

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）（令和3（2021）採択分）

研究期間：2021～2023

課題番号：21KK0159

研究課題名（和文）癌関連collagenを標的とした新たな治療抵抗性の克服を目指す日米共同研究

研究課題名（英文）Japan-US Research Collaboration on the Development of a Novel Therapeutic Strategy Targeting the Cancer-Associated Collagen to Overcome Treatment-Resistant Cancer Phenotypes.

研究代表者

鶴澤 一弘（Uzawa, Katsuhiko）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30302558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,600,000円

研究成果の概要（和文）：Cre-loxPシステムを用いてtamoxifenで全臓器がLH2をノックアウトするtamoxifen誘導性のLH2-cKOマウスや骨特異的LH2-cKOマウスを作製した。LH2-cKOマウスを用いて機能解析を行い、LH2-cKOマウスにおける皮膚の創傷治癒の異常や骨の脆弱性を明らかにした。さらに、マウス由来口腔癌細胞の移植実験で、LH2の喪失により硬性コラーゲン（コラーゲンバリア）が著しく減少し、癌細胞への抵抗性が下がることが示唆された。また、癌細胞自身のLH2過剰発現口腔癌細胞株では、細胞増殖能や遊走能が亢進することも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの癌研究においては、癌細胞そのものの性質を追求し、治療抵抗性との関連を探索するアプローチが主体をなしていた。しかし、近年の癌関連線維芽細胞をはじめとする癌細胞周囲環境成分の研究が急速に進み、時にそれらが主体的な役割を果たすことが徐々に明らかとなってきた。本研究では、米国North Carolina大学のYamauchi教授との共同研究により、癌細胞の増殖や浸潤に関与（または抵抗）する硬性コラーゲンの可能性について示し、その一端を解明した。癌細胞周囲の環境に注目した新たな口腔癌治療戦略になると考えられ、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Using the Cre-loxP system, we generated tamoxifen-inducible LH2-cKO mice in which LH2 was knocked out in all organs with tamoxifen treatment and bone-specific LH2-cKO mice. LH2-cKO mice revealed abnormalities of skin wound healing and bone fragility by functional analyses. Furthermore, transplantation experiments with mouse-derived oral cancer cells showed that loss of LH2 significantly decreased stiffness collagen (collagen barrier), suggesting reduced resistance to cancer cells. In addition, overexpression of LH2 in OSCC was shown to have enhanced cell proliferation and migration abilities.

研究分野：口腔癌周囲硬性コラーゲンの微小環境機構

キーワード：Lysyl Hydroxylase 2 コラーゲンクロスリンク 口腔癌治療抵抗性 コンディショナルノックアウトマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、転移や癌治療薬の耐性出現といったいわゆる治療抵抗性は、患者の予後に多大な影響を与える。したがって、そのメカニズムの解明と有効な解除法（治療法）の開発は、特に急を要する重要な課題である。しかしながら、未だに決定的な治療法は見出されず、一旦、それらの症状が制御不能になると根治治療の対象外とされてしまうケースも少なくない。これまでの癌研究においては、癌細胞そのものの性質を追求し、上記の治療抵抗性との関連を探索するアプローチが主体をなしていた。しかし、近年の癌関連線維芽細胞をはじめとする癌細胞周囲環境成分の研究が急速に進み、時にそれらが主体的な役割を果たすことが徐々に明らかとなってきている。癌細胞が周囲に浸潤する際に、コラーゲンをはじめとする周囲細胞外基質が変化し、その遊走を助ける「硬性コラーゲン」の概念が注目されている。また、抗癌剤や免疫細胞の患部侵入を阻止する「硬性コラーゲン」の存在も示唆されている。我々と四半世紀に亘って研究を共にしてきた米国 North Carolina 大学 Yamauchi 教授が開発した高精度の collagen 架橋 (cross-link) に対する独自解析法によって、リシン水酸化酵素 2 (Lysyl Hydroxylase 2: LH2) 関連のコラーゲン線維がこの「硬性コラーゲン」である可能性が高いことがわかった (*J Clin Invest*, 2015)。

2. 研究の目的

LH2-conditional ノックアウト (LH2-cKO) マウスを独自に作製し、形態学的・組織学的・物理的・生化学的特性について解析する。さらに、その LH2-cKO マウスに、マウス由来の癌細胞を移植し、「硬性コラーゲン」と癌進展能について解析し、癌の浸潤・増殖機構の一端を解明することを目的とした。また、Yamauchi 教授の独自技術である collagen cross-link 解析技術を米国 North Carolina 大学の研究室に若手研究者 (研究分担者) を直接赴かせて体現・習得させることで、その技術や考え方を当教室に還元させること、ならびにグローバルな視野を有した国際的に活躍が期待できる若手研究者の育成を図ることも本国際共同研究の重要な目的に掲げた。

3. 研究の方法

(1) LH2-cKO マウスの作製

- a. 薬剤誘導性 (タモキシフェン誘導性) の全身性 LH2-cKO マウスの作製
- b. 組織特異的 (骨特異的) LH2-cKO マウスの作製

(2) 上記 LH2-cKO マウスの多角的な解析

形態学的・組織学的・物理学的 (機械的試験) ・生化学的 (collagen cross-link) 解析

(3) 上記 LH2-cKO マウスを用いた腫瘍形成能・増殖能・浸潤能の検討

LH2-cKO マウスとコントロールマウスにマウス由来の口腔癌細胞を移植し、移植モデルを作成し、腫瘍形成能・増殖能・浸潤能についての解析

(4) LH2 過剰発現における口腔癌腫瘍増殖能・浸潤能・転移能の検討

LH2 過剰発現口腔癌細胞での機能解析および臨床検体における LH2 発現解析・collagen cross-link 解析

(5) ドッキングシミュレーションより LH2 選択的な低分子化合物を検索・同定

LH1 および LH3 には親和性を持たず、LH2 のみに親和性のある低分子化合物の検索・同定

4. 研究成果

(1) LH2-cKO マウスの作製

LH2 のコンベンショナル KO は胎生致死を招くことが判明したために (Kasamatsu *et al.*, *BBRC*, 2019), 図 1 の様に Cre-loxP システムを用いた LH2 コンディショナルノックアウトマウスを作製した。図 1 の様に loxP/Cre や Frt/Flp の位置を調整して作製し、コンディショナルの要件を満たしたマウスを作成した (LH2^{lox/lox})。最初に、この LH2^{lox/lox} マウスと CAG-Cre マウスとの交配を行うことにより、タモキシフェン作用することにより全臓器が LH2 をノックアウトするタモキシフェン誘導性の LH2-cKO マウス (LH2^{lox/lox}CAG-Cre マウス) を作製し、そのマウスは胎生致死を回避したことを確認した (Nozaki *et al.*, *BBRC*, 2021)。

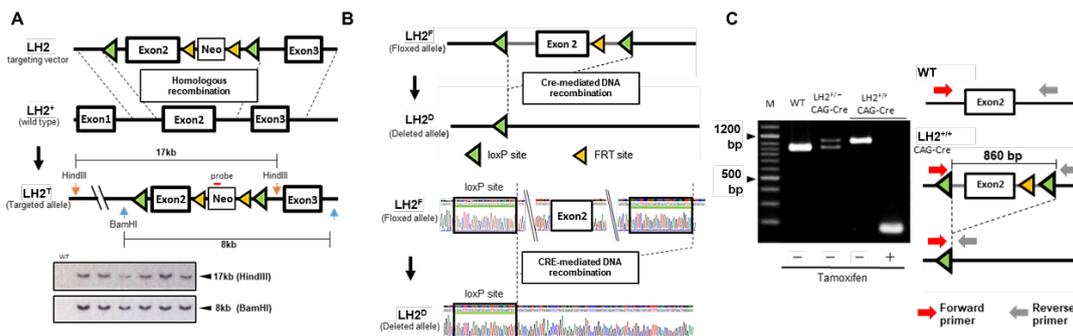


図 1: Cre-loxPシステムを用いたLH2コンディショナルノックアウトマウスの作製

その次に、LH2^{flox/flox} マウスと骨を標的とした Osteocalcin (OC)-Cre マウスとの交配を行うことにより、骨特異的に LH2 をノックアウトする LH2-cKO マウス (LH2^{flox/flox}OC-Cre マウス : bsLH2-cKO マウス) を作製した (図 2)。このマウスも胎生致死を回避することを確認した。

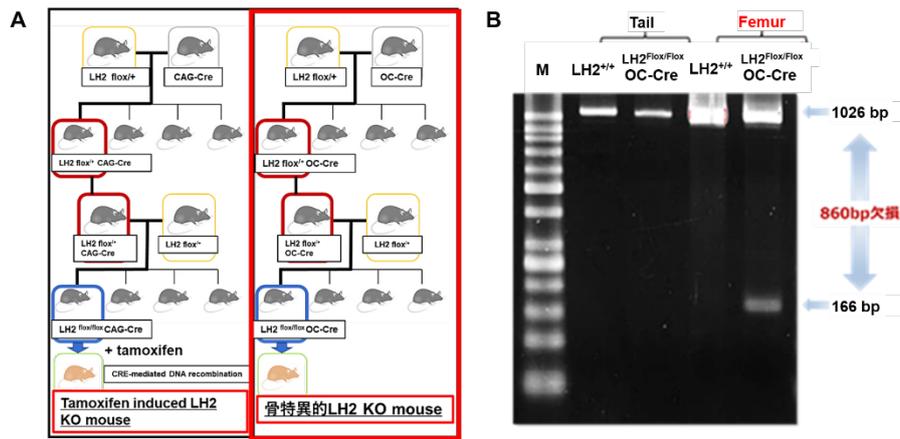


図2：骨特異的にLH2をノックアウトするLH2-cKOマウス (LH2^{flox/flox}OC-Creマウスの作製)

(2) LH2-cKO マウスの多角的な解析

-形態学的・組織学的・物理学的 (機械的試験)・生化学的 (collagen cross-link) 解析-

LH2^{flox/flox}CAG-Cre マウスや bsLH2-cKO マウスにおいて、肉眼的に明らかな形態学的異常は認めなかった。LH2^{flox/flox}CAG-Cre マウスを用いて、皮膚をヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色)、免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry : IHC)、Picro-Sirius-Red 染色で評価した。HE 染色にて、LH2^{flox/flox}CAG-Cre マウスの真皮層は幅が広く、Picro-Sirius-Red 染色では LH2-cKO マウスの真皮層は幼弱なコラーゲンを多く認めた (図 3A)。また、IHC にて、LH2 の染色性は強く減弱していた。皮膚の創傷治癒の実験を行ったところ、図 3B で示すように LH2^{flox/flox}CAG-Cre マウスでは、創傷治癒の遅延を認めた。これによって、タモキシフェン誘導性の LH2-cKO マウスにおいて LH2 発現量と皮下組織の ECM 環境が密接に関与していることが示唆された。

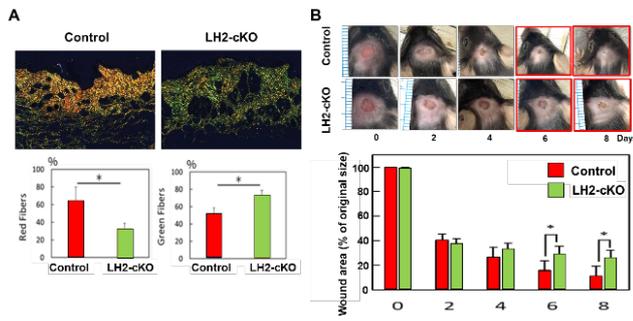


図3：LH2-cKO (LH2^{flox/flox}CAG-Cre) マウスの皮膚における創傷治癒速度の遅延

bsLH2-cKO マウスの大腿骨では、Picro-Sirius-Red 染色で幼弱なコラーゲンを多く認め、コラーゲン fibril の径は密度ともに不均一である異常を認めた (図 4A)。また、骨強度の有意な低下が認められ (図 4B)、Collagen cross-link 解析では、ヒドロキシリシン (Hyl) 由来のコラーゲン架橋 (DHLNL, Pyr) の著しい減少を認めた (図 4C) (論文投稿中)。

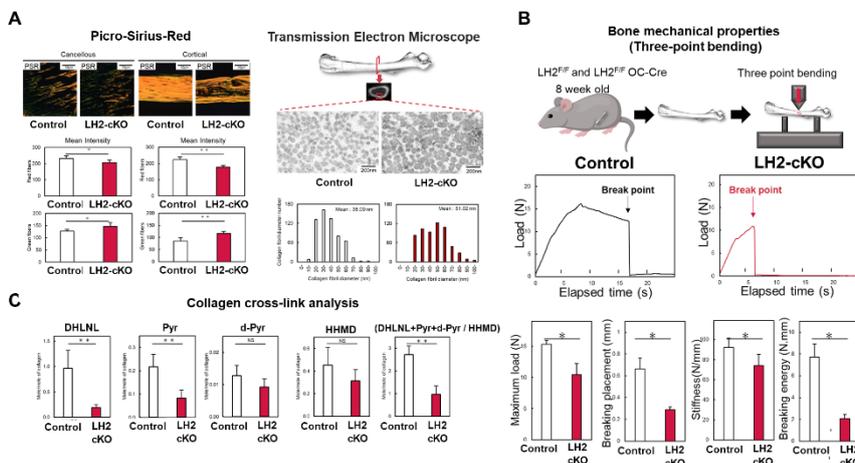


図4：LH2-cKO (LH2^{flox/flox}OC-Cre) マウスの大腿骨における骨脆弱性

(3) LH2-cKO マウスを用いた腫瘍形成能・増殖能・浸潤能

bsLH2-cKO でコントロールと比較して、様々なフェノタイプの違いを認めたために、bsLH2-cKO を用いて口腔癌細胞移植モデルを作製した。bsLH2-cKO マウス大腿骨にマウス由来口腔癌細胞 (MOC1) (2.5×10^5 /PBS 10 μ l) を 29G の針で髄腔内注射し、熱可塑性樹脂にて蓋をした。処置 14 日後にマウスを安楽死させ、摘出した大腿骨における癌細胞の増殖能や骨への浸潤能を解析した。CT で評価すると、bsLH2-cKO の大腿骨では、骨膨隆を認め、髄腔内に注入した癌細胞の顕著な増殖と骨皮質の菲薄化を認めた (図 5)。HE 染色や IHC では、bsLH2-cKO において骨吸収や癌細胞の骨浸潤像を多く認め、bsLH2-cKO とコントロールで皮質骨部に LH2 の発現に差異を認めた (図 5)。これは、bsLH2-cKO では LH2 の喪失により硬性コラーゲン (コラーゲン・バリア) が著しく減少し、癌細胞への抵抗性が下がることが示唆された。

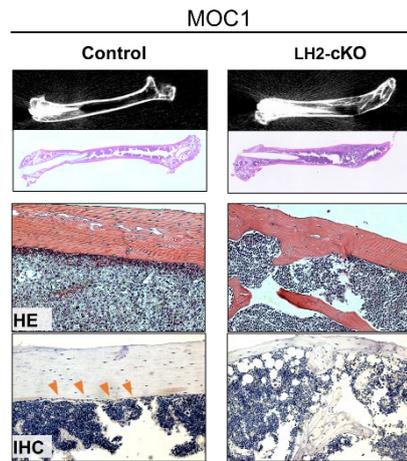


図5: LH2-cKOマウスにおける癌細胞骨吸収・浸潤の亢進

(4) LH2 過剰発現における口腔癌腫瘍増殖能・浸潤能・転移能の検討

臨床検体における癌進展度と LH2 発現や Collagen cross-link の関連性を調べるために、口腔癌臨床検体を用いて解析した。最初に、TCGA data base を用いた頭頸部扁平上皮癌臨床検体 (N=522) で検索した。頭頸部扁平上皮癌臨床検体では、癌進展症例で LH2 は有意に発現増加しており、高発現群は 5 年生存率の有意な低下を認めた (図 6A)。

次に、当科における口腔癌臨床検体 (N=15) で解析すると、癌進展症例 (stage III/IV やリンパ節転移陽性) では、LH2 が正常組織と比較して有意に発現増加していた (図 6B)。さらに、同一検体を用いた Collagen cross-link 解析では、癌進展症例 (stage III/IV やリンパ節転移陽性) では、LH2-mediated-collagencrosslink が正常組織と比較して有意に増加していた (図 6C)。そのため、癌組織における「LH2 の発現増加 = 癌細胞周囲 I 型コラーゲンの変化 = LH2 由来の硬性コラーゲンの産生」が考えられ、癌の進展に関連することが示唆された (Saito et al., J Dent Res, 2019)。

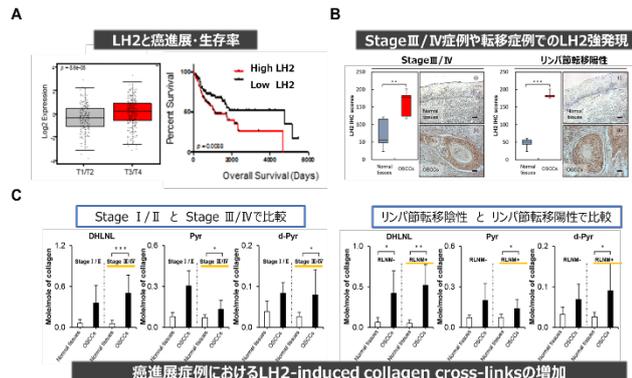


図6: LH2高発現は、口腔癌進展・転移・予後に関係する

よって、マウス由来口腔癌細胞株 (MOC1) を用いて LH2 過剰発現細胞株を作製し、各種機能解析 (細胞増殖試験や細胞遊走能試験) を行い、LH2 過剰発現による癌細胞自身の変化について検討した。ベクタービルダーを用いて LH2-GFP ベクターを作成し、

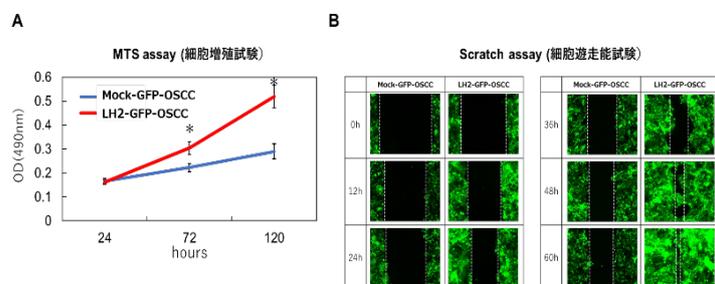


図7: LH2過剰発現OSCC細胞株における細胞増殖能や遊走能の亢進

Lipofectamine 2000 を用いて MOC1 ヘトランスフェクションを行い、安定発現細胞株 (LH2 過剰発現 OSCC 細胞株: LH2-GFP-OSCC 細胞およびコントロール細胞株: Mock-GFP-OSCC 細胞) を樹立した。細胞増殖能試験において、LH2-GFP-OSCC 細胞では、Mock-GFP-OSCC 細胞と比較して細胞増殖能の有意な亢進が認められた (図 7A)。細胞遊走能試験においては、LH2-GFP-OSCC 細胞では、Mock-GFP-OSCC 細胞と比較して細胞遊走能の有意な亢進が示唆された (図 7B)。

(5) ドッキングシミュレーションより LH2 選択的な低分子化合物を検索・同定

LH2 の酵素活性部位に超選択的に結合する低分子化合物を千葉大学のスーパーコンピュータを経由してドッキングシミュレーションを行い、1200 万個低分子化合物データベースの中から候補を選出した。酵素活性が類似しているが、ターゲットが異なる LH1 および LH3 についても三次元構造体を作成した。LH1 および LH3 には親和性を持たず、LH2 のみに親和性のある低分子化合物のうち、有意差を持って選出された上位 10 を LH2-選択的結合低分子化合物とした。このうち、劇物を除外した 8 個の候補化合物を特定した。この内の一つが LH2 に対してアゴニスト的に作用する可能性を捉えた。また、LH2 に対してアンタゴニスト的に作用する低分子化合物も二つ同定している (data not shown) .

まとめ

LH2 のコンベンショナル KO は胎生致死を招くために、Cre-loxP システムを用いて loxP/Cre や Frt/Flp の位置を調整して作製し、LH2^{flox/flox} マウスを作成した。CAG-Cre マウスや Osteocalcin (OC)-Cre マウスとの交配にて、タモキシフェンで全臓器が LH2 をノックアウトするタモキシフェン誘導性の LH2-cKO マウス (LH2^{flox/flox}CAG-Cre マウス) や骨特異的 LH2-cKO マウス (LH2^{flox/flox}OC-Cre マウス : bsLH2-cKO) を作製した。LH2-cKO マウスの多角的な解析で、多くのフェノタイプの違いを確認した。bsLH2-cKO では、幼弱なコラーゲンを多く認め、コラーゲン fibril の径は密度ともに不均一であった。さらに、骨密度や骨強度の明らかな低下が認められ、脆弱性を示した。マウス由来口腔癌細胞の移植実験では、bsLH2-cKO では LH2 の喪失により硬性コラーゲン (バリア) が著しく減少し、癌細胞への抵抗性が下がること示唆された。また、癌細胞自身の LH2 の発現を増強させることにより、細胞増殖能や遊走能が亢進し、癌の進展に関与することが示唆された。LH2 のアンタゴニストあるいはアゴニストとなる低分子化合物は同定しており、今後それらを用いて *in vitro/vivo* で更なる分析をすることで、LH2 由来の硬性コラーゲンの詳細な役割が明らかになり、新たな口腔癌治療戦略になると考えられた。

また、本研究は米国 North Carolina 大学の Yamauchi 教授と定期的に Web ミーティングを行い多角的な解析を行った。実験結果の一部は、UNC に駐在した当科の若手研究者により解析され算出された。そのため、研究目標の一つであった「グローバルな視野を有した国際的に活躍が期待できる若手研究者の育成」といった点でも十分な成果が得られたと思われる。

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	笠松 厚志 (Kasamatsu Atsushi) (60375730)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	齋藤 智昭 (Saito Tomoaki) (40833554)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	福嶋 玲雄 (Fukushima Reo) (00833576)	千葉大学・医学部附属病院・医員 (12501)	
研究分担者	宮本 勲 (Miyamoto Isao) (00741836)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	

	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
研究協力者	野崎 龍之介 (Nozaki Ryunosuke)	千葉大学・医学部附属病院・医員 (12501)	

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