

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11876

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるリンパ節転移機構に及ぼす癌免疫応答の解明

研究課題名(英文) Analysis of cancer immune response to lymph node metastasis mechanism in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

熊丸 渉 (kumamaru, wataru)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90432947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の転移や免疫応答の解明には、がんの不均一性や多様性を考慮する必要があり、バルクでの解析ではなくシングルセルレベルでの解析が重要と考えられる。そこで、口腔扁平上皮癌細胞の初代培養後、早期に保存された細胞群より、シングルセル培養を行い、99細胞を作製した。そのうちの10細胞について、生物学的特性(細胞増殖能、浮遊培養下での自己複製能)を解析した。シングルセル由来の10細胞の内、2つの細胞は同一の細胞と考えられたが、他の細胞は特性が様々であった。特に、増殖能は低い細胞接着が弱い細胞や基底細胞様の細胞は、バルクでは解析できていない重要な細胞と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1つの癌細胞がリンパ節にたどりつき、多くのリンパ球との免疫応答により、癌細胞が生き残り増殖することでリンパ節転移が成立する。がんの不均一性や多様性を調べるには、シングルセルレベルでの解析が重要である。今回、新しい方法でシングルセルを抽出し、生物学的特性の違いにより9種類のシングルセル由来癌細胞を作製した。シングルセルレベルでの転移が成立する初期段階の解析に、大いに役立つものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of cancer metastasis and immune response requires considering cancer heterogeneity and diversity. It is deemed essential to analyze at the single-cell level rather than the bulk level. Therefore, after the primary culture of oral squamous epithelial cancer cells, single-cell culture was performed from the cell group preserved early to prepare 99 cells. The biological characteristics (cell proliferation ability, self-renewal ability in suspension culture) of ten of them were analyzed. The two cells were considered to be the same cell, while the other cells had different characteristics. In particular, cells with weak cell adhesion and basal cell-like cells were considered to be important cells that could not be analyzed in bulk because of their low proliferative capacity.

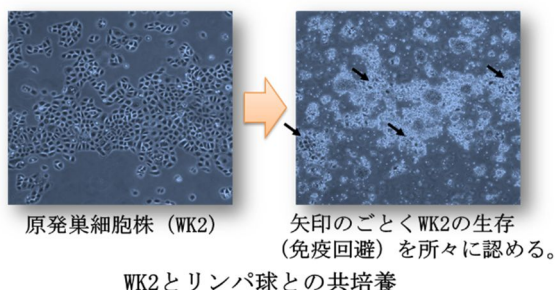
研究分野：口腔がん

キーワード：シングルセル 口腔扁平上皮癌細胞 がんの不均一性・多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療を困難にする最も煩わしい現象は転移である。そこで、一例の口腔扁平上皮癌患者より原発巣の癌細胞株(WK2)と後発頸部リンパ節転移巣から癌細胞株(WK3F)を樹立し、頸部リンパ節よりリンパ球を保存した。WK2 と同一患者のリンパ球を共培養したところ、癌細胞は生存と死滅が混在し、癌免疫応答の相違を認めた(右図)。



原発巣細胞株(WK2)と後発転移巣細胞株(WK3F)の生物学的特性について解析したところ、転移巣細胞株の方が、増殖能、浸潤能、浮遊培養での自己複製能(増殖能)などに優れていた。また、転移巣細胞株の方が、ヌードマウス異種移植による舌への造腫瘍能および頸部リンパ節転移能にも優れていた[Fujinaga, kumamaru, et al, Int J Oncology, 2014]。

リンパ節に転移する癌細胞は、初めは1つ癌細胞がリンパ節に到達し、免疫細胞の攻撃からの生存(回避)し、増殖していくものと考えられる。癌細胞は、腫瘍内不均一性で、生物学的特性の異なる集団(バルク)と言われている。これまでは、バルクでの解析が主流であったが、個々の細胞の特徴が平均化され、多様性が稀に出現する細胞の特徴を十分解析できてはいなかった。

2. 研究の目的

癌の不均一性や最も重要な転移初期段階を解析するには、癌細胞をシングルセルごとに解析することが重要と考えられる。そこで、初代培養から早期に保存された癌細胞よりシングルセルを作製し、まずは in vitro において、生物学的特性がどれだけ異なり、多様性の細胞が存在するかを確認することである。

3. 研究の方法

1) シングルセルの作製

24 穴平型プレートの中央に 1cell/50 μ l で滴下し、底面接着後にメEDIUMを加え、中央部の写真をキーエンス BZ-X810 で定期的に撮影しながら、シングルセル由来であることを確認して、増殖したものをシングルセル由来とした。

2) MTT assay による細胞増殖能、

96 穴平型プレートに、1 穴あたり 1.5×10^3 個を播種し、24 時間培養した。その後、Dye Solution を 1 穴あたり 15 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 4 時間培養し、Stop Solution を 1 穴あたり 100 μ l 加え、24 時間インキュベートした。DAY 1~12 までマイクロプレートリーダーを用いて吸光度(570 nm)を測定した。測定は各種細胞株で 3 穴ずつ用意し、同一の実験は 3 回行った。

対数増殖期(吸光度のグラフから傾きが大きくなる 2 点)において各種細胞株の細胞倍加時間を以下の式より算出した。

$$\mu = (\log N(t) - \log N(t_0)) / (t - t_0) \quad x = \log 2 / \mu$$

(μ : 増殖速度、 $N(t_0)$: t_0 の時の細胞数、 $N(t)$: t の時の細胞数、 x : 倍加時間)

3) Sphere Forming Assay による浮遊培養下での自己複製能

ノンコート 24 穴平型プレートに、1 穴あたり 1.0×10^4 個を播種した（無血清培地）。24 時間毎に 50 ng/ml の b-FGF と 20ng/ml の EGF をそれぞれ 100 μ l 添加した。10 日後に 100 μ m 以上の直径を持つ sphere の形成数をカウントし比較した。測定は各種細胞株で 3 穴ずつ用意し、同一の実験は 3 回行った。

4 . 研究成果

1) 480 細胞を播いた中よりシングルセル由来と考えられた 99 細胞の中から、安定した増殖を認めた 10 種類のシングルセル由来癌細胞を選別した。扁平上皮由来の癌のため、角化細胞様の癌細胞がほとんどであったが、細胞接着が明瞭なもの（4-14、8-16、9-22、10-14、13-9、17-13、20-16）紡錘形細胞が混在した癌細胞（12-22）、細胞接着が弱い癌細胞（3-12）が存在した。また、基底細胞様の癌細胞（13-5）も認められた。

2) 細胞倍加時間は、32 時間～53.5 時間と様々であった。細胞倍加時間が短い（増殖能が高い）順は、12-22、20-16、17-13、8-16、4-14、13-9、9-22、10-14、13-5、3-12 であった。

3) 浮遊培養下での sphere の形成数は、平均 4 個～92 個と大きく異なっていた。sphere の形成数の多い順は、17-13、9-22、8-16、4-14、20-16、10-14、12-22、13-9、13-5、3-12 であった。

考察

JMP Pro 16 での細胞倍加時間（h）と Sphere(個)の二変量の関係では、4-14 と 8-16 はほぼ同じ生物学的特性をもつと考えられたが、他の 8 つは異なっていた。早期癌細胞より、9 つ以上の生物学的特性の異なる癌細胞が存在することが判明した。その中で、WK3（70 継代）時のデータ（細胞倍加時間が 32h）と比較するとバルクで継代し続けると当然のことながら増殖能の高い細胞集団となってしまう、増殖能は低い、細胞接着が弱い癌細胞や基底細胞様の癌細胞といった特異な細胞が失われていく結果となった。

今後の予定

選別したシングルセル由来の 10 細胞の内、6 細胞への GFP 導入が済み、九州大学大学院医学研究院附属ヒト疾患モデル研究センター動物実験施設内で、ヌードマウス（BALB/cAJcl-nu/nu、日本クレア株式会社）（メス、12 週齢）への接種を行い、造腫瘍能とリンパ節転移能を確認中である。さらに、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の解析を行い、癌細胞の多様性を解析する予定である。

尚、論文投稿予定のため Figure と Table は割愛している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鬼丸 満穂 (ONIMARU Mitsuho) (00380626)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関