

口腔白板症における腫瘍関連マクロファージの局在と
その分化誘導機構

原口 茂樹

明海大学歯学部
病態診断治療学講座 口腔顎顔面外科学分野

**Localization of Tumor-associated Macrophages in Oral Leukoplakia and
Their Differentiation-inducing Mechanisms**

Shigeki HARAGUCHI

**Division of Oral and Maxillofacial Surgery,
Department of Diagnosis and Therapeutics Sciences,
Meikai University School of Dentistry**

(Mentor: Prof. Jun SHIMADA)

要 旨

腫瘍関連マクロファージ (以下 MΦ と略す) は、種々な固形腫瘍の増殖、浸潤、転移に関与していると考えられている。しかし、癌の成立する以前の前癌病変における浸潤 MΦ の性状やその役割については明らかにはされていない。本研究は、口腔前癌病変である白板症における腫瘍関連 MΦ のサブセットを同定し、その分化誘導に関わる関連因子を含め浸潤 T 細胞の関与について免疫組織学的に検討した。

対象は、白板症 30 例および正常粘膜 10 例として、CD68 (全 MΦ)、CD80 (M1 MΦ)、CD163 (M2 MΦ)ならびに CD4 (ヘルパー T 細胞: Th), CD8 (細胞傷害性 T 細胞)、Th1 のマーカーである CXC chemokine receptor 3 (CXCR3)、Th2 のマーカーである CC chemokine receptor 4 (CCR4)、そして interferon- γ (IFN γ)誘導性遺伝子産物である signal transducer and activator of transcription (STAT1) に対する抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。CD163⁺MΦ は、正常粘膜では認められなかったが、上皮性異形成の mild から moderate において増加が認められた。また CD163⁺MΦ の割合と上皮内浸潤 CD4⁺Th 細胞の割合に正の相関関係が認められた。上皮性異形成において CCR4⁺Th2 はほとんど認められなかったが、CXCR3⁺Th1 の浸潤が認められた。Th1 からは IFN γ が産生されることから、IFN γ 誘導性遺伝子産物である STAT1 の発現について検討したところ、上皮下および上皮内に陽性所見が認められた。さらに、蛍光二重染色により STAT1 と CD163⁺MΦ とが共局在しており、STAT1 陽性細胞率と CD163 陽性細胞率との間に正の相関関係が認められた。

これらの結果から、白板症部のMΦは、CD163⁺ MΦであるが、M1 MΦの表現型を示す新たなMΦサブセットである可能性が示唆された。このCD163⁺ MΦの誘導には、白板症部に浸潤しているCD4⁺ Th1から産生されるIFN γ が関与している可能性が示唆された。

索引用語：前癌病変、白板症、口腔扁平上皮癌、CD163, 腫瘍関連性マクロファージ (tumor-associated macrophages: TAMs)、M1 マクロファージ、M2 マクロファージ、CXCR3、Th1、STAT1

Abstract

Tumor-associated macrophages (M Φ) have been implicated in growth, invasion and metastasis of various solid tumors. However, it has not been clarified phenotype and role of the infiltrated M Φ in precancerous lesions. In the present study, the phenotype of the infiltrated M Φ in leukoplakia, an oral precancerous lesion, was determined by immunohistochemical analysis and involvement of infiltrated T cells that participated in induction of phenotype of the M Φ was also investigated.

The subjects included 30 cases of leukoplakia and 10 cases of normal mucosa. Immunohistochemical analysis was carried out using antibodies against CD68 (pan-M Φ), CD80 (M1 M Φ), CD163 (M2 M Φ), CD4 [helper T cells (Th)], CD8 (cytotoxic T cells), CXC chemokine receptor 3 [CXCR3 (Th1)], CC chemokine receptor 4 [CCR4 (Th2)], and signal transducer and activator of transcription (STAT1). An increase in the rate of infiltrating CD163⁺ M Φ was observed in mild and moderate epithelial dysplasia, and a positive correlation was observed with the rate of intraepithelial infiltration of CD4⁺ Th cells. Although infiltrations of CCR4⁺ cells (Th2) were barely observed, CXCR3⁺ cells (Th1) were observed in the lesions. The cells positive for STAT1, which is an interferon- γ inducible product gene, were also observed in the same lesions. Immunofluorescence double staining demonstrated that the cells positive for CD163⁺ M Φ were colocalized with STAT1. Moreover, a positive correlation with rate of infiltrated CD163⁺ M Φ and rate of STAT1 positive cells was observed.

These results suggested that although the M Φ in oral leukoplakia are CD163⁺ M Φ , the

MΦ are a new subset exhibited M1 phenotype. Furthermore, IFN γ produced from CD4⁺ Th1 infiltrating precancerous lesions may be involved in the induction of the CD163⁺ M1 MΦ.

Key words : precancerous lesion, oral leukoplakia, squamous cell carcinoma, CD163, TAMs, M1 macrophag, M2 macrophage, CXCR3, Th1, STAT1

緒 言

前癌病変は、発癌に関係する初期の遺伝子変異が上皮細胞にすでに認められており、悪性腫瘍に転換する可能性を持つ病変である^{1,2)}。口腔前癌病変の代表的なものは白板症であり、その癌化率は1%未満～17.5%との報告があり³⁾、すべての白板症が悪性転換するわけではない。しかし白板症例の中でより高頻度で悪性転換するものもあり、遺伝子変異の質的、量的な違いや環境的な要因も関与していると考えられている³⁾。

口腔前癌病変から扁平上皮癌への癌化過程は、上皮性異形成から癌腫へと進行するいわゆる *dysplasia-carcinoma sequence* の経緯をとり、近年、その病理組織学的変化と遺伝子変化との関連が明らかにされてきている^{4,5)}。口腔粘膜上皮にアルコールやたばこなどの発癌性因子の持続的な侵襲が加わることで、染色体の9pのヘテロ接合性の消失(*loss of heterozygosity: LOH*)により癌抑制遺伝子である *p16^{INK4a}* の欠失が起こり、正常粘膜上皮が上皮過形成を起こす^{6,7)}。次いで染色体 3pや17pの欠失により、癌抑制遺伝子である *p53* が欠失し、また *p53* の遺伝子変異により上皮性異形成が生じる⁸⁾。さらに11q, 13qの欠失や *cyclin D1* 遺伝子の増幅などの遺伝子異常の蓄積により上皮内癌を経て浸潤癌へ移行すると考えられている^{4,5,9)}。

一方、癌の発生、進展には遺伝子変異だけでなく、DNAのメチル化などのエピジェネティック (*epigenetic*) な変化、さらに腫瘍が形成される組織の慢性炎症性反応も密接に関与していることが多くの固形癌の解析から明らかにされてきている¹⁰⁻¹³⁾。特に、腫瘍局所の微少環境に存在する炎症性細胞や線維芽細胞など

の間質細胞の役割が注目されている¹⁴⁻¹⁶。多くの癌組織ではマクロファージ(以下MΦと略す)やリンパ球などの炎症性細胞浸潤が多数認められ、癌組織に存在するMΦは特に腫瘍関連MΦ (tumor-associated macrophages: TAMs) といわれている¹⁷⁻¹⁹。腫瘍関連MΦは、血管新生因子、細胞増殖因子、組織破壊酵素、免疫抑制因子などを産生し、腫瘍の増殖、浸潤、転移に関わっていると考えられている^{18,19}。

近年、MΦはその生物学的活性により機能的に異なる2つのサブセットが存在することが明らかにされている²⁰⁻²²。ヘルパー1型T細胞(Th1)由来のinterferon-gamma (IFN γ)により活性化されたMΦは、M1 MΦ (classically activated macrophages) と呼ばれ、抗細菌活性、抗腫瘍活性を示すことが知られている^{21,22}。M1 MΦは一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS)、抗腫瘍性 chemokine CXC ligand 9 (CXCL9)、CXCL10や炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF α)などの遺伝子の発現を増強し、炎症反応の増強や腫瘍細胞に対する細胞傷害性を示すことが明らかにされている²⁰⁻²²。一方、Th2由来の抗炎症性サイトカイン interleukin-4 (IL-4)、IL-13により活性化されたMΦは、M2 MΦ (alternatively activated macrophages) に分類され²³、増殖因子や血管新生因子を発現し、またIL-10やtransforming growth factor- β (TGF- β)などのサイトカインを産生することにより炎症反応、免疫応答を抑制し、創傷治癒に関与していると考えられている²⁰⁻²²。これらのMΦの細胞表面の細胞分化抗原群 (cluster of differentiation: CD) の解析から、M1 MΦのマーカーとしてCD80, CD86^{20,24}が、またM2 MΦのマーカーとしてCD163, CD204が同定され²⁰、固形腫瘍に浸潤している腫瘍関連MΦの表現型が次第に明らかにされてきている。CD163は、神経膠腫

25)、卵巣癌²⁶⁾、消化管間質腫瘍²⁷⁾、メラノーマ²⁸⁾、腎癌²⁹⁾、乳癌³⁰⁾、肺癌³¹⁾などの固形腫瘍における腫瘍関連MΦに発現している。これらの臨床症例におけるCD163⁺ MΦの浸潤が多い症例では、腫瘍の組織学的悪性度が高く、予後や抗癌剤に対する治療成績が悪いことが示されており、腫瘍細胞の悪性化にCD163⁺ MΦが関与していることが示唆されている²⁵⁻³¹⁾。

以前、Moriら³²⁾は先行研究において、口腔扁平上皮癌におけるCD163⁺ MΦの局在について検討し、口腔癌の分化度の低下に伴い、CD163⁺ MΦの数が有意に増加し、他の固形癌と同様に癌の発症および進展に何らかの関与がある可能性について報告した。しかし、口腔前癌病変における浸潤MΦの表現型やその役割については、いまだ明らかにはされていない。そこで本研究は、口腔前癌病変である白板症における浸潤MΦのフェノタイプを明らかにし、その分化誘導に関わる関連因子について免疫組織学的に検索し、口腔癌の発症、進展における腫瘍関連MΦの役割について考察した。

材料と方法

1. 検索対象

対象は、2006年～2009年の4年間に明海大学歯学部附属明海大学病院 口腔顎顔面外科学分野にて診療した口腔白板症未治療生検材料と、病理組織学的に正常粘膜と判断された部位を検体とした。正常粘膜は生検病変のうち正常組織と判断された部位10例を用いた(Table 1)。前癌病変は、未治療で初診において病理組織学的に診断する目的で採取した結果、白板症の診断を得た30例とした(Table 2)。切除病変は、パラフィン包埋材料から薄切切片を作成後、hematoxylin-eosin (H-E)染色を施し、組織学的検索を行った。病理組織学的上皮性異形成の程度についてはWHOの診断基準³³⁾に従い、複数の病理医と協議し ①without epithelial dysplasia, ②mild epithelial dysplasia (mild), ③mild-moderate epithelial dysplasia (mild to moderate), ④moderate epithelial dysplasia (moderate), ⑤moderate-severe epithelial dysplasia (moderate to severe), ⑥severe epithelial dysplasia (severe)の6段階に分類した。なお本研究は、明海大学歯学部倫理委員会の承諾を得て実施した(承認番号 A0290号)。

2. 免疫組織化学的検索

ホルマリン固定パラフィン包埋材料より薄切切片を作製し、レモゾール (和光純薬工業、大阪)により脱パラフィン後、エタノールで脱水し、内因性ペルオキシダーゼ阻止のため 0.3% 過酸化水素水加メタノール中にて室温で15分間処理を行った。CD68の抗原性の賦活化については proteinase K (20 µg/ml; Roche

Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて室温で15分間酵素処理を行った。CD68以外の抗原性の賦活化は、10 mMクエン酸緩衝液 (pH 6.0)中でマイクロウェーブにて15分間熱処理を行った。抗原性賦活化後、内因性 avidin/biotinのブロッキングを目的にavidinおよびbiotin (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA)を添加し、各10分間の処理を行った。その後、検体はトリス塩酸緩衝生理食塩水[Tris-HCl buffered saline; TBS (pH7.4)]で洗浄し、非特異的反応を阻止するためにブロッキング溶液 [2% bovine serum albumin (BSA)] を用いて室温で30分間の処理を行った。免疫組織化学的検索に使用した抗体をTable 3に示す。一次抗体はTBSを用いて適切な濃度に希釈し、4°C 湿温箱内にて一晩反応させた。その後、TBSで洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識goat anti-rabbit IgG antibody (200倍希釈 ; Dako EnVision System HRP-Labeled Polymer, Dako, Glostrup, Denmark) を用い、室温で30分間反応させた。TBSにて洗浄後、AEC substrate kit (Dako)を用い発色作用させ、Mayerのhematoxylin溶液 (武藤化学、東京)で核染色を行った。水洗後 Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA)を用いて封入し、光学顕微鏡にて検鏡した。なお、negative controlとして一次抗体の代わりにTBSで希釈した2% BSAを反応させた後、発色させ非特異的な呈色反応がないことを確認した。また、それぞれのpositive controlは、対象となる抗原の存在が既知である組織(扁桃、リンパ節)を用い、同染色方法で陽性であることをあらかじめ確認した。免疫組織学的評価は、200倍光顕下で標本中の染色陽性数をそれぞれ典型的な組織像 3視野について観察し、当該視野の全細胞数に対する陽性細胞率を算定した。

4. 蛍光二重染色法

薄切切片を脱パラフィン後、抗原性の賦活化を目的に、TBS に 3% H₂O₂, 0.5% Triton-X100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を加えた溶液を用いて、室温で 10 分間処理した。その後ブロッキングを目的に 10% non-immune goat serum (Zymed) を添加し、室温で 60 分間処理した。一次抗体は mouse anti-human CD163 monoclonal antibody (Table 3) を 1:100 に希釈し、室温で 60 分間反応させた。TBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (2,000 倍希釈 ; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を添加し、室温で 60 分間反応させた。その後 TBS にて洗浄、ブロッキング後に二重染色のための一次抗体として rabbit anti-human STAT1 polyclonal antibody (Table 3) を 1:500 に希釈し、室温で 60 分間反応させた。TBS で洗浄後、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (2,000 倍希釈 ; Life Technologies) を用い、室温で 60 分間反応させた。抗体反応後、TBS で洗浄し、褪色防止のため ProLong antifade mount kit (Life Technologies)により封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 Exciter, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)にて、励起波長 (excitation) : 488 nm、検出波長 (emission) : 緑色 505-530 nm、赤色 600-680 nm 下で検鏡を行った。

3. 統計学的分析

統計学的解析は、Kruskal–Wallis nonparametric testを用いて行い、post-hoc検定はDunn法にて検定した。また相関関係の検証にはSpearman順位相関係数を用い、いずれも危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

1. 臨床病理学的検索事項 (性別、部位、病理組織学的異形成の程度)

本研究で検討した症例の男女比は、男性20例、女性10例で、平均年齢は、61.0歳であった (Table 2)。発生部位は、歯肉が最も多く43.3% (13例)、次いで頬粘膜 26.7% (8例)、舌 13.3% (4例)、口蓋 10 % (3例)、口唇 6.7% (2例)であった。

病理組織学的に上皮性異形成の程度は、without epithelial dysplasia (以下上皮性異形成なしと略す)、16.7% (5例)、mild 23.3% (7例)、mild to moderate 16.7% (5例)、moderate 16.7% (5例)、moderate to severe 13.3% (4例)、そしてsevere 13.3% (4例)であった。

2. CD68⁺ MΦの浸潤

まず始めに白板症部におけるMΦの浸潤について、全MΦマーカーであるCD68を指標に免疫組織学的に検索を行った (Fig 1A)。正常粘膜上皮においてCD68⁺ MΦは、ほとんど認められなかったが、上皮性異形成なし、および上皮性異形成症例の上皮下組織にその浸潤が認められた。白板症の各組織学的上皮性異形成の程度におけるCD68陽性細胞率について、統計学的有意差はみられなかった (Fig 1B)。

3. CD80⁺ MΦの浸潤

MΦはその表現型の違いによりM1 MΦとM2 MΦに分類され、M1 MΦのマ-

カーとしてCD80が用いられている²⁴⁾。正常粘膜ではCD80⁺ MΦはほとんど認められなかったが、上皮性異形成なし、および各上皮性異形成症例のすべての症例の上皮下に認められた(Fig 2A)。白板症の各組織学的上皮性異形成の程度におけるCD80陽性細胞率について、統計学的有意差はみられなかった(Fig 2B)。

4. CD163⁺ MΦの浸潤

CD163は、多くの固形癌においてM2 MΦのマーカーとして汎用されている²⁵⁻³¹⁾。CD163⁺ MΦは、正常粘膜には認められなかったが、上皮性異形成なし、および各上皮性異形成症例の上皮下にその浸潤が認められた(Fig 3A)。特に上皮性異形成のmoderateで最も多く発現していた。統計解析の結果、CD163⁺ MΦの割合は、上皮性異形成なしと比較した場合、mild to moderateおよびmoderateにおいて有意な増加が認められた(Fig 3B)。

5. MΦの分化誘導に関わる浸潤T細胞の検討

MΦの分化誘導には、T細胞が関与することが知られている³⁴⁾。そこで上皮性異形成におけるMΦの浸潤とT細胞との関連性を調べるためにCD4⁺ ThならびにCD8⁺ 細胞傷害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)の浸潤について検討した。CD4⁺ Thは、上皮下ではすべての症例において認められたが、各組織学的上皮性異形成の程度間で有意差は認められなかった(Fig 4A)。一方、上皮内に浸潤しているCD4⁺ Thの割合は、上皮性異形成なしと比較してmoderateおよびsevereにおいて有意な増加が認められた(p<0.05)。そこでThの浸潤とMΦの浸潤との関連性を検討するために、それぞれの症例におけるCD163⁺ MΦの

割合とCD4⁺Thの割合の相関関係について検討した。その結果、CD163⁺MΦの割合が多い症例では、上皮内CD4⁺Thの割合も多く、両者の間に正の相関関係が認められた(p=0.0009; Fig 4B)。

また白板症の各組織学的上皮性異形成の程度におけるCD8⁺CTLの浸潤は、上皮下ではすべての症例において認められ、上皮内に浸潤しているCD8⁺CTLは、統計学的有意差は認められないものの、mildからmoderateにかけて増加傾向がみられた (Fig 5)。しかしCD163⁺MΦの割合とCD8⁺CTLの割合との間には相関関係は認められなかった (data not shown)。

これらの結果から、上皮性異形成におけるCD163⁺MΦの浸潤とCD4⁺Thの浸潤との関連性が示唆された

6. CD4⁺Thのサブセットの同定

CD4⁺Th はサイトカインの産生能の違いにより、Th1とTh2に分類され、M1 MΦの分化誘導にはCD4⁺Th1がまた、M2 MΦの分化誘導にはCD4⁺Th2がそれぞれ関与することが知られている^{20-22,35)}。そこで、白板症部に浸潤しているThがどのサブセットに属するのか、Th1のマーカであるchemokine受容体 CXC ligand receptor 3 (CXCR3)およびTh2のマーカである CC ligand receptor 4 (CCR4) について免疫組織学的検索を行った³⁶⁾。

CXCR3陽性細胞の染色像は、正常粘膜上皮では認められなかったが (data not shown)、上皮性異形成なし、および上皮性異形成のすべての症例において、上皮下組織ならびに一部の症例では上皮内への浸潤が認められた(Fig 6)。一方、CCR4陽性細胞はすべての症例で認められなかった (data not shown)。これらの

結果から、白板症部に浸潤しているCD4⁺ Th はCXCR3⁺ Th1サブセットであることが明らかとなった。

7. IFN γ 誘導性STAT1の発現

Th1からはM1 M Φ の分化誘導に関わるIFN γ が産生され、IFN γ によって誘導される転写因子STAT1の発現が増強される³⁷⁾。そこで、白板症部においてSTAT1の発現が認められるか、次に検討した(Fig 7A)。

正常粘膜ではSTAT1の陽性所見は認められなかったが (data not shown)、上皮性異形成の上皮下および上皮内にIFN γ 誘導性遺伝子産物であるSTAT1の陽性所見が認められた。各白板症症例におけるSTAT1陽性細胞の割合とTh1 (CXCR3陽性細胞)の割合について検討したところ、正の相関関係が認められた(p=0.0465; Fig 7B)。この結果から、白板症部に浸潤しているTh1が多い症例ではM1 M Φ の分化誘導に関わるIFN γ の産生も多く、IFN γ によって誘導されるSTAT1の発現も増強されていることが示唆された。

8. CD163⁺ M Φ とSTAT1との共局在

白板症部にCXCR3陽性Th1が浸潤していることから、同病変部に浸潤しているCD163⁺ M Φ もIFN γ の影響を受け、M1 M Φ のマーカーの一つであるSTAT1の発現が認められるのか、抗CD163抗体と抗STAT1抗体を用いた蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて検討した (Fig 8A)。その結果、上皮下のCD163⁺ M Φ は、STAT1を共発現していることが明らかとなった。各白板症症例におけるCD163⁺ M Φ の割合とSTAT1陽性細胞の割合について相関関係を検

討したところ、正の相関関係が認められた ($p=0.0034$; Fig 8B)。これらの結果から、白板症部に浸潤しているMΦは、従来のM2 MΦのマーカであるCD163陽性であるが、M1 MΦの表現型を持つ新たなサブセットである可能性が示唆された。

考 察

1. 白板症における浸潤MΦの表現型

多くの固形腫瘍において腫瘍関連MΦの浸潤が多い症例ではその予後が悪いことが報告されており、腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移に腫瘍関連MΦが関与していることが示されている²⁵⁻³¹⁾。しかし、癌病変が成立する以前の癌前病変に浸潤するMΦがどのような性状を持ち、癌の発生にどのような役割を演じているかについては、口腔癌を含めた他の固形癌においても明らかにはされていない。そこで本研究ではまず口腔癌前病変における浸潤MΦの表現型について、CD68、CD80、CD163をマーカーに免疫組織学的に検討した。なお、外傷性刺激により発生したと考えられた白板症の評価は困難であり今回は検討しなかった。

CD68は、単球-MΦ系細胞に発現しており、全MΦ系細胞のマーカーとして広く用いられている³⁸⁾。CD68は、lysosome-associated membrane protein (LAMP)-1 ファミリーに属し、110 kDa の糖タンパク質であり^{39,40)}、scavenger receptor として oxidized low-density lipoproteins の取り込みに関与している⁴¹⁾。本研究において、CD163⁺ MΦは正常上皮にほとんど認められなかったが、上皮性異形成なし、および上皮性異形成症例の粘膜下組織にその浸潤が認められた。白板症の各組織学的上皮性異形成の程度におけるCD68陽性細胞率について統計解析した結果、有意差は認められなかった。しかし粘膜上皮に過角化症が発症した早い段階からCD68⁺ MΦが上皮下組織に浸潤していることが明らかとなった。一般に炎症性病変におけるMΦの浸潤には、CC ligand 2 (CCL2)、CCL3などのchemokineが関与している^{42,43)}。これらのchemokineは口腔粘膜上皮細胞からも産生されること

から⁴⁴⁾、粘膜上皮細胞由来のchemokineが初期のMΦの浸潤に関与している可能性が考えられる。

近年、MΦは機能的に異なるM1 MΦとM2 MΦに大別され、感染症や炎症性病変など様々な疾患の病態形成に関与していることが明らかにされている。M1 MΦは従来、活性化MΦ (classically activated MΦ)として認識されていたMΦであり、IFN γ 、細菌由来リポ多糖によって活性化し、抗細菌活性、抗腫瘍活性を持ち、細胞性免疫において中心的な役割を演じていることが知られている⁴⁵⁾。M1 MΦからは、iNOS、TNF α 、抗腫瘍性chemokine CXCL9, CXCL10が産生され、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞傷害作用を持つことが示されている^{20,45)}。このM1 MΦの機能は、IL-4などの抗炎症性サイトカインによって抑制されるが⁴⁶⁻⁴⁹⁾、IL-4はM1 MΦの遺伝子発現の抑制だけでなく、M1 MΦとは異なる新たな機能発現を誘導することから、IL-4によって活性化したalternatively activated macrophage (M2 MΦ)という新たなサブセットの存在が提唱された²¹⁻²³⁾。このM2 MΦは、アレルギーや寄生虫感染などTh2優位の病態形成に関わっており、血管新生、組織修復にも関与していると考えられている^{21,22)}。さらにM2 MΦは、多くの固形癌組織に浸潤している腫瘍関連MΦと類似した性状を示し、腫瘍の増殖、浸潤、転移に関わっていると考えられている²⁰⁾。

本研究ではM1 MΦのマーカーとしてCD80を、M2 MΦのマーカーとしてCD163を用いた。CD80は、抗原提示細胞に発現する補助刺激分子であり、特にT細胞のCD28と結合することによりT細胞の活性化を誘導する細胞接着分子である⁵⁰⁾。CD80は、Th1由来のIFN γ によってその発現が増強されることから⁵¹⁾ M1 MΦのマーカーとしても用いられている^{20,24,52)}。CD163は、単球-MΦ系細胞に発現してい

る scavenger receptor の一つであり、hemoglobin- haptoglobin 複合体の取り込みに関与している^{53,54})。本研究結果から、CD80⁺ MΦ、CD163⁺ MΦともに上皮性異形成を示すすべての症例の上皮下に認められた。この結果は、口腔前癌病変において、CD80⁺ MΦとCD163⁺ MΦが共存していることを示唆している。CD80⁺ MΦがCD163⁺ MΦも共発現しているかについては、本結果からは判定できないが、各上皮性異形成症例のCD80陽性細胞率とCD163陽性細胞率との間に相関関係が認められなかったことから、それぞれ別の細胞集団である可能性が考えられる。一方、CD163は、上皮性異形成の moderate で最も強く発現していた。統計解析の結果、各組織学的上皮性異形成の程度におけるCD163陽性細胞率は、上皮性異形成なしと比較した場合、mild to moderate および moderate において有意な増加が認められた。この結果は、CD163⁺ MΦが、上皮性異形成の病変形成に何らかの関与をしている可能性が考えられる。腫瘍関連MΦからは組織破壊酵素や遺伝子変異を誘発する活性酸素や一酸化窒素が産生されることから^{19,55})、このようなMΦ由来の組織傷害性因子が上皮性異形成の病変形成に関与している可能性が考えられる。

2. 白板症に浸潤しているT細胞の同定

腫瘍関連MΦの表現型の獲得には、腫瘍が形成される微少環境ならびに腫瘍細胞や浸潤している免疫担当細胞由来の液性因子が関わっている^{18,20,56,57})。特にMΦの分化誘導には、T細胞由来のサイトカインが重要な役割を果たしている³⁴)。そこで前癌病変における浸潤T細胞のサブセットを同定し、腫瘍関連MΦの分化誘導における役割についてさらに検討した。

CD4⁺ Th、CD8⁺ CTLともに上皮下および上皮内に認められたが、特に上皮内に浸潤しているCD4陽性T細胞は、上皮性異形成なしと比較してmoderate および severe dysplasiaにおいて有意な増加が認められた。この上皮内浸潤CD4陽性細胞率とCD163陽性細胞率との相関関係を検討したところ、正の相関関係が認められた (p=0.0009; Fig 4B)。この結果は、CD163⁺ MΦが多い症例では、上皮内浸潤CD4⁺ Thの浸潤も多いことを示しており、両者の間に何らかの関連性が存在することを示している。T細胞の上皮内浸潤には、上皮基底膜の断裂が必要なことから⁵⁸⁾、CD163⁺ MΦから産生されるmatrix metalloproteinase (MMP)などの組織破壊酵素の関与が考えられる。

CD4⁺ Thは、産生するサイトカインの違いによりTh1とTh2に大別され³⁵⁾、それぞれM1 MΦ、M2 MΦの分化誘導に関わっている²⁰⁾。そこで白板症ではどちらのThサブセットが浸潤しているか、Th1のマーカであるchemokine受容体 CXCR3 およびTh2のマーカであるCCR4に対する抗体を用いて、免疫組織化学的に検討した。その結果、上皮性異形成なし、および上皮性異形成のすべての症例でTh1の浸潤が認められ、Th2は認められなかった。従来、M2 MΦの分化誘導には、Th2由来のIL-4、IL-13が関与していることが定説となっているが²⁰⁻²³⁾、白板症ではM1 MΦの分化誘導に関わるTh1が優位の環境になっていることが示された。Th1からはM1 MΦへ分化誘導するIFN γ が産生されることから、IFN γ によって誘導される遺伝子産物であるSTAT1の発現についても検討した。その結果、上皮性異形成の上皮下、上皮内にSTAT1の陽性所見が認められた。さらにCXCR3陽性細胞 (Th1)の割合とSTAT1陽性細胞の割合についての相関関係を調べたところ、正の相関関係が認められた(p=0.00465; Fig 7B)。これらの結果から、白板症ではM1

MΦの分化誘導に関わるTh1が浸潤しており、IFN γ が上皮下、上皮内組織の諸細胞に作用している可能性が示唆された。このことは、白板症の病変部に浸潤しているMΦもIFN γ の影響を受け、M1 MΦへ分化していることが考えられる。そこでCD163⁺ MΦがSTAT1を発現しているか、蛍光二重染色で検討したところ、共局在していることが明らかとなった。また、CD163⁺ MΦが多い症例では、STAT1陽性細胞の割合も多く、正の相関関係が認められた (p=0.0034; Fig 8B)。以上の結果から、白板症部に浸潤しているMΦは、CD163陽性であるが、M1 MΦの表現型を持つ新たなMΦ集団である可能性が示唆された。

3. 白板症、口腔癌における MΦ の機能的役割

従来、M1 MΦ は、抗腫瘍活性を持ち、細胞性免疫において中心的な役割を担っている細胞として認識されてきた^{20,21,45)}。本研究結果から、白板症部に浸潤している MΦ が、M1 MΦ のフェノタイプを持つことは、従来の腫瘍関連 MΦ の役割から考えると一見矛盾した結果に見える。しかし、白板症のすべてが悪性転換するわけではなく、M1 MΦ の浸潤の多い症例ではその抗腫瘍活性により癌化しないという可能性も考えられる。事実、前癌病変より癌化率の低い口腔扁平苔癬の病変部にも CXCR3⁺ Th1 の浸潤が認められており⁵⁹⁾、Th1 優位の環境になっていると考えられる。前癌病変から悪性転換し、癌腫へ移行する過程で局所の微少環境に存在する様々な選択圧により、抗腫瘍活性を持つ性状が次第に失われてゆき、腫瘍の増殖や浸潤を促進させるような性状を獲得してゆくとも考えられる。白板症症例に認められるこのCD163⁺ MΦ が、抗腫瘍的に働いているのか、あるいは腫瘍形成にとって促進的に働いているのかは今後検討すべき重要な課

題である。

口腔扁平上皮癌における腫瘍関連 MΦ について、Mori ら³²⁾は CD163⁺ MΦ の浸潤が認められ、口腔癌の組織学的分化度の低下に伴い、CD163⁺ MΦ の数が有意に増加していることを報告している。最近、Fujii ら⁶⁰⁾は CD163⁺ MΦ と口腔癌の予後との関連性を検討し、CD163⁺ MΦ が多い症例では生存率が低下することを報告している。この CD163⁺ MΦ が本研究で示した CD163⁺ M1 MΦ の表現型を持つかは不明であるが、著者らの予備実験の結果から口腔扁平上皮癌組織にも CXCR3⁺ Th1 の浸潤が見られ、M1 MΦ のマーカーである STAT1 の陽性所見が認められることを免疫組織学的に確認している。これらの結果から、口腔扁平上皮癌病変に浸潤している腫瘍関連 MΦ は、これまでの他の固形癌で報告されている M2 MΦ とは異なる表現型を有し、従来、抗腫瘍性に働いていると考えられていた MΦ が口腔癌においては腫瘍の増殖、浸潤、転移に関わっている可能性を示唆している。今後この仮説を検証するために、白板症、口腔癌症例において CD163⁺ MΦ がどのような性状を示しているのか、他のマーカータンパク質や遺伝子発現パターンを詳細に解析してゆく必要がある。また癌症例においてリンパ節転移例や再発症例と浸潤 MΦ がどのような関連性を有しているのか検討する必要もある。さらに白板症、口腔癌ではなぜ M1 MΦ の分化誘導に関わる CXCR3⁺ Th1 の浸潤が多く認められるのかについても解析する必要がある。

腫瘍関連 MΦ の浸潤、分化誘導に関わる分子機構については、他の固形腫瘍においても未だ十分には解明されていない。その観点から本研究において、口腔前癌病変における MΦ の表現型を同定し、さらに MΦ の分化誘導に密接に関わっている T 細胞の関与について検索を行ったことは、口腔癌の発症、進展機構

におけ **MΦ** の役割を明らかにするだけでなく、他臓器において発生する種々な固形腫瘍における腫瘍関連 **MΦ** の分化誘導機構のさらなる理解に貢献できるものである。今後、本研究で得られた知見を基盤に白板症、口腔癌の予後との関連やその治療効果とのかかわりを検討し臨床的観点から検討を行ってゆく必要がある。

結 論

口腔前癌病変である白板症における浸潤MΦの表現型ならびにMΦの分化に関する浸潤T細胞の性状について免疫組織学的検索を行い、以下の知見が得られた。

1. CD163⁺MΦは、白板症のmild to moderate およびmoderateの上皮性異形成において有意な増加が認められた。
2. 白板症の病変部にCXCR3⁺Th1の浸潤は認められたが、CCR4⁺Th2の浸潤は認められなかった。
3. 白板症の上皮内および上皮下にIFN γ 誘導性遺伝子であるSTAT1の陽性所見が認められた。
4. 白板症部のCD163⁺MΦは、STAT1と共局在していた。

以上の結果から、従来CD163は、抗炎症性M2 MΦのマーカーとして用いられてきたが、口腔前癌病変に浸潤しているMΦはCD163陽性であるが、MΦ M1の表現型を示す新たなMΦサブセットである可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に対し終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました明海大学歯学部 病態診断治療学講座 口腔顎顔面外科学分野 嶋田 淳教授に深甚たる感謝の意を表します。また実験指導、論文作成に終始ご教授、ご校閲を賜りました、口腔生物再生医工学講座 口腔微生物学分野 大森喜弘教授、病態診断治療学講座 口腔病理学分野 草間 薫教授、ならびに病態診断治療学講座 口腔顎顔面外科学分野 坂下英明教授に厚く御礼申し上げます。最後に病態診断治療学講座 口腔顎顔面外科学分野の皆様にも御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Incze J, Vaughan CW, Jr., Lui P, Strong MS, and Kulapaditharom B: Premalignant changes in normal appearing epithelium in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg* **144**, 401-405, 1982
- 2) Galle N, Pilch B, Sidransky D, Westra W, and Califano J: Epithelial precursor lesions. In: *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Barnes L, Eveson J, Reichart P, and Sidransky D Eds, IARC press, Lyon, pp 140-143, 2005
- 3) Reibel J: Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* **14**, 47-62, 2003
- 4) Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, and Sidransky D: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* **56**, 2488-2492, 1996
- 5) Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, and Sidransky D: Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res* **6**, 347-352, 2000
- 6) Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, Hittelman W, and Hong WK: Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med* **2**, 682-685, 1996
- 7) Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, Ro JY, Hittelman WN, Lotan R, Hong WK, and Mao L: Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* **14**, 1799-1803, 1997
- 8) Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, and Sidransky D: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* **53**, 4477-4480, 1993
- 9) Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, and Batsakis JG: PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* **74**, 152-158, 1994
- 10) Jones PA and Laird PW: Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* **21**, 163-167,

- 1999
- 11) Mantovani A, Allavena P, Sica A, and Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444, 2008
 - 12) Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, and Mantovani A: Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-1081, 2009
 - 13) Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, and Flavell RA: Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* **13**, 759-771, 2013
 - 14) DeNardo DG, Johansson M, and Coussens LM: Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 11-18, 2008
 - 15) Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, and Kalluri R: Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* **5**, 1640-1646, 2006
 - 16) Hanahan D and Coussens LM: Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309-322, 2012
 - 17) Mantovani A: Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* **71**, 5-16, 1994
 - 18) Pollard JW: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**, 71-78, 2004
 - 19) Qian BZ and Pollard JW: Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51, 2010
 - 20) Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, and Sica A: Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549-555, 2002
 - 21) Gordon S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35, 2003
 - 22) Martinez FO, Helming L, and Gordon S: Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* **27**, 451-483, 2009
 - 23) Stein M, Keshav S, Harris N, and Gordon S: Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* **176**, 287-292, 1992
 - 24) Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, McCabe GP, and Stewart-Akers AM:

- Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A* **14**, 1835-1842, 2008
- 25) Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, and Takeya M: Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* **216**, 15-24, 2008
 - 26) Kawamura K, Komohara Y, Takaishi K, Katabuchi H, and Takeya M: Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors. *Pathol Int* **59**, 300-305, 2009
 - 27) van Dongen M, Savage ND, Jordanova ES, Briaire-de Bruijn IH, Walburg KV, Ottenhoff TH, Hogendoorn PC, van der Burg SH, Gelderblom H, and van Hall T: Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* **127**, 899-909, 2010
 - 28) Bronkhorst IH, Ly LV, Jordanova ES, Vrolijk J, Versluis M, Luyten GP, and Jager MJ: Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 643-650, 2011
 - 29) Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, and Takeya M: Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* **102**, 1424-1431, 2011
 - 30) Medrek C, Ponten F, Jirstrom K, and Leandersson K: The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 306, 2012
 - 31) Chung FT, Lee KY, Wang CW, Heh CC, Chan YF, Chen HW, Kuo CH, Feng PH, Lin TY, Wang CH, Chou CL, Chen HC, Lin SM, and Kuo HP: Tumor-associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* **131**, E227-235, 2012
 - 32) Mori K, Hiroi M, Shimada J, and Ohmori Y: Infiltration of M2 tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma correlates with tumor malignancy. *Cancers* **3**, 3726-3739, 2011
 - 33) Gale N, Pich B, Sidransky D, Westra W, and Califano J: Epithelial precursor lesions. In: *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Barnes L, Eveson J, Reichart P, and Sidransky D Eds, IARC Press, Lyon, pp 140-143, 2005

- 34) Ohmori Y and Hamilton TA: Regulation of macrophage gene expression by T-cell-derived lymphokines. *Pharmacol Ther* **63**, 235-264, 1994
- 35) Mosmann TR and Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173, 1989
- 36) Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, and Sinigaglia F: Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* **187**, 129-134, 1998
- 37) Darnell JE, Jr., Kerr IM, and Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421, 1994
- 38) Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, and et al.: PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* **142**, 1359-1372, 1993
- 39) Holness CL and Simmons DL: Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* **81**, 1607-1613, 1993
- 40) Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, and Gordon S: Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* **23**, 901-944, 2005
- 41) Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, and Ponnambalam S: Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* **182**, 1-15, 2005
- 42) Balkwill F: Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* **4**, 540-550, 2004
- 43) Kakinuma T and Hwang ST: Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* **79**, 639-651, 2006
- 44) Bickel M, Nothen SM, Freiburghaus K, and Shire D: Chemokine expression in human oral keratinocyte cell lines and keratinized mucosa. *J Dent Res* **75**, 1827-1834, 1996
- 45) Adams DO and Hamilton TA: The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* **2**, 283-318, 1984
- 46) Essner R, Rhoades K, McBride WH, Morton DL, and Economou JS: IL-4 down-

- regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J Immunol* **142**, 3857-3861, 1989
- 47) Abramson SL and Gallin JI: IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J Immunol* **144**, 625-630, 1990
 - 48) Deng W, Ohmori Y, and Hamilton TA: Mechanisms of IL-4-mediated suppression of IP-10 gene expression in murine macrophages. *J Immunol* **153**, 2130-2136, 1994
 - 49) Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, and Nathan C: Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* **55**, 227-233, 1994
 - 50) Carreno BM and Collins M: The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* **20**, 29-53, 2002
 - 51) Freedman AS, Freeman GJ, Rhyndhart K, and Nadler LM: Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol* **137**, 429-437, 1991
 - 52) Joimel U, Gest C, Soria J, Pritchard LL, Alexandre J, Laurent M, Blot E, Cazin L, Vannier JP, Varin R, Li H, and Soria C: Stimulation of angiogenesis resulting from cooperation between macrophages and MDA-MB-231 breast cancer cells: proposed molecular mechanism and effect of tetrathiomolybdate. *BMC Cancer* **10**, 375, 2010
 - 53) Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, and Moestrup SK: Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198-201, 2001
 - 54) Lau SK, Chu PG, and Weiss LM: CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* **122**, 794-801, 2004
 - 55) Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, and Mantovani A: Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349-355, 2008
 - 56) Biswas SK and Mantovani A: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889-896, 2010
 - 57) Ruffell B, Affara NI, and Coussens LM: Differential macrophage programming

- in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* **33**, 119-126, 2012
- 58) Uccini S, Ruco LP, Monardo F, La Parola IL, Cerimele D, and Baroni CD: Molecular mechanisms involved in intraepithelial lymphocyte migration: a comparative study in skin and tonsil. *J Pathol* **169**, 413-419, 1993
- 59) Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O, and Sasano T: Infiltrating CD8⁺ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol* **163**, 261-268, 2003
- 60) Fujii N, Shomori K, Shiomi T, Nakabayashi M, Takeda C, Ryoke K, and Ito H: Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med* **41**, 444-451, 2012

Figure legends

Figure 1: Immunohistochemical staining of oral normal mucosa and leukoplakia with the anti-CD68 antibody.

A: Immunoreactivity against anti-CD68 antibody in normal oral mucosa (a; original magnification: $\times 100$) and various histological grades of leukoplakia (b-e, original magnification: $\times 100$). No CD68⁺ M Φ were observed in normal mucosa (a); CD68⁺ M Φ were distributed in the subepithelial lesion (b-e). Scale bar = 100 μ m.

B: CD68⁺ M Φ (%) in different histological grades of leukoplakia. Data are expressed as box plots indicating the maximum, median, and minimum values.

Figure 2: Immunohistochemical staining of oral normal mucosa and leukoplakia with the anti-CD80 antibody.

A: Immunoreactivity against anti-CD80 antibody in normal oral mucosa (a; original magnification: $\times 100$) and various histological grades of leukoplakia (b-e, original magnification: $\times 100$). No CD80⁺ M Φ were observed in normal mucosa (a); CD80⁺ M Φ were distributed in the subepithelial lesion (b-e). Scale bar = 100 μ m.

B: CD80⁺ M Φ (%) in different histological grades of leukoplakia. Data are expressed as box plots indicating the maximum, median, and minimum values.

Figure 3: Immunohistochemical staining of oral normal mucosa and leukoplakia with the anti-CD163 antibody.

A: Immunoreactivity against anti-CD163 antibody in normal oral mucosa (a; original magnification: $\times 100$) and various histological grades of leukoplakia (b-e, original magnification: $\times 100$). No CD163⁺ M Φ were observed in normal mucosa (a); CD163⁺ M Φ were distributed in the subepithelial lesion, in particular, mild (c) and moderate dysplasia (d). Scale bar = 100 μ m.

B: CD163⁺ M Φ (%) in different histological grades of leukoplakia. Data are expressed as box plots indicating the maximum, median, and minimum values. Statistically significant differences were observed in the mild to moderate and moderate of leukoplakia as compared with without of dysplasia. ($p < 0.05$, Dunn test).

Figure 4: CD4⁺ cells (%) in subepithelial and intraepithelial lesions of different histological grades of oral leukoplakia.

A: Data are expressed as box plots indicating the maximum, median, and minimum values. Statistically significant differences were observed in intraepithelial lesions of the moderate and severe dysplasia as compared to without of dysplasia. ($p < 0.05$, Dunn test).

B: Correlation between infiltrated CD163⁺ and CD4⁺ cells in leukoplakia. Statistically significant difference was determined by Spearman's rank correlation coefficient analysis ($p = 0.0009$).

Figure 5: CD8⁺ cells (%) in subepithelial and intraepithelial lesions of different histological grades of oral leukoplakia.

A: Data are expressed as box plots indicating the maximum, median, and minimum values. No statistically significant differences were observed among different histological grade of leukoplakia.

Figure 6: Immunohistochemical staining of oral leukoplakia with the anti-CXCR3 antibody.

Immunoreactivity against anti-CXCR3 antibody in various histological grades of oral leukoplakia (a-d, original magnification: $\times 100$). CXCR3⁺ Th1 cells were mainly distributed in the subepithelial lesion. Scale bar = 100 μm .

Figure 7: Immunohistochemical staining of oral leukoplakia with the anti-STAT1 antibody.

A: Immunoreactivity against anti-STAT1 antibody in various histological grades of oral leukoplakia (a-d, original magnification: $\times 100$). STAT1 positive cells were distributed in the subepithelial and epithelial lesions. Scale bar = 100 μm .

B: Correlation between infiltrated CXCR3⁺ and STAT1⁺ cells in leukoplakia. Statistically significant difference was determined by Spearman's rank correlation coefficient analysis ($p = 0.0465$).

Figure 8: Colocalization of CD163⁺ M Φ with STAT1 in oral leukoplakia.

A: Double-fluorescent immunostaining for CD163 (a: green) and STAT1 (b: red) in oral leukoplakia with moderate dysplasia. Arrowheads indicate the double-stained by both

anti-CD163 and anti-STAT1 antibodies (c). They were colocalized in subepithelial lesion. (a-c, original magnification: $\times 200$). Scale bar = 50 μm .

B: Correlation between infiltrated STAT1⁺ and CD163⁺ cells in oral leukoplakia. Statistically significant difference was determined by Spearman's rank correlation coefficient analysis ($p=0.0034$).

Table 1. Clinicopathological characteristics of the patients with normal mucosa

Clinical variables	% (n)
Age	
<60	30 (3)
≥ 60	70 (7)
Mean	50.0 years
Gender	
Male	70 (7)
Female	30 (3)
Region	
Tongue	70 (7)
Gingiva	20 (2)
Palate	10 (1)

Table 2. Clinicopathological characteristics of the patients with oral precancerous lesion

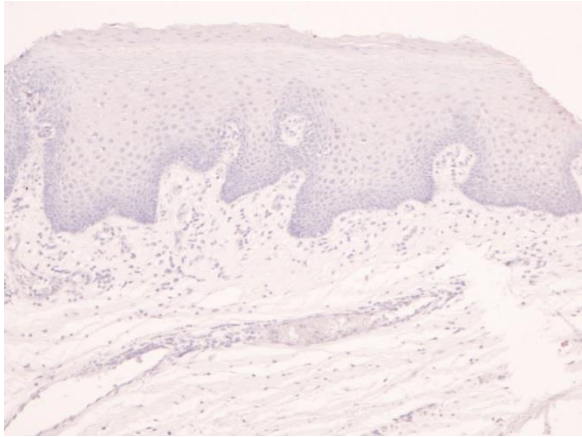
Clinical variables	% (n)
Age	
<60	33.3 (10)
≥60	66.7 (20)
Mean	61.0 years
Gender	
Male	66.7 (20)
Female	33.3 (10)
Region	
Gingiva	43.3 (13)
Buccal mucosa	26.7 (8)
Tongue	13.3 (4)
Palate	10.0 (3)
lip	6.7 (2)
Histological grade	
Without dysplasia	16.7 (5)
Mild	23.3 (7)
Mild to moderate	16.7 (5)
Moderate	16.7 (5)
Moderate to severe	13.3 (4)
Severe	13.3 (4)

Table 3. Primary antibodies used in this study

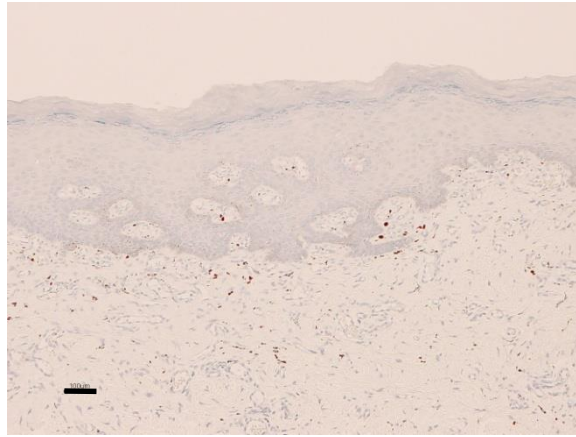
Antigen	Marker	Antibodies	Dilution	Vender
CD68	Pan-M Φ	Mouse anti-hCD68 Mab	1:80	Dako, Glostrup, Denmark
CD80	M1 M Φ	Mouse anti-hCD80 Mab	1:200	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
CD163	M2 M Φ	Mouse anti-hCD163 Mab	1:200	Leica, Wetzlar, Germany
CD4	Th	Mouse anti-hCD4 Mab	1:100	NordiQC organization, Aalborg, Denmark
CD8	CTL	Mouse anti-hCD8 Mab	1:100	Dako Glostrup, Denmark
CXCR3	Th1	Mouse anti-hCXCR3 Mab	1:200	R&D systems, Minneapolis, MN, USA
CCR4	Th2	Mouse anti-hCCR4 Mab	1:100	Novus biological, Littleton, CO, USA
STAT1	IFN γ -inducible gene	Rabbit anti-hSTAT1 Pab	1:200	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

CD: cluster of differentiation, Mab: monoclonal antibody, Pab: polyclonal antibody, Th: helper T lymphocyte, CTL: cytotoxic T lymphocyte, CXCR3: CXC chemokine receptor 3, CCR4: CC chemokine receptor 4, STAT1: signal transducer and activator of transcription, h: human

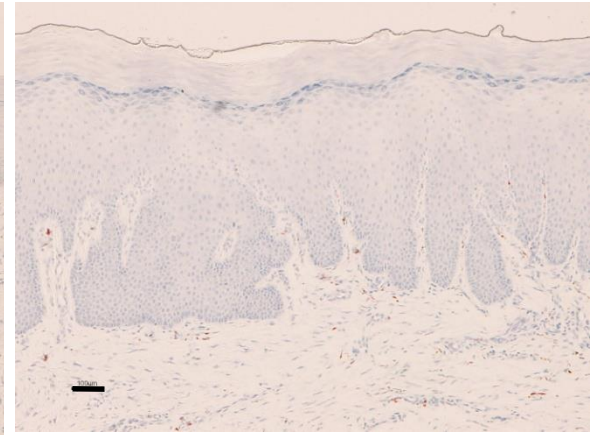
Fig 1A



(a) Normal mucosa

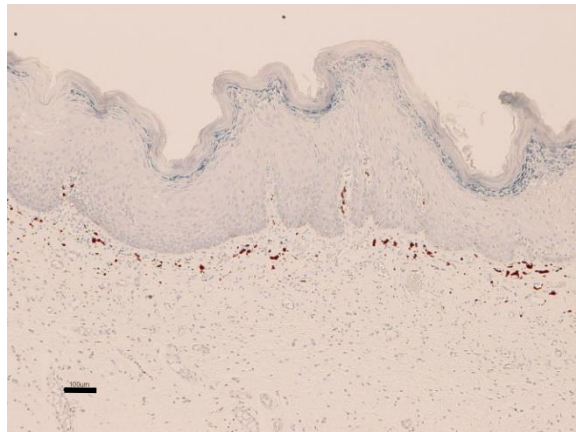


(b) without dysplasia

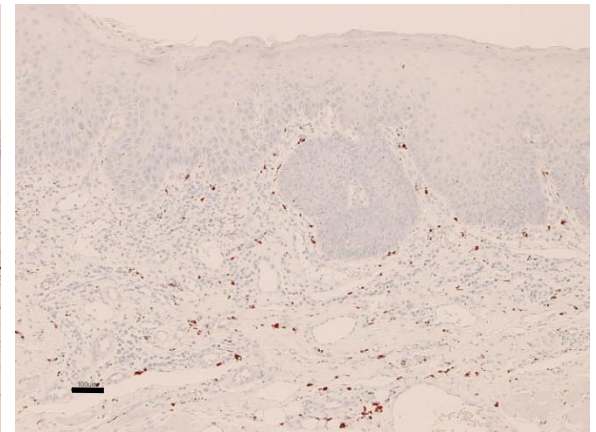


(c) mild dysplasia

CD68



(d) moderate dysplasia



(e) severe dysplasia

Fig 1B

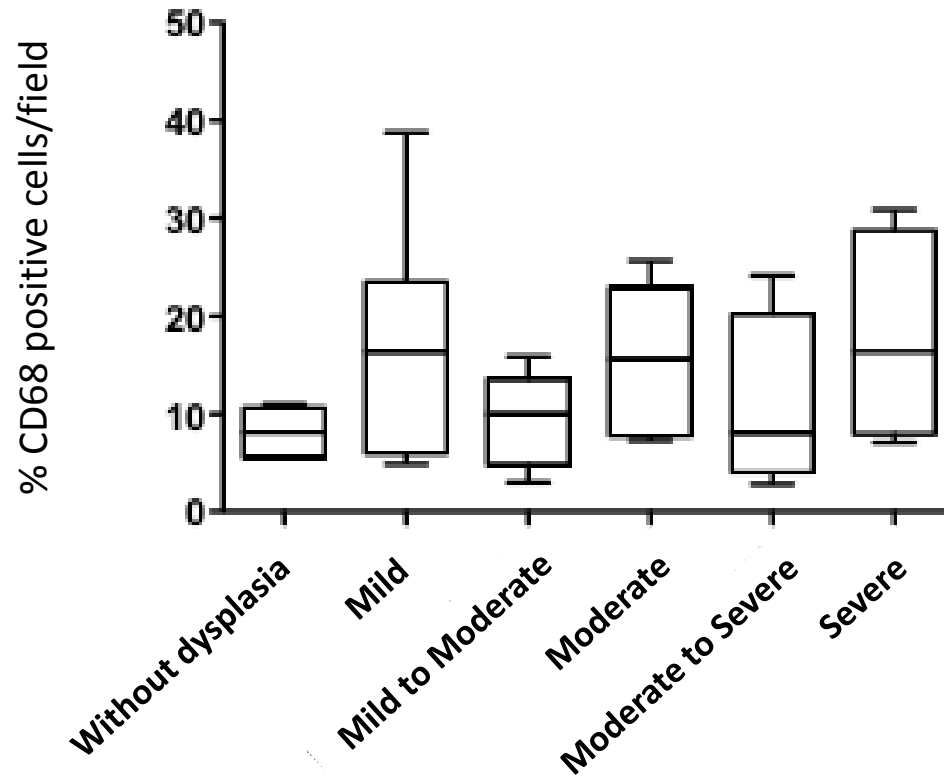
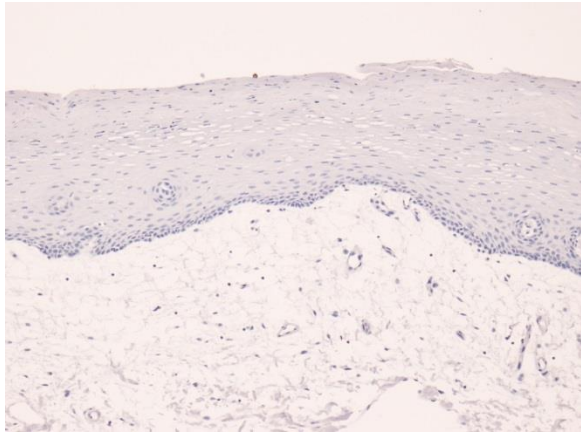
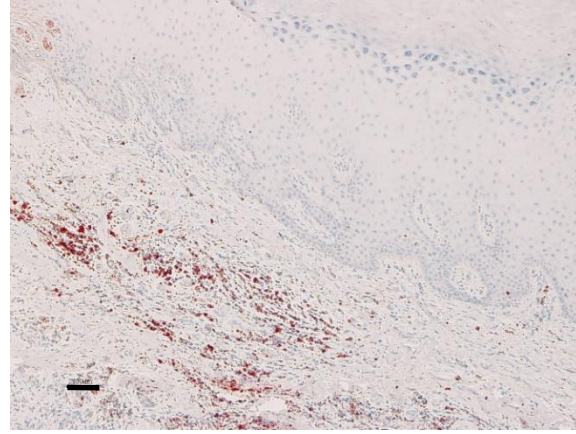


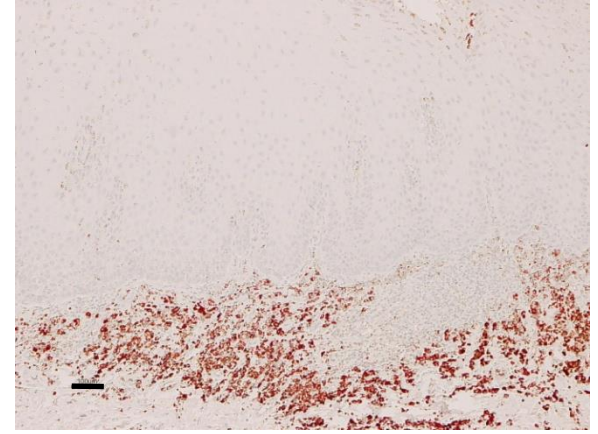
Fig 2A



(a) Normal mucosa

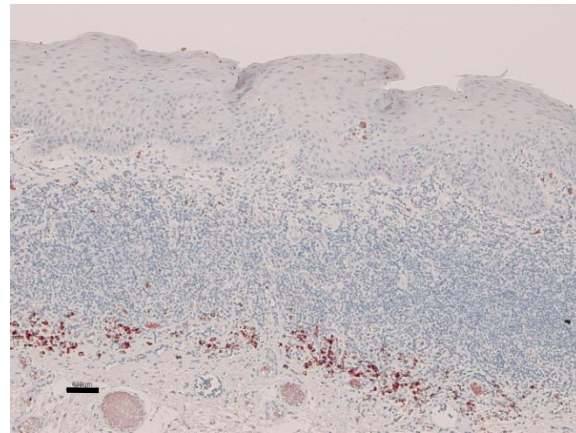


(b) without dysplasia

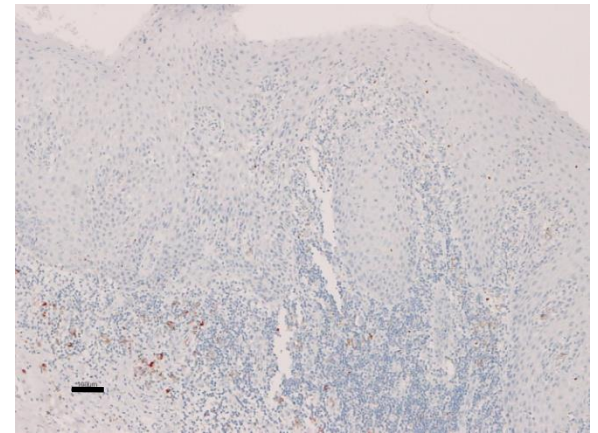


(c) mild dysplasia

CD80



(d) moderate dysplasia



(e) severe dysplasia

Fig 2B

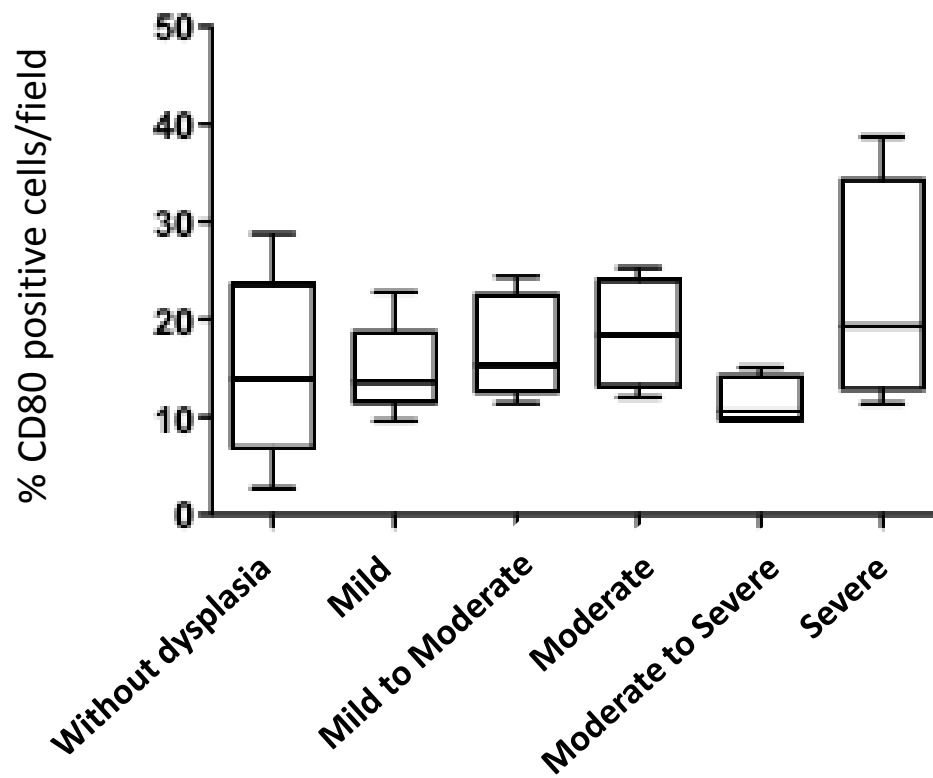
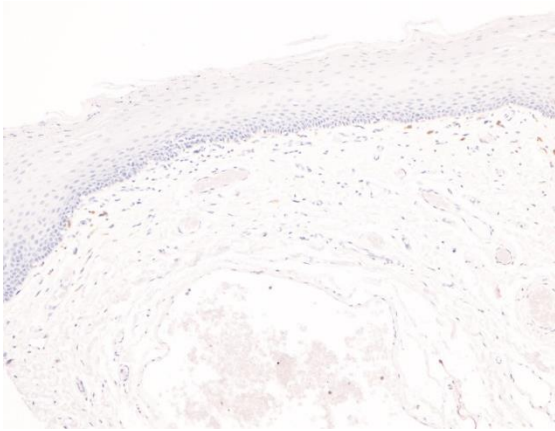
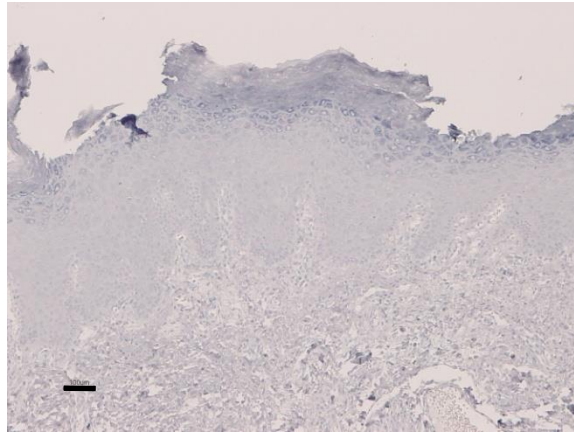


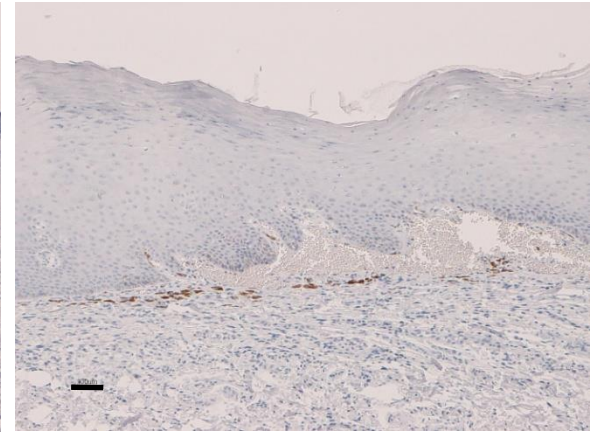
Fig 3A



(a) Normal mucosa

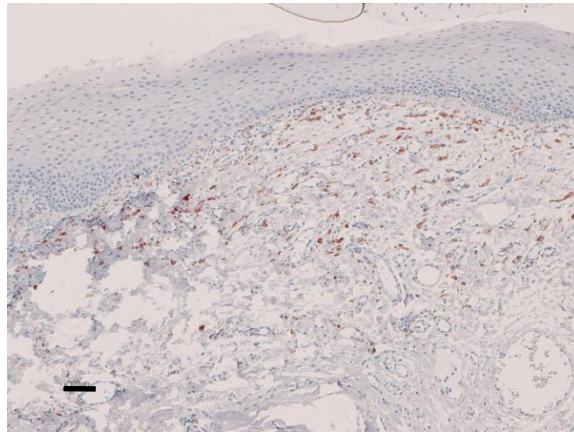


(b) without dysplasia

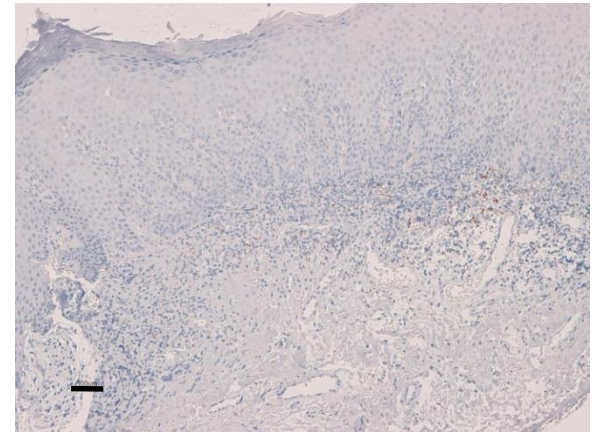


(c) mild dysplasia

CD163



(d) moderate dysplasia



(e) severe dysplasia

Fig 3B

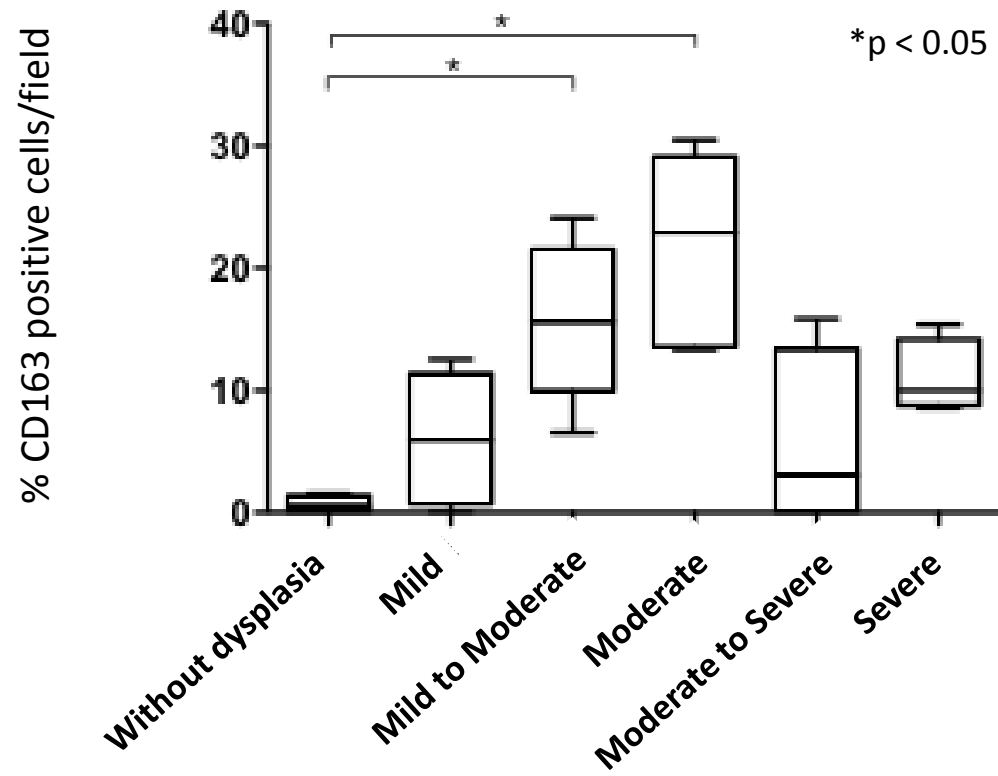
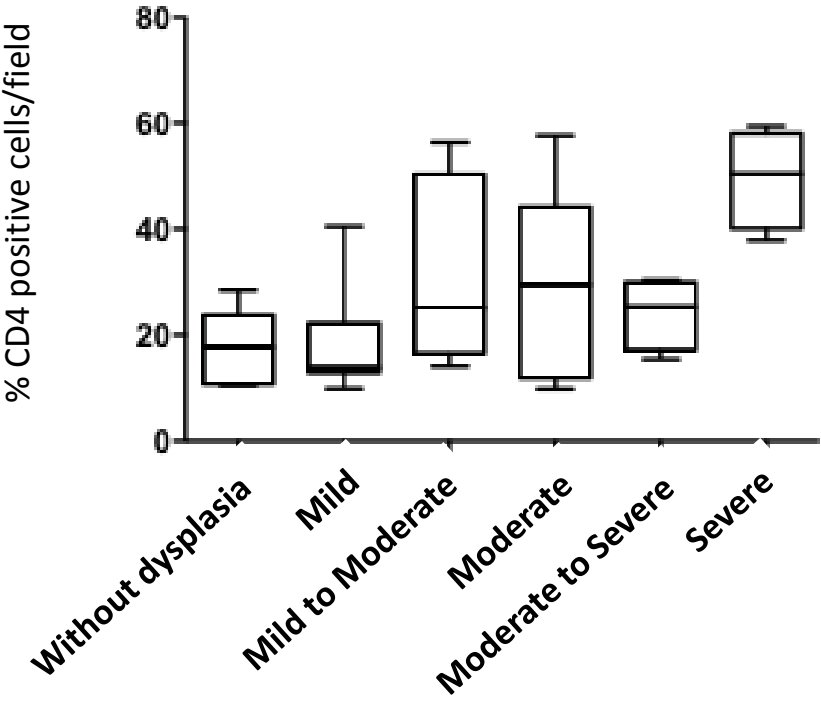


Fig 4A

CD4⁺ cells in subepithelial lesion



CD4⁺ cells in intraepithelial lesion

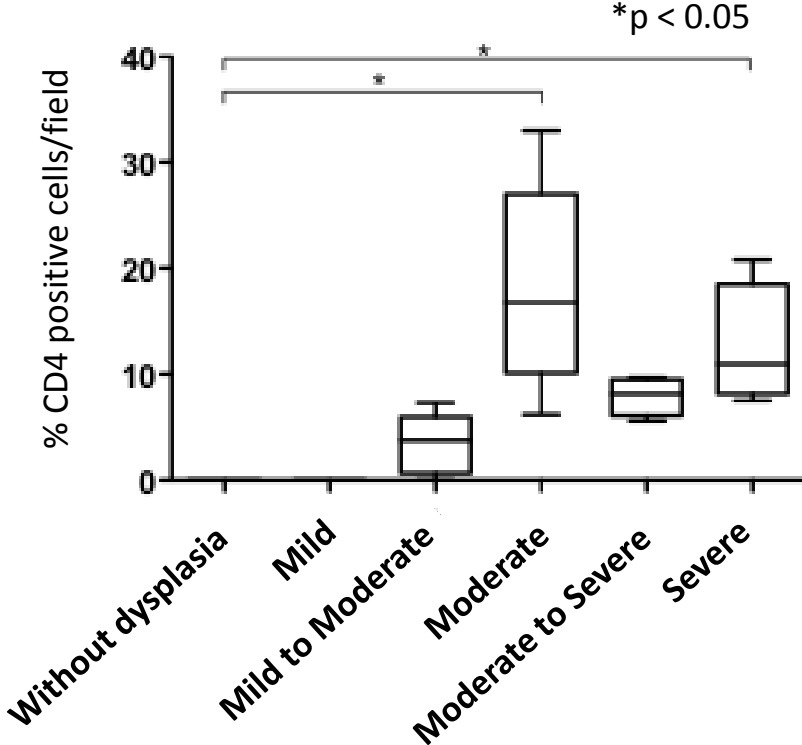
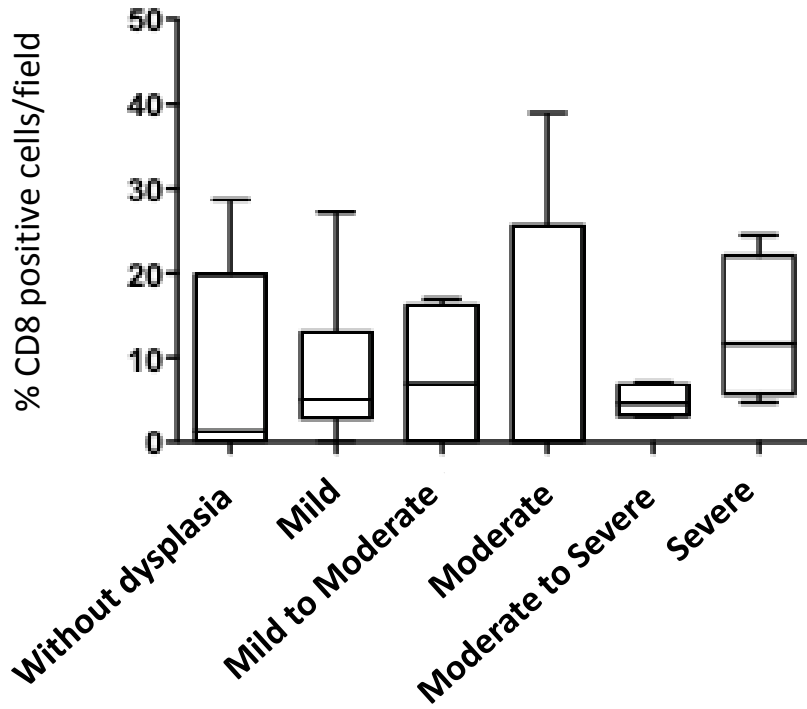


Fig 5

CD8⁺ cells in subepithelial lesion



CD8⁺ cells in intraepithelial lesion

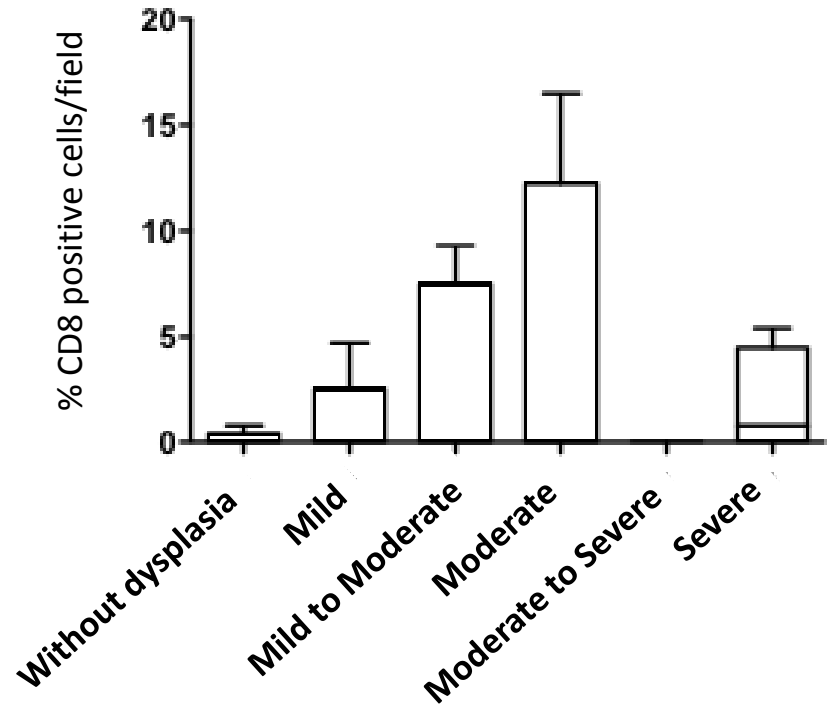
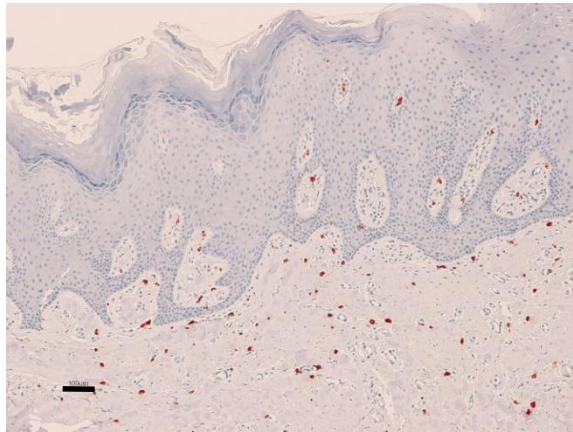
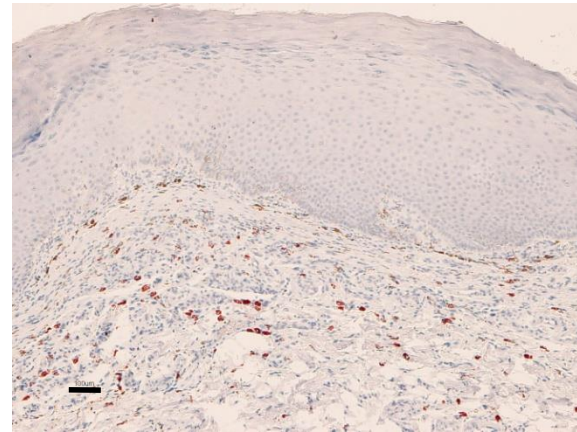


Fig 6

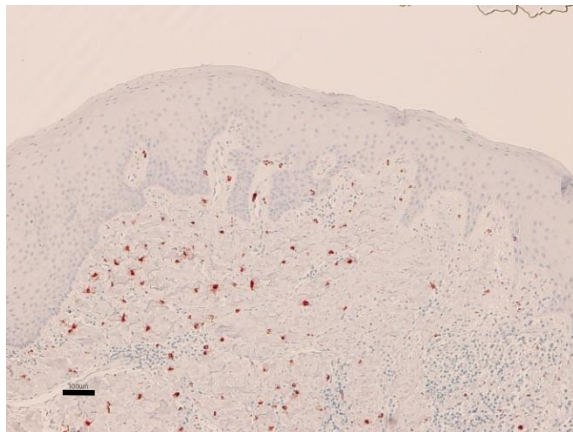
CXCR3



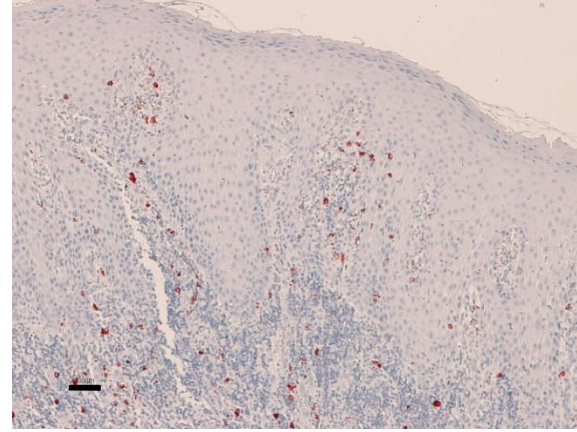
(a) without dysplasia



(b) mild dysplasia



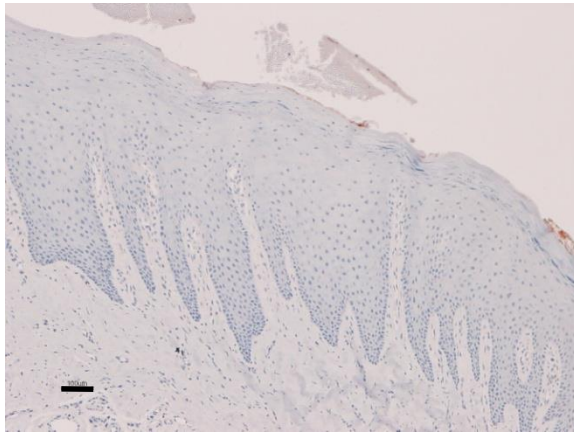
(c) moderate dysplasia



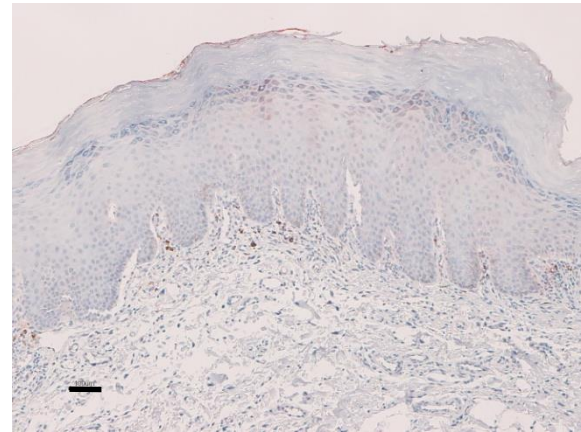
(d) severe dysplasia

Fig 7A

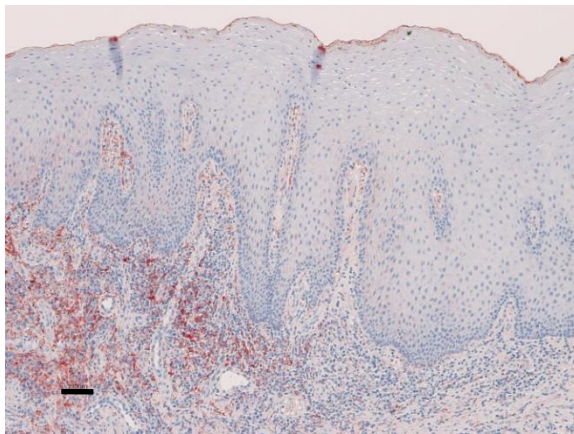
STAT1



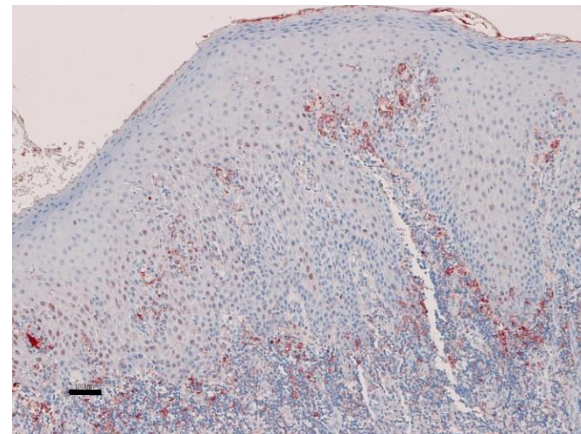
(a) without dysplasia



(b) mild dysplasia



(c) moderate dysplasia



(d) severe dysplasia

Fig 7B

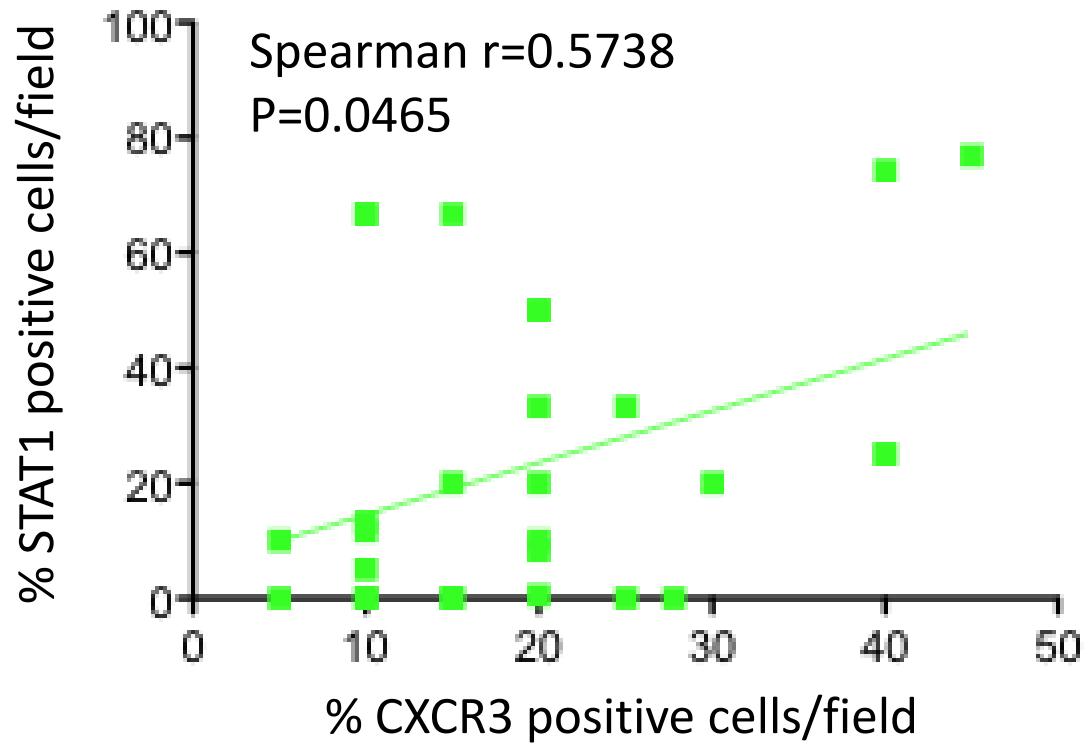


Fig 8A

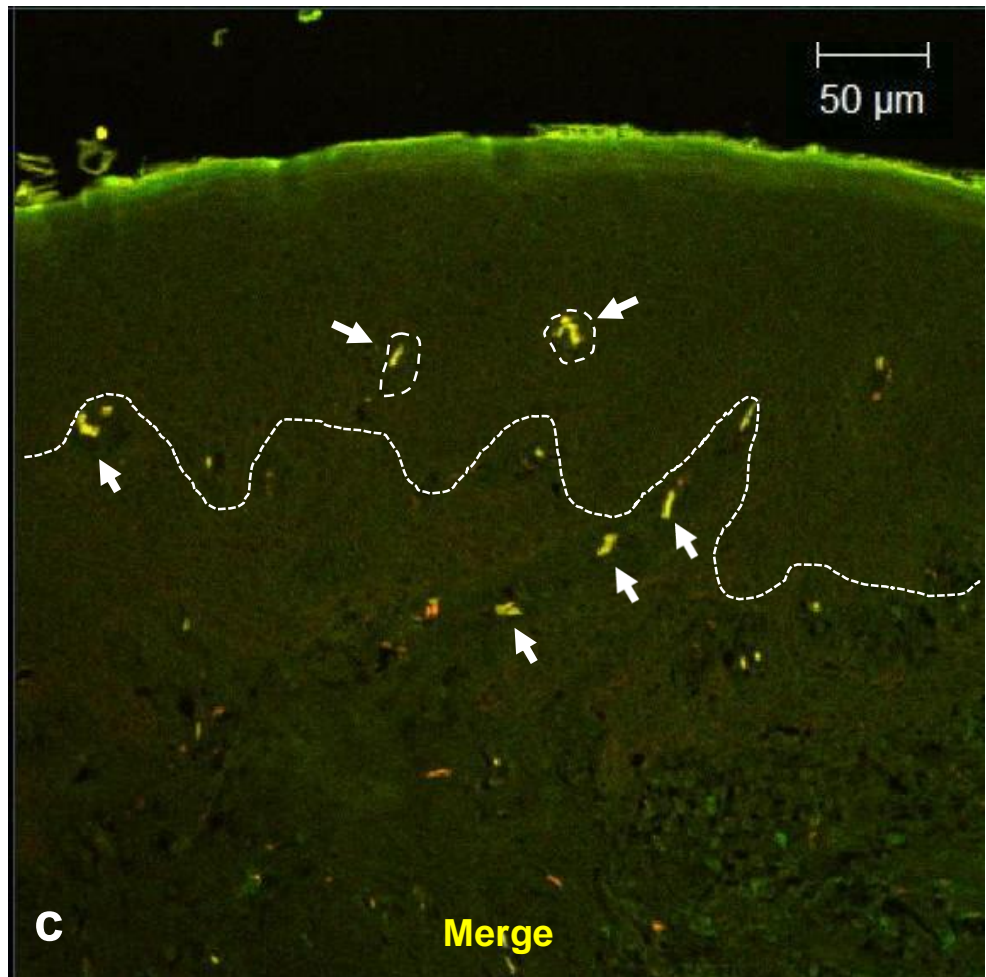
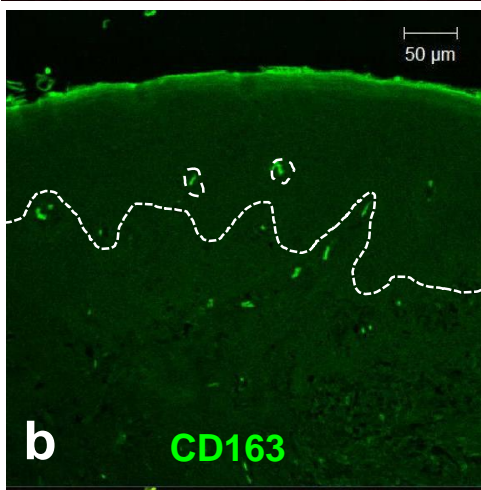
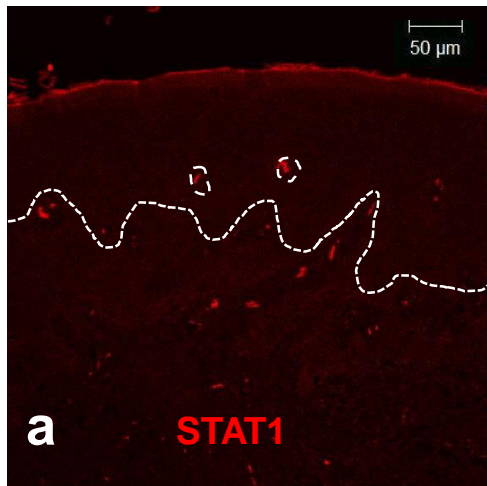


Fig 8B

