

令和元年6月11日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19777

研究課題名(和文) Pdpn-cKOマウスを応用した口腔組織由来CAFの癌幹細胞ニッチ形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cancer stem cell niche formation mechanisms of CAF derived from oral tissue using Pdpn-cKO mouse

研究代表者

沢 禎彦 (SAWA, YOSHIHIKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70271666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、癌が広がる、転移のための環境整備を促進する物質の発見を目指しています。この研究では、体の線維をつくる線維芽細胞でポドプラニンという物質が作られないマウスを開発し癌細胞を移植したところ、通常のマウスよりも癌周囲の線維芽細胞の形成が弱く、転移が有意に少なくなりました。また、口腔癌が発現し、正常細胞はつukらない「癌型」ポドプラニンと結合する抗体を開発し、舌ガン患者を調査した結果、この抗体の陽性患者は転移と再発が有意に多く、術後5年無病生存率が低下すること、癌型ポドプラニン抗体による組織検査が予後の予測に有用なことを見出しました(2018年7月26日記者発表、岡山大学)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌および癌の周囲の線維芽細胞はポドプラニンという物質を産生して転移の環境を整える可能性があります。ポドプラニンの機能を抑える薬が開発できれば、ポドプラニンを発現するタイプの癌の転移を阻止できる可能性が考えられます。また、ポドプラニンには正常な細胞がつかないタイプの癌型ポドプラニンがあり、癌型ポドプラニンをつくるタイプの口腔癌は、つくらないタイプと比べて転移する可能性が高いことは、口腔癌の転移の仕組みを解明するための学術的意義があること、癌型ポドプラニン抗体の反応を治療前に生検診断することで、口腔癌の治療計画と生存率をさらに向上させうる社会的意義があると考えます。

研究成果の概要(英文)：We aim to discover oncoproteins that promote environmental maintenance for metastasis. In this study, we developed mice where fibroblasts can not make podoplanin (cKO mice) and transplanted cancer cells in mice, it was shown that the formation of fibroblasts around transplanted cancer was weaker in cKO than in the normal, and metastasis was significantly reduced in cKO mice. Therefore, we developed an antibody to cancer-type podoplanin that produced in the human oral carcinoma but not in the normal, and investigated tongue cancer, it was shown that metastasis and recurrence were significantly higher in cancer-type podoplanin-positive patients than in the negative, and that the five-year new metastasis-free survival rate was reduced in cancer-type podoplanin-positive patients. We think that the expression of cancer-type podoplanin is useful as a prognostic factor (July 26, 2018 press release, Okayama University).

研究分野：解剖学

キーワード：口腔癌 ポドプラニン 癌関連線維芽細胞 抗体 転移 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞ニッチを構成する癌関連線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts (CAF) の機能の解明が急務となっている。CAF は血管を呼び込み、免疫チェックポイント機構と制御性 T 細胞の協力で免疫細胞の攻撃から逃れた癌幹細胞の増殖と転移に有利な環境を整備すると考えられている。近年、口腔癌や膵臓癌などにおいて、転移と強く相関する所見として CAF におけるポドプランニン (podoplanin, PDPN) の発現が相次いで報告された。PDPN はシアル酸に富むムチン型膜蛋白で、血小板膜蛋白 c-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) と結合して血小板凝集活性を示す。また PDPN は細胞内でアクトミオシンの重合を促進するので PDPN 発現細胞は緊縮する。一方、PDPN に血小板 CLEC-2 が結合すると細胞は弛緩するので、その相互作用の繰り返しで細胞に運動能力を与えるとされる。正常組織の線維芽細胞が PDPN 陰性であるにもかかわらず、癌周囲で増殖した線維芽細胞 CAF は PDPN 分子を発現する理由として、PDPN が運動能力を与えた CAF は増殖し血管を呼び込みながら癌幹細胞周囲を覆ってニッチを形成し整備する機能が増進すると着想した。本研究では、申請者が初めて樹立した顎骨、線維芽細胞の PDPN 遺伝子 (Pdpn) コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを顎骨、頬粘膜など口腔組織担癌マウスとして応用し、PDPN が口腔組織由来の癌間質細胞の運動と増殖重要な役割を演じているかを解明することを試みた。この研究の挑戦的要素は、申請者が確立した Pdpn cKO マウスを担癌マウスに応用することである。

2. 研究の目的

本研究は、口腔組織由来 CAF の癌幹細胞ニッチ形成機構を PDPN の分子機能に着目し、新規開発した口腔組織 Pdpn cKO 担癌マウスによって探求すること、同時に、新規開発した口腔癌特異的 (癌型) PDPN 特異抗体 Cancer specific Monoclonal antibody CasMab LpMab-23 の陽性患者は再発する可能性が高いかを明らかにすることを目的として行われた。PDPN は細胞膜に発現すると、細胞内領域で細胞膜 GTPase である Rho ファミリー、細胞内モジュレーター Ezrin/Radixin/Moesin (ERM)、およびミオシン軽鎖 (MLC) が複合体を形成し徐々にリン酸化することで、アクトミオシン束の形成と固定が起こり、細胞に張力が発生する。また PDPN と血小板 CLEC-2 の結合は、Rho-ERM-MLC 複合体リン酸化の解除と細胞の弛緩が起こる。従って、CAF は PDPN の発現によって運動能力を獲得し、幹細胞ニッチを整備する機能が増進すると考えられる。Pdpn cKO マウスに発生した CAF はワイルドタイプ (WT) CAF と比較してニッチ形成能力が低いこと、従って移植腫瘍の増殖と転移の効率が悪いことが予想された。さらに、今回開発した担癌モデルを用いて、申請者がすでに発表している抗マウス PDPN 抗体によるニッチ抑制効果を明らかにすることを目的とした (PMab-1, 特許 PCT/JP2010/067141. Wako, MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売中)。

3. 研究の方法

1) 担癌マウスの in vivo 解析

Pdpn 全身 KO マウス (生下時致死) C57BL/6N(B6)-TgH(PDPN)gt(KO-first) (ES clone; EPD0636_3_A10, ターゲティングベクター; HTGR03003_Z_2_G05, targeted mutation 1a, EUCOMM) の胚から起こした、Pdpn エクソン 3 を loxP で挟んだターゲティングアレルを有する Pdpn フロックスマウス B6-TgH(Pdpn)^{fl/fl}, B6-Pdpn^{fl/fl} を神経堤マーカー Wnt1 プロモーターで Cre をドライブする Wnt1-Cre マウスと交配させた顎骨特異的 Pdpn cKO マウス B6-Wnt1-Cre;Pdpn^{-/-}, 1 型コラーゲン遺伝子 Col1a1 プロモーターで Cre をドライブするマウス B6-TgN (Col1a1-Cre)

1Haak (RIKEN) と交配させた 1 型コラーゲン産生細胞特異的 Pdpn cK0 マウスを開発、B6-Col1a1-Cre; Pdpn^{-/-} について、顎骨、頬粘膜、舌組織に腫瘍細胞を移植し、B6(WT)と比較した。

(1) **移植腫瘍の生育**：移植拒絶を防ぐため、ハプロタイプ異系は交配によって移植マウスを作出、C57BL/6-R26R; Col1a1-Cre; Pdpn^{-/-} と BALB/c で BALB/B6-R26R; Col1a1-Cre; Pdpn^{-/-} を作出した。ハプロタイプ同系腫瘍 ルイス肺がん由来細胞株 Ex-3LL (JCRB1349)、肺高転移能 (C57BL) ルイス肺がん由来細胞株 Int-3LL (JCRB1351)、血管内高浸潤性 (C57BL) マウスメラノーマ B16-F10-Luc (JCRB1465)、高転移性 マウスメラノーマ B16-F0-Luc (JCRB1474)、ハプロタイプ異系腫瘍 乳がん細胞株 BALB-MC、転移能を示す (JCRB0233.0) (BALB/cHe mouse) 乳がん自然発症 FM3A、転移能を示す (JCRB0701) (C3H/He mouse) を用いた。

(2) **腫瘍血管と癌間質の発達**：免疫染色と組織 RT-PCR ImageJ による定量分析で決定した。

(3) **転移と生存曲線解析**：Humane endpoint 判定、カプラン・マイヤー法、ログランク検定、コックス比例ハザードモデルを用いた計算と生存曲線によって決定した。

2) CAF の 3 次元培養解析

マウス腫瘍細胞の移植腫瘍から CAF を単離し、共培養した腫瘍細胞の増殖効率を MTT で、血管内皮細胞の増殖効率と管腔形成を V-cadherin および CD31 の免疫染色で、また CAF の増殖効率を Col1 の RT-PCR で解析した。

3) 疫学研究

PDPN はリンパ管内皮細胞など種々の正常細胞のほか、口腔扁平上皮癌も発現する。今回、ヒト口腔扁平上皮癌が発現するが正常な細胞はつくりにくい癌型 PDPN を抗原とする癌型 PDPN 特異抗体 Cancer specific Monoclonal antibody (CasMab) 「LpMab-23」を開発し、33 歳から 92 歳までの 60 名の舌ガン患者の生検組織切片を材料として、LpMab-23 の陽性率と術後経過との関連を調査した (札幌医大、臨床研究審査委員会 整理番号 (23-117) 292-1116 「口腔癌幹細胞における浸潤・転移および耐性に関する基礎的研究と癌免疫療法に関する基礎的かつ臨床的研究」)。

4. 研究成果

1) 移植実験

(1) ハプロタイプ同系移植の in vivo 研究と in vitro 実験への継続

C57BL ハプロタイプ同系腫瘍として、肺への高転移能を示す Ex-3LL、血管内への高浸潤性を示す Int-3LL、マウスメラノーマ B16-F10-Luc の移植マウスでは、癌間質径と間質血管数は WT より Pdpn cK0 で低かった。また転移率と生存率は WT より Pdpn cK0 で低下した。メラノーマ移植実験は終了し培養細胞の in vitro 実験に継続したが、ルイス肺がん由来細胞株の移植後定着が難しく、現在追試検討している。

(2) ハプロタイプ異系腫瘍

乳がん細胞株 BALB-MC、乳がん自然発症細胞株 FM3A の腫瘍定着が困難を極め、移植拒絶なのか細胞株の性質なのかを検討中である。現在は BALB-MC の定着方法の改変・試行と異系マウスのバッククロスを行っている。

(3) 抗マウス PDPN 抗体投与

ADCC・CDC 活性誘導性マウス Fc キメラ型ラット抗マウス PDPN 抗体を投与された腫瘍移植マウスでは、Pdpn cK0 マウスと同様に癌間質径・間質血管数の減少傾向が見られた。しかし、生存率は抗腫瘍効果に有意差が無く、効果の程度も個体差が著しかった。現在、腫瘍細胞移植マ

ウスの腫瘍間質から CAF を単離し、腫瘍細胞・血管内皮細胞と共培養して、WT と Pdpn cK0 由来 CAF 間での増殖効率の差を検討している。

2) 疫学研究

今回の大きな成果として、ヒト口腔扁平上皮癌が発現するが正常な細胞はつくらない癌型 PDPN を抗原とする癌型 PDPN 特異抗体 Cancer specific Monoclonal antibody (CasMab) 「LpMab-23」を開発し、舌癌患者を調査した。舌癌は正常型ポドプラニンに反応する抗体である D2-40 が陽性である。しかし、D2-40 が陽性の癌には癌型ポドプラニン反応性抗体 LpMab-23 陰性型と陽性型があり、LpMab-23 陽性型の患者は陰性よりも転移しやすかった (図 1)。さらに、LpMab-23 強陽性の患者は癌間質線維芽細胞 CAF も LpMab-23 が陽性であり (図 2)、頸部リンパ節転移と局所再発が有意に多く、術後 5 年無転移生存曲線は 66 歳未満 (n=33) よりも 66 歳以上 (n=27)、浸潤型 YK-1/2/3 (n=42) よりも YK-4C (n=14) および 4D (n=4)、LpMab-23 陰性 (n=28) よりも陽性 (n=32) の方が低いこと (図 3)、頸部リンパ節転移腫瘍には LpMab-23 陽性のものが有意に多いことを明らかにした。すなわち、口腔癌における癌型ポドプラニンの発現は予後の予測に有用であること、予後予測因子として、年齢、浸潤型と、今回新規開発した LpMab-23 が陽性であることが、他の要素と比較して有意差のある 3 大要素であることを発表した (表 1) (論文 1) (2018 年 7 月 26 日記者発表、「歯周病原細菌が糖尿病性腎症の原因となる可能性を発見」とともにプレスリリース、岡山大学)。

以上は、札幌医科大学口腔外科学講座宮崎晃巨教授の甚大な協力で行われた。

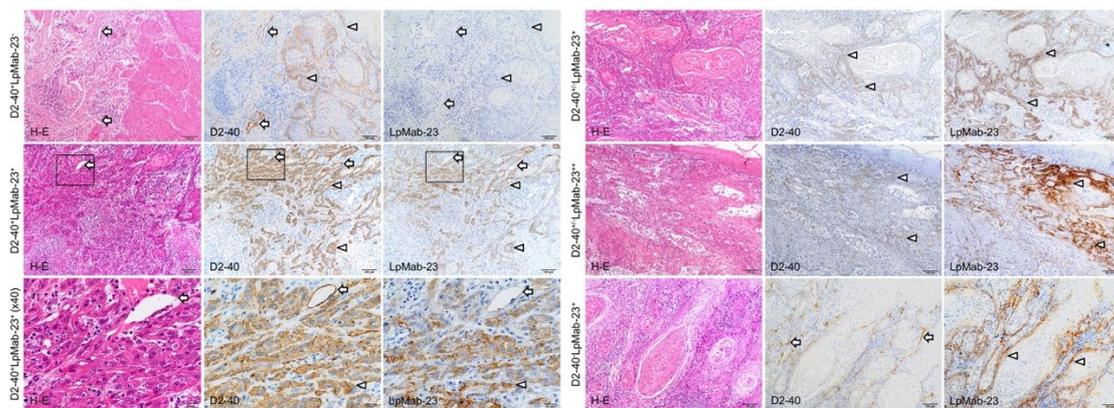


図 1 D2-40 陽性 LpMab-23 陰性/陽性早期舌癌組織

図 2 D2-40 陰性 LpMab-23 陽性早期舌癌組織

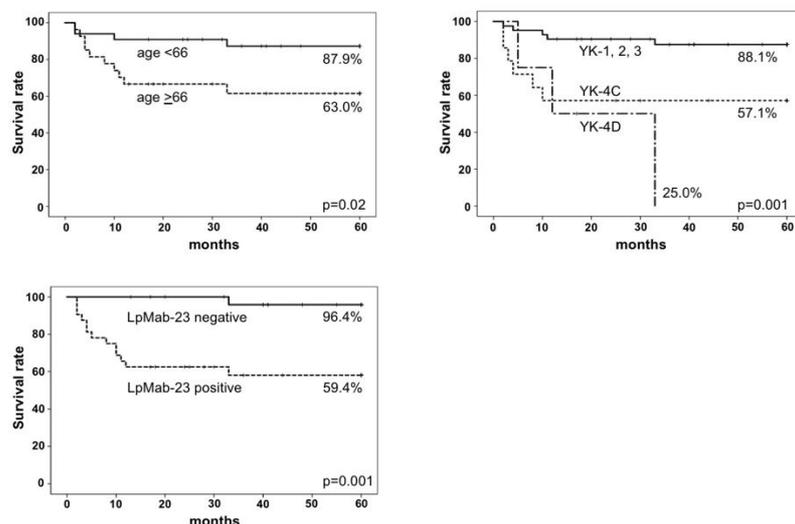


図 3 5 年無病生存率

表 1 . Relevance between clinical/pathological features including LpMab-23 reactivity and five-year metastasis-free survival rate (MFS)			
Characteristics	Number of patients	MFS (%)	P-value
Gender			
Male	33	84.8	NS
Female	27	66.7	
Age			
<66	33	87.9	P<0.05
≥66	27	63.0	
T-classification			
T1	29	79.3	NS
T2	31	74.2	
Histological grading			
Grade 1	29	86.2	NS
Grade 2, 3	31	67.7	
Mode of invasion			
YK-1, 2, 3	42	88.1	P<0.01
YK-4C	14	57.1	
YK-4D	4	25.0	
LpMab-23 reactivity			
dull and negative	28	96.4	P<0.01
positive	32	59.4	

表 1 5年無病生存率を左右する因子

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)*責任著者

- 1) Miyazaki, A., Nakai, H., Sonoda, Tomoko., Kaneko, M.K., Kato, Y., Sawa, Y*, Hiratsuka, H. LpMab-23-recognizing cancer-type podoplanin is a novel predictor for a poor prognosis of early stage tongue cancer. *Oncotarget*. 査読有 2018;9(30):21156-21165. doi: 10.18632/oncotarget.24986.
- 2) Kajii TS, Sakaguchi Y, Sawa Y, Tamaoki S. Maxillofacial morphological factors related to acceleration of maxillary growth attributed to facial mask treatment: a structural superimposition study. *Prog Orthod*. 査読有 2019;20(1):2. doi: 10.1186/s40510-018-0254-9.
- 3) Takenawa, T., Kanai, T., Kitamura, T., Yoshimura, Y., Sawa, Y*, Iida, J. Expression and dynamics of podoplanin in cultured osteoblasts with mechanostress and mineralization stimulus. *Acta Histochem Cytochem*. 査読有 2018;51(1):41-52. doi: 10.1267/ahc.17031.
- 4) Kajiwara K, Takata S, To TT, Takara K, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Darveau RP, Ishikawa H, Sawa, Y*. The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. *Diabetol Metab Syndr*. 査読有 2017;9:73. doi: 10.1186/s13098-017-0271-8.
- 5) Takara K, Maruo N, Oka K, Kaji C, Hatakeyama Y, Sawa N, Kato Y, Yamashita J, Kojima H, Sawa, Y*. Morphological study of tooth development in podoplanin-deficient mice. *PLoS One*. 査読有 2017;12(2):e0171912. doi: 10.1371/journal.pone.0171912.
- 6) Matsuda, Y., Hatakeyama, Y*, Nakashima, K., Kamogashira, N., Hatakeyama, J., Tamaoki, S., Sawa, Y., Ishikawa, H. Effects of a chemically synthesized leucine-rich amelogenin

peptide (csLRAP) on chondrogenic and osteogenic cells. J. Hard Tissue Biol. 査読有 2017; 26: 51- 60.

7) Matsuda, Y., Kamogashira, N., Hatakeyama, Y*., Mikami, T., Nakashima, K., Hatakeyama, J., Tamaoki, S., Sawa, Y., Ishikawa, H. Distinct role of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factors in human ameloblastoma epithelial cell proliferation. Biochem. Mol. Biol. 査読有 2017; 2: 1-5.

〔学会発表〕(計 2 件)

1) Kajiwara K, Takata S, Fujita T, Takara K, Tamaoki S, Sawa Y. Effects of TLR4 blocking on diabetic nephropathy promoted by the Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Japanese Association of Dental Research (JADR), Sapporo, NOV 2018.

2) Kajiwara K, Takata S, Fujita T, Takara K, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Ishikawa H, Sawa Y. Effects of TLR4 blocking on diabetic nephropathy promoted by the Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Japanese Association of Dental Research (JADR), Tokyo, NOV 2017.

〔その他〕

2018年7月26日記者発表、プレスリリース、岡山大学。

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：加藤幸成

ローマ字氏名：KATO YUKINARI

所属研究機関名：東北大学

部局名：未来科学技術共同研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 00571811

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：畠山雄次

ローマ字氏名：HATAKEYAMA YUJI

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、研究者個人に帰属されます。