

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11410

研究課題名(和文) 低酸素応答因子を標的とした頭頸部癌転移治療の開発

研究課題名(英文) Development of head and neck cancer treatment targeting HIF1-alpha

研究代表者

小澤 宏之(OZAWA, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30327621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HIF1- 転写因子の1つであるANGPTL4と頭頸部癌との関わりについて検討した。下咽頭癌症例のANGPTL4の免疫組織学的発現と臨床所見との関連について検討した。多変量解析で、OSについてANGPTL4発現が独立した予後規定因子であった。中咽頭癌でも同様の結果が得られた。続いて、頭頸部癌細胞株を用いANGPTL4発現のノックダウンを行い、ANGPTL4発現を低下すると、EMT関連遺伝子やがん幹細胞形質に関連する遺伝子の発現が減少した。ANGPTL4は腫瘍の促進と抑制と双方に関わっている報告があるが、頭頸部癌ではANGPTL4は腫瘍を抑制する方向で働いていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌全体の生存率は50%程度に過ぎず、予後を改善するためには予後因子の1つである転移を抑制する治療手段を確立すること、治療抵抗性である転移巣への治療効果を改善する必要がある。今回の検討により、HIF1- の転写因子であるANGPTL4が頭頸部癌において腫瘍抑制に関わることが示された。ANGPTL4を制御する薬は臨床レベルでは存在しないが、発現を促進する薬剤を開発することにより、将来の頭頸部癌の治療薬として期待できる。また2種の癌種で予後規定因子となっていたことから、ANGPTL4発現が予後予測などのバイオマーカーとして活用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the association of ANGPTL4, one of the HIF1- transcription factors, with head and neck cancer.

We examined the immunohistological expression of ANGPTL4 in hypopharyngeal carcinoma cases and its association with clinical data. Multivariate analysis revealed that ANGPTL4 expression was an independent prognostic determinant for overall survival. Similar results were obtained for oropharyngeal carcinoma patients.

Subsequent knockdown of ANGPTL4 expression in head and neck cancer cell lines showed that the down-regulation of ANGPTL4 reduced the expression of EMT-associated genes and genes associated with cancer stem cell properties. These results indicated that ANGPTL4 has a possibility to act as a tumor suppressor in head and neck cancers, although ANGPTL4 has been reported to be involved in both tumor promotion and suppression.

研究分野：頭頸部外科

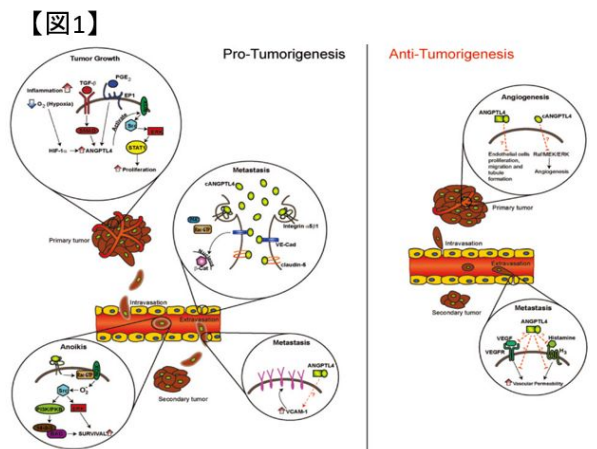
キーワード：低酸素応答因子 ANGPTL4 中咽頭癌 下咽頭癌

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織における低酸素状態(Tumor hypoxia)は様々な癌腫において癌進展のプロセスに関与する。特に HIF1- は低酸素下で細胞内に蓄積し、核内に移行し種々の腫瘍悪性化に関わる遺伝子転写を促す。これまで HIF1- 発現と放射線治療や化学療法との関連性について報告されており、頭頸部癌領域では喉頭癌(Kwon: Head Neck 2014)、上咽頭癌(Kitagawa: Cancer Lett 2013)、中咽頭癌(Silva: Int J Radiat Oncol Biol Phys 2008)などにおいて、HIF1- 過剰発現が予後不良因子であることが示されている。

一方で HIF1- の転写因子には血管新生因子や matrix metalloproteinase などがあり、血管・リンパ管新生および腫瘍細胞の組織浸潤など、転移巣の形成に重要な役割を果たしている (Semenza: Trends Pharmacol Sci 2012)。これまで頭頸部癌領域における HIF1- 発現と転移との関わりについての報告は殆どない。頸部転移・遠隔転移は頭頸部癌の予後因子の 1 つであり、また初期治療後の再発転移に対する治療手段の確立することは、頭頸部癌の予後改善に重要な意味をもつ。頭頸部癌の転移制御および転移病変の治療を開発していく上で HIF1- およびその制御因子は、分子標的薬開発における治療ターゲットの 1 つとして期待されている。

ANGPTL4 は HIF-1 の転写因子の 1 つで、Angiopoietin 構造類似蛋白で脂質代謝・糖代謝に関与している。主に肝臓や脂肪細胞に発現し、リポプロテインリパーゼ活性の阻害、白色脂肪組織の分解を促進し中性脂肪と脂肪酸の血漿中濃度を上昇させることで脂質代謝を調節している。腫瘍領域においても ANGPTL4 の関与が報告されてきており、腫瘍の微小環境での低酸素下において発現がみられる。乳癌・直腸癌・前立腺癌・肝臓癌・腎細胞癌といった様々な癌腫において ANGPTL4 の関与が報告されている。ANGPTL4 は腫瘍の増殖や血管新生・転移を促進させるといった報告が多く、ANGPTL4 は腫瘍促進に関与すると考えられてきた。しかし、最近になり ANGPTL4 が腫瘍抑制的に働くことを示す相反する報告が出てきている。ANGPTL4 が複数の腫瘍細胞株で腫瘍細胞の遊走能や浸潤能を抑制することや (Galaup: PNAS 2006) 尿路上皮癌では、ANGPTL4 が腫瘍増殖の浸潤抑制、コロニー形成能の低下、シスプラチン感受性の増強に関与することが報告されている。(Hsieh HY: Oncogene 2018)。本報告では ANGPTL4 過剰発現の xenograft において、腫瘍細胞のアポトーシスは増加し腫瘍細胞数は減少した。一方、ANGPTL4 には腫瘍促進の役割もあり、分泌型の ANGPTL4 は用量・時間依存的に癌細胞株の増殖を促進させると報告している(Hsieh HY: Oncogene 2018)。以上から、ANGPTL4 は腫瘍促進と腫瘍抑制の dual role を持っていると考えられている (図 1) (Tan MJ: Mol Cancer Res 2012)。しかしながら、癌における ANGPTL4 の役割は未だ明確にされておらず、今後の更なる検討が必要である。



### 2. 研究の目的

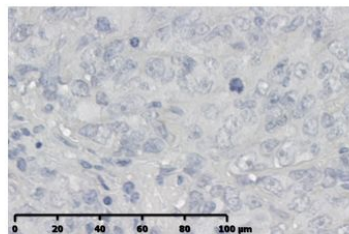
現時点で HIF1- を直接標的とした治療薬はその効果や副作用の点から臨床応用が困難なため、HIF1- 転写因子についての検討し、治療標的にすることを目的とする。HIF1- 転写因子のうち ANGPTL4 に注目し、頭頸部癌における ANGPTL4 の役割を明確にする。

### 3. 研究の方法

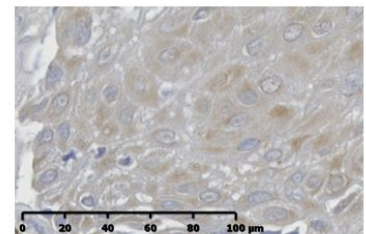
#### (1) 下咽頭癌および中咽頭癌の病理組織学的・免疫組織化学的検討

手術切除を行った早期下咽頭癌 55 症例、中咽頭癌にて生検もしくは手術で摘出した 137 例について病理組織学的検討を行った。抗 ANGPTL4 抗体 (Polyclonal anti-angiopoietin like4 antibody, ab115798, Abcam) を用いて免疫染色を行い、染色結果と臨床データとの関連について解析する。免疫染色結果は Tissue Studio® (Definiens Inc) を用いて細胞質染色を定量化し、それぞれの腫瘍

【図2】



陰性例



陽性例

に対して ROC 曲線を作成し cut off 値を設定した (図 2)。臨床データは OS, PFS, 無病生存率 (Disease free survival; DFS, 疾患特異的生存率 (Cause-specific survival; CSS)、TNM 分類、臨床病期、病理組織学的所見 (深達度、脈管侵襲の有無、p16 発現など) との関連などにつき検討

した。

(2) 頭頸部癌細胞株を用いた検討

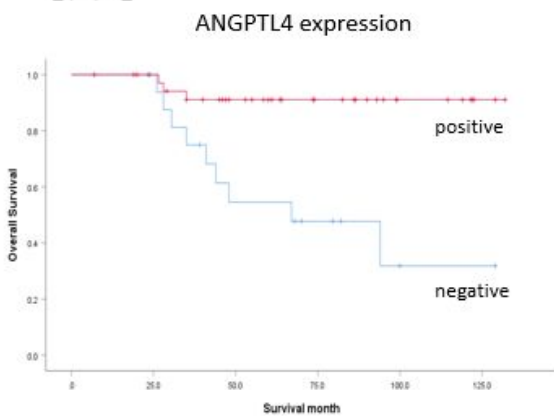
頭頸部癌細胞株 (FaDu, Detroit 562) について ANGPTL4 発現を定量した。各細胞から mRNA を抽出し、定量的 PCR を行い遺伝子レベルで評価した。頭頸部癌細胞株 FaDu を用いて、siRNA (Sigma Aldrich) を用いてプロトコルに従い transient knockdown させた。Knockdown による遺伝子変化について EMT 関連遺伝子、血管新生関連遺伝子、がん幹細胞形質関連遺伝子発現を real time PCR にて定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 下咽頭癌 55 例における検討

ROC 曲線から ANGPTL4 の cut off 値は 1.11% となった。Kaplan-Meier 法を用いた生存分析では、ANGPTL4 陽性で全生存率 (OS) を有意に延長した ( $p < 0.001$ ) (図 3)。無増悪生存率 (PFS) では、静脈侵襲陰性 ( $p < 0.005$ ) で有意差が認められた。また、病期が Tis/T1 症例、リンパ管侵襲陰性例、深達度が上皮 (ep) / 上皮層 (sep) 症例で、ANGPTL4 発現が陽性となる傾向がみられた (図 4)。多変量解析では、OS について ANGPTL4 発現が独立した予後規定因子であることが示された (HR 0.088、95%CI : 0.010-0.749、 $p < 0.05$ )。

【図3】



(2) 中咽頭癌 137 例における検討

ROC 曲線から ANGPTL4 の cut off 値は 7.7% となった。Kaplan-Meier 法を用いた生存分析では、ANGPTL4 陽性で OS および無病生存率 (DFS) を有意に延長した ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ )。多変量解析では、OS について ANGPTL4 (HR 3.320, 95%CI 1.357-8.120,  $P = 0.009$ )、T 分類 (HR 0.274, 95%CI 0.118-0.633,  $p = 0.002$ )、M 分類 (HR 0.006, 95%CI 0.001-0.052,  $p < 0.001$ ) がそれぞれ独立した予後規定因子であることが示された。

(3) 頭頸部癌細胞株を用いた検討

ANGPTL4 の siRNA による knockdown 効率は 40% 程度であった。ANGPTL4 の発現抑制の結果、HIF1- $\alpha$  が上昇した (図 6)。この変化は ANGPTL4 欠乏に伴う negative feedback の可能性がある。また HIF1- $\alpha$  上昇は頭頸部癌をはじめ種々の癌において予後不良にかかわるため、頭頸部癌における ANGPTL4 発現減少が腫瘍促進に関わることを裏付けるデータであり、そのメカニズムに HIF1- $\alpha$  発現が関与している可能性が示された。

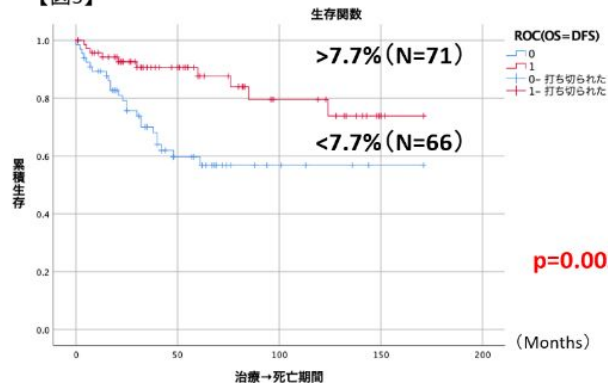
EMT 関連遺伝子では SNAI1, TWIST, ZEB1 などの遺伝子発現が上昇したが、CDH1 発現も上昇しており、必ずしも EMT 促進方向に制御しているとは言えなかった (図 7)。一方でがん幹細胞形質に関わる Nanog, Oct4, ALDH1, CD44 の発現が上昇しており、ANGPTL4 発現減少ががん幹細胞形質に関わっている可能性が示唆された (図 8)。VEGFR については VEGFR1 および VEGFR3 の発現上昇があり、過去の文献と同様に ANGPTL4 発現が血管新生へ影響を与えている可能性が推測された (図 6)。

【図4】

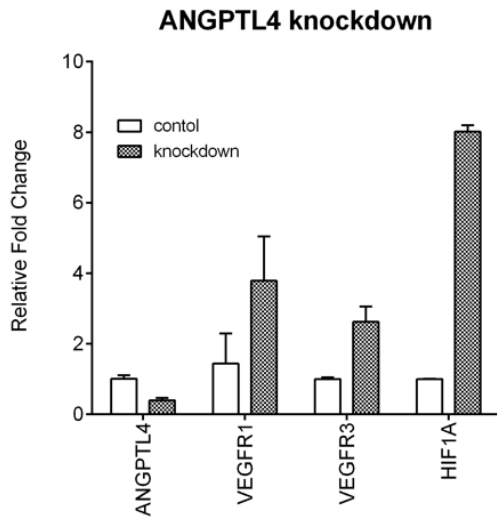
ANGPTL4発現と各項目の関係

Characteristics	total	ANGPTL4		p value	
		-	+		
Age, y	<70	30	9	21	0.873
	≥70	25	8	17	
Sex	Male	50	17	33	0.117
	Female	5	0	5	
T stage	Tis/T1	27	5	22	0.051
	T2/T3	28	12	16	
N stage	N0	31	6	25	0.035
	N1/N2	24	11	13	
Depth	ep/sep	39	9	30	0.027
	mp	4	3	1	
Lymph duct invasion	(-)	38	9	29	0.140
	(+)	16	7	9	
Venous invasion	(-)	45	11	34	0.062
	(+)	9	5	4	

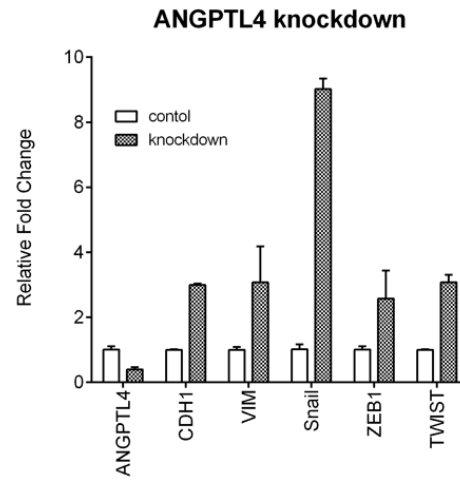
【図5】



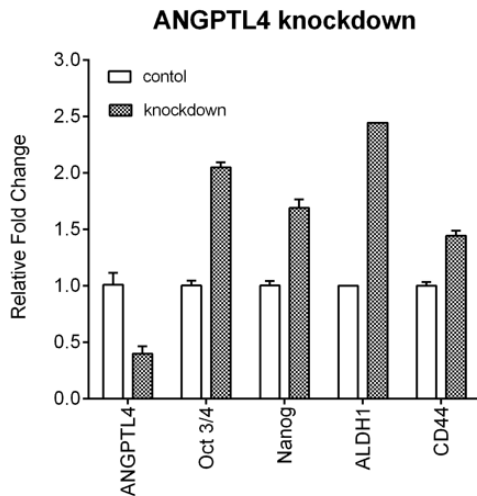
【図6】



【図7】



【図8】



#### (4) 今後の展望

これまで ANGPTL4 は腫瘍の促進に働くとする報告が多かったが、近年になり相反する作用を持つ証拠が示されてきている。我々の検討では性質の異なる下咽頭癌、中咽頭癌症例のいずれにおいても ANGPTL4 発現の高いことが予後良好との結果であった。腫瘍細胞株における検討でも ANGPTL4 発現を抑制することで、がん幹細胞形質、血管新生因子の発現亢進が見られた。これらの結果から、頭頸部癌では ANGPTL4 発現は腫瘍抑制の方向に働いていることが推察された。ANGPTL4 が前述の遺伝子発現を制御する仕組みは明らかではなく、今後の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中原奈々 小澤宏之 関水真理子 齋藤真 吉浜圭祐 中村伸太郎 小川郁
2. 発表標題 下咽頭癌におけるANGPTL4発現の検討
3. 学会等名 第43回頭頸部癌学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	中原 奈々  (NAKAHARA Nana)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教  (32612)	
研究協力者	御子柴 卓弥  (MIKOSHIBA Takuya)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教  (32612)	