

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463012

研究課題名(和文) 口腔癌における腫瘍関連マクロファージによる抗癌剤耐性機序の解明

研究課題名(英文) Regulation of chemoresistance by tumor-associated macrophages in oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

笹部 衣里 (SASABE, Eri)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：40363288

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)：口腔扁平上皮癌の化学療法ではしばしば耐性獲得が問題となることから、抗がん剤耐性獲得機序における腫瘍関連マクロファージ(TAM)の関与について検討した。その結果、TAMが分泌するエクソソームは、株化口腔扁平上皮癌(OSC)細胞に取り込まれた後、OSC細胞の増殖能を促進するとともに、抗がん剤により誘導される細胞周期の障害、アポトーシスを抑制することにより、抗がん剤感受性を低下させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether tumor-associated macrophages (TAM) are involved in the mechanism of acquired chemoresistance in oral squamous-cell carcinoma (OSCC). As a result, it was revealed that exosomes secreted by TAM promotes the proliferative capacity of OSCC cells and reduces the anti-cancer drug sensitivity through regulation of the cell cycle and suppression of apoptosis. Therefore, it was suggested that TAM may decrease sensitivity to anti-cancer drugs through secretion of exosomes in the tumor microenvironment.

研究分野：口腔外科

キーワード：腫瘍関連マクロファージ 口腔扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌の発生や悪性進展に炎症が関与することが明らかになり、癌の発生初期段階では、免疫・炎症細胞は抗腫瘍免疫を介して癌に対して生体防衛的に働くが、癌の増大や悪性進展に伴い、次第にマクロファージをはじめとする細胞は癌の進展を促進することが明らかとなってきた。われわれが日常、臨床の場で遭遇する口腔扁平上皮癌は、初診時には既に抗腫瘍免疫が作用しにくい癌の発生後期にあたることが多く、その生検材料や手術材料において、病理組織学的に、癌間質への高度なマクロファージ、好中球、リンパ球などを主体とする炎症細胞の集積が認められることが多い。このことは、口腔扁平上皮癌においてもまた、癌の発生や悪性進展に炎症が深く関与していることを示唆している。最近の報告でウイルス、細菌感染が関与しない癌でも、炎症反応が遷延化しており、その分子機序として内因性の癌細胞あるいは間質細胞由来成分が自然免疫を活性化することにより、炎症を誘導している可能性が示唆されており、自然免疫を介したシグナルは癌の間質において炎症性微小環境を形成し、それらが活性化されることで発癌や癌の悪性化が生じると考えられている。

炎症性がん微小環境を形成する主要細胞の一つである腫瘍関連マクロファージ (TAM) は、癌細胞の増殖促進、血管新生の誘導、抗腫瘍免疫の抑制などを介して癌の悪性進展を促進するだけでなく、これまでに、化学療法を受けた癌患者組織や担癌マウスに浸潤し、抗癌剤の耐性獲得にも関与することが報告されていることから<sup>1)</sup>、口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得においてもTAMが関与している可能性が示唆されるが、その点については十分に明らかにされていない。

一方、エクソソームは、エンドソームから形成される直径30から100nmの脂質二重膜で覆われた膜小胞で、癌細胞、免疫担当細胞など多様な細胞から細胞外に分泌され、近年、排出されたエクソソームが他の細胞内に取り込まれ、内包物質 (蛋白質や脂質、 mRNA、 miRNAなど) を介して取り込んだ細胞の様々な機能に影響を及ぼすことが明らかにされ、エクソソームが細胞間情報伝達物質として機能すると考えられるようになってきている。我々はこれまでに口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞が分泌するエクソソームの作用に着目した研究を行ってきており、OSC細胞の分泌するエクソソームは、OSC細胞自身の増殖・遊走・浸潤を濃度依存的に促進し、それらの作用は紫外線およびプロテイナーゼK処理により減弱する。エクソソーム処理によりOSC細胞のAkt、ERK、JNKのリン酸化が亢進し、それらの阻害剤はエクソソームにより誘導されるOSC細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制することを報告し<sup>2)</sup>、口腔扁平上皮癌において、癌細胞分泌エクソソームが腫瘍の発育・進展を促進していることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではTAMが分泌するエクソソームがOSC細胞の抗癌剤感受性に何らかの影響を及ぼすのではないかと考え、その点について検討した。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌において化学療法に対して抵抗性を示す症例では、その対応に苦慮させられることが多い。近年、慢性炎症により腫瘍組織に浸潤したTAMが、癌の悪性進展を促進していることが明らかとなってきた。そこで、本研究では化学療法による癌治療効果の向上を目指して、口腔扁平上皮癌微小環境に浸潤するTAMが分泌するエクソソームがOSC細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響を明

らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 細胞の調製

ヒト単球様細胞株THP-1は、10%仔牛由来血清を含むRPMI-1640にて培養した。また、末梢血由来単球（PBMC）は健康人より採取した末梢血をFicoll-Paqueを用いた密度勾配遠心法により分画して採取した。

#### 単球のマクローファージへの分化

単球様細胞株THP-1は10 nMのPMA存在下に24時間培養した。ヒト末梢血由来PBMCは10 ng/mLのM-CSFとGM-CSF存在下に7日間培養した。

#### エクソソームの回収

両細胞は、10% Exosome-depleted FBS (SBI) を含むRPMI-1640にて48時間培養し、培養上清を回収した。遠心 (2000 g × 30 mins)後の上清にTotal exosome isolation kit (Invitrogen)を加え、12時間処理したものを遠心して回収した (10000 g × 60 mins)。

#### マクローファージ分泌エクソソームの口腔扁平上皮癌への影響

回収したマクローファージ分泌エクソソームの口腔扁平上皮癌細胞株（OSC-4）の抗癌剤感受性に対する影響について、100 μMの5-FU、CDDP存在下にOSC-4をエクソソームで処理し、増殖、アポトーシス、細胞周期に及ぼす影響をそれぞれWST-1アッセイ、Annexin-VおよびPI染色によるフローサイトメトリー法を用いて検討した。

### 4. 研究成果

THP-1分泌エクソソームのOSC-4への取り込み

PKH-26で標識したTHP-1分泌エクソソームでOSC-4を4時間処理し、共焦点顕微鏡にて観察したところ、OSC-4細胞内へのエクソソームの取り込みが確認された（図1）。

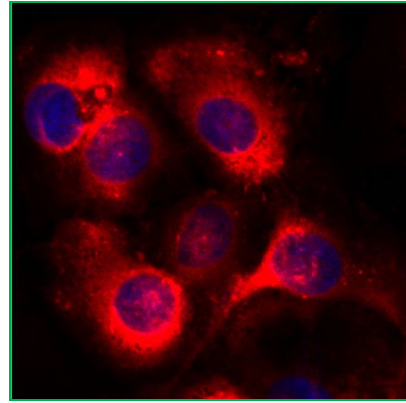


図1：OSC-4へのエクソソームの取り込み

#### マクローファージ分泌エクソソームのOSC-4の抗がん剤感受性に及ぼす影響

THP-1分泌エクソソームおよびPBMC分泌エクソソームはともに濃度依存性にOSC-4の増殖能を促進した。さらに、100 μMの5-FU、CDDP存在下にエクソソームを添加したところ、OSC-4の抗癌剤感受性は低下した（図2）。

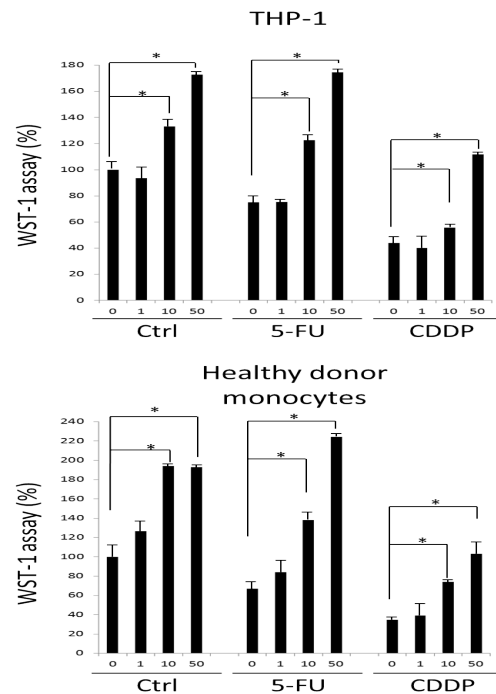


図2：OSC-4の抗がん剤感受性への影響

### THP-1分泌エクソソームのOSC-4の細胞周期に及ぼす影響

各処理を24時間行った後、細胞をPIにて染色しフローサイトメトリーを行った。その結果、THP-1分泌エクソソーム単独処理ではOSC-4細胞の細胞周期への影響は認められなかった。一方、5-FU、CDDP処理によりOSC-4はS期およびG2/M期に集積したが、THP-1分泌エクソソームを添加することにより、G2/M期への集積が抑制された(図3)。

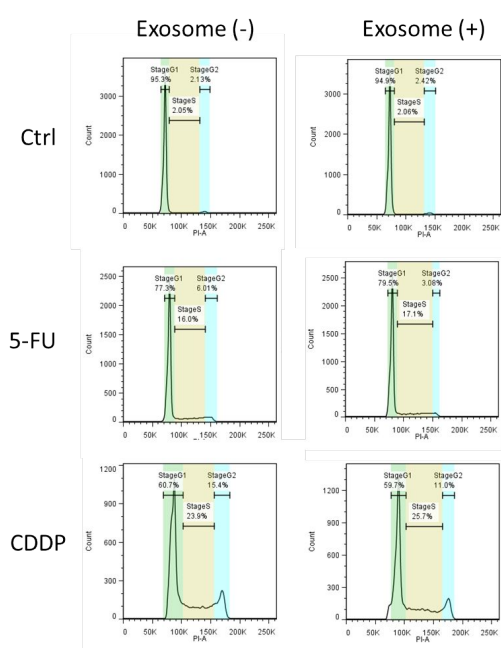


図3：THP-1分泌エクソソームのOSC-4の細胞周期に及ぼす影響

### THP-1分泌エクソソームのOSC-4のアポトーシスに及ぼす影響

各処理を24時間行った後、OSC-4をAnnexin-VおよびPIにて染色しフローサイトメトリーを行った。その結果、100 μMの5FU、CDDPでOSC-4を処理すると、Annexin-VおよびPI陽性細胞率は増加したが、THP-1分泌エクソソームを添加することにより、Annexin-V陽性細胞率は有意に減少した。一方、PI陽性細胞率への影響は認められなかつ

た(図4)。

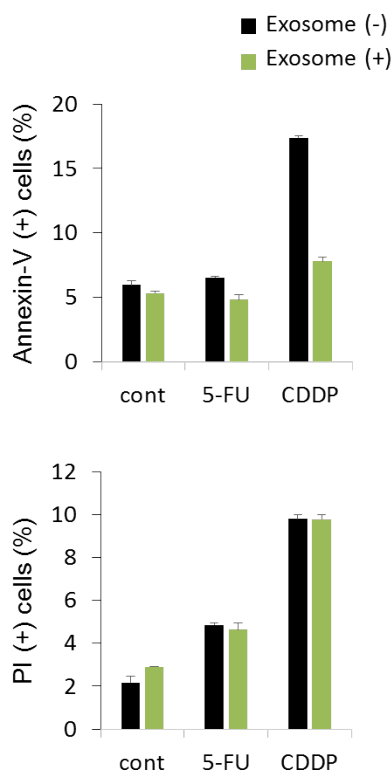


図4：THP-1分泌エクソソームのOSC-4のアポトーシスに及ぼす影響

以上の結果より、腫瘍微小環境において腫瘍関連マクロファージはエクソソームの分泌を介して、OSC-4細胞の増殖を促進するとともに、細胞周期の調節、アポトーシスの抑制を行い、抗がん剤感受性を低下させている可能性が示唆された。

### <引用文献>

- 1) Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med.* 2015 Apr 6;212(4):435-45.
- 2) Sento S, Sasabe E, Yamamoto T. Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor

Cell-Derived Exosomes. PLoS One.  
2016 Feb 5;11(2):e0148454.

## 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)

[学会発表](計 2件)

1. 富田理生、笹部衣里、山本哲也  
口腔扁平上皮癌細胞の抗癌剤感受性に対するマクロファージ由来エクソソームの影響  
第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
2017.4.26-4.28 ひめぎんホール(愛媛県松山市)
2. 富田理生、笹部衣里、山本哲也  
口腔扁平上皮癌細胞の抗癌剤感受性に対するマクロファージ由来エクソソームの影響  
第 15 回中四国口腔癌研究会 2016.10.28  
国際ホテル宇部(山口県宇部市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_dntst/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

笹部 衣里 (SASABE, Eri)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・講師  
研究者番号：40363288

### (2)研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授  
研究者番号：00200824

北村 直也 (KITAMURA, Naoya)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部

門・講師

研究者番号：70351921

### (4)研究協力者

富田 理生 (TOMITA, Riki)  
高知大学・医学部・大学院生  
研究者番号：90759416