

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03892

研究課題名（和文）患者由来口腔がんモデルの臨床的有用性（不均一性）を生かした新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）Establishment of novel treatment strategy for oral cancer using patient-derived in vitro model with heterogeneous characters

研究代表者

來生 知 (Kioi, Mitomu)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：30545059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、がんの不均一性やゲノム変化により治療抵抗性が生じ克服困難な大きな要因となっていることがわかりつつある。そこで本研究では、口腔がんの治療抵抗性を克服する多剤併用の新規治療戦略を開発するため、癌細胞の不均一性や微小環境などの臨床的有用性を有する患者由来口腔がんオルガノイドの確立とドラッグスクリーニングへの応用を行うこととした。これからのがん治療においては、いかにがんの不均一性を標的にした治療方法を確立できるか、またそれを実現させるために有効なハイスループットなアッセイ系の確立が重要と思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、口腔がんの治療抵抗性を克服する多剤併用の新規治療戦略を開発するため、癌細胞の不均一性や微小環境などの臨床的有用性を有する患者由来口腔がんオルガノイドの確立とドラッグスクリーニングへの応用を行う。

研究成果の概要（英文）：Tumor microenvironment (TME) plays crucial roles in tumor progression and treatment resistance. Thus, it is extremely important to find its role involved in the interaction of TME. The purpose of this study is to develop stroma cells-incorporating preclinical model, termed TME mimic oral cancer organoid. We have first developed the organoid by selecting the stroma cells such as endothelial cells, fibroblast, ratio of those cells, culture method, 3-D methods, culture media, and supplement of growth factors. Then, growth rate, morphology, radiosensitivity, and drug response were analyzed to investigate the effect of TME. Oral cancer cells were co-cultured with endothelial cells and mesenchymal stem cells in a particular ratio in 3D-culture, and the formed organoid became sphere. The vascular formation in the organoid was confirmed by immunofluorescent analysis. OSC-19luc organoid was resistance to cisplatin compared to 3D-cultured OSC-19luc alone or OSC-19-luc co-cultured with ECs/MSCs.

研究分野：がん研究

キーワード：口腔がん オルガノイド ドラッグスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

進行口腔がんにおいては術後の機能・審美障害の観点から、放射線や化学療法との集学的治療が望まれているが、有効な治療法が少なく克服すべき課題である。その原因の一つとして挙げられるのが希少がん故に大規模な臨床試験が行われにくく、また標準治療が手術であることも有効な薬剤の開発が進んでいない要因と思われる。近年次世代シーケンサーなどの革新的進歩に伴い、がんのゲノム異常の解析が可能となり、がんの不均一性やゲノム変化により治療抵抗性が生じ克服困難な大きな要因となっていることがわかりつつある。

研究代表者らのこれまでの研究から腫瘍再発には微小環境が深く関わる事が示唆されている (Kioi M et al, J Clin Invest, 2010)。腫瘍微小環境においては癌細胞に加え線維芽細胞や血管内皮細胞などの間質細胞や、マクロファージやリンパ球などの血球系の細胞で形成されている事が知られている。しかし治療などにより生じる低酸素などの癌細胞および周囲の微小環境の変化によって、これらの癌組織を構成する細胞群にも変化が見られ、治療抵抗性を示すことが明らかにされつつある (Jain R et al, Nature Review Cancer 2008)。現在までに、放射線照射後に骨髄由来 CD11b を発現する細胞群が腫瘍内へ誘導され、腫瘍血管の再形成や再発に関わる事が明らかにしてきた (Okubo M, Kioi M, et al, Sci Rep, 2016)。研究代表者らはさらに口腔癌患者の組織標本を用いて再発腫瘍において CD11b 陽性単球細胞や CD206 陽性マクロファージ (M2Mφ) が上昇している事を見出した。また放射線照射後に腫瘍組織内に誘導された CD11b+単球細胞の分化系の中で、血管新性能や免疫抑制能を有する CD11b+F4/80+ マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) と CD11b+Gr-1+骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cell: MDSC) の割合が有意に高いことが明らかになった。TAM と MDSC は血管新生や抗腫瘍免疫応答の抑制などに関与し、増腫瘍性を有するとされている。我々はさらにこの TAM の一部が、がん免疫療法で注目を集めている PD-1 (Programmed cell death-1) を発現している事を見出した。PD-1 は免疫チェックポイント受容体で、活性化された T 細胞上で発現上昇し、腫瘍細胞上の PD-1 リガンドである PD-L1 (programmed cell death ligand 1) と結合することで T 細胞活性を阻害し抗腫瘍免疫における免疫寛容を引き起こすことが知られている。抗 PD-1/PD-L1 抗体薬で両者の結合を阻害すると T 細胞による効果的ながん免疫応答が誘導されるため、免疫チェックポイント阻害療法として口腔がんを含む様々な癌患者で顕著な効果が見られている。PD-1/PD-L1 は主に T 細胞/腫瘍細胞上に発現しているが、一部の報告ではマクロファージや MDSC などのミエロイド系細胞群での発現が示されている。そのため放射線照射後に腫瘍内に誘導され、腫瘍の再発をサポートしている TAM や MDSC 上で PD-1/PD-L1 が発現し、免疫寛容を促進していることが考えられ、これらの細胞を治療ターゲットとすることで免疫チェックポイント阻害剤の効果増強につながる可能性が考えられる。また同一腫瘍内の癌細胞の不均一性も治療抵抗性に繋がることから、これらの壁を打ち破る複合的ながん治療戦略が必要であるが、この臨床的複雑性をトレースし、かつハイスループットで薬剤をスクリーニングできるアッセイ系がないため、開発がより困難となっている。

2. 研究の目的

これからのがん治療においては、いかにがんの不均一性を標的にした治療方法を確立できるか、またそれを実現させるために有効なハイスループットなアッセイ系の確立が重要と思われる。そのため本研究の目的は、個々のがんの heterogeneity “不均一性” を忠実にトレースさせる in vitro の培養系を確立させ口腔がんにも有効な治療薬をスクリーニングし、さらに多剤を組み合わせた治療法を探索することである。

3. 研究の方法

(1) 口腔がんオルガノイドを用いたドラッグスクリーニング

従来の含血清培地内で接着性プレートを用いた 2 次元培養は生体内における状況とは大きく異なり、がん細胞が備えている特性 (不均一性や薬剤耐性など) が多くの場合失われている。これまで固形癌において様々な 3 次元培養法の作製が試みられてきたが、がん細胞のみを用いたスフェロイドや癌シストでは細胞極性や不均一性などはある程度再現できるものの、微小環境因子を再現することはできない。一方研究代表者が確立した口腔がんオルガノイドは間質細胞と血管内皮細胞と 3 次元共培養することで微小環境を再現させ、腫瘍組織の性質を維持したモデルである。本研究では世界でもほとんど報告のない、より生体に近い微小環境を再現した口腔癌オルガノイドを用いることで、臨床応用に直結するトランスレーショナル研究としてドラッグスクリーニングを行う。

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 (Elplasia® kuraray) で培養する。まずは血管内皮細胞や MSC などの微小環境の構築が癌細胞の特性に与える影響を解析するため、口腔がん細胞株を用いて二次元培養や、3次元培養とオルガノイドの薬剤感受性、増殖能などを解析する。

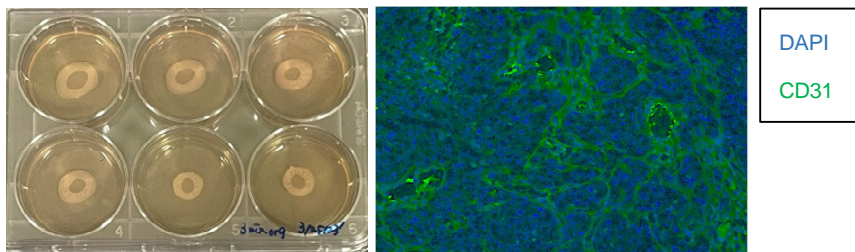
PD 口腔がんオルガノイドの作製

生検で得られた臨床検体から癌細胞をマトリゲル上で初代培養しその後オルガノイドを上記同様の方法で作製する。すでに 20 種類ほどの口腔癌検体で樹立に成功している。今回は間質を含めて全ての細胞を PD 細胞で行えるようにアッセイ系の確立を行う。さらに作製されたオルガノイドの不均一性や患者検体との類似性を解析するため、標本を作製し組織学的解析とゲノム解析を行う。検体採取が可能であれば再発腫瘍との比較検討も行う。

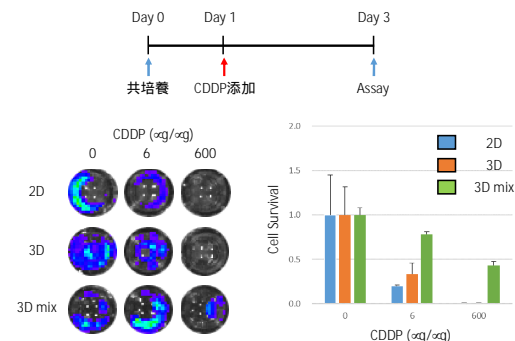
PD がんオルガノイドを用いて化合物ライブラリーを用いて薬剤感受性試験を網羅的に行う。口腔がんの生存を示すため、あらかじめレンチウイルスを用いて luciferase を遺伝子導入し、これを指標に薬剤感受性の解析を行う。薬剤に関しては既存の化合物ライブラリーを用いて行う。

4. 研究成果

まずは in vitro でがん微小環境を再現するため、口腔癌微小環境オルガノイドの作製を行った。様々な比率でヒト舌扁平上皮癌細胞 OSC-19、ヒト血管内皮細胞、ヒト間葉系細胞をマトリックスゲルコーティングしたプレート上で3次元にて共培養を行ったところ、球状の細胞塊を形成する適正な比率が確立された。また細胞塊を固定し薄切し蛍光免疫染色を行ったところ、癌細胞の周囲に血管内皮細胞がチューブフォーメーションを行なっていることが確認された。



次に口腔癌微小環境オルガノイドの薬剤耐性能について、OSC-19 に Luciferase を導入した細胞 OSC-19Luc を用いて、単独で 2 次元培養したもの(2D)、単独で 3 次元培養したもの(3D)、および口腔癌微小環境オルガノイド(3D mix)で抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)に対する薬剤感受性を luciferase 活性で測定したところ、口腔癌微小環境オルガノイドでより高い薬剤耐性能が認められた。



次に生検や手術で得られた口腔がん検体を 3 次元培養にて行い、患者由来 (patient-derived: PD) オルガノイドの作成も行なった。

現在までに 100 種類以上の PD オルガノイドの培養を行なっているが、継代の際に増殖活性が失われるなどの問題があり薬剤感受性試験までは至らなかった。

また放射線感受性試験も行なったが、コロニー形成アッセイにおけるコロニー形成が不安定で明確な傾向が見られていない。

以上より口腔がん微小環境オルガノイドでは、より抗がん剤耐性が見られたこと、マウス再発モデルにおける腫瘍増殖能が高かったことなどから、口腔がん微小環境オルガノイドは腫瘍組織の性質をトレースした良好な *in vitro* モデルであることが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ami Shimoda, Haruka Yoshii, Kenji Mitsudo, Mitomu Kioi
2. 発表標題 Development of stroma cells-rich oral cancer organoid for functional analysis of tumor microenvironment
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Mitomu Kioi
2. 発表標題 Gene expression profiling in recurrence of oral cancer involved in tumor microenvironment change and cancer stem cells
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mitomu Kioi, Isono Hitoshi, Shintaro Nakajima
2. 発表標題 Specific oral microbiome is closely associated with oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 來生 知
2. 発表標題 口腔癌の難治性を導く微小環境変化とそのターゲッティング
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会（ハイブリッド開催）シンポジウム7「がん微小環境の理解から迫る革新的治療法開発への試み」 共催：先端歯学教育研究ネットワーク（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島慎太郎, 來生 知
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者が保有する特徴的な歯周病原菌の同定
3. 学会等名 第63回日本歯科基礎医学会学術大会 (ハイブリッド開催)
4. 発表年 2021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	谷口 英樹 (Taniguchi hideki) (70292555)	横浜市立大学・医学研究科・客員教授 (22701)	

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