

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861525

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞を標的とした頭頸部癌の新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategies targeting cancer-associated fibroblasts

研究代表者

豊田 実 (Toyoda, Minoru)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70344942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌微小環境における癌関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblasts: CAFs)に着目して、癌組織における免疫抑制ネットワーク形成における役割を解析した。

CAFsはT細胞の増殖能を抑制し、その抑制機構にはB7H1/B7DC、TGF- $\beta$ 、VEGFが関与していた。またCAFsはT細胞にアポトーシスを誘導することや制御性T細胞を誘導することがわかった。単球に対しては免疫抑制効果を有するM2マクロファージに優位に分化させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether cancer-associated fibroblasts (CAFs) within the tumor microenvironment (TME) in head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN) contributed to promoting immunosuppression and evasion from immune surveillance.

CAFs suppressed T cell proliferation through B7H1/B7DC, TGF-beta, and VEGF. Moreover, peripheral blood mononuclear cells co-cultured with the supernatants of CAFs preferentially induced T cell apoptosis and regulatory T cells. CAFs could induce the immunosuppressive phenotype of tumor-associated macrophages, and the high intensity of CAFs was the significant independent prognostic factor of SCCHN. Thus, CAFs would collaborate with tumor cells in the TME to establish an immunosuppressive network.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織内には癌細胞以外に多数の間質細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞、リンパ球など)が存在しており、間質細胞が占める割合が癌細胞より高いことも多い。また癌の増殖や浸潤に伴い、これら間質細胞の構造や機能も劇的に変化していくと言われている。すなわち、癌が発生しても正常組織はその恒常性を保ち癌を排除していくが、癌細胞と間質細胞の相互作用により腫瘍の微小環境は癌細胞の増殖を促進するように変化していく。今回の研究では、腫瘍微小環境において癌細胞の増殖・浸潤・転移に対し最も重要な役割を演じている癌関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblasts: CAFs)に着目した。

CAFsは腫瘍組織に存在する線維芽細胞であるが、正常線維芽細胞(Normal fibroblasts: NFs)とは異なり癌の様々な特質に関わっている(Nat Rev Cancer, 2006;6:392-401)。その由来は正常の線維芽細胞以外のみならず上皮細胞、内皮細胞、間葉系細胞など非常に多様で、heterogeneityの高い細胞である。CAFsは癌細胞のみならず癌微小環境における他の間質細胞とも様々な増殖因子やケモカインの産生を通じて相互に影響を及ぼしあっていることがわかっている(Exp Cell Res 2010;316:2713-2722, Front Biosci 2010;15:166-179)。一方CAFsと宿主免疫系との関わりについては未知の部分が多く、とりわけ頭頸部癌においては報告がみられない。よって、頭頸部扁平上皮癌におけるCAFsの機能や癌細胞・免疫担当細胞との相互関係を明らかにすることは、CAFsをターゲットとした新しい治療戦略につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究はCAFsの機能や癌細胞・免疫担当細胞との相互作用を分子レベルで明らかにすることにより、癌間質をターゲットとした新しい治療戦略の開発、予後・治療効果の予測マーカーの開発を目的とした。

具体的には、癌組織にはCD4+/CD8+ T細胞、マクロファージ、ミエロイド由来免疫抑制細胞等、様々な免疫細胞が存在するが、CAFsがこれら正負の免疫応答に及ぼす影響について検討を行うことを目的とした。また、CAFsや抗腫瘍免疫応答と臨床因子・予後因子との相関について解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) CAFsの分離、培養法の確立  
頭頸部扁平上皮癌組織からCAFsを分離し、これを継代培養する方法を確立する。

(2) CAFsの細胞学的特質の解析  
CAFsの細胞学的特質について、(1)で樹立した細胞株を用いて免疫系分子を中心に解

析する。

(3) CAFsとT細胞免疫系の相互作用の解析

樹立した細胞株を用いて、CAFsがT細胞免疫系に及ぼす影響について*in vitro*で解析を行う。

(4) CAFsとマクロファージ、ミエロイド由来免疫抑制細胞の相互作用の解析

樹立した細胞株を用いて、CAFsがマクロファージの分化やミエロイド由来免疫抑制細胞の誘導に及ぼす影響について*in vitro*で解析を行う。

(5) CAFsと臨床因子・予後因子との相関に関する解析

頭頸部扁平上皮癌患者の臨床検体に対し免疫染色を行い、臨床因子・病理学的因子や予後因子との相関について解析を行う。

(6) 網羅的遺伝子発現解析

cDNAマイクロアレイを用いて、NFsと比較しCAFsの発現遺伝子を網羅的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) CAFsの分離、培養法の確立

頭頸部扁平上皮癌の手術検体より癌部・非癌部の組織をそれぞれ採取し細切後に培養し、複数回継代することでそれぞれの細胞株を樹立した。樹立したCAFsはCD11b(-) CD34(-) CD45(-) CD90(+) FAP(+) α-SMA(+)でありCAFsとして矛盾しなかった。非癌部より樹立したNFsはα-SMAの発現がなかった。以降の実験はこれをコントロールとして用いた。

(2) CAFsの細胞学的特質の解析

CAFsはPD-L1・PD-L2を発現していた。一方、NFsはこれらの分子の発現はほとんど認めなかった。CAFsではNFsと比較し*IL6*、*CXCL8*、*TNF*、*TGFβ1*、*VEGFA*のmRNAの発現が亢進していた。

(3) CAFsとT細胞免疫系の相互作用の解析

CAFsはNFsと比較し高いT細胞分裂抑制能を示し、PD-L1/PD-L2/TGF-β/VEGFを抗体ブロックあるいは中和することにより抑制が解除された。

またCAFsはT細胞アポトーシス誘導能、制御性T細胞誘導能がNFsに比べて有意に高かった。

(4) CAFsとマクロファージ、ミエロイド由来免疫抑制細胞の相互作用の解析

CAFsは免疫抑制性のM2マクロファージ誘導能を示し、誘導された細胞は高いT細胞分裂抑制能を示した。誘導されたM2マクロファージは*ARG1*、*IL-10*、*TGF-β*の遺伝子発現

が亢進していた。誘導された M2 マクロファージによる T 細胞分裂抑制能は IL-10・TGF-β 依存性であった。

(5) CAFs と臨床因子・予後因子との相関に関する解析

腫瘍組織における CAFs の発現はリンパ管浸潤、脈管浸潤、リンパ節転移、TNM ステージ、腫瘍浸潤マクロファージ数と相関した。更に、CAFs の浸潤が強い症例では、OS、PFS とも有意に低かった。

(6) 網羅的遺伝子発現解析

3 つの CAFs/NFs ペアを用いて、マイクロアレイ解析を行なったところ、症例毎で発現パターンは異なっていた。これら 3 ペアにて共通に発現が増強している分子を検索して、パスウェイ解析を行ったところ、CAFs では NFs と比較し白血球の血管外遊走能およびパキシリンシグナル経路が亢進していた。

<引用文献>

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006;6:392-401.

Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 2010;316:2713-2722.

Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumormicroenvironment. *Front Biosci* 2010;15:166-179.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Imai H, Sakakura K, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Asao T, Chikamatsu K. Prognostic significance of GRP78/BiP expression in patients with Stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Neoplasma* 2016 [Epub ahead of print]. 査読有
2. Kaira K, Toyoda M, Shimizu A, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Asao T, Chikamatsu K. Expression of ER stress markers (GRP78/BiP and PERK) in adenoid cystic carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2016;136:1-7. 査読有
3. Takahashi H, Sakakura K, Kawabata-Iwakawa R, Rokudai S, Toyoda M, Nishiyama M, Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64:1407-1417. 査読有
4. Nikkuni O, Kaira K, Toyoda M, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Suzuki M, Iijima M, Asao T, Nishiyama M, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Expression of Amino Acid Transporters (LAT1 and ASCT2) in Patients with Stage III/IV Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2015;21:1175-1181. 査読有
5. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2015;106:1-8. 査読有
6. Yokobori Y, Toyoda M, Sakakura K, Kaira K, Tsushima Y, Chikamatsu K. <sup>18</sup>F-FDG uptake on PET correlates with biological potential in early oral squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2015;135:494-449. 査読有
7. Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, Tominaga H, Oriuchi N, Nikkuni O, Suzuki M, Iijima M, Tsukamoto N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. CD98 is a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal

squamous cell carcinoma. Head Neck 2015;37:1569-1574. 査読有

8. Toyoda M, Kaira K, Ohshima Y, Ishioka NS, Shino M, Sakakura K, Takayasu Y, Takahashi K, Tominaga H, Oriuchi N, Nagamori S, Kanai Y, Oyama T, Chikamatsu K. Prognostic significance of amino-acid transporter expression (LAT1, ASCT2, and xCT) in surgically resected tongue cancer. Br J Cancer 2014;110:2506-2513. 査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 井田翔太、紫野正人、新國撰、豊田実、近松一朗 当科における頭頸部癌に対する Cetuximab の使用経験と安全性の検討 第 25 回日本頭頸部外科学会 H27. 1/29-30 (大阪府 コングレコンベンションセンター)
2. 新國撰、紫野正人、井田翔太、豊田実、近松一朗 総頸動脈結紮し救命しえた下咽頭癌の 1 例 第 25 回日本頭頸部外科学会 H27. 1/29-30 (大阪府 コングレコンベンションセンター)
3. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、新国撰、高橋克昌、近松一朗、斎藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部悪性腫瘍に対する重粒子線治療の短期成績 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会 H27. 5/20-23 (東京都東京国際フォーラム)
4. Chikamatsu K, Takayasu U, Shino M, Toyoda M, Nikkuni O. Carbon ion radiotherapy with concurrent chemotherapy for head and neck mucosal melanoma (頭頸部粘膜悪性黒色腫に対する化学療法併用炭素イオン線治療) 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 H27. 6/3-6 (神戸 神戸国

際会議場)

5. Sakakura K, Takahashi H, Toyoda M, Chikamatsu K. Relation between Tumor-associated Macrophage Subsets and CD47 Expression on Oral SCC (口腔 SCC における腫瘍関連マクロファージサブセットと CD47 の発言の関係) 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 H27. 6/3-6 (神戸 神戸国際会議場)
6. Nikkuni O, Takahashi H, Shino M, Sakakura K, Toyoda M, Takayasu Y, Chikamatsu K. Evaluation of Ultrasound Elastography for the Diagnosis of Salivary Gland Tumors (唾液腺腫瘍の診断に対する超音波エラストグラフィの評価) 第 39 回日本頭頸部癌学会ならびに第 4 回アジア頭頸部癌学会学術講演会 H27. 6/3-6 (神戸 神戸国際会議場)
7. 御任一光、井田翔太、矢島美香、中島恭子、岡宮智史、豊田実、近松一朗 気道熱傷後の気管挿管により形成された声門下肉芽の 1 例 第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会 H27. 6/25-26 (浜松市オークラアクトシティホテル浜松 アクトシティ浜松)
8. 井田翔太、御任一光、矢島美香、中島恭子、岡宮智史、豊田実、近松一朗 上咽頭腫瘍から内頸動脈狭窄による脳梗塞を発症した 1 例 第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会 H27. 6/25-26 (浜松市オークラアクトシティホテル浜松 アクトシティ浜松)
9. Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Chikamatsu K. Relation between tumor-associated macrophage (TAM) subsets and CD47 expression on squamous cell

- carcinoma of the head and neck (SCCHN) in tumor microenvironment International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> July (Tokyo 伊藤国際学術研究センター)
10. 紫野正人、豊田実、村田考啓、宮崎達也、宗田真、酒井真、桑野博行、近松一朗 赤外線サーモグラフィによる遊離空腸再建後・モニター空腸の状況判断 第 67 回日本気管食道科学会 H27. 11/19-20 (福島市 ザ・セレク トン福島 ホテル福島グリーンパレス)
  11. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗、斎藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部悪性黒色腫に対する重粒子線治療成績 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会 H26. 5/14-17 (福岡市 ヒルトン福岡シーホーク)
  12. 坂倉浩一、高橋秀行、解良恭一、豊田実、小山徹也、近松一朗 口腔扁平上皮癌における autophagy 関連分子の発現と腫瘍浸潤免疫細胞との関係 第 115 回日本耳鼻咽喉科学会 H26. 5/14-17(福岡市 ヒルトン福岡シーホーク)
  13. 安岡義人、中島恭子、紫野正人、村田考啓、豊田実、近松一朗 小児喉頭異物 3 症例の経験 第 9 回日本小児耳鼻咽喉科学会 H26. 6/6-7 (浜松市 アクティシティ浜松コンgresセンター)
  14. 坂倉浩一、高橋秀行、解良恭一、豊田実、小山徹也、近松一朗 舌扁平上皮癌における autophagy 関連分子の発現と腫瘍免疫原性との関係 第 38 回日本頭頸部癌学会 H26. 6/12-13 (東京都 東京ファッションタウンビル)
  15. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、近松一朗、斎藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部領域腺様嚢胞癌に対する重粒子線治療の短期治療成績 第 38 回日本頭頸部癌学会 H26. 6/12-13 (東京都 東京ファッションタウンビル)
  16. 矢島美香、中島恭子、平戸純子、豊田実、宮崎眞祈、近松一朗 診断に苦慮した Rosai-Dorfman disease の 1 例 第 76 回耳鼻咽喉科臨床学会 H26. 6/26-27 (盛岡市 盛岡グランドホテル)
  17. 宮崎眞祈、矢島美香、中島恭子、豊田実、近松一朗 動静脈瘻の破裂による頸部腫脹と気管狭窄の 1 症例 第 76 回耳鼻咽喉科臨床学会 H26. 6/26-27 (盛岡市 盛岡グランドホテル)
  18. 豊田実、矢島美香、宮崎眞祈、近松一朗 気管切開孔と胃瘻部に転移をきたした舌癌の 1 例 第 76 回耳鼻咽喉科臨床学会 H26. 6/26-27 (盛岡市 盛岡グランドホテル)
  19. Takayasu Y, Shino M, Toyoda M, Takahashi K, Chikamatsu K, Saitoh J, Shirai K, Ohno T, Nakano T. Results Of Carbon Ion Radiotherapy For Mucosal Malignant Melanoma Of The Head And Neck IFHNOS 5<sup>th</sup> World Congress And AHNS Annual Mtg. Marriott Marquis Hotel, NY, USA July 26-30, 2014
  20. Sakakura K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of autophagy components accumulated in oral squamous cell carcinoma IFHNOS 5<sup>th</sup> World Congress And AHNS Annual Mtg. Marriott Marquis Hotel,

- NY, USA July 26-30, 2014
21. Yokobori Y, Toyoda M, Sakakura K, Kaira K, Chikamatsu K. Biological significance of 18F-FDG PET in early stage oral squamous cell carcinoma IFHNOS 5<sup>th</sup> World Congress And AHNS Annual Mtg. Marriott Marquis Hotel, NY, USA July 26-30, 2014
  22. Sakakura K, Murata T, Toyoda M, Yokobori Y, Chikamatsu K. Therapeutic potentials of histone deacetylase inhibitors for cancer stem cell-like cell phenotype in squamous cell carcinoma of the head and neck AACR Annual Meeting 2013, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC April 6-10, 2013
  23. Toyoda M, Sakakura K, Yokobori Y, Chikamatsu K. Biological markers as predictors of clinical outcome in adenoid cystic carcinoma of the head and neck COSM Spring Meeting, JW Marriott Grande Lakes, Orlando USA, April 10-14, 2013
  24. 高安幸弘、紫野正人、豊田実、高橋克昌、近松一朗、斉藤淳一、白井克幸、大野達也、中野隆史 群馬大学における頭頸部非扁平上皮癌に対する重粒子線治療成績 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会 H25. 5/15-18 (札幌市 ロイトン札幌 ホテル札幌芸文館)
  25. 豊田実、坂倉浩一、解良恭一、横堀有紀、近松一朗 頭頸部腺様嚢胞癌の新しい予後のマーカーの検討 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会 H25. 5/15-18(札幌市 ロイトン札幌 ホテル札幌芸文館)
  26. 豊田実、坂倉浩一、解良恭一、横堀有

- 紀、近松一朗 頭頸部腺様嚢胞癌の新しい予後マーカーの検討 第37回日本頭頸部癌学会 H25. 6/13-14 (東京都 京王プラザホテル)
27. 横堀有紀、豊田実、坂倉浩一、解良恭一、近松一朗 口腔扁平上皮癌におけるFDG-PET max SUV値のimaging biomarkerとしての可能性について 第37回日本頭頸部癌学会 H25. 6/13-14 (東京都 京王プラザホテル)
  28. 横堀有紀、豊田実、近松一朗 超選択的動注化学療法併用放射線治療が著効した上顎洞筋上皮癌の1例 第75回耳鼻咽喉科臨床学会 H25. 7/11-12 (神戸市 神戸国際会議場)
  29. 豊田実、横堀有紀、近松一朗 耳下腺に生じた衝突腫瘍の1例 第75回耳鼻咽喉科臨床学会 H25. 7/11-12 (神戸市 神戸国際会議場)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
豊田実 (TOYODA Minoru)  
 群馬大学大学院 医学系研究科 助教  
 研究者番号：70344942