍組織
およびリンパ節転移能の検討

iv. 口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた舌腫瘍の
免疫組織学的検討

v. IL-6/STAT3経路による口腔癌細胞のEMT誘導の検討

vi. 口腔癌細胞のEMT誘導に対するSTAT3阻害剤によ
る検討

vii. TMEにおける炎症性サイトカイン発現の比較

IV. 考察

V. 総括

VI. 結論

VII. 謝辞

VIII. 脚注

IX. 参考文献

X. 図表

I . 緒言

がんは多くの国で 30～70 歳の死因の上位を占め、近年、先進国では、心疾患を上回る傾向にある(1)。GLOBOCAN2020 の推計によると、世界では、年間約 377700 人が口腔がんにより新規罹患し、死亡数は約 177700 人である(2-4)。日本では、2019 年に約 23600 人が口腔・咽頭がんにより新規罹患しており、2020 年の死亡数は約 7800 人であった(5)。口腔がんのおよそ 90%を扁平上皮癌が占めており、発生部位では舌が最も多い(6,7)。口腔扁平上皮癌(oral squamous cell carcinoma: OSCC)において、頸部リンパ節転移は生存率に大きく影響するが、転移機構は未だ不明な点が多い(8)。頸部リンパ節転移は、まず原発性腫瘍細胞が増殖するとともにリンパ管新生が起こり、腫瘍細胞が浸潤、移動し、リンパ管内に侵入、リンパ管内を循環中に生存し、頸部リンパ節に侵入し、新しい環境で生存、増殖することでリンパ節転移が成立する(9)。これらの各段階は腫瘍細胞の表現型や宿主の微小環境および免疫系との相互作用に依存しており、転移機構を解明するためには、従来のような腫瘍細胞のみを対象とする研究手法では限界がある(10,11)。

がん組織では、腫瘍細胞の周囲に腫瘍微小環境(tumor microenvironment: TME)と呼ばれる特殊な環境が構築されており、腫瘍の発生と進行において重要な役割を持つ様々な非腫瘍細胞を含んでいる。例えば、間質線維芽細胞、細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)、血管、リンパ管、免疫細胞

胞、成長因子、これらの TME の構成細胞から分泌されるサイトカインなどが挙げられ、腫瘍の発生と進行に正あるいは負の影響を与えている(12-16)。また、がんにおける炎症は、多くの種類のがんの発生と進行や、抗癌剤治療の奏功と密接に関連していることが報告されている(17,18)。急性炎症は抗腫瘍免疫反応を誘導することでがん細胞の死滅に寄与するが、一方で、慢性炎症は腫瘍免疫の抑制に関与し、腫瘍形成、発生、転移に適した TME を提供し、炎症反応は時として抗癌剤治療により誘発されることが報告されている(19-21)。さらに、抗癌治療における免疫療法は、TME 内の免疫機構と腫瘍との相互作用に関する研究により開発され、腫瘍の免疫逃避能力に対抗するために、TME 内の免疫細胞を補助することで、抗腫瘍免疫応答を強化するものである(22)。免疫療法の一つである免疫チェックポイント阻害は、免疫機構に効果的な抗腫瘍反応を引き起こさせることを目的としている(23)。免疫チェックポイント阻害剤は、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) やがん細胞などに発現する免疫チェックポイントを阻害することができる抗腫瘍療法剤である(24,25)。今後、新規の免疫チェックポイントとその標的を同定し、個々の患者に合わせた治療を行うことは、免疫療法における大きな目標の一つであり、さらなる研究の実施、新しい併用療法の開発、より多くの免疫療法薬の開発が必要とされている(26)。このような新規免疫療法の開発にあたり、その効果を評価するためには、ヒトの腫瘍とその微小環境を遺

伝的、生理的、解剖学的にモデル化したマウスモデルを確立し、ヒト腫瘍の形成と発生を忠実に反映させる必要がある(26)。

従来の2次元細胞培養や3次元オルガノイドのような、がん研究によく用いられる *in vitro* 実験は、様々な種類の細胞やサイトカイン、成長因子などによって構成される TME の複雑さをモデル化するには不十分である(27,28)。我々のグループではこれまで、ヒト口腔癌細胞株を免疫不全マウスであるヌードマウスに接種し、*in vivo* selection によりリンパ節高転移細胞株を樹立し、口腔癌細胞のリンパ節転移と上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal transition: EMT) との関連に着目し、解析してきた(29)。しかし、ヌードマウスは腫瘍免疫において重要である T 細胞数の著しい減少や、その機能不全があり、TME を含めた解析や、T 細胞を標的にした免疫チェックポイント阻害剤の評価は不可能であった(26,30)。一方で、正常免疫マウスに移植可能な同系統マウス由来のがん細胞を利用した同種移植マウスモデルは、癌免疫学研究で再現性のある結果を得ることができる有効なモデルである(27,28,31)。

本研究では、口腔癌頸部リンパ節転移における TME を含めた転移成立機構を解明するために、マウス由来口腔扁平上皮癌頸部リンパ節高転移細胞株を樹立し、癌免疫系も含めた TME の観察が可能な同種同所移植マウスモデルを作製した。

II. 材料と方法

i. 細胞および培養方法

癌細胞はマウス口腔扁平上皮癌細胞株 Sq1979 細胞を用いた (32)。37°C、5% CO₂ 気相下で、10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS、Thermo Fisher Scientific、NY、USA) および 100 µg/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) で細胞培養し、実験に用いた。0.25% トリプシン EDTA 溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) で細胞を浮遊させ、継代をおこなった。

ii. 口腔癌頸部リンパ節転移動物実験モデル

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 C3Hf/He マウス (日本 SLC、静岡、日本) に、メドトミジン (0.3 mg/kg 体重、Domitor®: 日本全薬工業株式会社、東京、日本)、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)、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、東京、日本) の 3 種混合麻酔をおこなった。

癌細胞を FBS 無添加の D-MEM Ham's F-12 で $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個/ml に懸濁し、正常免疫マウスである 5～6 週齢の雄性 C3Hf/He

の舌尖部に $100\mu\text{l}$ ($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 個) 接種した。舌腫瘍形成後、舌腫瘍および頸部リンパ節を摘出した (図 1 A)。

iii. 頸部リンパ節高転移細胞株の樹立

Sq1979 (以下、Pa) 細胞を接種した舌癌頸部リンパ節転移動物実験モデルから摘出した頸部リンパ節組織をバイオマッシャー (Nippi バイオマッシャー II : 株式会社ニッピ、東京、日本) を使用して破碎後、細胞培養用ディッシュに播種した。播種後、増殖し、コロニーを形成した転移癌細胞を回収し、2~3 回継代培養した後、マウスの舌へ再接種した。これらを 4 回繰り返して、Sq1979-LM4 (以下、LM4) 細胞を樹立した (図 1 B)。

iv. 細胞増殖能の評価 (Proliferation Assay)

Pa 細胞および LM4 細胞の細胞懸濁液 1×10^4 個 / ml を $100\mu\text{l}$ (1×10^3 個) ずつ 96well プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 気相下で培養し、4 日間、24 時間毎に細胞増殖を測定した。測定は、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所、熊本、日本) を各 well に $10\mu\text{l}$ 添加し、 37°C で 1 時間培養後、マイクロプレートリーダー (iMark: Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) を使用して 450nm の波長で、上澄み液の吸光度を測定した。

v. 細胞遊走能の評価 (Migration Assay)

$8.0\mu\text{m}$ の小孔を有する多孔メンブレンが下底に張られた上層

チャンバーを内蔵する二層構造トランスウェルチャンバーである Falcon Cell Culture Inserts (Corning, NY, USA) を使用した。FBS 無添加の DMEM Ham's F-12 で 4×10^5 個/ml に調製した Pa 細胞および LM4 細胞の細胞懸濁液を $500 \mu\text{l}$ (2×10^5 個) ずつ、上層チャンバーに播種し、下層チャンバーには誘引物質として 10%FBS を添加した DMEM Ham's を $750 \mu\text{l}$ 加え、 37°C 、5% CO_2 気相下で 24 時間培養した。上層チャンバーの上面に残存している細胞を綿棒で取り除いた後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (4%PFA: 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) で 10 分間固定し、Mayer's Hematoxylin (富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) で 30 分間染色した。メンブレンをメスで切り取り、封入し、顕微鏡 (Leica DM IL LED: Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 200 倍で観察し、無作為に 5 視野を撮影、メンブレンを通過した細胞数を計数した。

vi. 細胞浸潤能の評価 (Invasion Assay)

人工基底膜マトリックスであるマトリゲルでコーティングされた、 $8.0 \mu\text{m}$ の小孔を有する多孔メンブレンが下底に張られた上層チャンバーを内蔵する二層構造トランスウェルチャンバーである Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning, NY, USA) を使用した。FBS 無添加の DMEM Ham's で 4×10^5 個/ml に調製した Pa 細胞および LM4 細胞の細胞懸濁液を $500 \mu\text{l}$ (2×10^5 個) ずつ、上層チャンバーに播種し、下層チャンバーに

は誘引物質として 10%FBS を添加した DMEM Ham's を 750 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 気相下で 60 時間培養した。染色および解析は Migration Assay と同様の方法で行なった。

vii. 遺伝子発現の評価（RT-qPCR 法）

培養細胞および組織から Total RNA isolation system（Monarch Total RNA Miniprep Kit：New England Biolabs、MA、USA）を使用して、全 RNA を抽出した。ReverTraAce® qPCR RT Master Mix（東洋紡株式会社、大阪、日本）を使用して逆転写反応をおこない、一本鎖 cDNAs を合成した。定量的リアルタイム PCR（以下 qPCR）法は、qPCR 用マスターミックスである THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix（東洋紡株式会社、大阪、日本）を使用し、SYBR Green PCR プロトコールでおこなった。Step One Plus TM リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems、NJ、USA）を使用し、1 検体につき n=3 とした。増幅に使用した SYBR Green プライマーを表 1 に示す。

viii. タンパク発現の評価（Western-Blot 法）

細胞を培養し、全細胞溶解用の試薬（Ez RIPA Lysis kit：アトー株式会社、東京、日本）を添加した。15 分間氷上で静置後、滅菌ヘラで細胞を回収し、遠心分離機で 10 分間遠心分離（4 $^{\circ}$ C、14000rpm）した。サンプル 50 μ l と SDS サンプルバッファー（Ez Apply：アトー株式会社、東京、日本）50 μ l を混合し、95 $^{\circ}$ C で 5

分間加熱した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE：アトー株式会社、東京、日本）を使用して分子量に基づいてタンパク質を分離し、ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。一次抗体でイムノブロットし、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG 抗体および Super Signal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate（Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を使用して検出した。Gene Gnome（SynGene、Cambridge、UK）を使用し、画像を撮影した。使用した抗体を表 2 に示す。

ix. 免疫細胞染色法

12well Chamber, removable（ibidi、Gräfelfing、Germany）に細胞懸濁液 2×10^5 個/ml を $250 \mu\text{l}$ （ 5×10^4 個）ずつ各チャンバーに播種し、24 時間培養し、4% PFA 液または 100%メタノール（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を加え、室温で 15 分間固定した。1.5% ウシ血清アルブミン（アルブミン、ウシ血清由来、フラクシオン V, pH7.0：富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）を含むリン酸緩衝生理食塩水溶液（PBS：phosphate-buffered saline、富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）で 30 分間ブロッキングした後、一次抗体を 4°C で 12 時間反応させた。二次抗体は 1：100 に希釈した TRITC 標識抗ウサギ IgG 抗体（Rhodamine（TRITC）-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG（H+L）：Jackson ImmunoResearch Inc.、PA、

USA) を使用し、室温で 1 時間静置した。最後にインサートを撤去し、DAPI Fluoromount-G 封入剤 (SouthernBiotech、AL、USA) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。使用した抗体を表 2 に示す。

x. 免疫組織染色法

担癌マウスより切除した舌および頸部リンパ節を、4%PFA 液に 24 時間浸漬固定し、パラフィン切片と凍結切片を作製した。パラフィン切片は、固定されたマウス組織をパラフィン包埋し、4 μ m の薄切標本を作製した。凍結切片は、固定されたマウス組織を 30%ショ糖溶液で置換 (4℃, 24~48 時間) した後、OCT コンパウンド (サクラファインテック、東京、日本) で包埋し、10 μ m の薄切標本を作製した。作製した切片に H&E 染色、免疫組織染色および蛍光免疫組織染色を行った。

H&E 染色は、パラフィン切片を脱パラフィンし、通法に準じておこなった。

免疫組織染色には、パラフィン切片を用いた。脱パラフィン後、pH=8 の EDTA 溶液浸漬下に圧力鍋で 2 分間加熱する方法、あるいは pH=6 のクエン酸緩衝液に浸漬し、オートクレーブで 20 分間加熱する方法で抗原賦活した。3%過酸化水素溶液による内因性ペルオキシダーゼ活性の除去をおこない、1%ウシ血清アルブミンを含む PBS 溶液で 60 分間ブロッキングした後、一次抗体を 4℃で 12 時間反応させた。次に、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (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)を反応させた後、ImmPACT NovaRED (VECTOR LABORATORIES、CA、USA)により可視化し、ヘマトキシリンで対比染色をおこなった。

蛍光免疫組織染色はパラフィン切片あるいは凍結切片を使用した。パラフィン切片は免疫組織染色と同様に脱パラフィンおよび抗原賦活をおこない、凍結切片は PBS 溶液で洗浄した。1%ウシ血清アルブミンを含む PBS 溶液で 60 分間ブロッキングしたのち、一次抗体を 4℃で 12 時間反応させた。二次抗体には 1:100 に希釈した TRITC 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用し、DAPI Fluoromount-G 封入剤で封入した。

染色後は倍率 400 倍の顕微鏡下で観察し、染色されている領域を 5 視野撮影、画像解析ソフト Image J program を使用して定量的に評価した。Cd31、Lyve-1、Cox-2、 α SMA、Vimentin は陽性密度を測定し、Cd45、F4/80、Cd163 は陽性細胞数を計数した。使用した抗体を表 2 に示す。

xi. IL-6 および STAT3 阻害剤添加実験

Pa 細胞および LM4 細胞を 6well プレートに 1×10^5 個播種し、2 日間培養後、インターロイキン (Interleukin: IL) -6 (インターロイキン-6, マウス, 組換え体, 動物由来物フリー：富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) を 25 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml 添加した。5%CO₂ 気相下で 24 時間時間培養し、RNA およびタ

ンパクを抽出した。

STAT3 阻害剤である C188-9 (Med Chem Express、NJ、USA) は 10 μ M に調製し、50mg/ml の IL-6 と共に添加し、5%CO₂ 気相下で 24 時間培養し、RNA およびタンパクを抽出した。

xii. 統計分析

マウス組織の組織染色のデータは平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で提示し、その他のデータは平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) で提示した。独立した 2 群の比較は Student's t 検定を使用し、2 $\times$ 2 分割表の検定は Fisher's exact probability 検定を使用し、3 群以上の平均値の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) と Dunnett の多重比較検定を使用して、統計学的に解析した。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。

Ⅲ． 結果

i. 頸部リンパ節高転移細胞株 Sq1979-LM4 細胞の樹立

正常免疫マウス C3Hf/He を用いた同種同所移植モデルで頸部リンパ節転移を解析することを目的にリンパ節高転移細胞株の樹立を目指した。

Pa 細胞 1×10^6 個を C3Hf/He マウスの舌に接種すると、約 30 日後に舌腫瘍の増大を認めた。頸部リンパ節を摘出し、「材料と方法」に示すように LM4 細胞を樹立した。LM4 細胞は Pa 細胞と比較し、細胞形態がやや紡錘形に変化していた（図 2 A）。LM4 細胞は Pa 細胞と比較し、細胞増殖能に変化はなく（図 2 B）、遊走能（図 2 C）と浸潤能（図 2 D）は有意に亢進していた。

ii. LM4 細胞と EMT の関連

LM4 細胞の細胞形態がやや紡錘形に変化していたことから、LM4 細胞が EMT を引き起こしている可能性を考え、Pa 細胞および LM4 細胞の EMT 関連マーカーの発現を mRNA レベルで比較した。さらに、免疫細胞染色法でタンパクレベルの EMT 関連マーカーの発現を比較した。その結果、mRNA レベルとタンパクレベルにおいて、上皮系マーカーである E-cadherin に有意な変化は認めなかったが、Pa 細胞と比較して、LM4 細胞では間葉系マーカーである Vimentin と Snail の有意な発現上昇を認めた（図 3）。近年、上皮系マーカーと間葉系マーカーの両方を発現している状態を、ハイブリッド型 EMT とする概念が提唱されて

おり、これらの結果からリンパ節高転移細胞株がハイブリッド型 EMT の状態にあると考えられた(33,34)。

iii. 口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた腫瘍組織およびリンパ節転移能の検討

次に、Pa 細胞および LM4 細胞の口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた検討を行なった。正常免疫マウスである C3Hf/He の舌に Pa あるいは LM4 細胞を 5×10^5 個接種し、14 日後に舌腫瘍および頸部リンパ節を摘出した。まず、舌腫瘍組織を H&E 染色像で検討したところ、Pa 腫瘍は小さな胞巣状を呈した腫瘍塊を複数認め、その周囲に線維芽細胞や膠原繊維が増生していた(図 4 A)。腫瘍塊の間は比較的疎であり、そこにリンパ球の浸潤を認めた(図 4 A)。一方、LM4 腫瘍は充実性の増殖をしており、膠原繊維が癌細胞間に入り込むような組織像を呈し、腫瘍の周囲や内部にリンパ球の浸潤を認めた(図 4 A)。以上の結果から、Pa 腫瘍および LM4 腫瘍ともに腫瘍組織に炎症が起こっているものの、LM4 腫瘍はその内部まで炎症が亢進している可能性が示唆された。また、舌腫瘍組織の H&E 染色像で腫瘍長径を測定したところ、Pa 腫瘍よりも LM4 腫瘍の腫瘍長径は有意に大きく、*in vivo* において LM4 腫瘍の腫瘍増殖速度は Pa 腫瘍と比較して早く、腫瘍形成能が高いことが明らかになった(図 4 A)。

次に、摘出した頸部リンパ節に対して H&E 染色および Pan-

cytokeratin の蛍光免疫組織染色法にて頸部リンパ節転移の有無を解析した。接種後 14 日目において、Pa 接種群で 9 個体中 1 個体、LM4 接種群で 10 個体中、9 個体に頸部リンパ節転移を認め、LM4 接種群で有意に高い頸部リンパ節転移率を示した（図 4 B）。

iv. 口腔癌同種同所移植マウスモデルを用いた舌腫瘍の免疫組織学的検討

さらに Pa 腫瘍および LM4 腫瘍を免疫組織学的に検討した。腫瘍増殖には腫瘍組織内の血管新生が重要であるが、血管内皮細胞のマーカーである Cd31 の免疫組織染色では腫瘍面積あたりに占める血管の面積に有意な変化は認めなかった(35)。一方、リンパ節転移の成立には原発腫瘍組織内のリンパ管新生が重要であることが知られている(29)。リンパ管内皮細胞のマーカーである Lyve-1 を蛍光免疫組織染色したところ、Pa 腫瘍と比較して LM4 腫瘍ではリンパ管が有意に増加していることが明らかとなった（図 5 A）。

炎症部位において誘導され、口腔癌のリンパ節転移や予後との関連も報告されている Cyclooxygenase-2 (Cox-2) 発現や、腫瘍組織内の白血球浸潤、なかでも腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) について免疫組織学的に検討した(36)。その結果、Cox-2 発現は Pa 腫瘍と LM4 腫瘍ともに認められるものの、LM4 腫瘍で有意に高発現していた（図 5

B)。Cox-2 は古くから腫瘍組織内でのがん細胞の EMT 誘導との関連が報告されている(37,38)。さらに、白血球のマーカーとして Cd45、TAM のマーカーとして F4/80、M2 型の TAM(M2-TAM) のマーカーとして Cd163 の陽性細胞を評価したところ、白血球および TAM の数に有意差はなかったが、M2-TAM は LM4 腫瘍で有意に増加しており、主に腫瘍周囲の間質に多く分布していた(図 5 B)。また、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)のマーカーとして α SMA の陽性領域を評価したところ、LM4 腫瘍で有意に増加し、特に腫瘍内部に α SMA 陽性の細胞が入り込むような組織像を呈していた(図 5 B)。

v. IL-6/STAT3 経路による口腔癌細胞の EMT 誘導の検討

TME 構成要素である TAM は、炎症を生じた腫瘍組織内のがん細胞と様々な相互作用を起こすことが知られている(39-41)。Dehai らは、TAM と癌細胞が相互作用し、両者より分泌される IL-6 が癌細胞の EMT を誘導し、M2-TAM 優位の腫瘍形成に寄与していることを報告した(42)。IL-6 は重要な炎症性サイトカインの一つで、IL-6 により胃癌や膀胱癌細胞で EMT が誘導されることが示されている(43,44)。IL-6/JAK/STAT3 伝達経路は IL-6 の主要な経路で、STAT3 のリン酸化を介してがん細胞の増殖や転移を促進することが報告されている(45)。近年、ヒト口腔癌細胞株を用いた *in vitro* 研究において、この経路が活性化され Snail の発現が上昇し、EMT が促進することも報告されてい

る(44,46)。そこで、本研究で使用しているマウス口腔癌細胞においても IL-6/JAK/STAT3 伝達経路が EMT 誘導に関与しているかどうかを分子生物学的に検討した。

まず、Pa 細胞および LM4 細胞にマウス IL-6 を添加することによる STAT3 およびリン酸化された STAT3 のタンパク発現を検討した。その結果、両細胞ともに STAT3 は同程度に発現しており、IL-6 添加により STAT3 のリン酸化 (pSTAT3) が誘導されたことを確認した (図 6 A)。また、mRNA レベルでは IL-6 添加により両細胞とも STAT3 の発現自体も有意に上昇していた (図 6 B)。

さらに、EMT 関連マーカーである E-cadherin、Snail、Vimentin の mRNA レベルでの発現変化を RT-qPCR 法で解析した。Pa 細胞では IL-6 刺激により E-cadherin は発現量がやや低下したものの、Vimentin は上昇せず、Snail も安定した変化を認めなかった (図 6 C)。一方、LM4 細胞では E-cadherin の発現量がやや低下し、Vimentin、Snail の発現量は有意に上昇した (図 6 C)。

vi. 口腔癌細胞の EMT 誘導に対する STAT3 阻害剤による検討

LM4 細胞の EMT 関連マーカーの変化が STAT3 を介して生じていることを確認するため、STAT3 阻害剤である C188-9 を添加して EMT 関連マーカーの発現変化を検討した。まず、LM4 細胞への IL-6 添加による STAT3 のリン酸化は C188-9 添加により阻害されることを確認した (図 7 A)。さらに、LM4 細胞におけ

る mRNA レベルでの E-cadherin の発現上昇、Vimentin および Snail の発現低下が認められた（図 7 B）。

vii. TME における炎症性サイトカイン発現の比較

TME を含めた口腔癌研究においての本モデルの有用性をさらに検討するために、腫瘍組織内に発現する炎症性サイトカインの発現を検討した。LM4 腫瘍の TME で M2-TAM が増加していたことに着目し、IL-6 に加え、TAM の遊走や極性誘導との関連が報告されている CCL2 と CCL5 について検討した。CCL2 は単球、マクロファージをはじめとするさまざまな免疫細胞の遊走・浸潤を制御している(47,48)。CCL5 は受容体に結合することでマクロファージや線維芽細胞を誘引し、さらに、TAM の極性を M2 型に誘導することにより、腫瘍の増殖と転移を促進することが報告されている(49-56)。そこで、これら 3 つのサイトカインの発現を RNA レベルで確認した。Pa および LM4 細胞を舌に移植し形成した舌腫瘍組織より RNA を抽出し、IL-6、CCL2、CCL5 の発現を RT-qPCR 法にて解析した。その結果、IL-6、CCL2 の発現に有意差は認めなかったが、CCL5 は LM4 において有意に発現が上昇した（図 8 A）。

さらに、癌細胞自体におけるこれらのサイトカインの発現を確認するために Pa 細胞および LM4 細胞から抽出した RNA でこれらの発現を RT-qPCR 法にて解析した。その結果、IL-6、CCL2、

CCL5 と も に 腫 瘍 組 織 の 結 果 と は 逆 に LM4 細 胞 で の 発 現 は Pa 細 胞 と 比 較 し て 低 下 し て い た 。 (図 8 B) 。

IV. 考察

19世紀半ばに Rudolf Virchow により、がんが慢性炎症のある部位に発生し、腫瘍生検検体に炎症細胞が多く含まれることが報告され、初めて炎症とがんの関連が示唆された(57)。炎症はがんの重要な特徴であり、腫瘍発生や進行のリスクと関連していることが、多くの種類のがんにおいて報告されている(17,18,58)。創傷治癒や感染症とは異なり、がんの炎症反応は制御が困難である(59)。がんにおける外因性の炎症は、自己免疫疾患、細菌やウイルス感染、肥満、喫煙、アスベスト曝露、過度のアルコール摂取などにより生じ、がんの発生や進行を促進することが報告されている。また、腫瘍の内因性(腫瘍誘発性)の炎症は、がんの発生に関わる変異によって引き起こされ、炎症細胞の動員や活性化を介して腫瘍の進行に寄与することが知られている(60-62)。外因性および内因性の炎症はともに、免疫抑制性の TME をもたらし、腫瘍形成に好ましい状態を提供する(61)。炎症性 TME が形成されると、腫瘍細胞や間質細胞由来の炎症性因子が、がん遺伝子を活性化し、がん抑制遺伝子を不活性化することにより、腫瘍細胞の増殖や生存を誘導する(21,61,62)。本研究においては、転移能および腫瘍増殖能の異なる Pa 腫瘍と LM4 腫瘍の両方において、腫瘍組織内に CD45 陽性細胞の流入と Cox-2 の発現が認められ、腫瘍組織に炎症が起こっていた。特に LM4 腫瘍において Cox-2 が発現上昇し CAF が増加しており、より炎症が亢進していることが確認された。

これまでに COX-2 の発現がリンパ管新生および頸部リンパ節転移と関連していることが免疫不全マウスやヒト臨床検体を用いた研究で報告されている(36,63)。本研究で使用した同種同所移植モデルにおいても、Pa 腫瘍と比較して LM4 腫瘍ではリンパ節転移を高頻度に認め、原発腫瘍組織における Cox-2 の発現が増加し、リンパ管も増加しており、本モデルは過去の報告を再現しうる有用性の高いモデルであると考えられる。炎症によりがん細胞に EMT が誘導されることが知られているが、本研究結果では、もともと EMT 誘導が促進されたがん細胞で構成された腫瘍組織において、炎症が亢進しており、リンパ管新生や M2-TAM、CAF の増加も認め、その炎症により分泌された IL-6 により、さらにがん細胞の EMT 誘導が亢進するという、EMT 誘導と炎症との相乗効果の可能性が示唆されたが、その詳細な機構は不明である(64-66)。

EMT は、転移を含めたがんの進展に重要な役割を担うことが知られている(67)。しかしながら、がん細胞を上皮系の表現型と間葉系の表現型に単純に分類した場合、様々な報告の中で矛盾した結果が示されていることから、近年、上皮表現型と間葉表現型の間の状態、すなわちハイブリッド型 EMT という考え方が提唱されている(33,34)。ハイブリッド型 EMT は、個々の細胞が上皮系マーカーと間葉系マーカーの両方を発現し、がん細胞が転移成立過程においてストレスの多い環境に柔軟に適応するための変化であるとされ、完全な上皮系や間葉系の状態よりも

ハイブリッド型 EMT の状態が、がんの転移には重要であるとされている(34,68)。本研究において同種同所移植マウスモデルを用いた *in vivo* selection で樹立したリンパ節高転移細胞株である LM4 細胞は上皮系マーカーである E-cadherin の発現は低下していなかったが、間葉系マーカーである Vimentin と Snail の発現は顕著に上昇しており、ハイブリッド型 EMT の状態にあると考えられる。

IL-6 は炎症に関わる多面的なサイトカインで、C 反応タンパクの主要誘導因子であり T 細胞やマクロファージから主に産生される(69)。IL-6 は頭頸部癌患者の血清中に存在する主要なケモカインの一つであり、IL-6 の上昇は腫瘍の再発、生存率の低下、腫瘍の転移を独立して予測すると報告されている(70,71)。Yadav らは、SCID マウスの異種移植モデルにおいて、IL-6 は STAT3/Snail シグナル伝達経路の活性化を介して頭頸部腫瘍細胞の EMT 変化を誘導し、STAT3 ノックダウンにより EMT 変化が著明に逆転することを明らかにした(72)。これらの結果は、IL-6、STAT3、Snail が頭頸部癌患者の再発、転移、生存率低下に直接関連していることを示している(70-75)。本研究において、LM4 細胞で IL-6 刺激により、pSTAT3 が高発現し、IL-6/JAK/STAT3 伝達経路を介して、LM4 細胞の EMT が促進されることが示された。興味深いことに、IL-6 による EMT 促進の反応は Pa 細胞では起こらず LM4 細胞でのみ起こっていた。この様ながん細胞自体の炎症性サイトカインとの反応の違いが、*in*

vitro で細胞増殖能に差のない Pa 細胞と LM4 細胞が *in vivo* においては腫瘍増殖速度に大きな差がある理由の一つであることが予想され、がん細胞と TME 構成要素との相互作用の重要性を示していると考えられる。

炎症は、線維芽細胞を動員し、線維化を誘導し、線維芽細胞は腫瘍形成により生じる組織構造の変化を感知し、炎症性メディエーターを産生する(76)。TME に存在する線維芽細胞である CAF は、TME におけるコラーゲンや様々な ECM 成分の沈着に関与し、がん細胞の増殖や血管新生を促進することが知られている(77,78)。また、CAF は osteopontin、CXCL1、CXCL2、CXCL12、CXCL13、IL-6、IL-1 β 、CCL5 など多数のサイトカインおよびケモカインを産生し、免疫機能に重要な機能を持つ(21,79,80)。さらに、CAF が分泌する TGF- β は NK 細胞および CTL の活性化や制御性 T 細胞 (Regulatory T cells: Treg) および免疫抑制性形質細胞の分化を抑制する(44,81,82)。本研究では、Pa 腫瘍組織と比較し、LM4 腫瘍組織で α SMA 陽性の CAF が増加しており、CAF の存在は LM4 腫瘍の腫瘍増殖速度の上昇の一因となっている可能性がある。

M2-TAM を中心とする TAM は、T 細胞の細胞傷害機能を阻害し、サイトカインの分泌により、TME の免疫抑制状態を維持することで、腫瘍促進性炎症を引き起こしている(39,40)。さらに、M2-TAM は、TME における免疫応答の異常、血管新生、細胞増殖、間質細胞のリモデリングを制御することが報告されている

(41)。また、TAMの極性の変化は、がん細胞、T細胞およびB細胞からの刺激と信号によって生じることが知られている(21,41)。本研究では、LM4腫瘍組織でのCCL5の発現上昇をmRNAレベルで確認した。CCL5はM2-TAMを誘導することが報告されており、LM4腫瘍のM2-TAMの増加に矛盾しない(83)。また、*in vitro*ではLM4細胞自体からのCCL5のmRNA発現はむしろ低下しており、これはLM4腫瘍組織で発現が上昇していたCCL5が、同じくLM4腫瘍組織で発現上昇していたCAFなどのTME構成細胞より分泌されていることを示唆しており、この結果からも、がんの進行においてはがん細胞だけではなく、TMEとの相互作用が重要であると考えられる。

がんに限らず、生体内において炎症が進行するにつれて、成長因子、サイトカインおよびケモカインが含まれるシグナル伝達経路により、さまざまなタイプの免疫特異的な細胞（白血球および他の炎症細胞）が活性化され、炎症部位に動員される(84)。がんにおいては、外因性と内因性の炎症により腫瘍細胞でNF- κ BやSTAT3などの転写調節因子の活性化が起こる(17)。続いて、これらの転写調節因子は、サイトカイン、ケモカイン、およびCOX-2などの可溶性炎症性メディエーターの産生を誘導する。これにより動員された浸潤性炎症細胞、特に単球、顆粒球、およびリンパ球は、炎症誘発性サイトカインの産生をさらに誘導することによって、炎症症状を増幅させ、腫瘍形成を永続させる正のフィードバックループが形成される(61)。このようにが

んにおいても炎症の各段階で IL-6 や CCL5 を含む様々なサイトカインが TME 内に分泌されており、これらが複雑に相互作用し、分泌量も変化していることが考えられる。本研究では、重要な炎症誘発性サイトカインの一つである IL-6 とがん細胞の相互作用を示したが、腫瘍全体から抽出した RNA で IL-6 の発現に変化を認めなかった。これは腫瘍組織においては宿主側の IL-6 の発現量が同じであったとしても、IL-6 に対するがん細胞側の反応が違ふことで、がん細胞の増殖能や遊走能、浸潤能に差が生じる可能性を示唆しているが、その詳細は不明である。EMT 誘導に関しては、おそらく IL-6/JAK/STAT3 シグナルから Snail、Vimentin 発現までの間に LM4 細胞で Pa 細胞には無い、何らかの機構が存在するはずであるが、これには更なる研究が必要である。また、腫瘍組織から抽出した RNA による RT-qPCR 解析で個体間でのサイトカインの発現量が一定ではなく、生体内での炎症を伴う TME 解析の困難さを表している。今後はサンプル数を増やすなどのさらなる改善が必要である。

高転移細胞株の EMT 亢進や、IL-6 の EMT 誘導への影響や、腫瘍組織における M2-TAM との関連を示唆する CCL5 の発現など、本研究に使用した実験モデルで、これまでの炎症や腫瘍免疫に関する報告と概ね矛盾しない結果が得られたことは、このモデルが TME を含めたがん研究に非常に有用であることを示している（図 9）。今後も、がん細胞自体と TME の両面からの

研究アプローチによるさらなる解析を継続していくことが重要である。

V. 総括

- 1) 同種同所移植マウスモデルを使用した *in vivo* selection により、頸部リンパ節高転移細胞株である LM4 細胞を樹立した。
- 2) Pa 細胞と比較し、LM4 細胞は細胞増殖能に変化はなかったが、細胞遊走能および細胞浸潤能が亢進していた。
- 3) Pa 細胞と比較し、LM4 細胞は EMT が亢進していた。
- 4) LM4 細胞は同種同所移植マウスモデルにおいて、Pa 細胞と比較し、腫瘍増殖能および頸部リンパ節転移能が亢進していた。
- 5) Pa 腫瘍および LM4 腫瘍で炎症所見を認め、LM4 腫瘍でより亢進していた。
- 6) LM4 腫瘍では Pa 腫瘍と比較してリンパ管新生が亢進し、M2-TAM 数が上昇していた。
- 7) LM4 細胞は IL-6 を添加すると、STAT3 シグナルを介して EMT 誘導が促進された。
- 8) LM4 腫瘍で M2-TAM の誘導に関与する、CCL5 の発現が上昇していた。

VI. 結 論

本研究では、同種同所移植マウスモデルを使用して、マウス口腔癌頸部リンパ節高転移細胞株である LM4 細胞を樹立した。LM4 細胞は細胞増殖能に変化は認めなかったが、その担癌マウスではリンパ節転移能の向上だけでなく、腫瘍増殖能が著明に亢進しており、癌細胞と TME との相互作用の重要性が強く示唆された。

転移能や腫瘍増殖能の違う 2 種類の細胞を使用できる本モデルは TME を含んだ口腔癌研究に適しており、がん細胞の腫瘍組織における EMT 誘導、さらには頸部リンパ節転移機構の解明、新たな治療薬の探索などに非常に有用であると考えられる。

VII. 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）鵜澤成一教授に深甚なる謝意を表します。本研究を開始するにあたり、細胞を分与いただきました、熊本大学大学院生命科学研究部総合医薬科学部門感覚・運動医学分野（歯科口腔外科学講座）吉田遼司准教授、群馬大学重粒子線医学研究センター安藤興一先生に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）森田祥弘助教に深く感謝致します。最後に、この研究に対して多大なる御協力と御助言を頂いた顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）の皆様には厚くお礼申し上げます。

VII. 脚注

本論文の要旨の一部は、第 67 回 日本口腔外科学会総会・学術大会（2022 年、東京、日本）において発表した。

IX. 参考文献

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021;127:3029–30.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. American Cancer Society; 2021;71:209–49.
3. Muller S, Tilakaratne WM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol*. 2022;16:54–62.
4. Harsha C, Banik K, Ang HL, Girisa S, Vikkurthi R, Parama D, et al. Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *Int J Mol Sci*. 2020;21:3285.
5. CANCER STATISTICS IN JAPAN 2021 [Internet]. *CANCER Stat. Jpn*. [cited 2021 Dec 14]. Available from: https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/statistics/2021_en.html
6. Baba A, Hashimoto K, Kayama R, Yamauchi H, Ikeda K, Ojiri H. Radiological approach for the newly incorporated T staging factor, depth of invasion (DOI), of the oral tongue cancer in the 8th edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging manual: assessment of the necessity for elective neck dissection. *Jpn J Radiol*. 2020;38:821–32.
7. Head and neck cancers incidence statistics [Internet]. *Cancer Res. UK*. 2017 [cited 2022 Dec 26]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/head-and-neck-cancers/incidence>
8. Turajlic S, Swanton C. Metastasis as an evolutionary process. *Science*. American Association for the

- Advancement of Science; 2016;352:169–75.
9. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*. 2003;98:413–23.
 10. Sethi N, Kang Y. Unravelling the complexity of metastasis — molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:735–48.
 11. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. 2011;147:275–92.
 12. Wei L-Y, Lin H-C, Tsai F-C, Ko J-Y, Kok S-H, Cheng S-J, et al. Effects of Interleukin-6 on STAT3-regulated signaling in oral cancer and as a prognosticator of patient survival. *Oral Oncol*. 2022;124:105665.
 13. Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Cell Culture Based *in vitro* Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:322.
 14. Mun J-Y, Leem S-H, Lee JH, Kim HS. Dual Relationship Between Stromal Cells and Immune Cells in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2022;13:864739.
 15. Lv C, Li S, Zhao J, Yang P, Yang C. M1 Macrophages Enhance Survival and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma by Inducing GDF15-Mediated ErbB2 Phosphorylation. *ACS Omega*. 2022;7:11405–14.
 16. Hadjigol S, Shah BA, O'Brien-Simpson NM. The 'Danse Macabre'—Neutrophils the Interactive Partner Affecting Oral Cancer Outcomes. *Front Immunol*. 2022;13:894021.
 17. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140:883–99.
 18. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860–7.
 19. Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncol Williston Park N*. 2002;16:217–26, 229; discussion 230–232.
 20. Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88:218–30.

21. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther.* Nature Publishing Group; 2021;6:1–46.
22. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Green AR, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:402.
23. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* American Association for the Advancement of Science; 2016;8:328rv4-328rv4.
24. Naimi A, Mohammed RN, Raji A, Chupradit S, Yumashev AV, Suksatan W, et al. Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons. *Cell Commun Signal CCS.* 2022;20:44.
25. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 2018;11:39.
26. Chiu W-C, Ou D-L, Tan C-T. Mouse Models for Immune Checkpoint Blockade Therapeutic Research in Oral Cancer. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2022;23:9195.
27. Zeng Z, Wong CJ, Yang L, Ouardaoui N, Li D, Zhang W, et al. TISMO: syngeneic mouse tumor database to model tumor immunity and immunotherapy response. *Nucleic Acids Res.* 2021;50:D1391–7.
28. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Rutland CS, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Mouse Tumor Models for Advanced Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21:4118.
29. Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Omata T, Morita N, Yura Y, et al. Cellular fibronectin 1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp*

- Metastasis. 2015;32:739–53.
30. Stein RG, Ebert S, Schlahsa L, Scholz CJ, Braun M, Hauck P, et al. Cognate Nonlytic Interactions between CD8+ T Cells and Breast Cancer Cells Induce Cancer Stem Cell-like Properties. *Cancer Res.* 2019;79:1507–19.
 31. Olson B, Li Y, Lin Y, Liu ET, Patnaik A. Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer Discov.* 2018;8:1358–65.
 32. Sakuma K, Kii T, Takahashi H, Suzuki S, Yoshikawa K, Ogawa T, et al. An In Vivo Study of Local Administration of Low-dose Anti-PD-1 Antibody Using an Oral Cancer Cell Line. *Anticancer Res.* 2022;42:4293–303.
 33. Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM, et al. Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget.* 2016;7:27067–84.
 34. Liao T-T, Yang M-H. Hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Cancer Metastasis: Clinical Significance and Regulatory Mechanisms. *Cells.* 2020;9:623.
 35. Yoshida H, Yoshimura H, Matsuda S, Ryoke T, Kiyoshima T, Kobayashi M, et al. Effects of peritumoral bevacizumab injection against oral squamous cell carcinoma in a nude mouse xenograft model: A preliminary study. *Oncol Lett.* 2018;15:8627–34.
 36. Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Nishisho T, Yura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012;41:885–92.
 37. Neil JR, Johnson KM, Nemenoff RA, Schiemann WP. Cox-2 inactivates Smad signaling and enhances EMT stimulated by TGF- β through a PGE2-dependent mechanisms. *Carcinogenesis.* 2008;29:2227–35.
 38. Zhang X, Qu P, Zhao H, Zhao T, Cao N. COX-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and migration in osteosarcoma MG-63 cells via PI3K/AKT/NF- κ B signaling. *Mol Med Rep. Spandidos Publications;* 2019;20:3811–9.

39. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41:49–61.
40. Salmaninejad A, Valilou SF, Soltani A, Ahmadi S, Abarghan YJ, Rosengren RJ, et al. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. *Cell Oncol Dordr*. 2019;42:591–608.
41. Kim J, Bae J-S. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6058147.
42. Dehai C, Bo P, Qiang T, Lihua S, Fang L, Shi J, et al. Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunol Lett*. 2014;160:1–10.
43. Goulet CR, Champagne A, Bernard G, Vandal D, Chabaud S, Pouliot F, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC Cancer*. 2019;19:137.
44. Wu X, Tao P, Zhou Q, Li J, Yu Z, Wang X, et al. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8:20741–50.
45. Khatoon E, Hegde M, Kumar A, Daimary UD, Sethi G, Bishyae A, et al. The multifaceted role of STAT3 pathway and its implication as a potential therapeutic target in oral cancer. *Arch Pharm Res*. 2022;45:507–34.
46. Liu H, Wang C, Xie N, Zhuang Z, Liu X, Hou J, et al. Activation of adrenergic receptor $\beta 2$ promotes tumor progression and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2018;41:147–54.
47. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29:313–26.
48. Zhang H, Yang K, Chen F, Liu Q, Ni J, Cao W, et al.

- Role of the CCL2-CCR2 axis in cardiovascular disease: Pathogenesis and clinical implications. *Front Immunol.* 2022;13:975367.
49. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets.* Taylor & Francis; 2013;17:1439–60.
 50. Shen L, Chen Y, Cheng J, Yuan S, Zhou S, Yan W, et al. CCL5 secreted by senescent theca-interstitial cells inhibits preantral follicular development via granulosa cellular apoptosis. *J Cell Physiol.* 2019;234:22554–64.
 51. Zhuang Y, Zhao X, Yuan B, Zeng Z, Chen Y. Blocking the CCL5-CCR5 Axis Using Maraviroc Promotes M1 Polarization of Macrophages Cocultured with Irradiated Hepatoma Cells. *J Hepatocell Carcinoma.* 2021;Volume 8:599–611.
 52. Nieto JC, Zamora C, Cantó E, Garcia-Planella E, Gordillo J, Ortiz MA, et al. CSF-1 regulates the function of monocytes in Crohn's disease patients in remission. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2017;7:92.
 53. Halama N, Zoernig I, Berthel A, Kahlert C, Klupp F, Suarez-Carmona M, et al. Tumoral Immune Cell Exploitation in Colorectal Cancer Metastases Can Be Targeted Effectively by Anti-CCR5 Therapy in Cancer Patients. *Cancer Cell.* 2016;29:587–601.
 54. Mi S, Qu Y, Chen X, Wen Z, Chen P, Cheng Y. Radiotherapy Increases 12-LOX and CCL5 Levels in Esophageal Cancer Cells and Promotes Cancer Metastasis via THP-1-Derived Macrophages. *OncoTargets Ther.* 2020;13:7719–33.
 55. Ban Y, Mai J, Li X, Mitchell-Flack M, Zhang T, Zhang L, et al. Targeting Autocrine CCL5-CCR5 Axis Reprograms Immunosuppressive Myeloid Cells and Reinvigorates Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 2017;77:2857–68.
 56. Nie Y, Huang H, Guo M, Chen J, Wu W, Li W, et al. Breast Phyllodes Tumors Recruit and Repolarize Tumor-Associated Macrophages via Secreting CCL5 to Promote

- Malignant Progression, Which Can Be Inhibited by CCR5 Inhibition Therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2019;25:3873–86.
57. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl.* 2001;357:539–45.
 58. Elinav E, Nowarski R, Thaïss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:759–71.
 59. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell.* 2010;140:871–82.
 60. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* 2014;15:e493–503.
 61. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* Nature Publishing Group; 2008;454:436–44.
 62. Ritter B, Greten FR. Modulating inflammation for cancer therapy. *J Exp Med.* 2019;216:1234–43.
 63. Morita Y, Morita N, Hata K, Nakanishi M, Kimoto N, Omata T, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-c and lymph node metastasis in human oral tongue cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117:502–10.
 64. Islam MS, Morshed MR, Babu G, Khan MA. The role of inflammations and EMT in carcinogenesis. *Adv Cancer Biol - Metastasis.* 2022;5:100055.
 65. Ricciardi M, Zanutto M, Malpeli G, Bassi G, Perbellini O, Chilosì M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2015;112:1067–75.
 66. Suarez - Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol.* 2017;11:805–23.

67. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018;18:128–34.
68. Thompson EW, Nagaraj SH. Transition states that allow cancer to spread. *Nature*. 2018;556:442–4.
69. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*. 2006;8 Suppl 2:S2.
70. Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Götte K, Naim R, Hörmann K. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25:2761–5.
71. Duffy SA, Taylor JMG, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*. 2008;113:750–7.
72. Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Mol Cancer Res MCR*. 2011;9:1658–67.
73. Yang M-H, Chang S-Y, Chiou S-H, Liu C-J, Chi C-W, Chen P-M, et al. Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene*. 2007;26:1459–67.
74. Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, et al. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol*. 2012;33:6–13.
75. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*. 2000;19:2489–95.
76. Wong VW, Rustad KC, Akaishi S, Sorkin M, Glotzbach JP, Januszyk M, et al. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nat Med*. 2011;18:148–52.
77. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*.

- 2004;432:332–7.
78. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121:335–48.
 79. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol*. 2004;2:E7.
 80. Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*. 2014;25:719–34.
 81. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 2010;31:220–7.
 82. Shalapour S, Font-Burgada J, Di Caro G, Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Dhar D, et al. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*. 2015;521:94–8.
 83. Cao P, Ma B, Sun D, Zhang W, Qiu J, Qin L, et al. hsa_circ_0003410 promotes hepatocellular carcinoma progression by increasing the ratio of M2/M1 macrophages through the miR - 139 - 3p/CCL5 axis. *Cancer Sci*. 2022;113:634–47.
 84. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 8th ed. New York: Garland Science; 2012.

X . 図表

表 1 qPCR 法で使 用 し た SYBR Green プライマーの一覧

Gene name		Sequence(5'→3')
E-cadherin	Forward	CAGGTCTCCTCATGGCTTTGC
	Reverse	CTCCGAAAAGAAGGCTGTCC
Vimentin	Forward	GCTGCGAGAGAAATTGCAGGA
	Reverse	CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG
Snail	Forward	GCTGCGAGAGAAATTGCAGGA
	Reverse	CCACTTTCCGTTCAAGGTCAAG
Stat3	Forward	CAATACCATTGACCTGCCGAT
	Reverse	GAGCGACTCAAACCTGCCCT
CCL2	Forward	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA
	Reverse	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
CCL5	Forward	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC
	Reverse	ACACACTTGGCGGTTCTTTCCG
IL-6	Forward	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG
	Reverse	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
Gapdh	Forward	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

表 2 本研究で免疫細胞染色 (ICC)、Western blot 法 (WB)、免疫組織染色 (IHC)、蛍光免疫組織染色 (IF) に使用した抗体の一覧。

Antibody	Dilution	Company
E-cadherin	ICC(1:200)	proteintec
Vimentin	ICC(1:100) IHC(1:2500)	proteintec
Snail1	ICC(1:100)	GeneTex
Cd31	IHC(1:1000)	proteintec
Lyve1	IF(1:250)	abcam
Cox-2	IHC(1:200)	proteintec
Cd45	IHC(1:200)	Cell Signaling
F4/80	IHC(1:250)	Cell Signaling
Cd163	IHC(1:500)	abcam
α SMA	IHC(1:500)	Cell Signaling
Pan-cytokeratin Alexa Fluor488® conjugated	IF(1:100)	invitrogen
β -tubulin	WB(1:5000)	proteintec
STAT3	WB(1:2000)	Cell Signaling
pSTAT3	WB(1:2000)	Cell Signaling

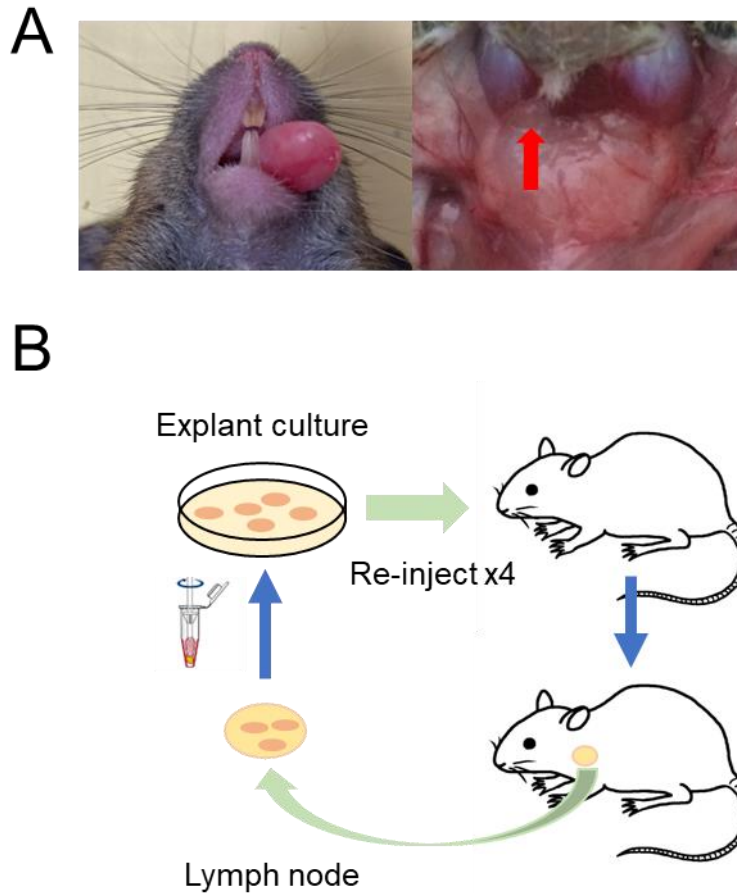


図 1 同種同所移植モデルによる *in vivo* Selection を用いた頸部リンパ節高転移細胞株の樹立

(A) マウス口腔扁平上皮癌 Sq1979 細胞を舌に接種した正常免疫マウス (C3Hf/He マウス) の舌および剖出した頸部リンパ節を示す。

(B) Sq1979 細胞 (Pa 細胞) を C3Hf/He マウスの舌に 1×10^6 個接種し、舌腫瘍の増大後、頸部リンパ節を摘出した。リンパ節を、バイオマッシャーを使用して破碎後、培養ディッシュに播種、培養し、転移細胞を 2~3 回継代培養したのち、舌へ再接種した。これらを 4 回繰り返す、頸部リンパ節高転移細胞株 Sq1979-LM4 細胞 (LM4 細胞) を樹立した。

A

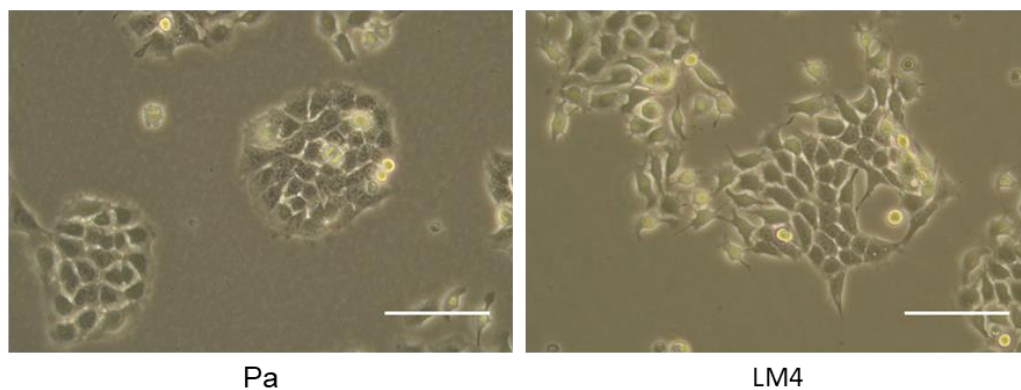


図 2 Pa 細胞と LM4 細胞の比較検討

(A) Pa 細胞と LM4 細胞の代表的な位相差顕微鏡画像を示す。Pa 細胞は敷石状の細胞形態を示したのに対し、LM4 細胞はやや紡錘形に変化していた。スケールバー：100 μ m。

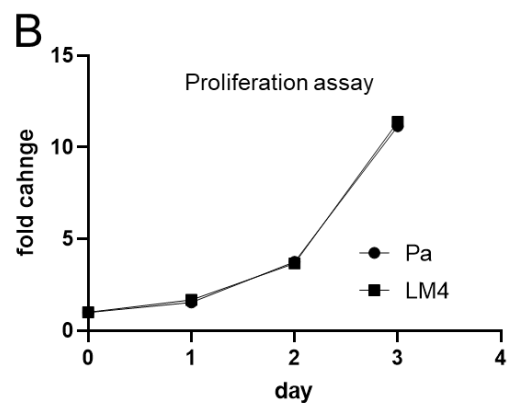


図 2 Pa 細胞と LM4 細胞の比較検討

(B) Proliferation Assay においては, Pa 細胞と LM4 細胞で細胞増殖能に有意な変化は認めなかった。24 時間培養時点を Day0 とし, グラフは Day0 の測定値 O.D.(光学濃度, optical density) の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=6。

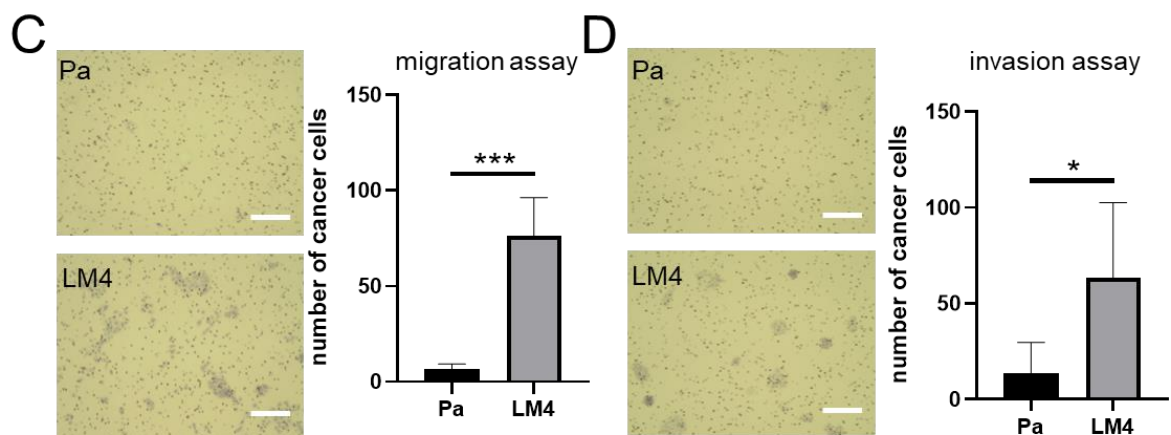


図 2 Pa 細胞と LM4 細胞の比較検討

(C) Migration Assay においては、Pa 細胞と比較し、LM4 細胞で遊走能に有意差を認めた。5 視野の細胞数を計数し、1 視野あたりの平均値を算出した。スケールバー：200 μ m *** $P < 0.001$ 。

(D) Invasion Assay においては、Pa 細胞と比較し、LM4 細胞で浸潤能に有意差を認めた。5 視野の細胞数を計数し、1 視野あたりの平均値を算出した。スケールバー：200 μ m。n=5。* $P < 0.05$ 。

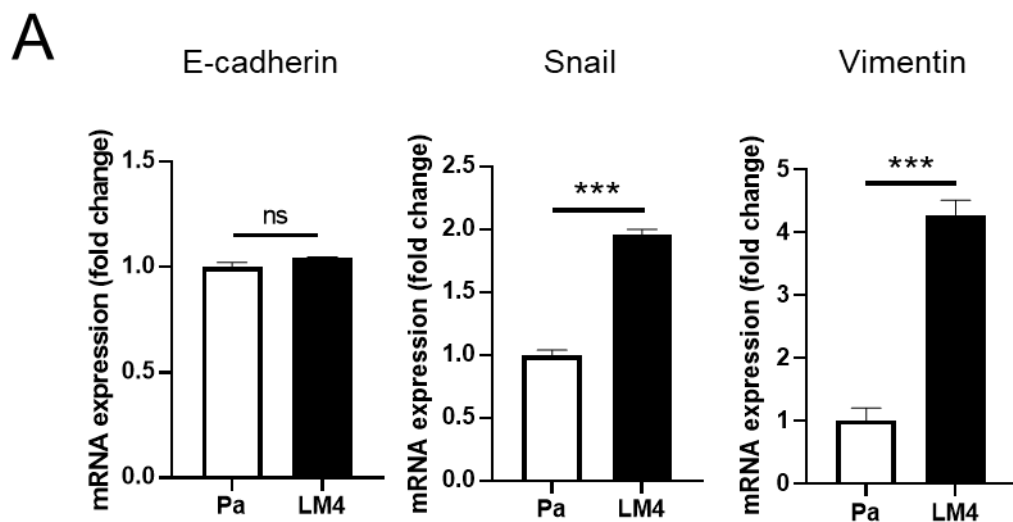


図 3 Pa 細胞と LM4 細胞における EMT 関連マーカー発現

(A) EMT 関連マーカーである E-cadherin、Vimentin、Snail の mRNA 発現量を示す。Pa 細胞と比較し、LM4 細胞の E-cadherin の発現量は変わらなかったが、Vimentin と Snail の発現量が有意に上昇した。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。***P<0.001。

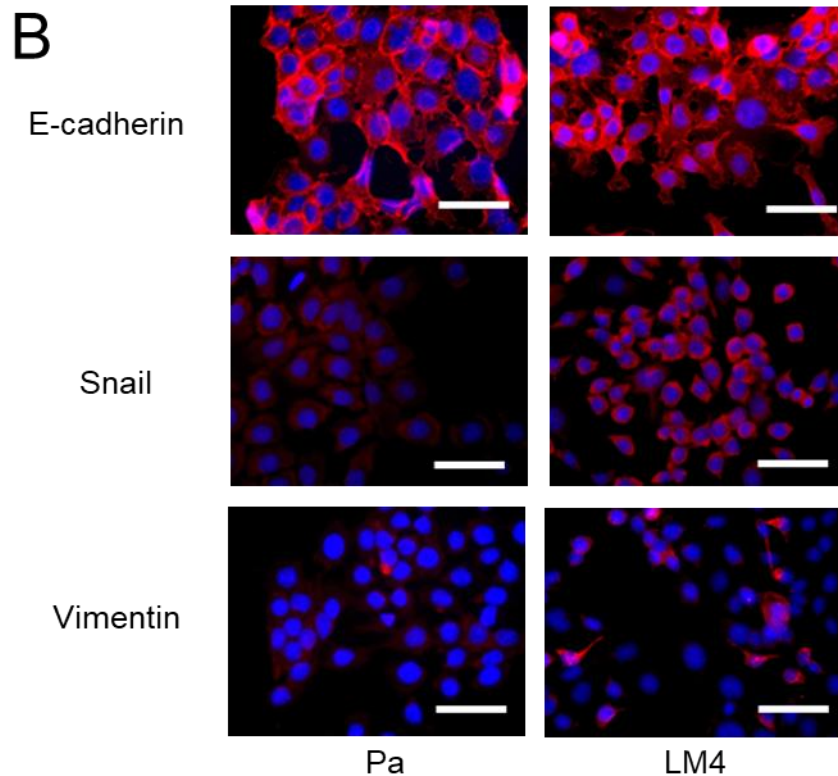


図 3 Pa 細胞と LM4 細胞における EMT 関連マーカー発現

(B) EMT 関連マーカーの免疫細胞染色像を示す。E-cadherin のタンパク発現は変わらなかったが、Vimentin と Snail のタンパク発現が Pa 細胞と比較し LM4 細胞で上昇した。赤：E-cadherin (上段)、Vimentin (中段)、Snail (下段)、青色：DAPI。スケールバー：50 μ m。

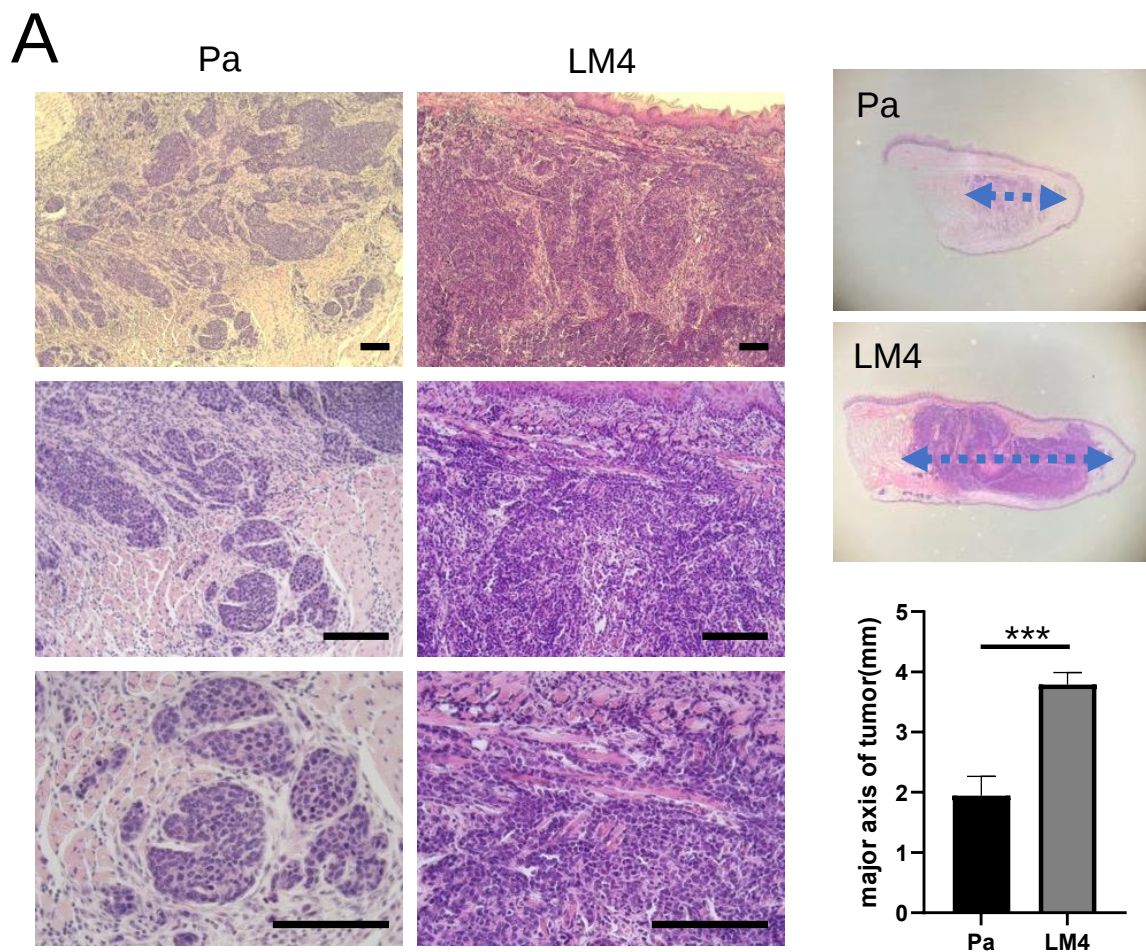


図 4 Pa 腫瘍と LM4 腫瘍の組織像の比較

(A) Pa 腫瘍および LM4 腫瘍の H&E 染色像を示す。Pa 腫瘍は胞巣状を呈した腫瘍塊を複数認め、その周囲に線維芽細胞や膠原繊維が増生し、腫瘍塊の間にリンパ球の浸潤を認めた。一方、LM4 腫瘍は充実性の増殖をしており、膠原繊維が癌細胞間に入り込むような組織像を呈していた。腫瘍の周囲や内部にリンパ球の浸潤を認めた。右に腫瘍長径を比較したグラフを示す。Pa 腫瘍と比較し、LM4 腫瘍は腫瘍長径が有意に大きかった。Pa 腫瘍群：n=7、LM4 腫瘍群：n=10。スケールバー：50 μ m。***P<0.001。

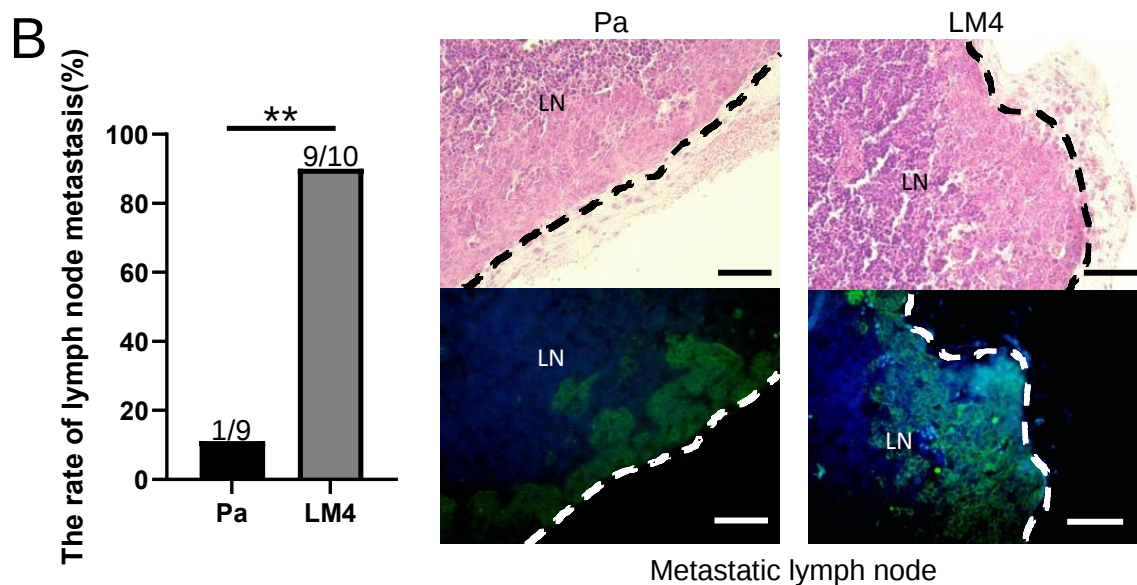


図 4 Pa 腫瘍と LM4 腫瘍の組織像の比較

(B) Pa 腫瘍群において 9 個体中 1 個体、LM4 腫瘍群において 10 個体中 9 個体で頸部リンパ節転移を認めた。H&E 染色像および Pan-cytokeratin の蛍光免疫組織染色像を示す。リンパ節内に Pan-cytokeratin 陽性の癌細胞を認め、頸部リンパ節転移を確認した。Pa 腫瘍群：n=9、LM4 腫瘍群：n=10。青：DAPI、緑：Pan-cytokeratin。スケールバー：50 μ m。

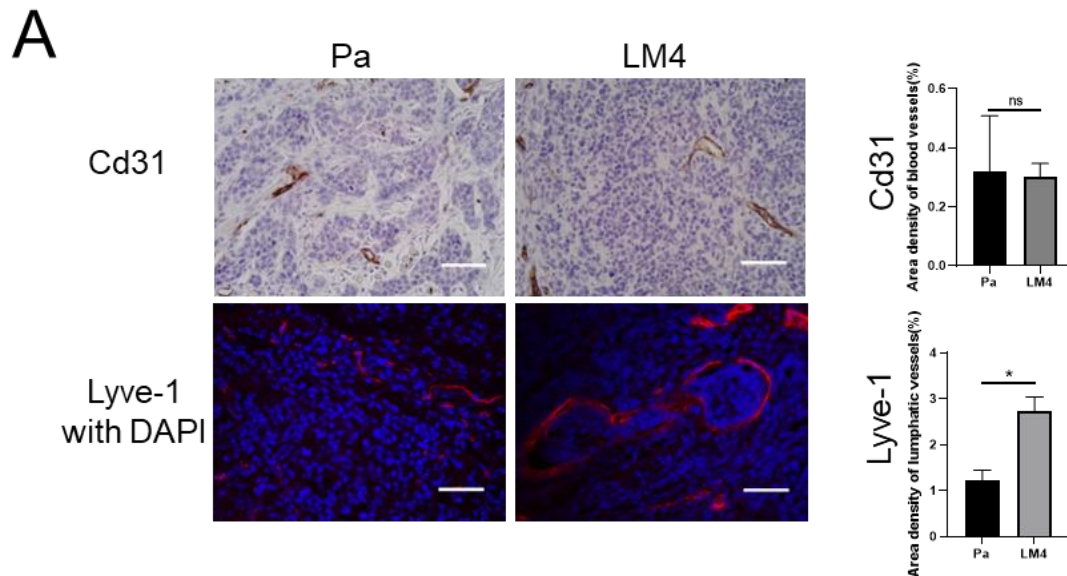


図 5 Pa 腫瘍と LM4 腫瘍の免疫組織学的比較

(A) Pa 腫瘍および LM4 腫瘍組織の免疫組織染色像および蛍光免疫組織染色像を示す。Cd31 陽性の血管内皮細胞は Pa 腫瘍および LM4 腫瘍で有意な差は認めなかった。Lyve-1 陽性のリンパ管内皮細胞は Pa 腫瘍と比較して、LM4 腫瘍で有意に増加していた。右に定量データを示す。5 視野撮影し、1 視野あたりの陽性領域面積の平均値を算出した。Pa 腫瘍：n=7、LM4 腫瘍：n=10。スケールバー：50 μ m。*P<0.05。

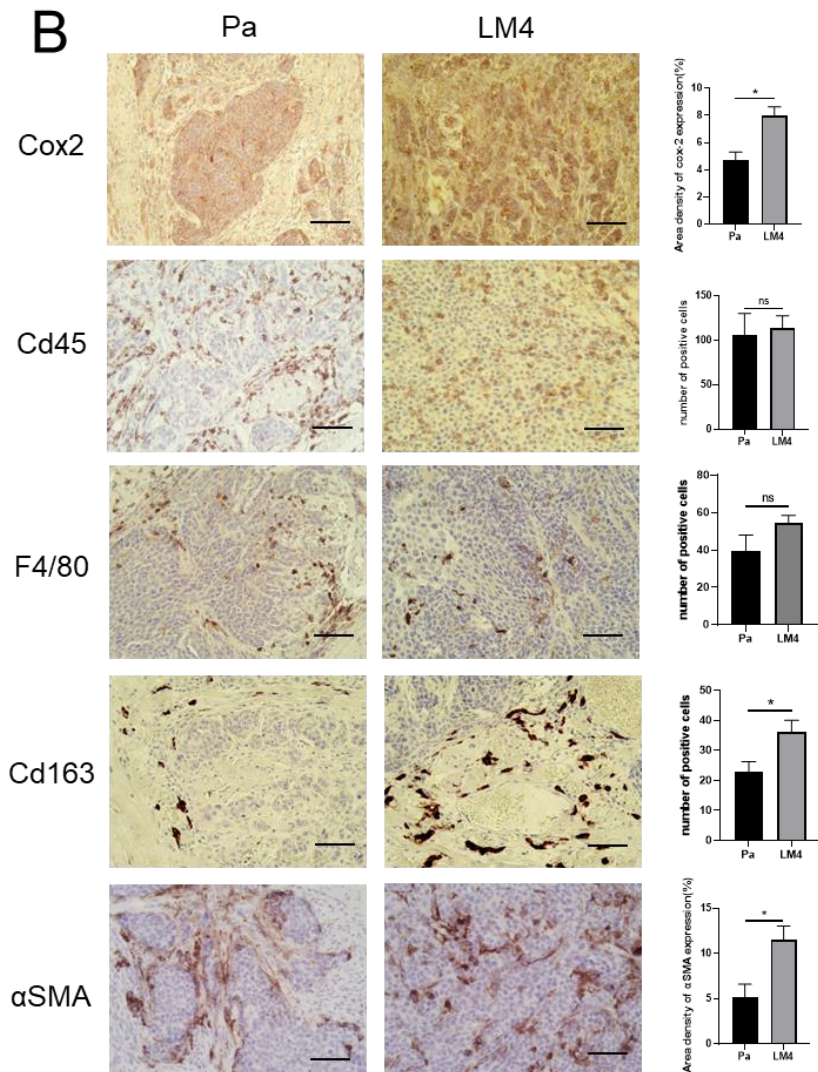


図 5 Pa 腫瘍と LM4 腫瘍の免疫組織学的比較

(B) Pa 腫瘍および LM4 腫瘍組織の免疫組織染色像を示す。Pa 腫瘍に比較して、Cox-2 の発現が LM4 腫瘍で有意に増加していた。また、Cd45 陽性の白血球数や F4/80 陽性のマクロファージ数に有意な差は認めなかったが、Cd163 陽性の M2-TAM 数は Pa 腫瘍と比較して LM4 腫瘍で有意に増加していた。また、 α SMA 陽性の CAF が LM4 腫瘍で有意に増加していた。右に定量データを示す。Cox-2 および α SMA は 5 視野撮影し、1 視野あたりの陽性領域面積の平均値を算出した。Cd45、F4/80、Cd163 は 5 視野撮影し、1 視野あたりの陽性細胞数の平均値を算出した。Pa 腫瘍：n=7 LM4 腫瘍：n=10。スケールバー：50 μ m。*P<0.05。

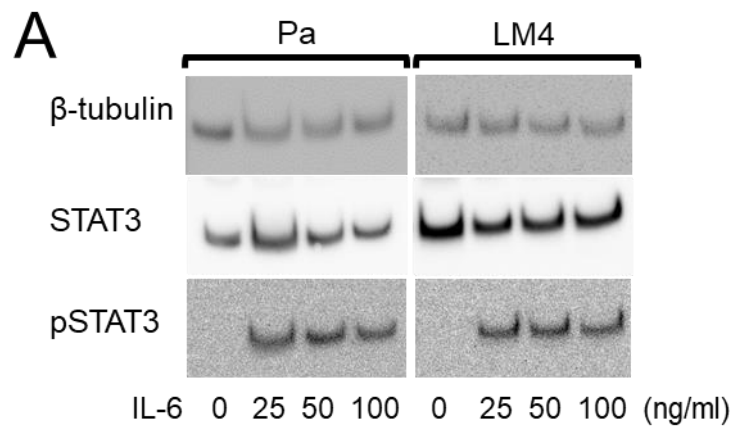


図 6 IL-6 添加による検討

(A) Pa 細胞および LM4 細胞に IL-6 を 0、25、50、100ng/ml の濃度で添加し、24 時間培養した後、タンパクを抽出し、Western blot 法でタンパク発現を比較した。Pa 細胞、LM4 細胞ともに、STAT3 のタンパク発現を確認したが IL-6 添加での変化は認めなかった。一方で、IL-6 添加により Pa 細胞、LM4 細胞ともに、pSTAT3 タンパクは発現増加を認めた。内部コントロールとして抗 β -tubulin 抗体（上）を用いた。

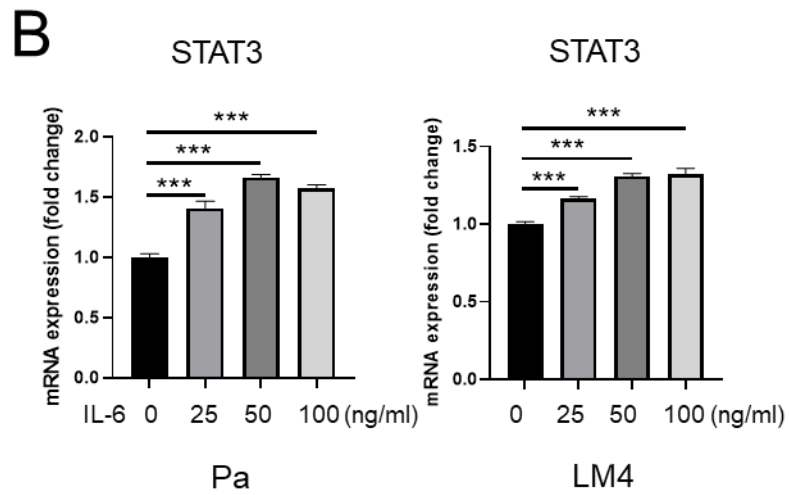


図 6 IL-6 添加による検討

(B) Pa 細胞および LM4 細胞に IL-6 を 0、25、50、100 ng/ml の濃度で添加し、24 時間培養した後、RNA を抽出した。IL-6 添加により Pa 細胞、LM4 細胞ともに、STAT3 の mRNA 発現は増加した。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。***P<0.001。

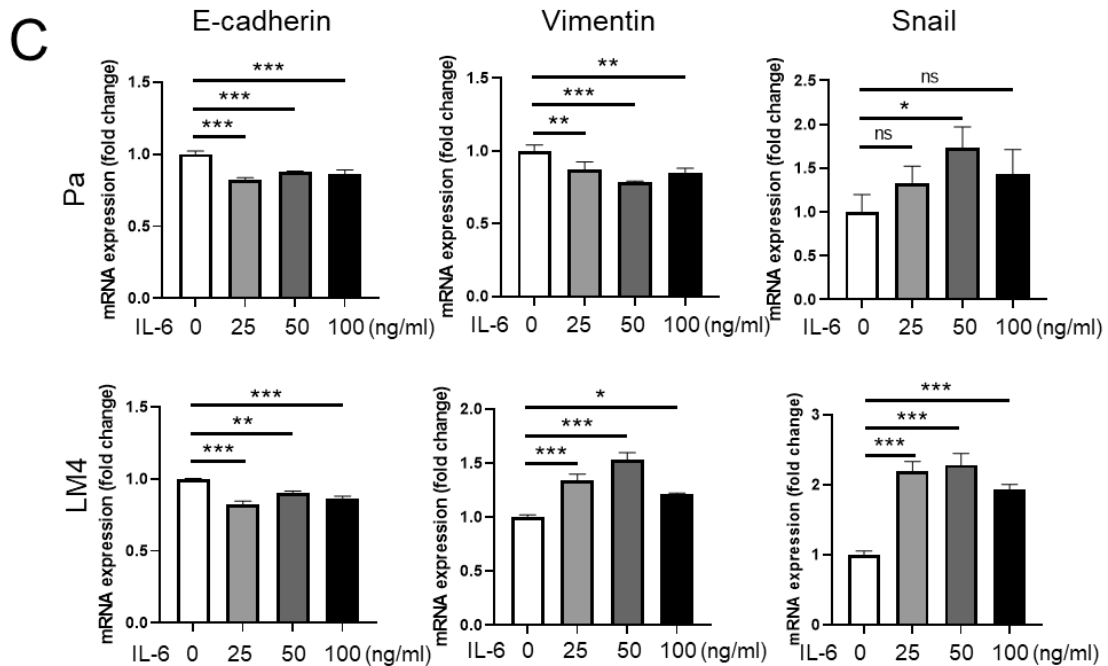


図 6 IL-6 添加による検討

(C) Pa 細胞および LM4 細胞に IL-6 を 0、25、50、100ng/ml の濃度で添加し、24 時間培養した後、RNA を抽出し、RT-qPCR 法で EMT 関連マーカーの発現変化を比較した。E-cadherin、Vimentin、Snail の mRNA 発現量を示す。Pa 細胞では E-cadherin は発現が低下し、Vimentin は上昇せず、Snail も安定した変化を認めなかった。一方、LM4 細胞では E-cadherin の発現量が低下し、Vimentin、Snail の発現は有意に上昇した。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

A

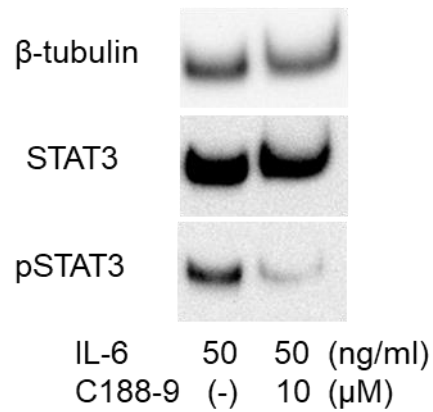


図 7 STAT3 阻害剤 (C188-9) 添加による検討

(A) LM4 細胞へ 50 ng/ml の IL-6 添加と同時に STAT3 の阻害剤 (C188-9、10 μM) を添加し、24 時間培養した後、タンパクを抽出した。Western blot 法で pSTAT3 のタンパク発現を確認した。LM4 細胞は C188-9 添加により pSTAT3 タンパク発現が抑制されており、STAT3 のリン酸化が阻害されていることを確認した。内部コントロールとして抗 β-tubulin 抗体(上)を用いた。

B

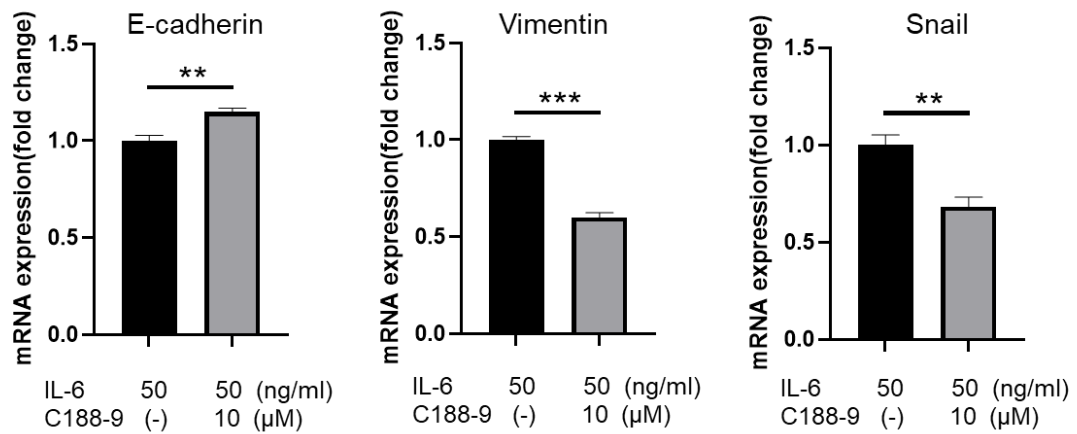


図 7 STAT3 阻害剤 (C188-9) 添加による検討

(B) LM4 細胞へ 50 ng/ml の IL-6 添加と同時に STAT3 の阻害剤 (C188-9、10 μM) を添加し、24 時間培養した後、RNA を抽出、EMT 関連マーカーの遺伝子発現を RT-qPCR 法にて比較した。C188-9 添加により LM4 細胞で E-cadherin の発現上昇、Vimentin および Snail の発現低下を認めた。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。**P<0.01、***P<0.001。

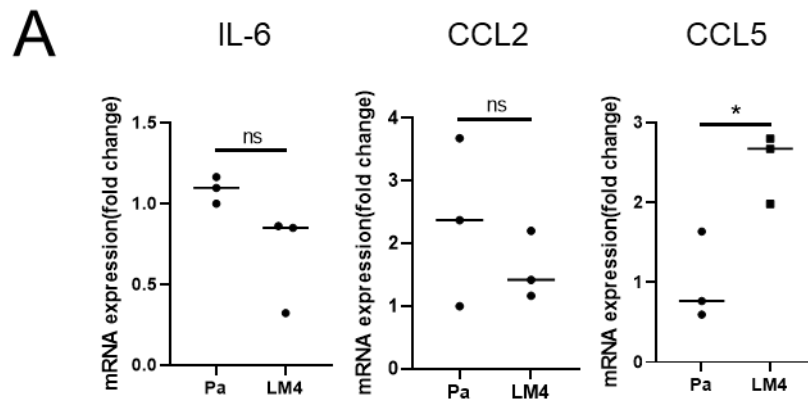


図 8 炎症性サイトカインの発現の検討

(A) Pa 腫瘍ならびに LM4 腫瘍組織から抽出した RNA を用いて、各腫瘍内での mRNA の発現量を RT-qPCR 法で比較した。mRNA の発現量を示す。CCL5 は Pa 腫瘍と比較し、LM4 腫瘍で有意に発現上昇していた。CCL2、IL-6 の発現に有意差は認めなかった。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、Pa 腫瘍群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。 **P<0.01、 ***P<0.001。

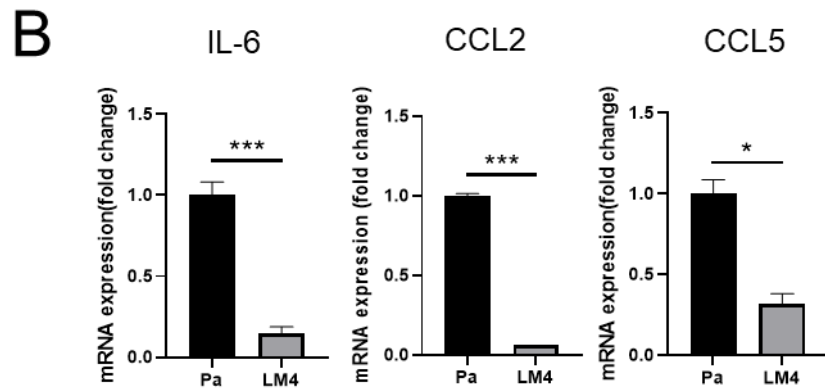


図 8 炎症性サイトカインの発現の検討

(B) IL-6、CCL2、CCL5 について、培養 Pa 細胞および培養 LM4 細胞での mRNA 発現を RT-qPCR 法で比較した。IL-6、CCL2、CCL5 は Pa 細胞と比較して、LM4 細胞でその発現が低下していた。各遺伝子発現量は Gapdh の発現量で補正し、コントロール群の発現量の倍数で示した。値は平均値および標準偏差を示す。n=3。*P<0.05、***P<0.0011。

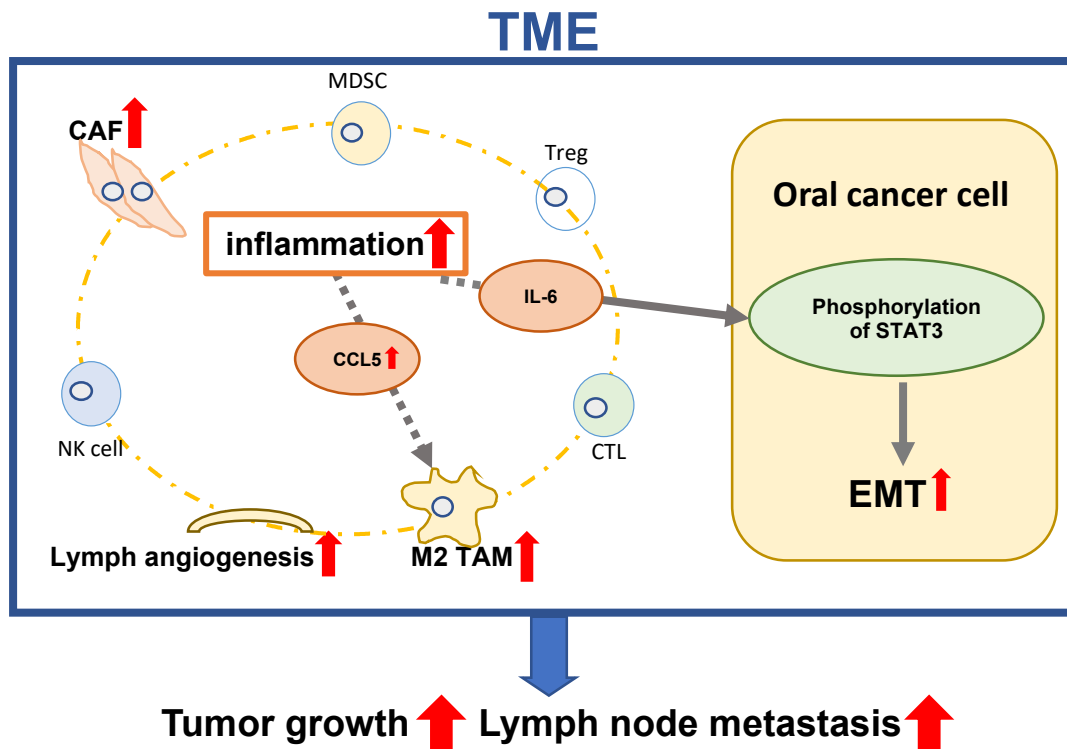


図 9 TME と口腔癌細胞の相互作用を示す概念図

TME は腫瘍細胞と様々な非腫瘍細胞により構成されている。本研究において同種同所移植モデルマウスを用いて樹立したリンパ節高転移株である LM4 細胞は TME に存在する IL-6 により容易に STAT3 のリン酸化を認め、EMT が亢進した。さらに、LM4 腫瘍は M2-TAM や CAF、リンパ管の発現が亢進し、炎症性サイトカインである M2-TAM 誘導との関連が知られている CCL5 の発現上昇も認めた。

