

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18736

研究課題名(和文) 頭頸部がんにおける微小環境を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of tumor stroma-related genes in head and neck cancer

研究代表者

萬 顕 (Yorozu, Akira)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20792120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮がん(OSCC)臨床検体におけるAEBP1発現を免疫組織染色で解析結果、AEBP1はCAFで高発現し、かつAEBP1発現は腫瘍サイズや組織学的悪性度と相関した。CAFにおけるAEBP1の発現は、OSCC細胞との共培養やTGF- β 刺激により誘導された。CAFにおいてAEBP1をノックダウンすることで、がん細胞の遊走・浸潤能が低下することが明らかとなった。また、がん細胞をリコンビナントAEBP1タンパクで処理することで、上皮間葉転換マーカー遺伝子発現の変動が認められた。さらにCAFのAEBP1過剰発現によりがん細胞の浸潤能・xenograft形成能促進する効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AEBP1のがん間質における働きについて、いまだ研究報告はわずかである。本研究により、AEBP1が頭頸部扁平上皮がんのCAFにおいて高発現すること、CAFにおけるAEBP1の発現は、癌細胞との共培養やTGF- β 刺激により誘導されること、がん細胞の遊走・浸潤・転移の促進や、腫瘍免疫の抑制に関わることが明らかになった。今後、CAFやがん細胞においてAEBP1と相互作用する分子の同定、腫瘍間質と免疫細胞の相互作用におけるAEBP1の機能解析など、AEBP1の作用機構を解明することで、頭頸部扁平上皮がんの新規治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：First, we analyzed the expression levels of AEBP1 in oral squamous cell cancer (OSCC) by immunohistochemical staining of 49 clinical specimens. As a result, we confirmed that AEBP1 is significantly upregulated in cancer associated fibroblast (CAF) cells in tumor tissues and expression levels of AEBP1 is associated with tumor size, clinical stage, histological grade, and prognosis of OSCC patients. The expression of AEBP1 was induced by treatment of TGF- β or co-culture with OSCC cells, and depletion of AEBP1 in CAF cells inhibited migration ability and invasiveness of co-cultured OSCC cells. Additionally, we demonstrated that AEBP1 induced upregulation of several EMT related genes including vimentin and overexpression of AEBP1 in CAF cells promoted invasion of OSCC cells and tumor forming ability in mouse xenograft model.

研究分野：頭頸部がん

キーワード：頭頸部癌 癌間質 AEBP1 ACLP CAF

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織にはがん細胞以外に、がん関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblast, CAF)、腫瘍血管内皮細胞(Tumor endothelial cells, TEC)、種々の免疫細胞などを含む間質細胞が存在する。腫瘍間質細胞はがん細胞の増殖・浸潤および転移に有利な微小環境を構築することでがんの進展に関与することから、その制御が重要な治療戦略として注目されている。我々は、大腸がん間質に高発現する遺伝子として AEBP1 (AE-binding protein 1)を同定し、腫瘍血管新生促進に関わることを報告した(Cancer Sci, 2020)。AEBP1 は転写因子や分泌型タンパク質など多様な機能を有し、特に AEBP1 の主要な遺伝子産物である ACLP (aortic carboxypeptidase-like protein) は、細胞外マトリックスと相互作用することや、肺の線維化に関わることが知られている。我々は、AEBP1 の高発現が頭頸部がんにおいても予後不良と相関することを見いだした。以上から頭頸部がん間質細胞における AEBP1 の機能を解析することで、頭頸部がん微小環境の分子メカニズムを明らかにし、新たな診断・治療法の開発につなげることができると考えられた。

2. 研究の目的

我々は、AEBP1 が頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)のがん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast, CAF)において高発現していることを見出した。本研究は CAF において AEBP1 が与える影響について遺伝子発現プロファイルの解析から AEBP1 の標的遺伝子を解明すること、また、CAF の AEBP1 発現ががん細胞の遊走・浸潤・転移能に与える影響を解析することで、頭頸部がん微小環境における AEBP1 の機能を解明し、新規治療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AEBP1 遺伝子発現解析・免疫組織染色の臨床病理学的検討

正常繊維芽細胞、CAF、口腔扁平上皮がん(OSCC)細胞株における AEBP1 の発現を定量 RT-PCR で解析した。外科切除された舌癌 49 症例を対象に、CAF マーカーである α -SMA と AEBP1 の免疫組織染色を行い、それぞれの染色面積を画像解析した。また画像解析結果から、AEBP1 発現と臨床病理学的因子との相関を解析した。

(2) AEBP1 発現を誘導する因子についての検討

様々な OSCC 細胞株の上清で培養した CAF における AEBP1 の発現を定量 RT-PCR で確認した。つぎに CAF を TGF- β 1 で処理し、AEBP1 の mRNA およびタンパク発現を定量 RT-PCR 及びウエスタンブロットで検証した。

(3) AEBP1 の機能解析

AEBP1 を siRNA でノックダウンした CAF を用いて Boyden チャンバーアッセイおよびコラーゲンゲルアッセイを行い、CAF が OSCC 細胞の遊走・浸潤能に与える影響を評価した。レンチウイルスベクターで AEBP1 variant1 あるいは variant2 を過剰発現させた CAF を用いて、OSCC 細胞の 3D invasion assay や mouse xenograft 実験を行い、その効果を検討した。リコンビナント AEBP1 を種々の OSCC 細胞に添加し、Boyden チャンバーやコラーゲンゲルを使用し、リコンビナント AEBP1 が OSCC 細胞の遊走・浸潤能に与える影響を評価した。またリコンビナント AEBP1 処理をした OSCC 細胞の EMT マーカーの発現変動を定量 RT-PCR で確認した。

(4) AEBP1 発現と腫瘍免疫の関連の検討

外科切除された舌癌 49 症例を対象に、CD8 陽性 T リンパ球の免疫組織染色を行い、AEBP1 と CD8 陽性 T リンパ球の染色面積と生存率の相関を比較した。

4. 研究成果

(1) AEBP1 遺伝子発現解析・免疫組織染色の臨床病理学的検討

AEBP1 の発現を定量 RT-PCR で解析した結果、正常繊維芽細胞や CAF は OSCC 細胞株と比較し AEBP1 variant1 を高発現していることが明らかになった。外科切除された舌癌 49 症例を対象に、CAF マーカーである α -SMA と AEBP1 の免疫組織染色を行い、その発現を検討した。AEBP1 は正常間質や腫瘍細胞では発現せず、腫瘍間質において強く発現していた。それぞれの染色面積を画像解析した結果、ACLP の発現と α -SMA 発現は正の相関を示すことから、AEBP1 は CAF において高発現することが裏付けられた。AEBP1 の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した結果、AEBP1 の発現のレベルと T 因子、N 因子、臨床病期、分化度、再発は正の相関を示した。また、AEBP1 の高発現群は有意に生命予後不良であった。

(2) AEBP1 の発現を誘導する因子についての検討

OSCC 細胞株の上清で培養した CAF はコントロールと比較し、AEBP1 の発現量が増加することが確

認められたことから、がん細胞由来の液性因子の関与が示唆された。また、TGF- β 1 は CAF の AEBP1 発現を誘導した。

(3) AEBP1 の機能解析

AEBP1 のノックダウンは CAF による OSCC 細胞の遊走・浸潤能の促進効果を抑制することが明らかとなった。CAF における AEBP1 variant1 の過剰発現は、OSCC 細胞の浸潤能を促進させた。また、AEBP1 による xenograft 腫瘍形成の促進が確認された。リコンビナント AEBP1 処理をした OSCC 細胞の VIM、CDH1、CDH2、TWIST などの EMT マーカー遺伝子の発現解析から、AEBP1 が癌細胞の EMT を促進する可能性が示唆された。

(4) AEBP1 の発現が腫瘍免疫に与える影響の解析

AEBP1 と CD8 陽性 T リンパ球の免疫組織染色の画像解析から、両者は相互に排他的な分布を示し、AEBP1 陽性細胞の密度が高い腫瘍は、CD8 陽性 T リンパ球の腫瘍内浸潤が抑制される傾向にあることが示された。さらに AEBP1 高発現かつ CD8 低発現の組み合わせは、AEBP1 低発現かつ CD8 高発現の組み合わせに比べ予後不良と強く相関した。これらの結果から、AEBP1 が CD8 陽性 T リンパ球の腫瘍内浸潤を阻害する可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Yorozu Akira, Yamamoto Eiichiro, Niinuma Takeshi, Tsuyada Akihiro, Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Numata Yuto, Kai Masahiro, Sudo Gota, Kubo Toshiyuki, Nishidate Toshihiko, Okita Kenji, Takemasa Ichiro, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu, Takano Kenichi, Suzuki Hiromu	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of adipocyte enhancer binding protein 1 in endothelial cells promotes tumor angiogenesis in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1631 ~ 1644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 2. Akira Yorozu, Makoto Kurose, Takashi Kojima, Kenichi Takano, Hiromu Suzuki.
2. 発表標題 Analysis of AEBP1 in the microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 10. 萬頭, 山本英一郎, 須藤豪太, 沼田有斗, 新沼猛, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小島隆, 高野賢一, 鈴木拓.
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんの微小環境におけるAEBP1の解析.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 20. 萬頭, 山本英一郎, 須藤豪太, 新沼猛, 北嶋洋志, 甲斐正広, 高野賢一, 鈴木拓.
2. 発表標題 大腸がんにおける腫瘍血管内皮関連遺伝子の同定.
3. 学会等名 第120回北海道癌談話会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 14. 須藤豪太, 山本英一郎, 萬頭, 新沼猛, 杉本亮, 北嶋洋志, 久保俊之, 畠中柚衣, 甲斐正広, 時野隆至, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓
2. 発表標題 新規大腸がん線維芽細胞関連遺伝子の同定.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 11. 青木敬則, 山本英一郎, 高澤啓, 新沼猛, 山野泰穂, 萬頭, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓
2. 発表標題 SMO C1の大腸腫瘍マーカーとしての臨床的有用性の検討.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 3. 鈴木拓, 萬頭, 山本英一郎, 新沼猛, 北嶋洋志, 甲斐正広, 仲瀬裕志.
2. 発表標題 大腸がんにおけるAEBP1の発現上昇は腫瘍血管新生を促進する.
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 6. 山本英一郎, 萬頭, 新沼猛, 北嶋洋志, 須藤豪太, 甲斐正広, 高野賢一, 仲瀬裕志, 鈴木拓
2. 発表標題 AEBP1の発現上昇は大腸がんの腫瘍血管新生を促進する.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 17. 萬頭，関口翔平，山本英一郎，新沼猛，高澤啓，須藤豪太，畠中柚衣，北嶋洋志，甲斐正広，小山内誠，宮崎晃亘，高野賢一，鈴木拓。
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんの微小環境におけるAEBP1の解析。
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会。
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 18. 関口翔平，萬頭，山本英一郎，新沼猛，高澤啓，須藤豪太，畠中柚衣，北嶋洋志，甲斐正広，小山内誠，高野賢一，宮崎晃亘，鈴木拓。
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんの微小環境におけるAEBP1の解析。
3. 学会等名 第122回北海道癌談話会例会。
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 21. 須藤豪太，山本英一郎，青木敬則，高澤啓，新沼猛，久保俊之，萬頭，北嶋洋志，甲斐正広，小山内誠，仲瀬裕志，鈴木拓。
2. 発表標題 早期大腸がん浸潤先進部の分子解析。
3. 学会等名 第122回北海道癌談話会例会。
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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