

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17186

研究課題名（和文）口腔癌のリンパ節転移におけるリンパ節ストローマ細胞と免疫寛容のメカニズムについて

研究課題名（英文）Mechanism of lymph node stromal cells and immune tolerance in lymph node metastasis of oral cancer

研究代表者

吉川 恭平（Yoshikawa, Kyohei）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00727480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌患者の頸部転移リンパ節組織から培養細胞株を樹立した。近年、癌の転移や浸潤に癌細胞が分泌するエクソソームの役割が注目されており、本研究で樹立した培養細胞株からエクソソームを抽出することに成功した。また、Western blot法にてエクソソームマーカーの高発現も確認できた。エクソソームの機能解析をすすめることで、口腔癌の転移メカニズムや治療戦略において新たな知見が得られる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌では「頸部転移」が重要な予後因子であり、しばしば予後不良となる症例に遭遇することも多く、口腔癌の治療成績を向上させるためには、エクソソームの機能解析をさらにすすめることで、癌の増殖や浸潤、転移に対する新たな治療戦略を見いだすことができる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established cell lines from the dissected metastatic cervical lymph nodes of an oral squamous cell carcinoma patient. In recent years, the role of exosome secreted by cancer cells is noticed and we made a success for extracting it from oral squamous cell carcinoma cell line. Furthermore, high expressions of exosome marker were seen in western blot analyzing. From these results, functional analysis of exosome could be a new information for the mechanism of cancer metastasis and therapeutic target.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 頸部リンパ節転移 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リンパ節は免疫器官の一種でリンパ管と連結する事により、末梢組織における病原体感染などに対し「フィルター」として作用するだけでなく、恒常性を維持し、免疫応答を効率よく誘導する「ハブ」となるように工夫された器官である。リンパ節にはリンパ球をはじめ様々な免疫細胞が活動する「場」が整備されている。リンパ節内にはストローマ細胞と呼ばれる間質細胞がその「場」を構築・維持しており、解剖学的にリンパ節内のさまざまな部位には機能の異なるストローマ細胞群が分布している。ストローマ細胞は細胞外マトリックスを産生して組織構築を支えるほか、ケモカインやサイトカインなど様々な因子を分泌して免疫応答・恒常性の維持に深く関与している。

(2) 口腔癌の原発巣とリンパ節転移巣における腫瘍組織の構成要素を考えると最も異なるのが免疫細胞、特にリンパ球の組織内比率および間質である。原発巣は癌関連線維芽細胞を間質として誘導するが、転移巣ではリンパ節内の fibroblastic reticular cells (FRCs) と癌細胞が接着し、ここでは原発巣とは全く異なる環境で癌細胞と FRCs が誘導するサイトカインの相互作用による免疫寛容や血管非依存性の増殖が生じていることが想像できる。

FRCs はリンパ節内の形態保持、免疫応答時のリンパ節の腫大や縮小に関わるだけでなく、免疫細胞を誘導するために様々なサイトカインを分泌する。中でも CCL19 と CCL21 は、CCR7 を持つ T 細胞に加え、樹状細胞や B 細胞を誘導する特徴がある。食道癌では CCR7 とリンパ節転移の関連は報告されており、口腔癌においても近年、報告が散見されるようになった。しかし、いずれの論文も免疫組織学的な観察から口腔癌の CCR7 の発現とリンパ節転移の因果関係を報告しているものの、CCL19/21 の供給源についてまで考察したものはない。本研究ではこの点まで明らかにすることを目的としており、口腔癌におけるリンパ節転移のメカニズムを解析する上で新規性の高い研究であると考えている。

2. 研究の目的

口腔癌が頸部リンパ節転移を生じるメカニズムを解析するため、われわれは、前述した FRCs に着目した。そこで本研究では、FRCs が免疫細胞を誘導するメカニズムと同じ方法で、口腔癌がリンパ節内で定着・増殖するのではないかと考え、癌細胞と FRCs が分泌する様々なサイトカインやケモカインの機能解析を行い、それらの相互作用とリンパ節転移の因果関係を明らかにすることで、新たな転移メカニズムやその治療標的を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株の樹立

口腔扁平上皮癌患者から採取した組織を用いて、原発および転移リンパ節から培養細胞株を樹立する。

(2) リンパ間質細胞からの FRCs の抽出・培養

リンパ間質細胞から FRCs を同定するために、リンパ管内皮細胞のマーカーである podoplanin 抗体と血管内皮細胞のマーカーである CD31 抗体を用いて、podoplanin (+) CD31 (-) の細胞集団を FRCs とし、フローサイトメトリーで抽出して培養する。

(3) タンパク質発現の解析

作製した扁平上皮癌細胞株およびストローマ細胞、抽出した FRCs における各タンパク質 (podoplanin, CD31, CCL19, CCL21 など) の発現は Western blot および ELISA を用いて解析する。

(4) 扁平上皮癌細胞と FRCs の共培養

two well chamber を用いて口腔扁平上皮癌細胞と FRCs を共培養させる。

(5) Proteome Profiler ヒトケモカインアレイキット (R&D Systems) を用いて癌細胞と間質で互いに作用するケモカインを同定。同定できなければエクソソームアレイを行う。

4. 研究成果

(1) 細胞株の樹立

口腔扁平上皮癌患者の頸部転移リンパ節組織から out growth 法で扁平上皮癌培養細胞株を作成した(HCM-SqCC010)。また、これらの細胞で3次元培養を行ったところ、扁平上皮癌様の spheroid を形成し、形態を保持していることを確認した(図1)。

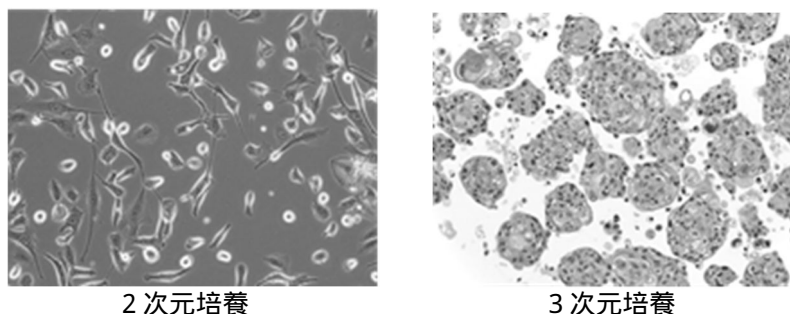


図1

(2) リンパ管内皮細胞のマーカーである podoplanin 抗体や血管内皮細胞のマーカーである CD31 抗体が検出されず、FRCs の抽出が困難であった。

(3) 樹立した HCM-SqCC010 の細胞上清より ExoQuick (System Biosciences) を用いてエクソソームを回収することができた(図2)。

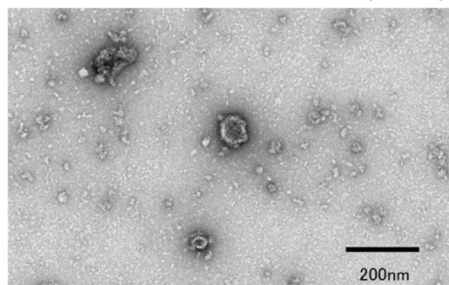


図2

(4) エクソソームマーカーである CD63 および TSG101 の高発現を Western blot 法にて確認し、エクソソームが適切に抽出されていることが示された(図3)。

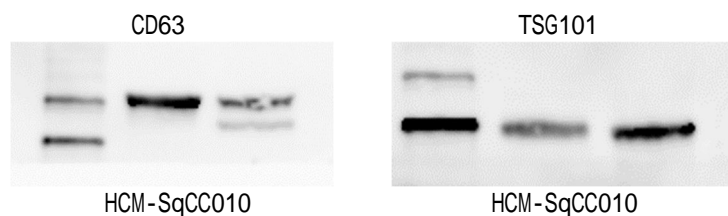


図3

口腔扁平上皮癌の転移リンパ節から樹立した細胞株においてエクソソームを抽出することが可能となった。特に癌細胞はエクソソームを活発に分泌し、またエクソソーム中には腫瘍特異的な抗原が内包されていると考えられる。さらに癌の増大において重要なタンパク質や miRNA がエクソソームによって輸送される可能性が示唆されており、今後さらなる解析をすすめることで、エクソソームは口腔癌のリンパ節転移機構や新たな治療方法の開発を含めた研究において新規性の高いターゲットになり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kyohei Yoshikawa, Kazuma Noguchi, Koji Yamanegi, Masumi Nakanishi, Kazuki Takaoka, Hiromitsu Kishimoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Occurrence of a mucocele in a submandibular gland containing a sialolith: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 209-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川恭平, 野口一馬, 山根木康嗣, 吉田和功, 森寺邦康, 高岡一樹, 岸本裕充	4. 巻 33
2. 論文標題 エーラスダンロス症候群患者に発生した舌癌の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会誌	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5843/jsot.33.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kyohei Yoshikawa, Kazuma Noguchi, Ayaka Hatanaka, Koji Yamanegi, Yuji Omori, Kazunari Yoshida, Shuji Kanda, Kuniyasu Moridera, Kazuki Takaoka, Hiromitsu Kishimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Partial maxillectomy for upper gingival carcinoma with a cheek-splitting transbuccal approach and reconstruction by buccal fat pad flap: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Science in japan 2020	6. 最初と最後の頁 27-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 吉川恭平, 野口一馬, 高岡一樹, 森寺邦康, 石瀬久子, 曾束洋平, 西本 聡, 垣淵正男, 岸本裕充	4. 巻 44
2. 論文標題 内側腓腹動脈穿通枝皮弁を用いた舌癌再建後の機能評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 兵庫医科大学医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 107-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 kyohei Yoshikawa, Kazuma Noguchi, Koji Yamanegi, Kazuki Takaoka, Hiromitsu Kishimoto	4. 巻 なし
2. 論文標題 Bilateral incidence of central odontogenic fibroma simulating hyperplastic dental follicle: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Science in Japan 2018	6. 最初と最後の頁 57-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉川恭平, 野口一馬, 中西満寿美, 吉田和功, 高岡一樹, 岸本裕充
2. 発表標題 セツキシマブ併用放射線療法により重篤な間質性肺炎を発症した舌癌の1例
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉川恭平, 野口一馬, 吉田和功, 中西満寿美, 神田修治, 森寺邦康, 高岡一樹, 岸本裕充
2. 発表標題 エーラス・ダンロス症候群患者に発生した舌癌の1例
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川恭平, 野口一馬, 森寺邦康, 高岡一樹, 岸本裕充
2. 発表標題 両側下顎骨に発生した中心性歯原性線維腫の1例
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川恭平, 野口一馬, 中西満寿美, 高岡一樹, 岸本裕充
2. 発表標題 シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌におけるHippo pathwayの関与と遺伝子解析
3. 学会等名 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔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

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