

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11824

研究課題名(和文) がん間質での特異的免疫応答に着目した新規口腔粘膜炎治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for oral mucositis focused on specific immune system in cancer stroma

研究代表者

久保田 耕世 (Kubota, Kosei)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10529689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜炎におけるがん関連線維芽細胞の役割を解明するため初期免疫応答能、サイトカイン産生能の観点から解析したところ、通常の歯肉線維芽細胞とは異なりがん関連線維芽細胞ではTLR-3mRNAの発現が低下しているにも関わらず、COX-2mRNA、VEGF mRNA、IL-6 mRNA、IL-1beta mRNA、IL-8 mRNAの発現が上昇していた。これらのサイトカイン産生はp38MAPKが関与していた。免疫チェックポイントに關与するPD-L1mRNAや腫瘍免疫でNK細胞に關与するMICA mRNAも発現しており、腫瘍免疫学的にも重要な役割を担ってい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

がん関連線維芽細胞は通常の歯肉線維芽細胞と異なる初期免疫応答能を有し、サイトカイン発現をしていることが分かった。また、腫瘍免疫学的にも重要な役割を担っていることが示唆された。今後がん関連線維芽細胞の役割を免疫学的に解明し、重篤な口腔粘膜炎の制御に向けたがん支持療法の基礎的研究を行いたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We studied innate immune systems and cytokine production of cancer-associated fibroblasts (CAFs) to clarify the roles in mucositis. Although expression of TLR-3 mRNA was decreased in CAFs, expressions of COX-2mRNA, VEGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1beta mRNA and IL-8 mRNA were increased, which was quite different from normal gingival fibroblast. P 38 MAPK was involved in these cytokine productions. Expression of PD L1, which is involved in immune check point, and MICA, which plays immunological roles in NK cell, are increased in CAFs. These results indicated that CAFs plays important roles in tumor immunology.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔粘膜炎 遺伝子 免疫学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

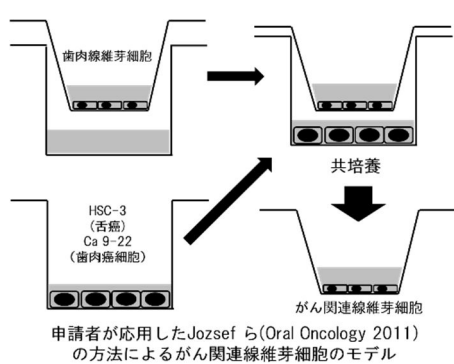
1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療において化学療法や化学放射線療法の治療成績は向上しているが、重篤な口腔粘膜炎の出現は必発であり、その治療に苦慮する事も多い。化学療法による口腔粘膜炎の機序は、Sonisら(Nat Rev Cancer 2004)が報告しており、シグナル期に各種サイトカインの産生、潰瘍期に細菌・ウイルスが関与し、修復期に周囲粘膜の細胞外基質からのシグナルにより、修復が促進されると考えられている。申請者はこれまで歯肉線維芽細胞・がん関連線維芽細胞の初期免疫応答能の研究を行い、歯肉線維芽細胞において細菌・ウイルスの認識とサイトカイン発現に RIG-I が役割を担っていること、また、がん関連線維芽細胞と歯肉線維芽細胞においては RIG-I や炎症性サイトカインの発現が異なることを解明してきた。また、口腔粘膜炎の臨床研究を行い、口腔癌動注化学療法における口腔ケアの有用性を明らかにした(Kubota K et al, Support Care Cancer 2015)。臨床的にも各口腔癌で口腔粘膜炎の治療が異なり、腫瘍近傍の口腔粘膜炎が残る事を多く経験する。以上を踏まえて、がん間質の代表的な構成要素であるがん関連線維芽細胞の初期免疫応答能の差異・炎症性サイトカイン産生能が化学療法誘発口腔粘膜炎の治療遅延に関与している可能性に着目した。各種口腔癌由来がん関連線維芽細胞の初期免疫応答能・炎症性サイトカイン産生能の差異を解析し、新規口腔粘膜炎治療に向けた基礎的研究を行うに至った。

2. 研究の目的

口腔粘膜炎におけるがん関連線維芽細胞の免疫応答能を解析するため、各口腔癌由来のがん関連線維芽細胞モデルを作成し、がん関連線維芽細胞の初期免疫応答能に関する TLR3 や炎症性サイトカインの遺伝子発現・タンパク産生と各癌細胞由来での差異を確認する。

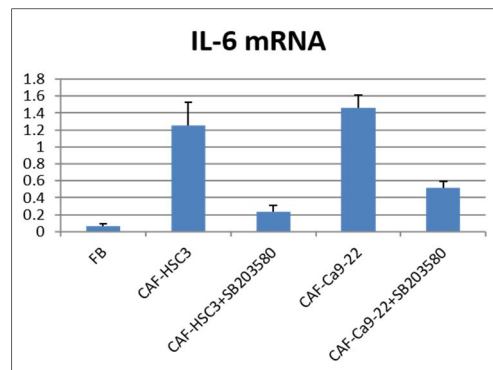
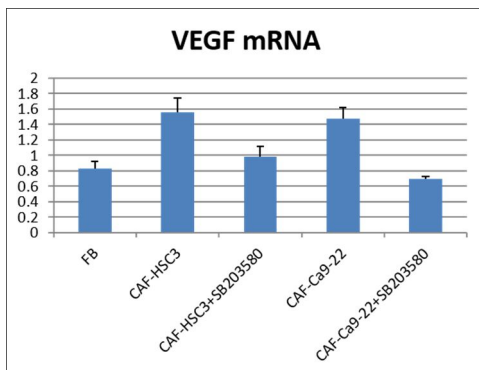
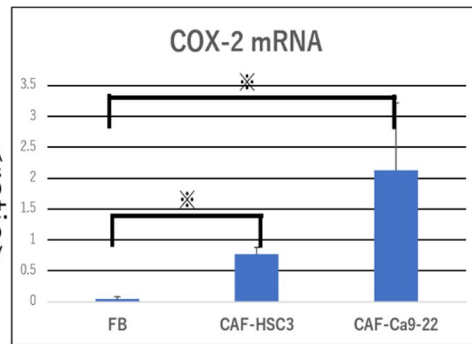
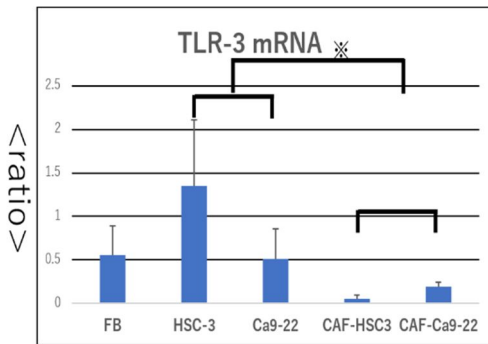
3. 研究の方法

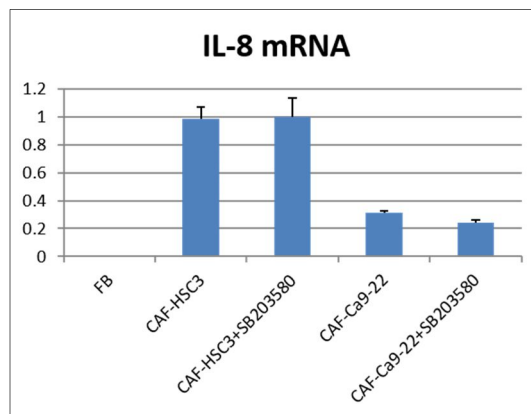
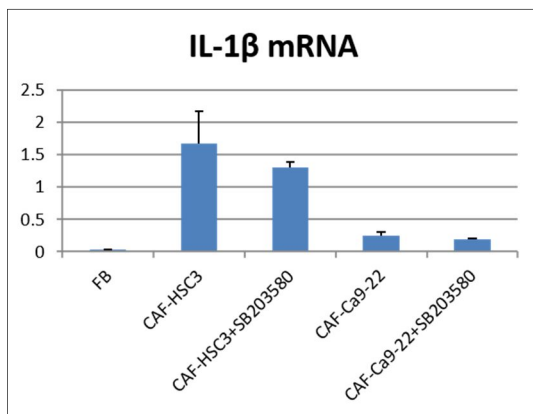


Ca9-22(歯肉癌)・HSC-3(舌癌：高転移性)の口腔癌細胞由来細胞株を使用する。口腔癌細胞と歯肉線維芽細胞を培養用ディッシュで培養した後、Jozsefら(Oral Oncology 2011)の方法に従い、共培養ディッシュで1週間共培養を行い、がん関連線維芽細胞モデル(以下CAF)を作成した。作成の後、total RNAを抽出、cDNAを作成した後、定量RT-PCRを施行した。

4. 研究成果

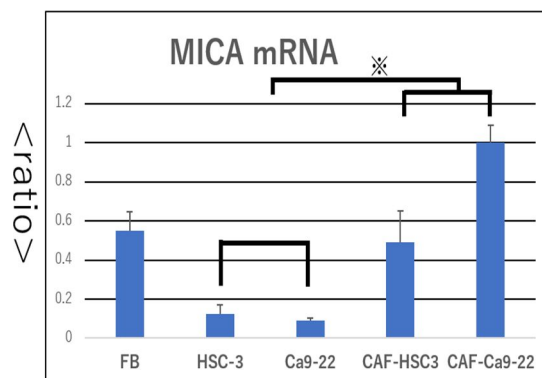
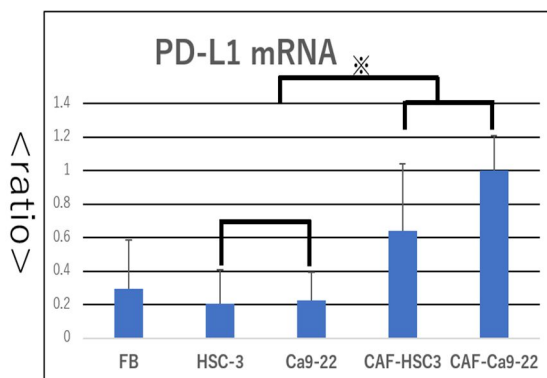
(1)FB (正常歯肉線維芽細胞) CAF-HSC3(舌癌由来がん関連線維芽細胞)、CAF-Ca9-22(歯肉癌由来がん関連線維芽細胞)の TLR-3 ならびに炎症性サイトカインの発現について





- ・正常歯肉線維芽細胞 (FB) と比較し、がん関連線維芽細胞 (CAF-HSC3, CAF-Ca 9-22) ではウイルス認識の初期免疫応答に関与する TLR-3 mRNA の発現が低下していた。がん関連線維芽細胞の間でも舌癌と歯肉癌由来で発現が異なっていた。
- ・正常歯肉線維芽細胞 (FB) と比較し、がん関連線維芽細胞 (CAF-HSC3, CAF-Ca9-22) では COX-2 mRNA, VEGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, IL-8 mRNA の発現上昇が認められた。これらの遺伝子発現は舌癌と歯肉癌由来で差異が認められた。
- ・VEGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, のがん関連線維芽細胞 (CAF-HSC3, CAF-Ca9-22) の発現について p38MAPK 阻害薬である SB203580 を添加したところ、VEGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA の発現が抑制された。IL-8 mRNA については HSC-3 由来のがん関連線維芽細胞では SB203580 で抑制されなかったものの、Ca9-22 由来のがん関連線維芽細胞では抑制が認められた。

(2) CAF-HSC3 (舌癌由来がん関連線維芽細胞)、CAF-Ca9-22 (歯肉癌由来がん関連線維芽細胞) の腫瘍免疫学的役割について



- ・がん関連線維芽細胞の腫瘍免疫学的側面を解析するため、免疫チェックポイントに関係する PD-L1 mRNA を解析した。PD-L1 mRNA は正常歯肉線維芽細胞 (FB), 舌癌細胞 (HSC3), 歯肉癌細胞 (Ca9-22) と比較しがん関連線維芽細胞で優位に発現が上昇していることが分かった。
- ・NK 細胞の活性化に関与する MICA mRNA を解析したところ、PD-L1 と同様に癌細胞と比較しがん関連線維芽細胞で発現上昇傾向が認められた。

### (3) 考察

口腔粘膜炎における口腔癌がん関連線維芽細胞の役割を初期免疫応答能、サイトカイン産生能の観点から解析したところ、通常の歯肉線維芽細胞とは異なり TLR-3 mRNA の発現が低下しているにもかかわらず、COX-2 mRNA, VEGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, IL-8 mRNA の発現が上昇していた。がん関連線維芽細胞においては通常の線維芽細胞の初期免疫応答能とは異なる機序でサイトカイン産生が行われることが示唆された。また、サイトカイン産生は SB203580 で抑制させたことより p38MAPK が関与していることがわかった。これらの遺伝子発現は舌癌由来と歯肉癌由来で差異が認められた。加えて、腫瘍間質におけるがん関連線維芽細胞の腫瘍免疫における役割についても解析することとした。その結果、免疫チェックポイントに関与する PD-L1 mRNA や腫瘍免疫で NK 細胞に関与する MICA mRNA も発現しており、腫瘍免疫学的にも重要な役割を担っていることが示唆された。新規口腔粘膜炎の開発に向けてさらに口腔粘膜炎機序におけるがん関連線維芽細胞の役割を免疫学的に解析したいと考えている。

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 0件）

1. 著者名 久保田 耕世、伊藤 良平、成田 紀彦、中川 祥、田中 祐介、福田 はるか、小林 恒	4. 巻 32
2. 論文標題 Inflammation based prognostic scoreを用いた口腔癌の予後因子の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会誌	6. 最初と最後の頁 9-14
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kosei KUBOTA, Ken FURUDATE, Takao KON, Anna SATAKE, Haruka FUKUDA, Wataru KOBAYASHI
2. 発表標題 Study on Cancer-associated fibroblasts derived from oral cancer
3. 学会等名 Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 耕世、伊藤 良平、成田 紀彦、今 敬生、中川 祥、福田 はるか、小林 恒
2. 発表標題 Inflammation based prognostic scoreを用いた口腔癌の予後因子の検討
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田 耕世、伊藤 良平、成田 紀彦、福田 はるか、今 敬生、中川 祥、小林 恒
2. 発表標題 口腔癌由来がん関連線維芽細胞の比較検討
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 耕世、伊藤 良平、成田 紀彦、福田 はるか、今 敬生、中川 祥、小林 恒
2. 発表標題 口腔癌由来がん関連線維芽細胞の腫瘍免疫学的役割について
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	松宮 朋穂 (Matsumiya Tomoh)  (30344592)	弘前大学・医学研究科・助教   (11101)	