

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462992

研究課題名(和文) 口腔癌に対する選択的免疫逃避解除を目指した基礎的研究

研究課題名(英文) Study on target of cancer immunoediting in oral cancer

研究代表者

榊 宏剛 (Sakaki, Hiroataka)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90374850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌では免疫療法の報告が極めて少ない。この理由として口腔内の免疫学的特異性が考えられる。申請者らはこの点に着目して、自然免疫関連因子の制御が抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。はじめに細胞周期を観察しやすい様、蛍光タンパク質融合Fucciを発現する口腔癌由来細胞株を作出し、機能を評価したところ、この細胞は細胞周期の解析に極めて有用であった。口腔癌の治療に用いられる抗癌剤の作用に対する自然免疫関連因子の影響を検討した結果、個々の自然免疫関連因子の影響は極めて小さいものの、これらが複合的に作用することで、抗腫瘍効果に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Little report regarding immunotherapy for oral cancer has been shown. Since Oral immune tolerance has been proposed, we focused on the effect of innate immune system-associated factors in ant-tumor effect in oral cancer. We initially generated Fucci-expressing oral cancer cell line to evaluate cell cycle. Using this cell line, we found that little individual immune-related factor altered cell cycle distribution in response to anticancer reagents. However, we also observed that multiple immune-related factors did affect the cell cycle distribution altered by the anticancer drugs, indicating that immune-related factors may alter the anticancer effect in oral cancer.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌

1. 研究開始当初の背景

さまざまな治療の努力にもかかわらず、口腔癌罹患患者の約 6 割が 5 年以内に再発・転移あるいは二次性発癌をひきおこし、口腔癌の生存率は最近 20 年で大きな改善はみられない予後が不良な疾患である。

近年の癌幹細胞の研究から、免疫逃避状態にある癌幹細胞の細胞周期は休止期に相当することが分かっている。一般に腫瘍が休止期よりは活動期の方が正常細胞との違いが明確になる。すなわち、大きな抗腫瘍効果が期待できる。

口腔領域の癌の治療法について、有効な免疫治療に関する報告は少ない。この一因として、常在性の細菌やウイルスの侵入に常にさらされる口腔内ではある程度の免疫寛容をもった、特異的な免疫機構を有するためと推測されている。

従来、ウイルス感染におけるパターン認識受容体は、膜貫通型センサーである TLRs (Toll-like receptors)が中心とされていたが、細胞内 RNA ウイルスセンサー RIG-I (retinoic acid-inducible gene-I) に続き、細胞内 DNA ウイルスセンサー DAI (DNA-dependent activator of IRFs)が同定され、申請者はこれらの細胞内ウイルスセンサーが自然免疫機構を賦活化させ、さらに癌細胞の細胞周期を制御し、アポトーシスを誘導する可能性について報告を行ってきた。しかしながら、これらの免疫系賦活化は癌細胞のみならず周囲の正常細胞もターゲットになるため臨床応用への障害となっていた。

2. 研究の目的

常在性の細菌やウイルスの侵入に常にさらされる口腔内において組織が恒常性を保つために、口腔内は特異的な免疫機構を有するものと推測される。申請者らは、新規の治療法を開発するために以下を研究の目的とした。

(1) 本研究においては、申請者がこれまで遂行してきた RNA ウイルスセンサーである RIG-I 遺伝子の機能解析に加えて、DNA ウイルスセンサーである DAI 遺伝子に注目し遺伝子レベルでの免疫機構の賦活化を達成した上に口腔癌細胞の細胞周期を制御し、加えてアポトーシスに導くことで癌細胞の死

滅を図る。

(2) 免疫機構の賦活化と癌細胞に選択的な細胞周期の抑制的制御、さらにアポトーシス誘導機構の関係を検証する。

(3) 既存の抗癌剤(Docetaxel、Cisplatin、分子標的薬として Cetuximab)による抗癌剤の感受性に対する増強効果を検討する。

3. 研究の方法

本研究では細胞周期の解析が必須である。そこではじめに細胞周期の分布を簡便に測定するような細胞の作出を行った後、以下の研究を行った。

(1) 歯肉扁平上皮癌由来細胞株 Ca9-22 細胞に細胞周期評価用蛍光タンパク質 Fucci-G1 orange および Fucci-S/G2/M green を同時に安定的に発現させるよう、Ca9-22 細胞へ 2 それぞれの蛍光タンパク質発現ベクターを遺伝子導入し、2 種類の蛍光タンパク質をともに、かつ同程度発現している細胞のクローニングを行い、Ca9-22-Fucci 細胞の樹立を目指した。

(2) Ca9-22-Fucci 細胞の細胞周期分布を蛍光顕微鏡下に観察した。

(3) Ca9-22-Fucci 細胞の細胞周期分布をフローサイトメーターで解析した。

(4) 各種抗癌剤による Ca9-22-Fucci 細胞の細胞周期分布への影響を解析した。

(5) 抗癌剤による細胞周期分布の変化における細胞内核酸センサーをはじめとした自然免疫関連因子の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) Fucci-G1 orange および Fucci-S/G2/M green を同時に安定的に発現する Ca9-22 細胞株の作出が完了した。

(2) Ca9-22-Fucci 細胞を顕微鏡下に観察することで、細胞周期の分布を視覚的に確認することが可能であった。

(3) プロテアソーム阻害剤で処理することで、Fucci の蛍光分布が変化した。すなわち、Ca9-22-Fucci 細胞内の Fucci は機能しており、この細胞株を用いて細胞周期を評価するこ

とが可能であることが分かった。

(4) Ca9-22-Fucci 細胞はフローサイトメトリ解析においても良好に分画が可能であった。

(5) 抗癌剤処理により、Ca9-22-Fucci 細胞の細胞周期分布が変化した。この変化はこれまでの報告と一致しており、少なくとも本課題における Fucci タンパク質の発現による細胞周期への影響は考慮せずに研究を遂行できると考えられた。

(6) Ca9-22-Fucci 細胞に対し RIG-I、DAI といった細胞内核酸センサーの発現抑制は可能であった。

(7) RIG-I、DAI 等細胞内核酸センサーの発現を抑制した Ca9-22-Fucci 細胞を抗癌剤処理したのちに細胞周期分布を測定した結果、一部影響を受ける抗癌剤を認めたが、統計学的有意差は得られなかった。

(8) これらの結果から個々の細胞内核酸センサーが抗癌剤の効果に影響を及ぼす可能性は限定的であると考えられた。

(9) 本課題では複数の核酸センサーの影響は検討しておらず、抗癌剤による抗腫瘍効果への影響は今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

以下の論文は全て査読有

1. Kobayashi W, Kubota K, Ito R, Sakaki H, Nakagawa H, Teh BG. Can Superselective Intra-Arterial Chemoradiotherapy Replace Surgery Followed by Radiation for Advanced Cancer of the Tongue and Floor of the Mouth? J Oral Maxillofac Surg. 2016; 74(6):1248-54.
2. Sakaki H, Matsumiya T, Furudate F, Kobayashi W, Kon T, Itoh R, Kimura H. Identification of a point mutation in the SH3BP2 gene in cherubism. J Oral Maxillo Surg Med Pathol. 2015: 28 880-3.
3. Kubota K, Kobayashi W, Sakaki H, Nakagawa H, Kon T, Mimura M, Ito R, Furudate K, Kimura H. Professional oral health care reduces oral mucositis pain in patients treated by superselective

intra-arterial chemotherapy concurrent with radiotherapy for oral cancer. Support Care Cancer. 2015: 11 3323-9.

4. Kubota K, Furudate K, Nakagawa H, Sakaki H, Kobayashi W, Kimura H. Sjögren's syndrome with marked swelling of major salivary glands related to localized AL amyloidosis: A case report and literature review. J Oral Maxillo Surg Med Pathol. 2015: 27(4) 518-21.

[学会発表](計 2件)

1. Sakaki H, Furudate K, Matsumiya T, Sato H, Itoh R, Kobayashi W, Kimura H. Identifying a point mutation in the SH2BP2 gene in cherubism. 96th Annual Meeting of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Sep 8-13, 2014 Hawaii, USA.
2. 榎宏剛, 古舘健, 松宮朋穂, 伊藤良平, 小林恒, 木村博人. ケルビズムの1例. Oct 17-19, 2014. 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会(千葉市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
榎 宏剛(SAKAKI HIROTAKA)

弘前大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：90374850

(2)研究分担者
松宮 朋穂 (MATSUMIYA TOMOH)
弘前大学・医学研究科・助教
研究者番号： 30344592

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()