

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10149

研究課題名（和文）抗腫瘍性ケモカインCXCL14C末端ドメインを応用した次世代の癌転移阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of a new cancer metastasis inhibitor using the C-terminal domain of the anti-tumor chemokine CXCL14

研究代表者

小澤 重幸（Ozawa, Shigeyuki）

神奈川県大学・歯学部・特任准教授

研究者番号：40434394

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）：癌細胞の転移を抑制する抗がん剤の開発が期待されている。申請者らは、CXCL14を応用した新たな癌転移阻害剤の開発を目的とし、CXCL14の転移抑制メカニズムを解明した。近年、すべての癌細胞が転移するわけではなく、癌細胞群のなかにわずかに存在する癌幹細胞が、癌の転移に関与することが明らかとなっている。我々はCXCL14が頭頸部扁平上皮癌細胞を高分化させることによって、転移しにくい癌細胞に変化させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国民の健康に対する知識及び理解の向上によって、悪性腫瘍の早期発見や早期治療が可能となっている。それに伴い、癌治療の成績は良好となっているが、遠隔臓器への転移を生じてしまった患者への新たな治療方法は確立していない。担癌患者の死亡率に関与する因子は、遠隔臓器への転移であり、新たな治療法開発のためにも、癌細胞の遠隔器転移を制御するメカニズムの解明が切望されている。これまでに申請者らは、CXCL14が癌細胞の他臓器への転移を抑制することを証明した。本研究は、CXCL14が癌幹細胞を転移しにくい癌細胞へ分化誘導することを明らかにした。本研究は、今後の新たな癌転移阻害剤の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：It is essential to develop anticancer drugs that suppress cancer cell metastasis. We aimed to elucidate the mechanism of metastasis suppression by CXCL14 and develop a new anticancer drug using the mechanism. Recent studies have clarified that not all cancer cells metastasize but only a few cancer stem cells, which are found in a group of cancer cells, are involved in cancer metastasis. We found that CXCL14 induced the differentiation of cancer stem cells, which were less tumorigenic.

研究分野：口腔外科

キーワード：CXCL14 頭頸部扁平上皮癌 転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CXCL14 は、1999 年に悪性腫瘍で発現が消失するケモカインとしてクローニングされた分子である。ケモカインは細胞に対して化学遊走性を示すサイトカインであり、インターロイキンなどが挙げられる。ケモカインのアミノ酸配列にはある一定の規則があり、必ず 4 つのシステインが順序だった部位に存在する。CXCL14 の成熟したアミノ酸配列は、N 末端から ELR 配列 (ELR 配列があれば血管新生促進作用、欠失していれば血管新生抑制作用を有するアミノ酸配列) が欠失した C (システイン)-X (リシン)-C (システイン) であり、CXCL14 は nonELR モチーフ CXC ケモカインとして分類された。ケモカインは、構造から分子機能が予想されるため、CXCL14 の機能は、血管新生抑制作用と免疫系細胞の走化性に関与すると想定された。これまでの CXCL14 の研究は、CXCL14 がさまざまな種類の癌細胞で発現消失する分子であったことから、CXCL14 は癌抑制機能を有する遺伝子として考えられていた。また、CXCL14 の癌抑制メカニズムについても、CXCL14 の分子構造から、B 細胞や、樹状細胞、NK 細胞などの免疫系を活性化、もしくは、血管新生抑制作用による癌抑制メカニズムとして仮定されていた。実際のところ、実験条件によって、CXCL14 による免疫細胞の反応は異なり、さまざまな免疫系細胞の走化性に関与する、もしくは関与しないなどの議論の対象となっていた。CXCL14 の癌組織における血管新生抑制作用についても決定的な結果は得られず、正常組織において血管新生促進作用を有するケモカインの機能を阻害する程度であった。現在でも、CXCL14 と悪性腫瘍の研究は、CXCL14 の発現レベルと癌細胞の悪性度についての研究にとどまっており、癌細胞の発生元組織によっては、CXCL14 は癌増悪因子としてさえ報告されている。近年、CXCL14 の研究は他分野でも盛んに行われており、本来のケモカインとしての感染に対する防御反応や炎症反応など多岐にわたる。また、CXCL14 ノックアウトマウスにおいて、高栄養食を摂取させてもそのマウスは肥満にならず、CXCL14 がインスリン抵抗性に関与したことから、糖尿病や肥満の原因遺伝子としても研究が進んでいる。我々も、癌のみならず、正常組織における CXCL14 に対する免疫染色を行ったところ、基底細胞層では CXCL14 は染色されず、分化レベルの高い顆粒層や有棘細胞層で発現が認められること、癌組織においても高分化扁平上皮癌が構築する癌真珠周囲で発現が上昇する可能性を示してきた。このデータをもとに、培養細胞で未分化上皮細胞モデルとして高分化扁平上皮癌細胞を分化誘導刺激すると CXCL14 の発現が上昇することを明らかにしてきた。本研究は、CXCL14 が有する癌の他臓器転移阻害メカニズムの解明として、これまで報告されてきた CXCL14 の免疫系や血管新生抑制作用以外の新たなアプローチであり、CXCL14 をターゲット分子とした、かつてない癌転移抑制剤開発の一助となる研究と考える。

### 2. 研究の目的

近年、癌の検査や診断技術の進歩により、担癌患者は早期発見、早期治療されることにより、癌治療の成績が向上されている。しかしながら、その中で、一番の問題となっているものが、所属リンパ節を含めた他臓器転移の有無であり、担癌患者の死因のほとんどは転移による制御不能によるものである。現在、多くの癌研究者によって転移阻害剤の開発が行われているが、決定的なものはいまだ存在しない。転移阻害剤として検討される事項は、増殖や浸潤に関与する責任遺伝子、免疫系、および血小板凝集性に関与する遺伝子などを対象に行われている。癌細胞の転移が成立するメカニズムとして、Seed and soil theory が挙げられる。これは癌細胞を種 (Seed)、転移先臓器を肥沃な土壌 (soil) に例えた癌の転移のメカニズムであり、現代においても普遍的な事象である。管腔内の流れに乗った癌細胞は、物理的な刺激に耐えながら管腔壁をローリングする。その多くは死滅するものの、生存できた癌細胞は、標的とする臓器まで転がり続ける。その後、転移先臓器へ到達すると、1 つの癌細胞が管腔内壁を構成する細胞間隙をすり抜け、細胞間質で定着し腫瘍塊を形成する。これは、炎症性サイトカインを産生した組織へ、免疫系細胞が導入されるシステムに類似する。Seed and soil theory が指摘する重要なステップは 2 つあり、(1) 特定臓器で管腔から癌細胞がすり抜けること、(2) たった 1 つの癌細胞が定着し、腫瘍塊を形成するまで増殖できることであり、これを肥沃な土壌と例えている。また、すべての癌細胞がこの転移能を有するわけではなく、癌細胞群の中にわずかに存在する分化レベルが著しく低い癌幹細胞がその機能を有することが明らかとなっている。さまざまなケモカインが癌の転移に関与することが報告されており、CXCL14 と相互作用を示すケモカイン SDF-1 が、我々が対象とする頭頸部扁平上皮癌細胞と同様、高確率で肺転移を示す乳癌で高発現している分子であることが報告されている。これまで我々は、CXCL14 が癌抑制分子であることのみならず、CXCL14 のトランスジェニックマウスにおいて、CXCL14 が悪性黒色腫の肺転移を著しく阻害する分子であることを明らかにしてきた。本研究は、CXCL14 の新たな癌転移メカニズムを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

頭頸部扁平上皮癌細胞株 HSC-3 をもとに、CXCL14 の強制発現ベクターを遺伝子導入し、安定して CXCL14 を高発現する癌細胞 (HSC-3 細胞株 CXCL14 安定強制発現 HSC-3 細胞)、および CXCL14 の遺伝子発現をウイルスベクターで著しく低下させた癌細胞 (CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞) を準備した。それぞれの癌細胞を *in vitro* で培養し、細胞増殖に変化を示すかどうか検討した。また、以前、当院で行った研究テーマで、CXCL14 が正常扁平上皮の分化に關与するデータに基づき、前述した各培養細胞、およびその移植腫瘍細胞から採取した RNA を用いて、RT-PCR 法で各癌細胞における CXCL14、癌幹細胞マーカー、および上皮分化マーカーの遺伝子発現レベルについて比較検討を行った。*in vivo* の実験系でそれぞれの癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、経時的に腫瘍サイズを測定した。形成された腫瘍がネクローシスを生じ縮小、もしくは腫瘍増大が見込まれなくなった時点で移植実験を終了とし、解剖することでリンパ節を含めた癌細胞の各臓器への転移の有無について検討した。

### 4. 研究成果

HSC-3 細胞株、CXCL14 安定強制発現 HSC-3 細胞および CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞それぞれにおいて、CXCL14 の発現レベルを比較した。HSC-3 細胞株と比較し CXCL14 安定強制発現 HSC-3 細胞は 1000 倍以上、CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞は 1/1000 以下の遺伝子発現レベルであった。それぞれの細胞を培養し、細胞形態および細胞増殖を比較した結果、*in vitro* では、細胞形態および細胞増殖に明らかな変化は認められなかった。それぞれの細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、経時的に腫瘍サイズを比較検討した結果、HSC-3 細胞株と比較し、CXCL14 安定強制発現 HSC-3 細胞は背部皮下への癌細胞の定着が著しく悪く、さらには形成された腫瘍塊のサイズも明らかに小さかった。一方、CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞は、HSC-3 細胞株より形成された腫瘍塊のサイズが大きい結果を得た。以上の結果から、CXCL14 の遺伝子発現は、マウス背部皮下組織への癌細胞の定着に關与することが明らかとなった。前述した段階でマウスを解剖し、それぞれの癌細胞におけるリンパ節を含めた他臓器転移を確認したが、どの細胞においても転移は認められなかった。HSC-3 細胞自体のマウスにおける転移能が著しく低いためと考えられた。*in vitro* の実験において、上皮分化マーカーであるインボルクリン、TGM1、TGM3 は、前述した CXCL14 の発現が異なる 3 つの癌細胞群において、CXCL14 の発現に伴いそれぞれの上皮分化マーカーが上昇する結果を得たことから、CXCL14 が癌細胞を分化誘導する可能性が示された。HSC-3 細胞株および CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞の移植腫瘍における癌幹細胞マーカー KLF4 および NANOG の遺伝子発現を比較検討したところ、CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞では、明らかに KLF4 および NANOG の発現が上昇していた。以上のことから CXCL14 は癌幹細胞の減少に關与することが示唆された。また、*in vitro* の実験系で、癌幹細胞マーカーである CD44V3、V6、V9 は、HSC-3 細胞と比較し、CXCL14 安定発現低下 HSC-3 細胞で高値を示したことから、CXCL14 は癌幹細胞の発生を阻害する可能性が示された。本実験では、使用した各細胞で他臓器転移を認めることはできなかったが、(1) CXCL14 の発現が移植腫瘍の定着に關与すること、(2) CXCL14 発現低下が癌幹細胞の誘発に關連性があることが明らかとなった。目的の項目に記載したように、転移メカニズムの 1 つのポイントである癌細胞の定着に CXCL14 は阻害作用を示す、そしてその理由として、CXCL14 は癌幹細胞を転移しない分化した癌細胞へと分化誘導する可能性が考えられた。本研究は、CXCL14 の転移抑制メカニズムの解明のみならず、癌幹細胞を消失させる新たな手掛かりとなる研究と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	畑 隆一郎  (Hata Ryu-ichiro)  (10014276)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特任教授   (32703)	
研究分担者	安部 貴大  (Abe Takahiro)  (20383250)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授   (32703)	
研究分担者	讃岐 拓郎  (Sanuki Takuro)  (40533881)	神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・教授   (32703)	

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