



Title	口腔扁平上皮癌における腫瘍血管マーカーCXCR7の発現と臨床病理学的因子との比較解析
Author(s)	柳谷, 美沙; Yanagiya, Misa
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12608号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12608
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66153
Type	doctoral thesis
File Information	Misa_Yanagiya.pdf



博士論文

口腔扁平上皮癌における腫瘍血管マーカーCXCR7の発現と
臨床病理学的因子との比較解析

平成29年3月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

柳谷美沙

口腔扁平上皮癌における腫瘍血管マーカーCXCR7の発現と
臨床病理学的因子との比較解析

柳谷 美沙^{1, 2)}

1) 北海道大学遺伝子病制御研究所 フロンティア研究ユニット 血管生物学
研究室

2) 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 口腔診断内科学教室

連絡先

樋田 京子

北海道大学遺伝子病制御研究所 フロンティア研究ユニット 血管生物学研究
室

E-mail: khida@igm.hokudai.ac.jp

〒060-0815 札幌市北区北 15 条西 7 丁目

電話)011-706-4315

著者連絡先

E-mail: miya1031@den.hokudai.ac.jp

略題： 口腔癌血管内皮細胞における CXCR7

本文原稿枚数 : 31 枚

表枚数 : 1 枚

図枚数 : 5 枚

写真枚数 : 0 枚

必要別刷数 : 50 部

抄録

われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞には正常血管内皮細胞と比較して発現の高い分子が複数あることを報告してきた。その1つである C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) は腎癌など幾つかの癌の腫瘍血管において発現している。しかし口腔扁平上皮癌の血管内皮細胞における CXCR7 の発現については未だ不明である。本研究では口腔癌の CXCR7 発現を解析し、治療方針の決定に有用なバイオマーカーとして CXCR7 の有用性を探ることとした。1996年から2008年の間に北海道大学病院にて切除された口腔扁平上皮癌の組織検体のうち、HE染色、CD34免疫染色による解析が可能な59例を用いた。ランダムに選択した10視野から hot spot (CD34陽性血管が特に多い領域) を5視野選択し、連続切片で CXCR7 抗体による免疫染色を行い、CXCR7陽性血管の割合を算出して評価した。腫瘍血管における CXCR7 発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。さらに、CXCR7陽性血管の割合の中央値をもとに CXCR7低発現群・高発現群の2群に分け、CXCR7の発現と予後との関連を解析した。癌部の CXCR7陽性血管の割合は41.9%、非癌部における陽性血管の割合は18.8%で、非癌部に比較し癌部の血管では有意に CXCR7 発現の割合が高かった。また、腫瘍血管における CXCR7 発現は、腫瘍径の大きさ (T分類) および Stage 分類と正の相関が認められた。術後144ヶ月 (12年) の全生存率は、CXCR7低

発現群で 95%，CXCR7 高発現群で 73%であり，また無病生存率は，CXCR7 低発現群では 70%，CXCR7 高発現群では 30%であった．腫瘍血管の CXCR7 発現とこれらの予後には有意な差は認められなかったが，CXCR7 高発現群では再発頻度が高い傾向が示された．腫瘍血管の CXCR7 発現は患者の予後予測マーカーとして応用できる可能性が示唆された．

キーワード：口腔癌，腫瘍血管内皮細胞，CXCR7

緒言

口腔癌は全腫瘍において約1%と比較的低い発生率を示し、その約90%が扁平上皮癌である¹⁾。また5年平均生存率は約55%といわれており、決して予後の不良な癌ではない²⁾。しかし、口腔領域には解剖学的所見から各種の重要な器官が存在するため、根治的切除後の発語や嚥下などの機能的および審美的障害などによる患者のQOL低下をきたすことが多く、口腔癌の発症は患者の人生に大きな影響を及ぼす。したがって、患者にとって最善の治療方針を決定することが重要となり、そのためのバイオマーカーが求められている。口腔癌の予後予測因子に関して様々な検討がおこなわれている。その中でも特に病理組織学的診断は癌の悪性度を判定し、治療の選択や予後の推測に有用な情報をもたらす³⁾。

腫瘍血管新生は癌の進展や転移に重要なファクターであり、口腔癌においても血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor:VEGF) は血管新生を誘導し、癌の進展、転移に重要な役割を果たすことが報告されている⁴⁻⁵⁾。複数の培養口腔癌細胞においてもVEGFの発現が高いことが報告されている⁶⁾。腫瘍血管新生阻害療法は多くの癌の治療に用いられており、血管の内側を構成する血管内皮細胞は血管新生阻害剤の重要な標的である。近年まで血管内皮細胞はこれまで全身の血管で同一の性質をもつと考えられてきたが、われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞を複数の癌から分離・培養し⁷⁾、それらが正

常血管内皮細胞と比較して様々な点で異なることを報告してきた。例えば、腫瘍血管内皮細胞には正常血管内皮細胞よりも発現の高い分子が複数あり⁸⁻¹¹⁾、CXCR7はその1つである¹²⁻¹³⁾。CXCR7は腎癌や大腸癌、悪性黒色腫など様々な腫瘍の血管内皮細胞において発現が亢進し、腫瘍の悪性化に関与している¹³⁾。口腔癌の癌細胞においてもCXCR7が高発現しているという報告があるが¹⁴⁻¹⁵⁾、口腔癌の血管内皮細胞におけるCXCR7の発現については未だ不明である。そこで本研究の目的は、口腔癌腫瘍血管内皮におけるCXCR7の発現を解析し、腫瘍血管のCXCR7発現と臨床病理学的因子との関連を検討し、腫瘍血管におけるCXCR7の口腔癌バイオマーカーとしての有用性を探ることとした。

材料と方法

1. 対象

1996年から2008年に北海道大学病院口腔内科、口腔外科にて外科的切除された口腔扁平上皮癌641例のうち、ホルマリン固定パラフィン包埋標本が入手可能であり初発癌に該当する73例を抽出し、4 μ m厚みの連続薄切切片を作成した。HE染色および血管内皮マーカーCD34の免疫染色を施し、CD34染色の状態が良好な59例とした。

2. 免疫組織学的染色

薄切切片を脱パラフィン，脱水処理後，マイヤーヘマトキシリン溶液（和光純薬工業株式会社，大阪）にて2分染色して水洗し，1% エオシン Y 溶液（和光純薬工業株式会社，大阪）にて10分染色を行った．その後，脱水，透徹を行い封入し，ヘマトキシリン・エオシン染色（HE 染色）を行った．HE 染色の状態が良好な標本を選出し，以後免疫染色に用いた．免疫染色は H-E 染色と同様に連続切片を脱パラフィン，脱水処理後，Tris-EDTA (TE) バッファー中で熱処理抗原賦活化を行い，0.5% H₂O₂ で10分間処理し内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した．リン酸緩衝液（Phosphate-buffered saline:PBS）で洗浄し，5% bovine serum albumins (BSA) 含有 PBS を用いて60分間処理し，非特異的反応の阻止を行った．抗体の濃度を検討後，抗 CD34 抗体（Abcam, Cambridge）は1:500，抗 CXCR7 抗体（R&D Systems, Minneapolis）は1:150に希釈し，4℃で15時間反応させた．その後，HRP 標識抗ウサギ二次抗体を1:100（Dako, 東京），および HRP 標識抗マウス二次抗体を1:100（Dako, 東京）に希釈した後，室温で60分間作用させ，DAB (3, 3 – diaminobenzidine, Dako, 東京) にて発色後，ヘマトキシリンで核染色を行った．水洗後，脱水，透徹を行い封入し，光学顕微鏡にて検鏡した．

3. Hot spot の選択方法および微小血管密度の算出

CD34 染色された組織から、ランダムに 10 視野選択し、CD34 陽性血管が特に多い領域として Hot spot を 5 視野選択した。1 視野あたりの面積は 0.75mm^2 とした。また、Hot spot から癌部の微小血管密度 (Micro Vessel Density: MVD) を算出した。MVD の描出には、画像解析ソフト Image J (U. S. National Institutes of Health, Maryland) を使用し、5 つの視野から CD34 陽性領域のピクセル数を求め、平均値をその個体の癌部における MVD 値として評価した。

4. 腫瘍血管における CXCR7 発現の評価方法

CXCR7 染色を行った連続切片において、Hot spot として選抜された領域に該当する視野の CXCR7 陽性の腫瘍血管の数を計測した。Hot spot における CD34 陽性の全血管数に対して CXCR7 陽性血管の割合を算出し、腫瘍血管の CXCR7 発現割合として評価した。

5. 臨床病理学的因子と腫瘍血管における CXCR7 の発現の割合との関連性

各臨床病理学的因子と腫瘍血管における CXCR7 の発現の割合との関連について統計学的に解析した。また、腫瘍内の全血管における CXCR7 陽性血管の割合の中央値で 59 例を 2 群化した。CXCR7 低発現群を LOW, 高発現群を HIGH

とし、各臨床病理学的因子について割合を比較した。

6. 統計学的解析

統計学的解析には統計ソフトウェアを使用し (Stat Flex v.6 , アーテック, 大阪), 各臨床病理学的因子と腫瘍血管における CXCR7 の発現の割合との関連については Mann Whitney-U 検定および Kruskal-Wallis 検定を用い, 全生存率および無病生存率は Kaplan-Meier 法により評価し, 各群間の有意差を log-rank 検定にて検討した. $P < 0.05$ を有意な差とした.

結果

1. 患者背景と腫瘍血管内皮細胞における CXCR7 発現

解析に用いた 59 例の内訳は初診時の年齢は 30~90 歳で中央値 66 歳, 男性 35 例, 女性 24 例であった. 発生部位別では頬粘膜癌 : 9 例, 舌癌 : 27 例, 歯肉癌 : 17 例, 口底癌 : 5 例, 下顎骨中心性癌 : 1 例であった. 腫瘍の T 分類は T1 : 21 例, T2 : 17 例, T3 : 11 例, T4 : 10 例で, 初診時にリンパ節転移への転移が認められた症例は 6 例で, 遠隔臓器への転移は認められなかった. Stage 別に分類すると Stage I : 21 例, Stage II : 15 例, Stage III : 12 例, Stage IV : 11 例であった. なお, 59 例中 16 例に頸部リンパ節後発転移および頸部再発が認め

られた。また局所再発が認められた症例は 5 例だった。59 症例中の癌部の平均 MVD 値は 1.42~9.15 で中央値が 2.77 だった (表 1)。

これらの症例のパラフィン連続切片を用いて CD34, CXCR7 の免疫染色をおこなった。なお、癌部から離れた部位を非癌部として定義した。59 例全体的に、非癌部では CD34 で染色された血管の一部にしか CXCR7 発現は認められず、殆どの血管が CXCR7 陰性であった。一方、癌部においては多くの血管が CXCR7 に陽性であった。また血管の数についても、CD34 で染色される血管数は非癌部に比べ、癌部の方により多く認められた。

図 1 に代表的な染色像を示す。症例によって、上述の血管の CXCR7 の発現における所見に加え様々な染色像がみられた。例えば、非癌部の口腔粘膜上皮では癌組織同様に CXCR7 染色性を示す標本と、殆ど染まらない標本が認められた。また、異形成を示す上皮および上皮下の結合組織の血管においても少数だが染色性を示すものも認められた。症例 1 (T1N0, 舌癌 Stage I) のように、腫瘍組織全体が抗 CXCR7 により染色された標本が大多数であった (図 1 f) が、なかには癌細胞がほとんど染まらない標本も少数認められた。また、症例 2 (T2N0, 舌癌 Stage II) のように腫瘍組織周囲の炎症性細胞浸潤が強い部位では多数のリンパ球と思われる細胞における CXCR7 染色もみられた (図 1 i)。なお、今回の解析では CXCR7 を発現する血管は、円形状 (症例 3: T3N0, 口底癌 Stage III)

(図 1 q, r) のものや扁平状 (症例 1, 2) (図 1 e,f,k,l) とさまざまな形状を示しており, 血管の大小や形状によっては CXCR7 発現に差は認められなかった.

次に CXCR7 陽性血管の割合を定量評価する目的で選出した各症例の Hot spot において詳細に解析を行った. Hot spot における血管数を癌部と非癌部において比較すると, 癌部では平均 248 個, 非癌部では平均 107.8 個であり, 癌部の方が非癌部に比較して 2 倍の数の血管が認められた (図 2 a) .

次に, 59 例の癌部と非癌部における CXCR7 を発現する腫瘍血管の割合を算出し, 血管における CXCR7 発現頻度を比較した. 癌部において CXCR7 陽性血管の割合は $41.9\% \pm 16.8$, 非癌部における割合は $18.8\% \pm 17.4$ となり, 癌部と非癌部において有意な差が認められた (図 2b) . また, 全 59 例の CXCR7 陽性血管率と人数の内訳をグラフ化した (図 2c) . グラフに示す通り CXCR7 陽性血管率の割合は正規に分布していた.

2. 腫瘍血管における CXCR7 の発現と臨床病理学的因子との関連性

各臨床病理学的因子と腫瘍血管における CXCR7 の発現の割合との関連について解析した. 66 歳以上の患者の CXCR7 陽性血管の割合の平均値は $43.9\% \pm 14.3$, 66 歳以上では $39.8\% \pm 18.4\%$ で年齢と腫瘍血管における CXCR7 発現の間には有意な差はなかった (図 3a, 表 1) . 性別に関しても, 腫瘍血管における CXCR7

陽性率の平均値は男性で $41.4\% \pm 17.6$ ，女性では $42.0\% \pm 15.8$ と有意な差はなかった (図 3b, 表 1) . 癌の部位別における CXCR7 陽性血管の割合については，頬粘膜癌： $42.2\% \pm 24.8$ ，舌癌： $42.2\% \pm 14.6$ ，歯肉癌： $39.2\% \pm 17.5$ ，口底癌： $42.9\% \pm 11.5$ ，下顎骨中心性癌： 57.0% であり，部位との間に有意な差はなかった (図 3c, 表 1) . T 分類別では，T1 ならびに T2 症例における CXCR7 陽性血管の割合については $38.9\% \pm 15.6$ ，T3 ならびに T4 症例については $46.5\% \pm 17.9$ であり，腫瘍の大きさと CXCR7 陽性血管の割合との間には有意な正の相関が認められた (図 3d, 表 1) . 初診時のリンパ節転移の有無との関連に関しては，リンパ節転移が認められなかった 53 例では $41.4\% \pm 17.3$ ，リンパ節転移が認められた 6 例では $43.9\% \pm 11.7$ であり，有意な差は認められなかった (図 3e, 表 1) .

Stage 別の腫瘍血管 CXCR7 発現は，Stage I，Stage II 症例における CXCR7 陽性血管の割合は $38.6\% \pm 15.9$ ，Stage III，Stage IV 症例については $46.3\% \pm 17.3$ であり腫瘍の Stage が高いほど CXCR7 陽性血管の割合が高くなり，有意な差が認められた (図 3f, 表 1) . さらに，頸部リンパ節後発転移および頸部再発の有無と腫瘍血管内皮細胞における CXCR7 発現について分析を行った . 頸部リンパ節後発転移および頸部再発が認められなかった 43 例では $41.2\% \pm 17.7$ ，頸部リンパ節後発転移および頸部再発が認められた 16 例では $42.8\% \pm 14.2$ で，有意差は認められなかった (図 3g, 表 1) . 術後の口腔内局所再発と腫瘍血管 CXCR7

発現については、局所再発が認められなかった 54 例では $40.7\% \pm 16.0$ 、局所再発が認められた 5 例では $51.1\% \pm 23.1$ で、有意差は認められなかった (図 3h, 表 1)。癌部 MVD と腫瘍血管における CXCR7 発現の関連性について解析した。癌部 MVD の中央値 2.77 未満であった 29 例では $41.3\% \pm 18.0$ が CXCR7 陽性血管であり、癌部 MVD が 2.77 以上であった 30 例では 41.9 ± 15.7 で、血管密度と腫瘍血管 CXCR7 発現の間には有意な差は認められなかった (図 3i, 表 1)。

3. 腫瘍血管 CXCR7 の発現と生存率、有病率との関連

CXCR7 低発現群と高発現群間で全生存率、無病生存率を比較した。CXCR7 陽性血管の割合は 0%~89.9%で中央値は 41.97%であり、CXCR7 低発現群は 25 例、高発現群は 24 例であった。Log-rank 検定により、CXCR7 発現の程度と、全生存率 ($P=0.13$) および無病生存率 ($P=0.18$) の間には有意差は認められなかった。全生存率に関し、120 ヶ月 (10 年) の生存率は低発現群で 95%、高発現群で 89%、144 ヶ月 (12 年) の生存率ではそれぞれ 95%、73%であった (図 4)。無病生存率はそれぞれ 120 ヶ月で 70%、59%であったが、144 ヶ月では 70%、30%と CXCR7 高発現群の無病生存率は著しく低下した。132 ヶ月 (11 年) 以上経過後、他病死した症例は 2 例認められたが、口腔癌による原病死症例、さ

らに頸部リンパ節後発転移と局所再発を認めた症例は 2 ヶ月から 108 ヶ月の間に認められた。腫瘍血管内皮において CXCR7 が高発現している症例は再発が多かった (図 5)。

考察

CXCR7 は 7 回膜貫通型 G タンパク共役型のケモカインレセプターの 1 つである。生体において、T 細胞や B 細胞、神経細胞や筋細胞に発現しており、炎症反応や免疫応答での細胞遊走に関与する事が知られている。CXCR7 は C-X-C motif chemokine 11 (CXCL11) , C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) をリガンドとしており、癌細胞における CXCR7 は、癌細胞の遊走を促進し、癌の浸潤や転移に関与することが報告されている¹⁶⁾。これまで癌細胞との関連性については、同じく CXCL12 をリガンドとしてもつ C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) の方がより注目されていたが、近年、CXCR7 は CXCR4 より CXCL12 と高い結合性を示すことが明らかとなり、様々な癌細胞において CXCR7 の発現解析や機能解析が行われている。CXCR7 は肺癌、膵癌、精巣癌、乳癌など様々な癌において発現しており¹⁷⁾、膵臓癌細胞においては Stage が進むにつれて CXCR7 発現が上昇し、さらには CXCR4 と同様に予後とも関連することが報告されている¹⁸⁾。乳癌細胞においても CXCR4 と CXCR7 は癌の転移

と予後に関与する事が報告されている¹⁹⁻²⁰⁾。CXCR7を過剰発現させた精巣癌マウスモデルでは、血管新生が亢進する事が報告されている²¹⁾。口腔扁平上皮癌においても、CXCR7の発現が高いこと¹⁴⁾、さらにCXCL12を高発現させると、CXCR7の発現が上昇し、口腔扁平上皮癌細胞の増殖能および遊走能が亢進することが報告されている¹⁵⁾。このように他の癌同様、CXCR7は口腔扁平上皮癌においてもその増殖、浸潤に影響を及ぼす因子と考えられる。

腫瘍細胞の生存および増殖には血管新生が不可欠である²²⁾。血管新生が起こるには、血管内皮細胞の遊走と新しい血管を形成するための血管内皮細胞の増殖が必要となる²³⁾。

CXCR7の発現は癌細胞だけではなく、腫瘍血管においても報告がある²⁴⁻²⁶⁾。腫瘍血管におけるCXCR7の発現は乳頭状腺癌、肝細胞癌、神経膠腫において報告されている²⁷⁻²⁸⁾。われわれは腫瘍血管内皮細胞の特異性についてこれまで発表してきた。たとえば腫瘍血管内皮細胞では染色体異常(核型異常)がみられること⁷⁾、トランスポーターが高く発現しており薬剤抵抗性が向上していること²⁹⁾、幹細胞マーカーの発現が高く、骨分化能があること³⁰⁾、腫瘍血管内皮細胞は特異的遺伝子(腫瘍血管内皮細胞マーカー)を多数発現していること³¹⁾など正常血管内皮細胞と比較して様々な相違点がある。さらにわれわれは特異的遺伝子の1つであるCXCR7が腎癌、大腸癌、悪性黒色腫の腫瘍血管内皮細胞

において高く発現していることを示した¹²⁻¹³⁾。腫瘍血管内皮細胞における CXCR7 の機能については、CXCR7 は腫瘍血管新生を促進し、CXCR7 を高発現させた HUVEC は腫瘍細胞との接着性が亢進したことが報告されている³²⁾。また、CXCR7 はケモカインレセプターであることから、その機能に関してはリガンドである CXCL12 および CXCL11 との関連性について注目されている。われわれは腫瘍血管内皮細胞が CXCL12 を自己分泌し、CXCR7 を介して高い管腔形成や遊走能を獲得し、血管新生を自ら亢進させていることを報告している¹³⁾。さらに免疫組織学的な解析により、ヒトやマウスの肝細胞癌組織および腫瘍血管において CXCR7 と CXCL11 の発現亢進が認められ、CXCL11/CXCR7 シグナル経路が肝細胞癌進展に関与していることが示されている³³⁾。また、CXCR7 は炎症性サイトカインのレセプターであることから、炎症と癌化との関連における CXCR7 の役割についての報告もある。CXCR7 を発現している脳毛細血管内皮細胞において CXCR7 発現をノックダウンすると、管腔形成能、遊走能、増殖能、腫瘍細胞の血管内皮細胞への接着能が低下した。また炎症誘発因子である TNF- α により脳血管における CXCR7 発現が亢進したことから、炎症で誘発された血管の CXCR7 が癌の進展に関連する可能性も示唆されている³⁴⁾。CXCR7 は肺癌、乳癌の腫瘍血管に発現しており、血管内皮細胞の炎症性反応としてその遊走を促進し血管新生を介して癌の増殖に寄与している事も示されて

いる²⁵⁾。また興味深いことに、癌微小環境で一般的に観察される酸性環境や低酸素環境に血管内皮細胞を曝露させると、CXCR7 発現が亢進することも報告されている³³⁾。実際、われわれの解析においても炎症性細胞浸潤が多い部位に CXCR7 の強い染色が観察された。以上のこれまでの報告を考慮しても、CXCR7 は血管新生に深く関与していることは確かである。

本研究においては口腔癌における CXCR7 の発現に注目した。CXCR7 は口腔癌の腫瘍細胞には殆ど発現しており、症例の臨床背景による差はみられなかったが、腫瘍血管においては症例により CXCR7 陽性率に差が認められた。さらに、原発腫瘍の大きさ (T 分類) と腫瘍血管における CXCR7 の発現に正の相関があることが示された。これまでのわれわれの研究結果と合わせると、腫瘍血管内皮細胞に発現する CXCR7 は血管新生および癌細胞の遊走を亢進して腫瘍の進展を促進する働きがあると考えられる。さらに血管内皮細胞が自ら発現する CXCR7 が血管新生を亢進させることから、腫瘍の浸潤、転移の起因となり、患者の予後にも影響を及ぼすことが示唆される。実際にヒトの神経膠腫の予後解析にて脳腫瘍血管の CXCR7 が陽性である群は陰性である群よりも予後不良であることが報告されている²⁷⁾。

今回われわれの解析においても、初回手術を受けた口腔癌患者のうち腫瘍血管の CXCR7 の発現が高い症例は術後 120 ヶ月 (10 年) までの期間の間に全生存

率、無病生存率が低くなり、リンパ節転移を含む再発がより多くみられる傾向が示された。144 か月（12 年）以降の全生存率および無病生存率の差は、他病死によるものであるが 2 ヶ月から 108 ヶ月（9 年）の間においては、口腔癌による原病死症例、頸部リンパ節転移および局所再発が認められた。この期間内における全生存率および無病生存率の差は、原疾患の再発および転移による影響と考えられる。口腔癌の腫瘍血管内皮細胞において CXCR7 は他の癌と同様に炎症性サイトカインの亢進に伴って発現が亢進し、腫瘍細胞の遊走能を亢進させている可能性が考えられる。なお今回、口腔癌の頸部リンパ節転移に関しては腫瘍血管の CXCR7 発現と相関はみられなかった。リンパ節転移に直接関与するリンパ管新生に関する解析は今回行っておらず、また CXCR7 のリンパ管新生における役割については影響報告がない。

しかし、過去にわれわれは癌細胞から分泌される血管内皮細胞増殖因子 VEGF が血管内皮細胞の CXCR7 発現を亢進させ、血管新生を促進させることを報告している¹³⁾。VEGF は血管新生だけでなくリンパ管新生も誘発する事から、CXCR7 が高発現している微小環境はリンパ管新生も促進される可能性が高い。以上の事から、腫瘍血管内皮細胞の CXCR7 発現はリンパ節転移と相関する可能性は否定できない。今後さらに症例を増やした詳細な検討により明らかになると思われる。

結論

本研究において以下のことを明らかにした。

1. 過去の報告と同様に，口腔癌の癌細胞において CXCR7 は高発現していた。
2. 口腔癌の血管内皮細胞において CXCR7 は高発現していた。
3. 腫瘍血管の CXCR7 発現が高いと全生存率，無病生存率が低くなる傾向が示された。

以上より，口腔癌の腫瘍血管内皮における CXCR7 は腫瘍の進展および予後と関連することが示唆された。本研究の結果から，腫瘍血管の CXCR7 は腫瘍の増大や術後の予後を予測するマーカーとして有用性があり，治療方針の決定に役立つ可能性が示唆された。

参考文献

1. 大橋裕生, 熊谷章子, 星 秀樹, 泉澤 充, 杉山芳樹 : 当科で治療を行った過去 10 年間にわたる口腔領域扁平上皮癌の臨床統計学的検討. 口腔腫瘍 28 : 41-48, 2016.
2. 国立がんセンター がんの統計 ' 15 : 26, 財団法人 がん研究振興財団, 東京, 2015.
3. 川崎五郎, 高野美貴子, 中井雅人, 馬場信行, 山辺 滋, 伊藤道一郎, 空閑祥浩, 水野明夫, 岡邊治男 : 舌扁平上皮癌症例の臨床病理学的検討. 口科誌 46 : 171-176, 1997.
4. Chen, Z., Malhotra, P.S., Thomas, G.R., Ondrey, F.G., Duffey, D.C., Smith, C.W., Enamorado, I., Yeh, N.T., Kroog, G.S., Rudy, S., McCullagh, L., Mousa, S., Quezado, M., Herscher, L.L. & Van Waes, C. : Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. Clin Cancer Res 5 : 1369-1379, 1999.
5. Shemirani, B. & Crowe, D.L. : Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. Oral Oncol 36 : 61-66, 2000.
6. Shinriki, S., Jono, H., Ota, K., Ueda, M., Kudo, M., Ota, T., Oike, Y., Endo, M., Ibusuki, M., Hiraki, A., Nakayama, H., Yoshitake, Y., Shinohara, M. & Ando, Y. :

- Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15 : 5426-5434, 2009.
7. Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C. & Klagsbrun, M. : Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res* 64 : 8249-8255, 2004.
 8. Amin, D.N., Hida, K., Bielenberg, D.R. & Klagsbrun, M. : Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* 66 : 2173-2180, 2006.
 9. Kurosu, T., Ohga, N., Hida, Y., Maishi, N., Akiyama, K., Kakuguchi, W., Kuroshima, T., Kondo, M., Akino, T., Totsuka, Y., Shindoh, M., Higashino, F. & Hida, K. : HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer* 104 : 819-829, 2011.
 10. Muraki, C., Ohga, N., Hida, Y., Nishihara, H., Kato, Y., Tsuchiya, K., Matsuda, K., Totsuka, Y., Shindoh, M. & Hida, K. : Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int J Cancer* 130 : 59-70, 2012..

11. Yamamoto, K., Ohga, N., Hida, Y., Maishi, N., Kawamoto, T., Kitayama, K., Akiyama, K., Osawa, T., Kondoh, M., Matsuda, K., Onodera, Y., Fujie, M., Kaga, K., Hirano, S., Shinohara, N., Shindoh, M. & Hida, K. : Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells. *Br J Cancer* 106 : 1214-1223, 2012.
12. Maishi, N., Ohga, N., Hida, Y., Akiyama, K., Kitayama, K., Osawa, T., Onodera, Y., Shinohara, N., Nonomura, K., Shindoh, M. & Hida, K. : CXCR7: a novel tumor endothelial marker in renal cell carcinoma. *Pathol Int* 62 : 309-317, 2012.
13. Yamada, K., Maishi, N., Akiyama, K., Towfik Alam, M., Ohga, N., Kawamoto, T., Shindoh, M., Takahashi, N., Kamiyama, T., Hida, Y., Taketomi, A. & Hida, K. : CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *Int J Cancer* 137 : 2825-2836, 2015.
14. Xia, J., Wang, J., Chen, N., Dai, Y., Hong, Y., Chen, X. & Cheng, B. : Expressions of CXCR7/ligands may be involved in oral carcinogenesis. *J Mol Histol* 42 : 175-180, 2011.
15. Chen, N., Jiang, X., Wang, J., Wu, T., Cheng, B. & Xia, J. : CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis contributes to cell motilities of oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* : 567-575, 2015.

16. Morimoto, M., Matsuo, Y., Koide, S., Tsuboi, K., Shamoto, T., Sato, T., Saito, K., Takahashi, H. & Takeyama, H. : Enhancement of the CXCL12/CXCR4 axis due to acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic cancer: effect of CXCR4 antagonists. *BMC Cancer* 16 : 305, 2016.
17. Zheng, K., Li, H.Y., Su, X.L., Wang, X.Y., Tian, T., Li, F. & Ren, G.S. : Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 31 : 2010.
18. Guo, J.C., Li, J., Zhou, L., Yang, J.Y., Zhang, Z.G., Liang, Z.Y., Zhou, W.X., You, L., Zhang, T.P. & Zhao, Y.P. : CXCL12-CXCR7 axis contributes to the invasive phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget* : 62006-62018, 2016.
19. Wu, W., Qian, L., Chen, X. & Ding, B. : Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8 : 13217-13224, 2015.
20. Inaguma, S., Riku, M., Ito, H., Tsunoda, T., Ikeda, H. & Kasai, K. : GLI1 orchestrates CXCR4/CXCR7 signaling to enhance migration and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget* 6 : 33648-33657, 2015.
21. Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K.J., Mehra, R., Loberg, R. & Taichman, R.S. : The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor

- for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283 : 4283-4294, 2008.
22. Folkman, J. : Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1 : 27-31, 1995.
 23. Carmeliet, P. & Jain, R.K. : Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473 : 298-307, 2011.
 24. Madden, S.L., Cook, B.P., Nacht, M., Weber, W.D., Callahan, M.R., Jiang, Y., Dufault, M.R., Zhang, X., Zhang, W., Walter-Yohrling, J., Rouleau, C., Akmaev, V.R., Wang, C.J., Cao, X., St Martin, T.B., Roberts, B.L., Teicher, B.A., Klinger, K.W., Stan, R.V., Lucey, B., Carson-Walter, E.B., Lattera, J. & Walter, K.A. : Vascular gene expression in nonneoplastic and malignant brain. *Am J Pathol* 165 : 601-608, 2004.
 25. Miao, Z., Luker, K.E., Summers, B.C., Berahovich, R., Bhojani, M.S., Rehemtulla, A., Kleer, C.G., Essner, J.J., Nasevicius, A., Luker, G.D., Howard, M.C. & Schall, T.J. : CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 15735-15740, 2007.
 26. Totonchy, J.E., Clepper, L., Phillips, K.G., McCarty, O.J.T. & Moses, A.V. : CXCR7 expression disrupts endothelial cell homeostasis and causes ligand-

- dependent invasion. *Cell Adhesion & Migration* 8 : 165-176, 2014.
27. Birner, P., Tchobanov, A., Natchev, S., Tuettenberg, J. & Guentchev, M. : The chemokine receptor CXCR7 influences prognosis in human glioma in an IDH1-dependent manner. *J Clin Pathol* 68 : 830-834, 2015.
 28. Zhang, H., Yang, L., Teng, X., Liu, Z., Liu, C., Zhang, L. & Liu, Z. : The chemokine receptor CXCR7 is a critical regulator for the tumorigenesis and development of papillary thyroid carcinoma by inducing angiogenesis in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 37 : 2415-2423, 2016.
 29. Akiyama, K., Ohga, N., Hida, Y., Kawamoto, T., Sadamoto, Y., Ishikawa, S., Maishi, N., Akino, T., Kondoh, M., Matsuda, A., Inoue, N., Shindoh, M. & Hida, K. : Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol* 180 : 1283-1293, 2012.
 30. Ohga, N., Ishikawa, S., Maishi, N., Akiyama, K., Hida, Y., Kawamoto, T., Sadamoto, Y., Osawa, T., Yamamoto, K., Kondoh, M., Ohmura, H., Shinohara, N., Nonomura, K., Shindoh, M. & Hida, K. : Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol* 180 : 1294-1307, 2012.
 31. Otsubo, T., Hida, Y., Ohga, N., Sato, H., Kai, T., Matsuki, Y., Takasu, H., Akiyama,

- K., Maishi, N., Kawamoto, T., Shinohara, N., Nonomura, K. & Hida, K. :
Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene
expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci* 105 : 560-567, 2014.
32. Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z.,
Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., Wei, K., McMaster, B.E.,
Wright, K., Howard, M.C. & Schall, T.J. : A novel chemokine receptor for SDF-
1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J
Exp Med* 203 : 2201-2213, 2006.
33. Monnier, J., Boissan, M., L'Helgoualc'h, A., Lacombe, M.L., Turlin, B., Zucman-
Rossi, J., Theret, N., Piquet-Pellorce, C. & Samson, M. : CXCR7 is up-regulated
in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by
endothelial cells. *Eur J Cancer* 48 : 138-148, 2012.
34. Liu, Y., Carson-Walter, E. & Walter, K.A. : Chemokine receptor CXCR7 is a
functional receptor for CXCL12 in brain endothelial cells. *PLoS One* 9 : e103938,
2014.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究に多大なるご支援とご協力を頂きました本学遺伝

子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室の皆様，本学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室，口腔顎顔面外科学教室，口腔病理病態学教室の諸先生方に厚く御礼を申し上げます。

表

表 1 CXCR7 陽性腫瘍血管と臨床病理学的因子との関連

各臨床病理学的因子と Mann Whitney U 検定および Kruskal-Wallis 検定にて解析した。

図とその説明

図 1 口腔癌の HE, CD34 および CXCR7 染色像

a)~f) 症例 1 T1N0, Stage I の舌癌. g) ~l) 症例 2 T2N0, Stage II の舌癌.
m) ~r) 症例 3 T3N0, Stage III の口底癌の染色像. それぞれ, a, d, g, j, m, p は HE 染色像を, b, e, h, k, n, q は CD34 染色像を, c, f, i, l, o, r は CXCR7 染色像を示す. また各症例の上段に非癌部, 下段に癌部の染色像を示す. 各染色像の代表的な血管の拡大図を黒囲みで示した. スケールバー : 250 μ m.

図 2 癌部および非癌部の平均血管数, CXCR7 陽性血管率

a) 全 59 例における癌部と非癌部の Hot spot の平均血管数. 平均値を数値で示した ($p < 0.05$, t 検定). b) 全 59 例における癌部と非癌部の CXCR7 陽性血管の割合. 平均値を数値で示した ($p < 0.05$, t 検定). c) 全 59 例の CXCR7 陽性血管率と人数の内訳. ほぼ正規分布に従っている.

図 3 臨床病理学的因子と腫瘍血管における CXCR7 発現比較

a) 年齢 b) 性別 c) 原発部位別 d) T 分類 e) N 分類 f) Stage 分類 g) 頸部リンパ節後発転移 h) 局所再発 i) 微小血管密度 (MVD) について, CXCR7 低発現群および CXCR7 高発現群間で比較した.

図 4 腫瘍血管における CXCR7 発現と全生存率

腫瘍血管における CXCR7 低発現群と高発現群間で全生存率に有意差はない ($P=0.13$).

図 5 腫瘍血管における CXCR7 発現別の無病生存率

腫瘍血管における CXCR7 低発現群と高発現群間に有意差はない ($P=0.18$).

英文抄録

Correlation between CXCR7 expression of blood vessels and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma.

Misa Yanagiya^{1,2}, Nako Maishi¹, Yasuhiro Hida⁴, Chisaho Torii³, Hiroshi Kikuchi¹,
Randa Ibrahim Hassan Dawood¹, Noritaka Ohga², Kanchu Tei³, Tetsuya Kitamura⁵,
Masanobu Shindo⁵, Yoshimasa Kitagawa², Kyoko Hida¹

1. Vascular Biology, Frontier Research Unit, Institute for Genetic Medicine,
Hokkaido University
2. Department of Oral Diagnosis and Medicine, Division of Oral Pathobiological
Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido
University
3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathobiological
Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
4. Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Hokkaido University
5. Department of Oral Pathology and Biology, Division of Oral Pathobiological
Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

Abstract: We have reported that tumor endothelial cells (TECs) differ from normal endothelial cells (NECs) in many aspects, such as gene expression profiles. For example, CXCR7 is reportedly highly expressed in TECs of several tumors, such as renal carcinomas and colon cancers. However the expression of CXCR7 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) has not been reported. Because OSCC impairs the functionality and sensuousness resulting in a dismal quality of life, the effective marker is demanded to determine treatment policy. In this study, we examined the relationship between CXCR7 expression in TECs and clinicopathological factors in OSCCs.

Immunohistochemistry for CXCR7 and CD34 was performed on 59 of OSCC specimens resected between 1996 and 2008 at Hokkaido university hospital. Five fields which most highly vascularized areas (hot spot) were picked up and the expression of CXCR7 in the patient was evaluated by the ratio of CD34/CXCR7 positive vessels. Normal blood vessels were also analyzed in normal tissue apart from tumor in same patients, when it was possible.

CXCR7 expression in blood vessels was 42% and 19% in tumor tissue and in normal tissue, respectively, suggesting that CXCR7 expression is higher in TEC than in

NEC in OSCC. The expression of CXCR7 in TEC were correlated with the T pathological stage (P=0.04) and cancer stage (P=0.03) by Mann whitney U test.

We divided all patients into two groups; high CXCR7 and low CXCR7 group, with the ratio of CXCR7 expression (Median 41.97%) and calculated the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) using the Kaplan-Meier method. OS and DFS were higher in the low CXCR7 expression group than high expression group although there was no statistical significance. These results suggested that CXCR7 expression may be useful as a prognostic marker of OSCCs.

Key words : Oral cancer, tumor endothelial cells, CXCR7