

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18733

研究課題名（和文）口腔がん再発を導くM2マクロファージ液性因子の同定

研究課題名（英文）identification of M2 macrophage-secreted factors involved in oral cancer relapse

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）：口腔癌治療において再発を制御することは予後改善のため非常に重要であると考えられている。申請者はこれまで放射線照射後に腫瘍内へ誘導されるCD11b陽性骨髄細胞がM2タイプのマクロファージ（M2M_s）へ分化し、再発に貢献することを見出した。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て行われた。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で高い薬剤耐性を認めた。またM2M_sより分泌された因子がパラクラインに作用することにより血管新生が促進されることが示唆された。

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、本研究結果から口腔がん治療における最も重要な問題の一つである治療後に生じる再発におけるM2マクロファージの役割の一端が明らかとなった。今後これに対する治療標的や診断方法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重要となりうる。

研究成果の概要（英文）：Regulation of relapse following radiotherapy is important for the improvement of prognosis in oral cancer treatment. We previously found that recruitment of M2 type macrophage contributed to relapse of tumor after radiation. Although M2 macrophage is thought to be pro-tumorigenic, the role and molecular mechanism of M2 macrophage in tumor microenvironment in recurrence is not known yet. Therefore, the subject of this study was to clarify the role of M2 macrophage in relapse of oral cancer using organoid culture, in which the tumor microenvironment are closely mimic in vitro. We cocultured 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. The conditioned media from M2 macrophage induced angiogenesis in vitro assay.

研究分野：口腔癌研究

キーワード：口腔癌

1. 研究開始当初の背景

口腔癌全体における進展例は約 40~50%と高い割合を占める。進行癌における標準的治療は手術が主体となるが、切除不能症例や口腔は機能が集中する部位でもあり、機能温存のため放射線や化学療法が選択される場面も少なくない。近年新規分子標的薬や腫瘍免疫薬が次々と開発されているが、局所制御は改善されていない。再発症例の二次治療は選択肢が制限され著しく予後が悪化するため、再発の制御は喫緊の課題である。

近年、腫瘍再発には微小環境が深く関与することが示唆されている。がん微小環境はがん細胞だけでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞などの間質細胞や、Mφs やリンパ球などの免疫系細胞で構成される。これらの細胞とがん細胞との相互作用ががん細胞の増殖や浸潤、治療抵抗性や再発にまで深く関与することが明らかになりつつあり、がん微小環境は新たな治療の標的として注目されている。

申請者は、がんの再発に関わる微小環境変化の解明とその克服を目標に研究を行っており、これまでに放射線や抗がん剤により血管内皮細胞がダメージを受けると HIF-1 が活性化し、CD11b 陽性ミエロイド細胞が腫瘍内へ誘導され、その一部が F4/80+CD206+M2Mφs へ分化し腫瘍血管の再形成を促し再発に貢献していることをマウスモデルで明らかにした(図1, Okubo M et al, Sci Rep, 2016, Kioi M et al, J Clin Invest, 2010)。しかしながら M2Mφs がどのように血管の再形成を促しているのか明らかでなく、またその分子メカニズムも不明のままである(図1, ?で示す部分)。これまでの研究で微小環境を再現する目的で血管内皮細胞、間葉系幹細胞をがん細胞と共培養を用いて形成させるオルガノイドを確立させ、解析に用いてきた。さらにそこにマクロファージを含める試みを様々な方法で行ってきたが、実験毎に形態不正や腫瘍内の局在変位が見られ解析が困難であったことから本研究では口腔がんオルガノイドに M2Mφs の液性因子を作用させることで生じる再発のプロセスに注目して、そのメカニズムの解明を行うとともに、直接作用する液性因子を同定することでがん再発を標的とする新規治療法の開発に繋がるものと思われた。

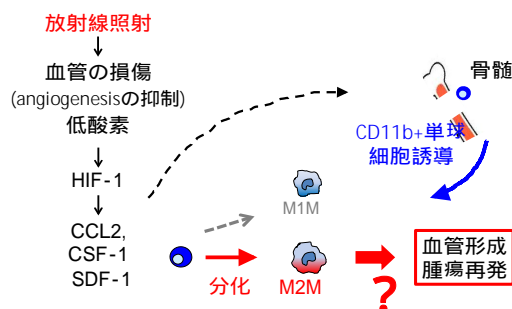


図1 先行研究の概要と課題

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌の治療後再発に関わる M2Mφs の役割を解明し、治療標的を同定することである。そこ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 M2Mφs の分泌する液性因子の役割を解析することで動物実験では不可能であったハイスループットな解析と標的の探索が可能になると思われる。

3. 研究の方法

口腔癌 3次元初代培養細胞もしくは 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 (Corning Elplasia) で培養を行う。M1, M2Mφs はヒト単球系細胞である THP-1 細胞を PMA で Mφs へ誘導し、LPS/INF-γ で M1Mφs へ、IL-4/IL-13 で M2Mφs へ分化させ無血清で培養したものを液性因子として使用した。

M1Mφs or M2Mφs 液性因子を加えた口腔癌オルガノイドを用いて以下の項目を検証した。予めルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を導入した OSC-19 細胞、GFP を導入した EC を用いることで、測定機器を用いた評価を可能にし以下の実験を行った。

- (1) 細胞増殖
- (2) Wound-healing assay
- (3) 血管新生チューブフォーメーションアッセイ
- (4) 薬剤感受性
- (5) 放射線感受性

4. 研究成果

まずは生検で採取した口腔癌臨床検体を用いて三次元培養を行い、オルガノイド細胞を樹立させた。その後レンチウイルスを用いて luciferase を発現させ、上記アッセイに用いたがオルガノイド細胞が増殖停止もしくはコンタミしてしまい、うまくアッセイに用いることができなかった。そのためその後の実験では口腔癌細胞株 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たものを使用し、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。

OSC-19 細胞株オルガノイドの作製: 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専用の小型ディンプルプレート (Corning Elplasia) もしくはマトリゲルコート上で培養した (図 2)。

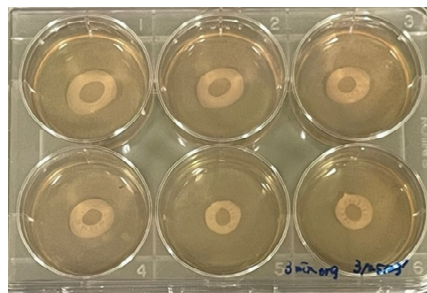


図 2 口腔癌オルガノイド

- (1) 3次元培養もしくはマトリゲルコートの影響のため luciferase の活性がうまく反映されず結果が安定しなかった。今後の実験系の改良が必要と思われた。
- (2) M2Ms の液性因子ががん細胞や血管内皮細胞にパラクリンに関与し血管新生に影響している実験結果が得られた。
- (3) 組織を固定し薄切後に免疫染色を行い顕微鏡下に観察を行う予定であったが、固定後組織を包埋する際に断片化してしまい、解析に十分な組織量を確保することが困難であった。
- (4) 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。液性因子を加えた際の解析には至っていないがオルガノイドの特性が反映されていることがわかった。
- (5) 放射線照射後にオルガノイドを分散させシングルセルの単離が困難で安定したコロニーの形成が困難であった。

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

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