

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17233

研究課題名(和文)がん微小環境における癌関連線維芽細胞のmTORシグナル制御によるがん治療の新展開

研究課題名(英文) New development of cancer treatment by mTOR signal control of cancer-associated fibroblasts in cancer microenvironment

研究代表者

古舘 健 (Furudate, Ken)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50638898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔癌細胞と線維芽細胞の両者が存在するがん微小環境において、癌関連線維芽細胞(Cancer-Associated Fibroblasts: CAF)の栄養状態を反映するmTOR(mammalian target of rapamycin)シグナルが血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)を制御する機構を調べた。本研究により、MCAM高発現の筋癌関連線維芽細胞がVEGFシグナル経路ネットワークおよびIL-6シグナル経路ネットワークの細胞間相互作用により、腫瘍の進展促進、腫瘍血管新生および腫瘍免疫抑制に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔癌細胞と線維芽細胞の両者が存在するがん微小環境において、癌関連線維芽細胞(Cancer-Associated Fibroblasts: CAF)の栄養状態を反映するmTOR(mammalian target of rapamycin)シグナルが血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)を制御する機構を明らかにすることで、口腔扁平上皮癌を制御する新規治療薬の開発につながる基礎的研究であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism by which mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling, which reflects the trophic state of cancer-associated fibroblasts (CAFs), regulates angiogenesis in the cancer microenvironment, where both oral cancer cells and fibroblasts are present. We investigated the mechanism by which VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) is regulated by mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling, which reflects the trophic state of CAFs. This study suggests that MCAM-overexpressing myofibroblastic cancer-associated fibroblasts are involved in tumor promotion, tumor angiogenesis, and tumor immunosuppression through cell-cell interactions of the VEGF and IL-6 signaling pathway networks.

研究分野：歯科口腔外科、バイオインフォマティクス

キーワード：がん微小環境 癌関連線維芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

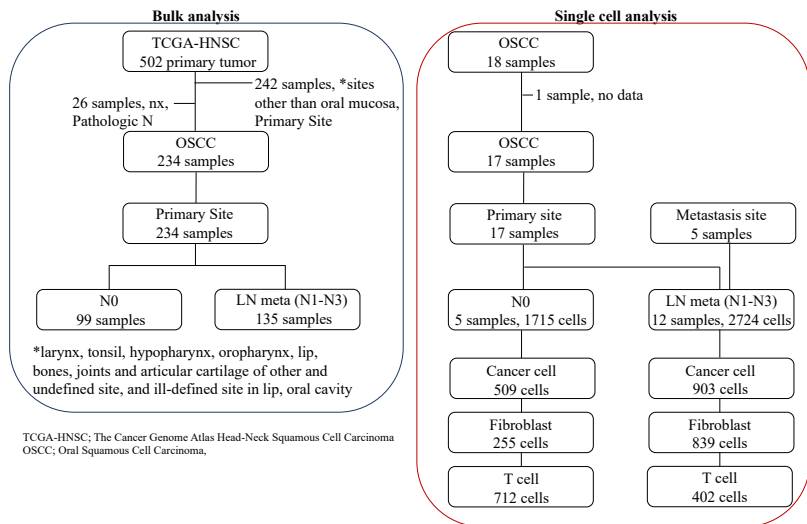
がん細胞と間質細胞の両者が存在するがん微小環境において、がん関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts : CAF) が、がん細胞の進展に与える影響を明らかにする。がん組織は、がん細胞と間質細胞から構成されている。がん組織の浸潤部において、がん細胞は 50%以下となり、残りの大部分は間質細胞の線維芽細胞が占めている。一方、がん組織から得られたデータはがん細胞、間質細胞、正常細胞で平均化されてしまう。そこで本研究では、シングルセル解析を用い、CAF とがん細胞の相互作用を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌細胞と線維芽細胞の両者が存在するがん微小環境において、癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts : CAF) の栄養状態を反映する mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナルが血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)を制御する機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌 17 症例のシングルセル解析並びに The Cancer Genome Atlas (TCGA) の口腔扁平上皮癌 234 例の公開ゲノムデータを用いて、癌ゲノミクス解析 (発現変動遺伝子解析、エンリッチメント解析等) により、頸部リンパ節転移なし (N0) と転移あり (N1-N3; LN meta) に分けて、包括的に検討した。



4. 研究成果

本研究では、口腔癌細胞と線維芽細胞の両者が存在するがん微小環境において、癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts : CAF) の栄養状態を反映する mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナルが血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)を制御する機構を調べるために、The Cancer Genome Atlas の大規模がんゲノミクスデータを用いて、口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移群と非転移群遺伝子変異、コピー数異常、メチル化、免疫細胞構成において、網羅的に解析した。

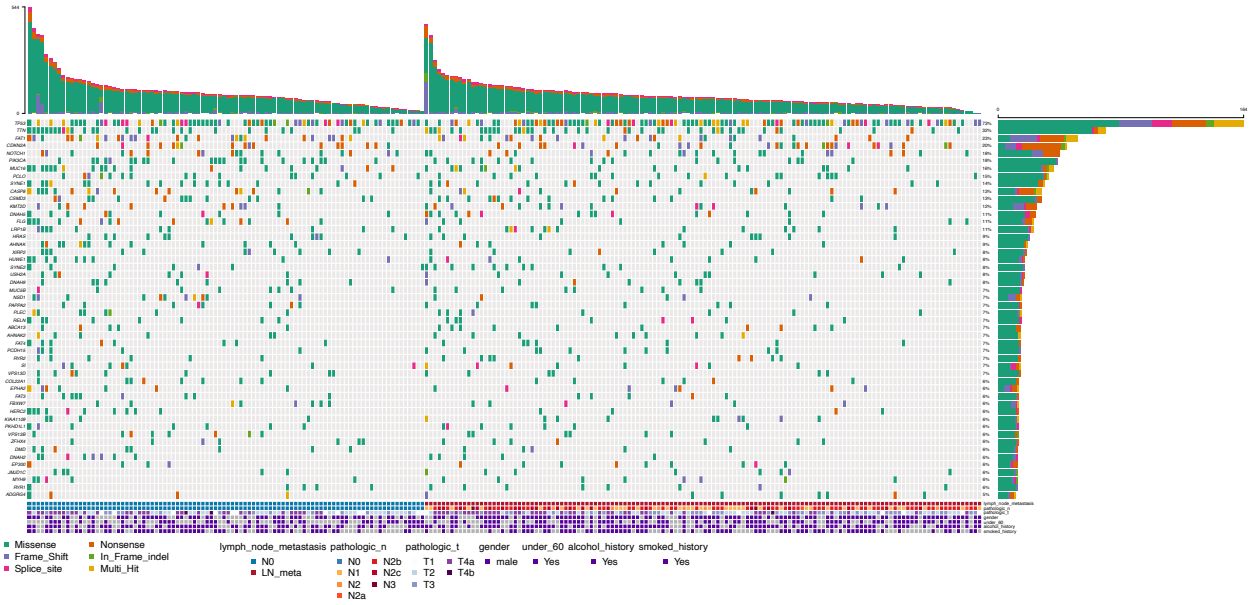
口腔癌 234 例の臨床的特徴

Overall		N = 234	% or IQR
Median age at diagnosis, y		60	52-69
Sex	Female	73	31.2%
	Male	161	68.8%
Race	White	202	86.3%
	Black	16	6.8%
	Asian	9	3.8%
	Not Reported	9	3.8%
Tissue origin	Tongue	132	56.4%
	Gun	9	3.8%
	Floor of mouth	49	20.9%
	Cheek mucosa	18	7.7%
	Palate	4	1.7%
	Other	22	9.4%
Pathologic N	N0	99	42.3%
	N1	41	17.5%
	N2 (2a, 2b, 2c)	92	39.3%
	N3	2	0.9%
Pathologic Stage	Stage I	14	6.0%
	Stage II	36	15.4%
	Stage III	52	22.2%
	Stage IVA	127	54.3%
	Stage IVB	5	2.1%
HPV status p16 Immunohistochemistry	Positive	8	3.40%
	Negative	40	17.10%
	Not Evaluated	73	31.20%
	Not Available	107	45.70%
	Unknown	6	2.60%
In situ hybridization	Positive	3	1.30%
	Negative	36	15.40%
	Not Evaluated	79	33.80%
	Not Available	109	46.60%
	Unknown	7	3%

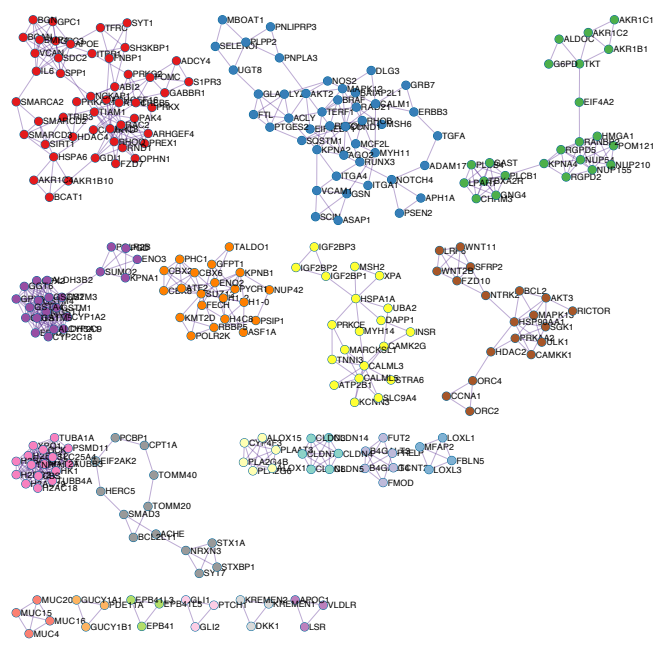
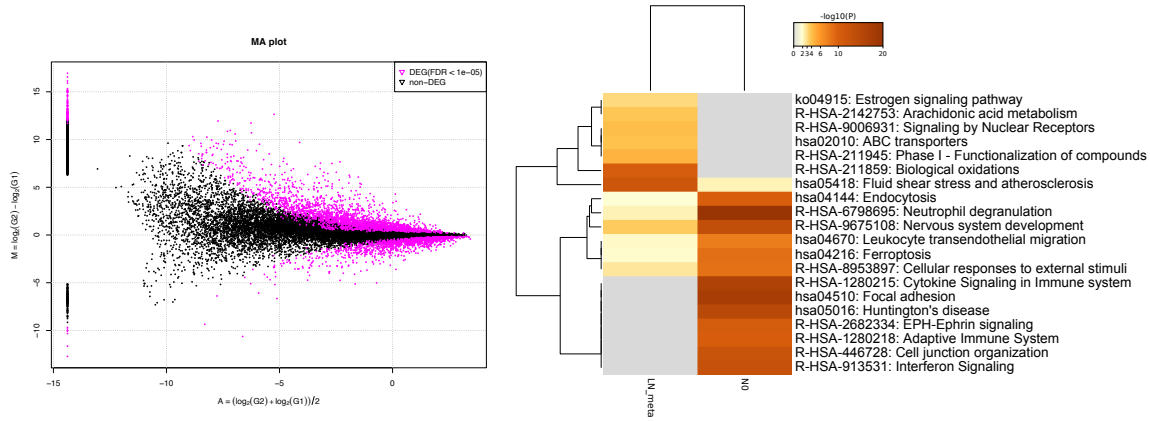
		N0 (N = 99)	% or IQR	LN meta (N = 135)	% or IQR	P value
Median age at diagnosis, y		63	54-76	59	50-67	0.06538
Sex	Female	40	40.4%	33	24.4%	0.01043
	Male	59	59.6%	102	75.6%	
Pathologic T	T1	14	14.1%	8	5.9%	0.04371
	T2	36	36.4%	40	29.6%	
	T3	17	17.2%	42	31.1%	
	T4a	30	30.3%	44	32.6%	
	T4b	2	2.0%	1	0.7%	
Alcohol history	Yes	63	63.6%	94	69.6%	0.2316
	No	32	32.3%	42	31.1%	
	Not Reported	4	4.0%	1	0.7%	
Smoked history	Yes	53	53.5%	70	51.9%	0.8946
	No	46	46.5%	65	48.1%	

Percentages in each given category are based on the total number of cases with sufficient information

扁平上皮癌の頸部リンパ節転移群と非転移群遺伝子変異

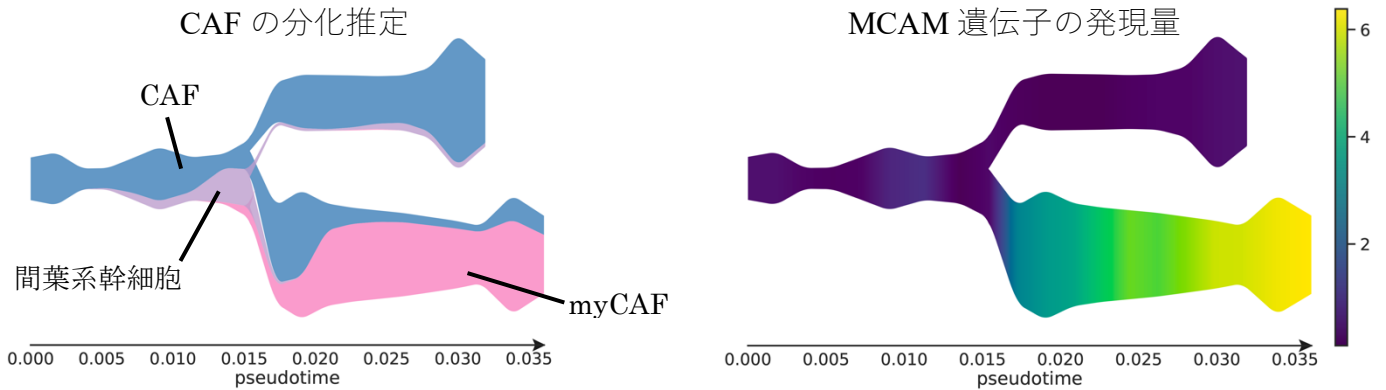


続いて、転移群と非転移群の口腔癌のシングルセル解析データを用いて、転移群と非転移群の口腔癌細胞の発現変動遺伝子を比較すると、転移群では2210個の遺伝子が高発現しており、その中には mTOR signaling pathway(log10(P) -15.6) が検出された。

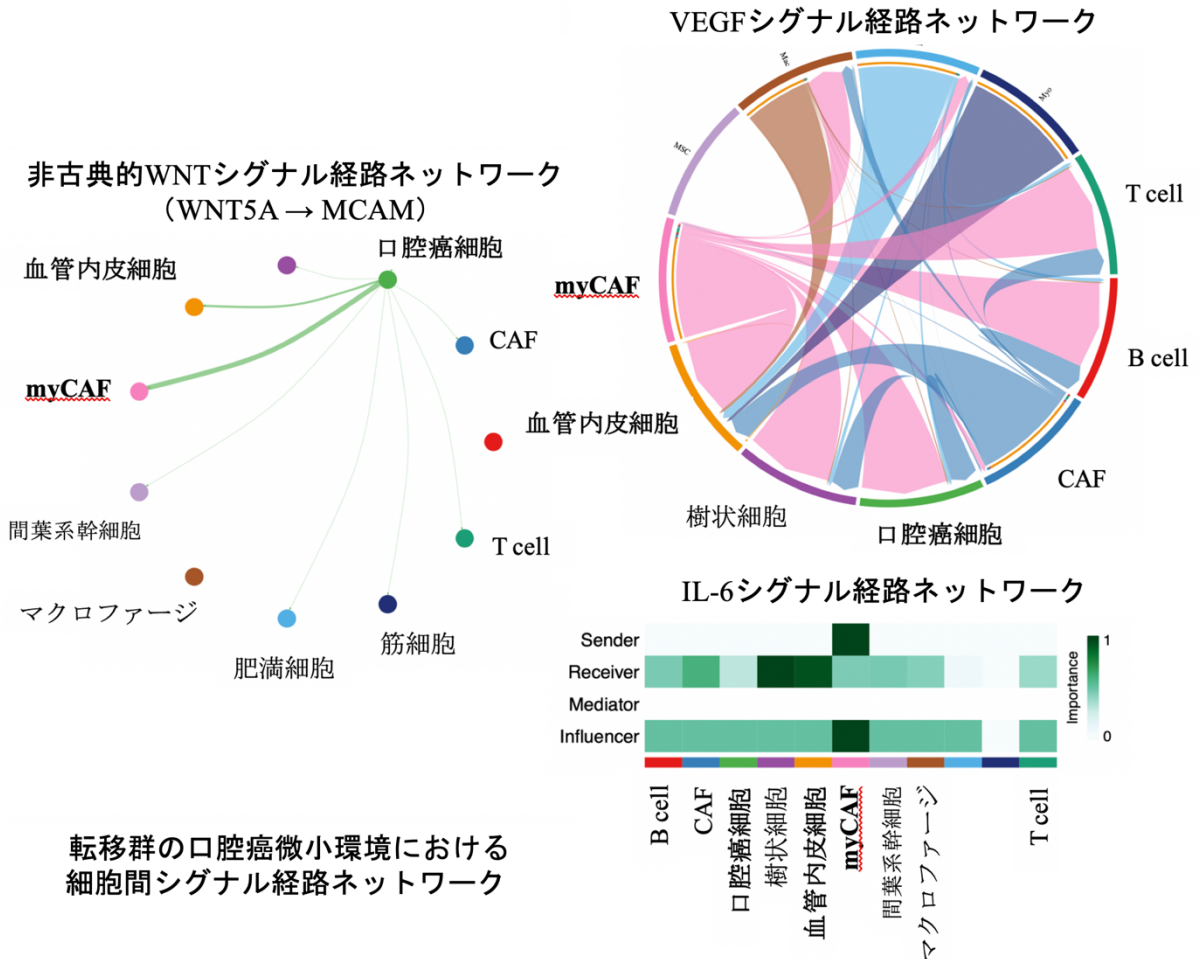


Network	Annotation
LX_meta	hsa05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;13.3,hsa05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;13.7,R-HSA-211859[Biological oxidations;11.9
FNAL	R-HSA-55833[Metabolism of lipids;29.6,hsa05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;24.3,hsa05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;23.7
MCODE_ALL	ko05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;26.7,hsa05418[Fluid shear stress and atherosclerosis;26.1,R-HSA-226752[Cellular responses to stress;20.5
MCODE_1	R-HSA-461299[RHO GTPase cycle;13.7,R-HSA-356080[Defective IEGAT3 causes JDS/SDID;12.1,R-HSA-442032[Defective BSGALT6 causes EDRF2 and SEMDL1;12.1
MCODE_2	R-HSA-900693[Signaling by Receptor Tyrosine Kinase;8.3,hsa00082[Notch signaling;8.0,MM0082[Notch signaling;8.0
MCODE_3	hsa_M00427[Nuclear pore complex;14.4,MM0427[Nuclear pore complex;14.4,R-HSA-1169408[IG15 antiviral mechanism;12.9
MCODE_4	ko05204[Chemical carcinogenesis;30.5,hsa05204[Chemical carcinogenesis;30.0,hsa00980[Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450;12.3
MCODE_5	R-HSA-255958[Cellular Senescence;14.0,R-HSA-2262752[Cellular responses to stress;12.4,R-HSA-4953897[Cellular responses to external stimuli;12.3
MCODE_6	R-HSA-423559[Insulin-like Growth Factor-2 mRNA Binding Protein (IGFBP/IMP/VICK2) bind RNA;9.5,hsa0925[aldosterone synthesis and secretion;8.1,hsa04261[Adrenergic signaling in cardiomyocyte;7.3
MCODE_7	hsa04150[mTOR signaling pathway;15.6,hsa04150[mTOR signaling pathway;15.6,hsa05200[Protein-protein interactions in cancer;10.0
MCODE_8	R-HSA-48886[M Phase;16.6,R-HSA-49278[Cell Cycle, Mitotic;15.1,R-HSA-960990[ICMV Early Events;14.6
MCODE_9	R-HSA-479436[Neurexins and neuroligins;8.0,R-HSA-4794362[Protein-protein interactions at synapse;7.2,R-HSA-112116[Neuronal System;6.1
MCODE_10	R-HSA-420029[Tight junction interactions;18.2,R-HSA-421270[Cell-cell junction organization;16.0,R-HSA-446728[Cell junction organization;15.0
MCODE_11	ko00590[Arachidonic acid metabolism;16.1,hsa00590[Arachidonic acid metabolism;16.1,hsa00591[Inoselic acid metabolism;10.9
MCODE_12	ko00601[Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neofacto series;11.0,hsa00601[Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neofacto series;11.0,R-HSA-202284[Keratan sulfate biosynthesis;10.9
MCODE_13	R-HSA-508363[Defective GALNT12 causes colorectal cancer 1 (CRC13);13.0,R-HSA-508362[Defective GALNT3 causes familial hypobromiduric tamniel calcinosis (HTTC);13.0,R-HSA-508362[Defective CIGALT1C1 causes Tn polyglutamin syndrome (TNPS);12.9
MCODE_14	R-HSA-156948[Elastic fibre formation;11.2,R-HSA-17424[Etracellular matrix organization;7.9
MCODE_15	R-HSA-392134[Nitric oxide stimulates guanylate cyclase;9.4,R-HSA-41846[Platelet hemostasis;7.5,ko00230[Purine metabolism;6.6
MCODE_16	R-HSA-479436[Neurexins and neuroligins;8.2,R-HSA-4794362[Protein-protein interactions at synapse;7.6,R-HSA-112116[Neuronal System;5.5
MCODE_17	hsa_M00678[Hedgehog signaling;10.4,hsa00678[Hedgehog signaling;10.4,hsa04340[Hedgehog signaling pathway;8.4
MCODE_18	R-HSA-333971[Signaling by LRP5 mutants;11.3,R-HSA-377247[Negative regulation of TCR-dependent signaling by Wnt ligand antagonists;9.9,R-HSA-470125[Signaling by WNT;8.8
MCODE_19	R-HSA-496406[VLDL clearance;11.3,R-HSA-496404[Plasma lipoprotein clearance;8.8,R-HSA-17424[Plasma lipoprotein assembly, remodeling, and clearance;7.8

また、頸部リンパ節転移群において MCAM 高発現の筋肉癌関連線維芽細胞 (myCAF) が間葉系幹細胞を経て分化誘導されていることを明らかにした。



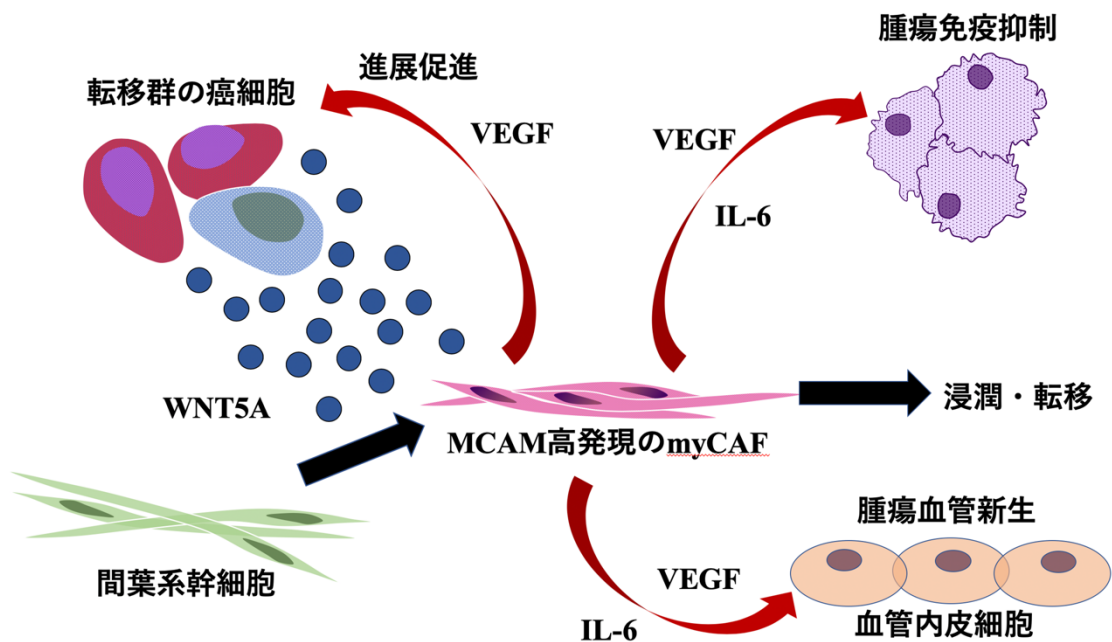
転移群の口腔癌細胞では、腫瘍形成の抑制および細胞移動の促進に関与する分泌型シグナル伝達タンパク質の WNT5A(Wnt Family Member 5A)遺伝子の発現が亢進していた。口腔癌細胞が分泌した WNT5A は、筋肉癌関連線維芽細胞 (myofibroblastic cancer associated fibroblasts: myCAF の β カテニン非依存性の非古典的 WNT シグナル経路を活性化し、myCAF の MCAM(melanoma cell adhesion molecule)遺伝子の発現が亢進していた。



転移群の口腔癌微小環境における細胞間シグナル経路ネットワーク

非古典的 WNT シグナル経路の活性化は、造血幹細胞の維持に働くことが明らかになっており、癌幹細胞の維持や myCAF の分化にも関与している可能性がある。また MCAM 遺伝子は、細胞接着に関与しており、メラノーマ細胞の血行性転移と関連が報告されている。MCAM 高発現の myCAF は、VEGF (vascular endothelial growth factor:血管内皮増殖因子) および IL-6 により、細胞間シグナル経路ネットワークを癌細胞、血管内皮細胞と、免疫細胞と形成していた。また VEGF および IL-6 の機能は、免疫抑制性であることが知られている。

本研究により、MCAM 高発現の myCAF が VEGF シグナル経路ネットワークおよび IL-6 シグナル経路ネットワークの細胞間相互作用により、癌細胞と癌間質細胞の両者が存在する癌微小環境において、腫瘍の進展促進、腫瘍血管新生および腫瘍免疫抑制に関与することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古館 健、久保田 耕世、伊藤 良平、成田 紀彦、田村 好弘、米沢 寿晃、莊 豪智、小松 正太郎、高木 康貴、小林 恒
2. 発表標題 頸部リンパ節転移における口腔癌微小環境の癌ゲノミクス解析を用いた包括的検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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