

令和 4 年 9 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17233

研究課題名(和文) 口腔癌オルガノイドを用いた再発に関わるM2マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of M2 macrophage functions in recurrence of oral cancer

研究代表者

大久保 牧子 (OKUBO, Makiko)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：10780611

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)：口腔癌において再発制御は予後改善のため重要で我々はこれまで腫瘍内へ誘導されたCD11b陽性骨髄細胞がM2M_sへ分化し、再発に貢献することを見出した。M2M_sは培養系で様々な腫瘍促進性を有することが報告されているが、複雑ながん微小環境における役割や作用機序には不明な点が多い。本研究ではがんオルガノイド培養の確立を試み、口腔癌再発に関わるM2M_sの役割の解明を目的とした。口腔癌細胞株を用いてオルガノイドの作製を確立し様々な方法で検討した結果、癌細胞単独や共培養2次元培養と比較しオルガノイドにおいて高い薬剤耐性を認めた。またM2M_sより分泌された因子により血管新生が促進されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まだ最終的な成果は得られていないが、本研究成果から口腔がん治療において喫緊の課題である治療後再発のメカニズムの一端が明らかとなり、またその治療標的が確立されることにより新たな治療法の開発や診断ツールの開発への貢献が期待され、学術的意義のみならず、社会的な意義においても注目される。

研究成果の概要(英文)：Regulation of relapse in oral cancer is currently significance for the improvement of prognosis. We previously found that recruitment of bone marrow-derived CD11b positive M2 macrophage contributed to recurrence after radiation. Although M2 macrophage is reported its pro-tumorigenic activities in vitro, the role and molecular mechanism of M2 macrophage in tumor microenvironment in the process of recurrence is not known yet. Thus, the subject of this study was to elucidate the role of M2 macrophage in relapse of oral cancer using organoid, in which the tumor microenvironment are closely re-organaised in vitro. We utilized several different types of cells including cancer, endothelial, stroma, and monocytes for establishment of oral cancer organoid. We found that the resistance against chemo drugs was seen in 3D-organoid compared to either oral cancer cells alone or 2D-cocultured cells. M2 macrophage-secreting proteins contributed angiogenesis in vitro assay.

研究分野：口腔がん研究

キーワード：口腔癌 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療は主に化学療法、放射線療法および外科的療法で全体の5年生存率は約60%と比較的良好である。しかしながら、全体の約半数を占める進行口腔癌では、手術侵襲により嚥下・構音などの機能障害や審美障害が著しいことから放射線療法、化学療法による保存療法を選択するケースが少なくない。近年重粒子線や強度変調放射線治療 (IMRT: Intensity Modulated Radiation Therapy) などの治療技術や新たな抗がん剤の開発、免疫療法などの著しい進歩にも関わらず、治療後の再発がしばしば認められている。

中でも、放射線療法後の再発症例において、その多くが照射野内からの再発であることは注目すべき点である。再発腫瘍の治療は困難になるため、治療後に再発したがん細胞の制御は口腔癌の予後を改善するために早急に克服すべき課題の一つとなっている。

悪性腫瘍において、再発の際に腫瘍血管の再生が不可欠である事が知られている。申請者らは以前に、悪性腫瘍の放射線治療後に骨髄細胞が腫瘍内に取り込まれている事を見出し、中でも細胞表面マーカーである CD11b を有する骨髄単核細胞群が腫瘍血管の再形成に重要であるが分かった。ヌードマウスに口腔扁平上皮がん細胞を播種させたのち、放射線照射を行ったところ、対照群に対し照射群では再増大した腫瘍内に誘導される CD11b 陽性の骨髄細胞が有意に多いことを見出された。

このことはすなわち、放射線照射後に起こる腫瘍血管の再生は、既存の血管から起こるいわゆる“angiogenesis”ではなく、腫瘍内に誘導される骨髄細胞中のある一群によって起こる“vasculogenesis”に起因する事が明らかにされた。更に治療により腫瘍内へ誘導された CD11b を発現する骨髄細胞が M2 マクロファージ (M2M_s) へ分化し、再発に貢献することを見出した。M2M_s は培養系では血管新生などの様々な腫瘍促進性を有することが報告され、治療の標的として注目されているが、複雑ながん微小環境における M2M_s の役割や作用機序には不明な点が多い。特に再発に関わる役割はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究ではがん本来の微小環境を再現する目的で、申請者が着目したのががんの臨床的な特徴を保持するオルガノイド培養というツールであり、またこれを用いて微小環境の特性を反映させながら口腔癌再発に関わる M2M_s の多様な役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である OSC-19 細胞と、生検や手術で得た Patient-derived cell (PD cell) による2種類の口腔癌オルガノイドの作製を行った。まずは OSC-19 細胞株を用いてオルガノイドの作製を試みるため、OSC-19 細胞に血管内皮細胞、間葉系細胞を添加した懸濁液を専用の小型ディンプルプレートで三次元培養を行った。まずはがん細胞と微小環境を構築する細胞との比率や培地の組成、培養条件など詳細な条件検討を行い培養方法の確立を行なった。

さらに添加する増殖因子や無血清培養への条件検討など口腔がんオルガノイド培養の最適化の探索を行なった。

口腔がんオルガノイド培養の方法を確立した後、以下の方法についてそれぞれ検討を行い結果を解析した。

- ・細胞増殖試験
- ・血管新生
- ・薬剤耐性(シスプラチン、ドセタキセル、セツキシマブなど)
- ・放射線感受性試験

生検や手術で得た Patient-derived cell (PD cell) による口腔癌オルガノイドの作製においても上記同様、細胞の割合、培地の組成、培養条件や増殖因子など様々な条件の検討を行ってきた。

また本培養においてはディンプルプレートでの増殖は困難であったため、マトリゲルなどを用いた3次元培養系の確立を行なった。

4. 研究成果

まずは口腔癌細胞株 OSC-19 細胞にレトロウイルスを用いて luciferase を恒常的に発現させ、また血管内皮細胞には GFP を発現させ、オルガノイド培養におけるそれぞれの細胞の局在を識別させた。

次に、様々な培養条件や細胞比を検討した上で最適な口腔癌オルガノイドの作製方法を確立した。

OSC-19 細胞株オルガノイドの作製

OSC-19 細胞 + 血管内皮細胞 (EC) + 間葉系幹細胞 (MSC) を専用の小型ディンプルプレート (Eiplasia® kuraray) で培養した (図 1)。

OSC-19 細胞 + 血管内皮細胞 (EC) + 間葉系幹細胞 (MSC) を専用の小型ディンプルプレート (Eiplasia® kuraray) で培養し、M1, M2M s はヒト単球系細胞である THP-1 細胞を PMA で M s へ誘導した後に、LPS/INF- で M1M s へ、IL-4/IL-13 で M2M s へ誘導させ無血清で培養したものを液性因子として使用した。

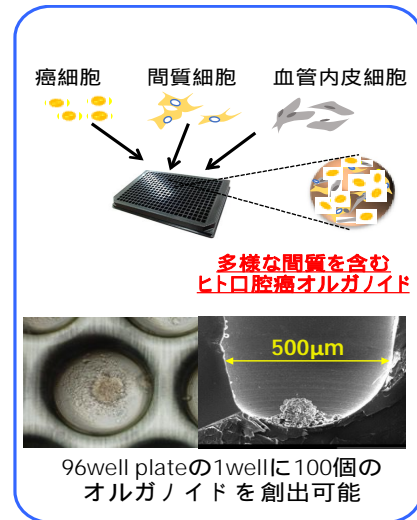


図 1 口腔癌オルガノイドの作製

その後のアッセイにおいても様々な方法で検討した結果、癌細胞単独や共培養 2 次元培養と比較しオルガノイドにおいて高い薬剤耐性を認めた。

また M2M s より分泌された因子により血管新生が促進されることがわかった。本実験では M2 マクロファージの液性因子がよりがん細胞や血管内皮細胞にパラクリンに参与することが見出された。

PD cell オルガノイドの作製

一方、生検や手術で得た PD cell による口腔癌オルガノイドの作製においても細胞株における方法と同様に細胞の割合、培地の組成、培養条件や増殖因子など様々な条件の検討を行ったが、全般的に細胞増殖が遅く、また継代を繰り返す度にその増殖性が失われたり、また手順の最中の喪失などの数多くの問題があった。

その後最適な条件の確立を行い、上記同様のアッセイに関して条件検討を行なったが、最終的な結果を得られるまでには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大久保牧子・來生 知・杉浦 圭・光藤健司・藤内 祝	4. 巻 64
2. 論文標題 M2マクロファージは血管形成を促し放射線照射後の口腔癌再発を導く	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 307-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.64.307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------