

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10109

研究課題名(和文)細胞外基質環境下における腫瘍特異的なCD73誘導低酸素応答性増殖機構の解明

研究課題名(英文) Tumor-specific CD73-induced hypoxia-responsive growth mechanism in the extracellular matrix environment

研究代表者

丸山 智 (Maruyama, Satoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素誘導因子(HIF)活性化機構の標的分子の一つであるCD73の低酸素下での細胞機能における役割を調べた。唾液腺多形腺腫由来細胞系SM-AP細胞系を用いた細胞機能解析より、細胞外基質が豊富な腫瘍間質の中で、腫瘍細胞自身がCD73を発現し、腫瘍細胞の増殖や遊走能を亢進している可能性が示された。細胞増殖関連因子の網羅的解析から、CXCL10など、CD73を介した低酸素応答性増殖機構の候補分子として考えうる候補分子を見出した。ヒト腫瘍組織材料での組織学的解析から、腫瘍細胞以外にもリンパ球及び線維化等の間質誘導がみられる腫瘍では、腫瘍細胞に代わって間質細胞からのCD73供給の可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍は低酸素状態という特異な微小環境下において、低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factors: HIF)により引き起こされる低酸素応答を介した生存・増殖をおこなっている。今回、我々はHIF活性化機構の標的分子の一つであるCD73が低酸素下で細胞機能に果たす役割を検討した。その結果、細胞外基質が豊富な腫瘍間質の中で、HIF活性化機構の標的分子の一つであるCD73の高発現が、腫瘍細胞の増殖や遊走能を亢進し、生存・維持に寄与している可能性が示された。CD73を介した腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療への展望を見出すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of CD73, one of the target molecules of the hypoxia-inducible factor (HIF) activation mechanism, in cell function under hypoxia was investigated. Cell function analysis using the SM-AP cell line, a salivary gland pleomorphic adenoma-derived cell line, indicated that tumor cells themselves may express CD73 in the tumor stroma, where extracellular matrix is abundant, to enhance tumor cell proliferation and migration ability, and to survive and maintain the cells. Comprehensive analysis of cell proliferation-related humoral factors revealed several candidate molecules, such as CXCL10, that could be considered as candidate molecules for CD73-mediated hypoxia-responsive growth mechanisms. Histological analysis of human tumor tissue material suggested the possibility of CD73 supply from stromal cells instead of tumor cells in tumors with stromal induction such as lymphocytes and fibrosis in addition to tumor cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：Hypoxia HIF-1 CD73 Pleomorphic adenoma

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍は低酸素状態(Hypoxia)という特異な微小環境下にあるため、低酸素腫瘍微小環境を標的とした抗腫瘍治療法の創出が求められる。そこで、低酸素環境下での腫瘍細胞の増殖やエネルギー代謝および腫瘍細胞への免疫反応抑制や腫瘍間質細胞の機能制御などにおいて重要な役割を果たしていると考えられる低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factors: HIF)による腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構の解明を目的とし、研究を開始した。

我々は日常の病理診断業務にて口腔扁平上皮癌や唾液腺腫瘍の病理組織像を診る中で、腫瘍間質が、腫瘍自身の分泌する細胞外基質(Extracellular Matrix, ECM)が豊富に蓄積した乏血管組織で構成されていることに注目し、腫瘍間質における ECM の機能を検討することで、腫瘍細胞が低酸素下で維持・増殖できる仕組みを解明することができると考えた。そこで申請者は、唾液腺腫瘍の中で、多彩な間質形成と乏血管性を特徴とする唾液腺多形腺腫に注目し、「多形腺腫は低酸素環境下で多彩な間質を形成することで腫瘍細胞増殖が維持されている」という仮説のもと、これまで科学研究費補助金(若手研究 B、基盤研究 C)の継続的な支援を得て多面的に解析を重ねてきた。

初めに、申請者は耳下腺に発生した多形腺腫から多形腺腫由来細胞 SM-AP 細胞系を樹立し、細胞系及び組織系の両面から研究をアプローチできる環境を整えた。同時に外科材料を用いた病理組織学的解析により、腫瘍間質 ECM の一つである Heparan Sulfate Proteoglycan (Perlecan, HSPG)が細胞増殖因子のリザーバとなり、細胞増殖を維持していることを報告した。さらに樹立した SM-AP 細胞系を低酸素下で培養することで、HIF-1 $\alpha$  蛋白質レベルが有意に高く維持されるとともに、HIF-1 $\alpha$  は核へ移行し、ECM の合成が促進されること、siRNA を用いた ECM 発現抑制にて細胞増殖が抑制されることを見出した。

次に、申請者らは、HIF 活性化機構の標的分子の一つである CD73 に注目した。腫瘍微小環境における CD73 の主な機能としては、免疫活性化 ATP を免疫抑制アデノシンに変換することで、CD73/アデノシン経路を介して腫瘍自身を攻撃する NK 細胞や CTL 細胞の活性化を抑制し、免疫不活化状態を保つことが知られており、腫瘍免疫抑制機構のターゲットの一つとなっている。また、CD73 は ECM 成分と細胞の相互作用を制御し、癌の浸潤性および転移性を媒介するシグナルおよび接着分子としても機能しているといわれている。そこで、申請者らは、唾液腺腫瘍の外科材料を用いた病理組織学的解析から、腫瘍自身の分泌する ECM が豊富に蓄積している腫瘍間質の中で、腫瘍細胞自身が CD73 を発現していることに注目し、既知の CD73/アデノシン経路を介して免疫系に及ぼす機能とは別に、腫瘍細胞自身が CD73 を発現することで、生存・増殖に直接関わる機能を持っているのではないかと推測した。

すなわち、CD73 による低酸素環境下での腫瘍の低酸素応答性増殖機構を解明できれば、CD73 による細胞外アデノシンの産生を介した免疫抑制機構を標的とした免疫療法とは異なる、ECM の存在下での CD73 を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療法を創出することができると考えたのである。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、低酸素環境下である腫瘍自身が分泌する ECM が豊富に蓄積している腫瘍間質において、CD73 は、免疫不活化機構とは異なった CD73/アデノシン経路を介した腫瘍細胞自身の生存・増殖に直接関わる機能を果たしているのではないかと仮説を検証することである。特に腫瘍間質を構成する ECM が、細胞増殖因子と同様に、CD73 の可溶性フォームのリザーバとしての機能しているのではないかと考え、ECM の存在下での CD73 を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を解明することで、低酸素環境下での腫瘍の低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療法を創出することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) CD73 発現抑制による ECM の発現動態の検証：ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した SM-AP 細胞系を、通常の酸素正常培養条件(5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub>)と低酸素(5% CO<sub>2</sub>/1% O<sub>2</sub>/94% N<sub>2</sub>)の条件下で 48 時間維持できるように培養する。低酸素環境下における CD73 発現と CM 分子である、perlecan や fibronectin 合成能との関係や、siRNA 法による CD73 発現抑制下での ECM 合成能から検討する。
- (2) CD73 発現動態と腫瘍細胞の機能評価：低酸素下での腫瘍細胞における CD73 の機能を解析するために、低酸素培養条件下と通常培養条件下での SM-AP 細胞系の CD73 の発現動態を詳細に検討する。siRNA 法による腫瘍細胞での CD73 発現及び ECM 合成抑制下での、CD73 の発現動態および細胞の増殖及び遊走能を検討する。さらに CD73 のプロモータにある HIF-1 $\alpha$  結合部位の近傍に STAT3 の結合部位が存在する可能性があることから、低酸素下における CD73 発現について、STAT3 が CD73 を転写誘導する可能性についても検討する。

- (3) 細胞増殖関連液性因子の網羅的解析：腫瘍間質に存在する細胞増殖関連液性因子を抽出するために、SM-AP 細胞系を通常培養条件下と siRNA 法による CD73 発現抑制下でそれぞれ培養した後、培養上清を回収し、Proteome Profiler™ 抗体アレイキット(R&D systems)を用いて細胞増殖関連液性因子の網羅的解析を行い、これまでの研究ですでに得られた低酸素培養条件下と通常培養条件下での網羅的解析の結果と比較することで、CD73 を介した増殖に関わる低酸素応答性増殖機構の候補分子を見出す。
- (4) ヒト腫瘍組織材料を用いた組織学的解析：ヒト手術外科材料での CD73 の発現パターンを確認するために、ヒト多形腺腫組織をはじめとした、ヒト唾液腺腫瘍組織手術材料パラフィンブロックを用いた免疫組織化学にて検証する。特に CD73 免疫陽性のパターンから良性・悪性及び細胞分化の観点からの腫瘍細胞性格や腫瘍間質に見られる発現パターンについて、具体的に検討する。

#### 4. 研究成果

- (1) CD73 発現抑制による ECM の発現動態の検証：低酸素環境下における CD73 発現と ECM 合成能との関係を解析するために、SM-AP 細胞系を用いた siRNA 法による CD73 発現抑制下での ECM 分子である、perlecan や fibronectin の発現を検討した。SM-AP1 細胞系で HIF-1 $\alpha$  の発現抑制により、perlecan や fibronectin の発現が抑制される傾向があるのに対して、SM-AP1/4 とともに CD73 発現抑制では perlecan や fibronectin の発現抑制はみられなかった。よって CD73 発現は ECM 合成能に影響を及ぼしていない可能性が示唆された。
- (2) CD73 の発現動態及び腫瘍細胞の機能評価：低酸素下での腫瘍細胞における CD73 の機能を解析するために、siRNA 法による CD73 発現抑制下での、SM-AP 細胞系を用いた細胞の機能評価を行った。SM-AP1/4 はともに、CD73 遺伝子は通常の培養条件下に比べて低酸素培養条件下 (1%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>/94%N<sub>2</sub>) で高発現し、CD73 の発現を抑制することで細胞増殖が抑制された。通常培養条件及び siRNA を用いた CD73 発現抑制下で SM-AP 細胞系を培養したのちに、トランスウエルチャンパーにまきおした後、24 時間培養後の細胞遊走能の検討から、細胞遊走も抑制されることも確認できた。また、低酸素培養条件下と通常培養条件下での SM-AP 細胞系における STAT3 の発現動態を調べてみると、SM-AP1/4 とともに、通常の培養条件下に比べて低酸素培養条件下で STAT3 が高発現していることがわかった。そこで、siRNA 法による CD73 及び HIF-1 $\alpha$  発現抑制下での STAT3 の発現を比較してみると、SM-AP1/4 とともに CD73 抑制下では、STAT3 の発現抑制傾向が見られたものの、HIF-1 $\alpha$  発現抑制下では STAT3 の発現抑制はみられなかった。以上の結果からは、低酸素下における STAT3 の発現上昇は、HIF-1 $\alpha$  を介さない別の経路である可能性も示唆された。
- (3) 細胞増殖関連液性因子の網羅的解析：SM-AP 細胞系を通常培養条件下及び siRNA 法による CD73 発現抑制下で培養した後、各培養上清を回収し、Proteome Profiler™ 抗体アレイキット(R&D systems)を用いて細胞増殖関連液性因子の網羅的解析を行った。さらに先の研究でおこなった低酸素培養条件下と通常培養条件下での細胞増殖関連液性因子の網羅的解析の結果とも併せて検討した結果、IP-10 (別名 CXCL10) など、低酸素環境下で発現が促進し、一方、CD73 発現抑制下で発現が低下する、CD73 を介した低酸素応答性増殖機構の候補分子として考えうる、いくつかの候補分子を見出した。
- (4) ヒト腫瘍組織材料を用いた組織学的解析：ヒト良性および悪性唾液腺腫瘍手術材料パラフィンブロックから切片を作製し、免疫組織化学的に検討した。CD73 免疫陽性のパターンは、大きく分けると 3 種類が確認できた。1 つ目は腫瘍細胞自身が陽性となるパターンで、主に多形腺腫などの良性腫瘍で認められた。2 つ目は、腫瘍細胞自身に代わって腫瘍間質細胞が陽性となるパターンで、主に腺様嚢胞癌など悪性腫瘍やリンパ球及び線維化等の間質誘導がみられる腫瘍に多く認められた。3 つ目は、悪性腫瘍の中でも悪性化や個在性に浸潤する腫瘍細胞に特に陽性となるパターンであった。
- (5) 実験結果の評価と研究の総括：細胞外基質が豊富な腫瘍間質の中で、腫瘍細胞自身が HIF 活性化機構の標的分子の一つである CD73 を発現することで、腫瘍細胞の増殖や遊走能を亢進し、生存・維持している可能性が示された。CD73 発現動態に関与する分子として STAT3 について検討したが、CD73 発現抑制下で STAT3 の発現抑制傾向がみられたものの、HIF-1 $\alpha$  を介さない別の経路での STAT3 発現上昇の可能性が示唆された。Proteome Profiler™ 抗体アレイキット(R&D systems)を用いた細胞増殖関連液性因子の網羅的解析から、IP-10 (別名 CXCL10) などいくつかの候補分子を見出した。またヒト腫瘍組織材料を用いた組織学的解析からは、腫瘍細胞以外にもリンパ球及び線維化等の間質誘導がみられる腫瘍では腫瘍細胞に変わって間質細胞からの CD73 の供給の可能性も示唆された。まずは次に、低酸素環境下において HIF 活性化による CD73 が制御する候補分子として、液性因子であるケモカイン CXCL10 に焦点を当て、ECM を背景に CD73 を介した CXCL10 が腫瘍細胞の自己制御にどのような役割を果たしているのかを検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maruyama S, Yamazaki M, Abe T, Kato Y, Kano H, Sumita Y, Tomihara K, Tanuma J.	4. 巻 51
2. 論文標題 Liquid based cytology for differentiating two cases of pemphigus vulgaris from oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Cytopathology	6. 最初と最後の頁 E170-E175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dc.25117.	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 -

1. 著者名 Maruyama S, Yamazaki M, Abe T, Cheng J, Saku T, Tanuma J.	4. 巻 11
2. 論文標題 Hypoxia-Induced Biosynthesis of the Extracellular Matrix Molecules, Perlecan and Fibronectin, Promotes the Growth of Pleomorphic Adenoma Cells In Vitro Models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2981 ~ 2981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11112981.	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 -

1. 著者名 Kawaharada M, Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Chan NN, Kitano T, Kobayashi T, Maeda T, Tanuma JI.	4. 巻 23(3)
2. 論文標題 Novel cytological model for the identification of early oral cancer diagnostic markers: The carcinoma sequence model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13196.	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 -

1. 著者名 Kawaharada M, Maruyama S, Yamazaki M, Abe T, Chan NN, Funayama A, Uenoyama A, Akimori T, Tomihara K, Tanuma JI.	4. 巻 24(5)
2. 論文標題 Clinicopathologic factors influencing the screening accuracy of oral cytology: A retrospective cohort study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13505.	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 -

1. 著者名 Maruyama S, Mori T, Yamazaki M, Abe T, Ryo E, Kano H, Hasegawa G, Tanuma JI	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Central mucoepidermoid carcinoma arising directly from a glandular odontogenic cyst of the mandible: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagn Pathol.	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-021-01124-0.	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 -

1. 著者名 Haga K, Yamazaki M, Maruyama S, Kawaharada M, Suzuki A, Hoshikawa E, Chan NN, Funayama A, Mikami T, Kobayashi T, Izumi K, Tanuma JI.	4. 巻 14(12)
2. 論文標題 Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- /SOX9 axis in cancer progression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 101236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101236. Epub 2021 Oct 5.	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 -

1. 著者名 Kawaharada M, Maruyama S, Abe T, Yamazaki M, Kurokawa A, Katagiri W, Takagi R, Hayashi T, Kobayashi T, Tanuma JI.	4. 巻 132(6)
2. 論文標題 Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders in the oral cavity: a clinicopathologic study of 4 cases and literature review.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.	6. 最初と最後の頁 687-697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oooo.2021.05.015. Epub 2021 Jun 7.	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13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 唾液腺多形腺腫由来細胞は低酸素環境下にてCD73 による増殖及び遊走能を亢進する.
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部達也, 山崎 学, 丸山 智, ニェイン ニェイン チャン, 田沼順一
2. 発表標題 頭頸部癌特異的スプライシングイベントの探索.
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 学, 阿部達也, 丸山 智, 田沼順一
2. 発表標題 同種死細胞により誘導される口腔扁平上皮癌細胞の活性化メカニズム.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 良性および悪性唾液腺腫瘍の診断におけるCD73免疫組織化学的検索.
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山 智
2. 発表標題 前癌病変としての上皮性異形成の診断、治療、予後 -特にhigh-grade dysplasiaについて-
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部達也, 山崎 学, 丸山 智, 河原田壮史, Nyein Nyein Chan, 北野 太一, 田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるIadigin-1の上皮性格維持及び間質浸潤制御機能.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎 学, 阿部達也, 丸山 智, 河原田壮史, チャンニェインニェイン, 河原田壮史, 田沼順一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるTLR-NF- B経路を介した死細胞誘導性活性化.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 天疱瘡2例のLBC法における細胞像の検討.
3. 学会等名 第39回新潟県臨床細胞学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nyein Nyein Chan , Manabu Yamazaki, Satoshi Maruyama, Tatsuya Abe, Tadaharu Kobayashi, Jun-ichi Tanuma.
2. 発表標題 Cholesterol promotes oral cancer cells migraion by regurating front-rear cell polarity.
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 河原田壮史, Nyein Nyein Chan, 田沼順一
2. 発表標題 低酸素環境下でCD73は唾液腺多形腺腫由来細胞の増殖及び遊走を亢進する.
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 低酸素応答性CD73は唾液腺多形腺腫由来細胞の増殖及び遊走を亢進する.
3. 学会等名 第17回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 智
2. 発表標題 口腔領域の上皮性異形成・上皮内癌について.
3. 学会等名 第12回新潟県臨床細胞学会研修会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山 智
2. 発表標題 臨床及び免疫組織化学的解析に基づく口腔上皮性異形成の客観的病理組織診断の均霑化をめざして
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会(招待講演)
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	阿部 達也 (Abe Tatsuya)  (70634856)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	山崎 学 (Yamazaki Manabu)  (10547516)	新潟大学・医歯学系・准教授  (13101)	
研究分担者	田沼 順一 (Tanuma Jun-ichi)  (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	

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