

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09740

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍の低酸素応答性増殖機構を標的とした抗腫瘍治療法の創出

研究課題名(英文) Hypoxia-responsive CD73 promotes the growth and migration of pleomorphic adenoma cells

研究代表者

丸山 智 (Maruyama, Satoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：30397161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素誘導因子(HIF)の標的分子であるCD73が細胞機能に果たす役割を検討した。唾液腺多形腺腫由来細胞系SM-APを通常及び低酸素条件下で培養し、HIF-1 およびCD73の発現、細胞遊走能さらにCD73合成レベルをsiRNA法で制御したときの細胞増殖能について検討した。HIF-1 遺伝子・蛋白質は48時間低酸素培養下で核に高発現し、CD73発現も高発現がみられた。低酸素条件下において細胞遊走能は亢進し、CD73発現を抑制すると細胞増殖は抑制された。以上より、低酸素状態でHIF-1 を活性化させることで、多形腺腫細胞はCD73を高発現させ、細胞の増殖・遊走を促進してい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

腫瘍は低酸素状態(Hypoxia)という特異な微小環境下において、低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factors: HIF)により引き起こされる低酸素応答を介した生存・増殖をおこなっている。今回、我々はHIF活性化機構の標的分子の一つであるCD73が低酸素下で細胞機能に果たす役割を検討した。その結果、低酸素状態でHIF-1 を活性化させることで、多形腺腫細胞は自身がCD73を高発現させ、細胞の増殖・遊走を促進していることが示唆された。CD73を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療への展望を見出すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of CD73, one of the target molecules of the hypoxia inducible factors (HIF) activation mechanism, in cell function under hypoxia. We cultured SM-AP cells, which were established from a human pleomorphic adenoma, under normal or hypoxic conditions, and examined the expression of HIF-1 and CD73, as well as cell migration and proliferation when the level of CD73 synthesis was controlled by siRNA. The HIF-1 gene and protein were highly expressed in the nucleus under hypoxic conditions for 48 hours, and CD73 expression was also highly expressed. Under hypoxic conditions, the cell migration ability was enhanced compared to normal culture conditions. On the other hand, when CD73 expression was suppressed, cell proliferation was inhibited. These results suggest that activation of HIF-1 under hypoxic conditions promotes cell proliferation and migration of pleomorphic adenoma cells through their own high expression of CD73.

研究分野：口腔病理学

キーワード：hypoxia HIF-1 CD73 pleomorphic adenoma

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は低酸素状態(Hypoxia)という特異な微小環境下にあるため、低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factors: HIF)により引き起こされる低酸素応答は、腫瘍細胞の増殖やエネルギー代謝および腫瘍細胞への免疫反応抑制や腫瘍間質細胞の機能制御などにおいて重要な役割を果たしている。しかし HIF は生体の恒常性維持にも重要な役割を果たしていることから、HIF そのものをターゲットとするのではなく、腫瘍微小環境に特異的な HIF による活性化機構を標的とした新規抗腫瘍治療法の創出が求められている。

我々は日常の病理診断業務において、口腔扁平上皮癌や唾液腺腫瘍の病理組織像を診る中で、腫瘍間質には免疫系細胞及び血管などの間葉系細胞が介在しない、腫瘍自身の分泌する細胞外基質(Extracellular Matrix, ECM)が豊富に蓄積していることを見出し、腫瘍間質における ECM の機能を検討することで腫瘍細胞が低酸素下で維持・増殖できる仕組みを解明することができると考えた。そこで申請者は、多彩な間質形成と乏血管性を特徴とする唾液腺多形腺腫に注目し、「多形腺腫は低酸素環境下で多彩な間質を形成することで腫瘍細胞増殖が維持されている」という仮説のもと、これまで科学研究費補助金(若手研究 B、基盤研究 C)の継続的な支援を得て多面的に解析を重ねてきた。

まず申請者は耳下腺に発生した多形腺腫から多形腺腫由来細胞 SM-AP 細胞系を樹立し、細胞系及び組織系の両面から研究をアプローチできる環境を整えた。同時に外科材料を用いた病理組織学的解析により、腫瘍間質 ECM が細胞増殖因子のリザーバとなり、細胞増殖を維持していることを報告した。さらに樹立した SM-AP 細胞系を低酸素下で培養することで、HIF-1 蛋白質レベルが有意に高く維持されるとともに、HIF-1 は核へ移行し、ECM の合成が促進されること、siRNA を用いた ECM 発現抑制にて細胞増殖が抑制されることも確認した。

低酸素環境において多彩な間質形成を促進し、細胞増殖が維持されている可能性が示唆されたものの、依然としてその分子機構については未だ不明な点が多い。そこで申請者らは、HIF 活性化機構の標的分子の一つである CD73 に注目した。CD73 は、2 つの同一の 70kD サブユニットの二量体から構成され、glycosylphosphatidylinositol (GPI) 構造によって膜に固定された 5'-ヌクレオチダーゼである。腫瘍微小環境における CD73 の主な機能としては、免疫活性化 ATP を免疫抑制アデノシンに変換することで、CD73/アデノシン経路を介して腫瘍自身を攻撃する NK 細胞や CTL 細胞の活性化を抑制し、免疫不活化状態を保つことが知られており、腫瘍免疫抑制機構のターゲットの一つである。しかし申請者らは、唾液腺腫瘍の外科材料を用いた病理組織学的解析から、腫瘍自身の分泌する ECM が豊富に蓄積している腫瘍間質の中で、腫瘍細胞自身が CD73 を発現していることを見出した。

さらに SM-AP 細胞系に siRNA を用いて CD73 発現を抑制することで、細胞増殖が抑制されることも確認できた。よって CD73 による低酸素環境下での腫瘍の低酸素応答性増殖機構を解明できれば、CD73 による細胞外アデノシンの産生を介した免疫抑制機構を標的とした免疫療法とは異なる、ECM の存在下での CD73 を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療法を創出することができると考えたのである。

2. 研究の目的

本研究課題では、腫瘍自身の分泌する ECM が豊富に蓄積している低酸素環境下にある腫瘍間質のなかで、腫瘍細胞自身が CD73 を発現することで、CD73/アデノシン経路を介して免疫系に及ぼす機能とは別の腫瘍細胞自身の生存・増殖に直接関わる機能を持っているのではないかと推測した。特に CD73 には GPI アンカーのタンパク質分解的切断または加水分解を介して細胞膜から放出される可溶性フォームも存在していることも知られており、細胞増殖因子と同様に腫瘍間質 ECM が CD73 の可溶性フォームのリザーバとしての機能しているのではないかと考えた。ECM の存在下での CD73 を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を解明することで、低酸素環境下での腫瘍の低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療法を創出することを目的とし、以下の3点について明らかにする。

低酸素環境下での腫瘍細胞における CD73 発現と ECM 合成能の検証

腫瘍細胞性格や腫瘍間質に注目した CD73 発現パターンと機能評価

ECM の存在下での CD73 を介した細胞増殖関連液性因子の検討

3. 研究の方法

- (1) HIF-1 発現抑制による ECM の発現動態の検証: ヒト唾液腺多形性腺腫より樹立した SM-AP1 ~ SM-AP5 細胞について、通常の酸素正常培養条件(5% CO₂/20% O₂)と低酸素(5% CO₂/1% O₂/94% N₂)の条件下で 48 時間維持できるように培養する。低酸素環境下における HIF-1 発現と ECM 合成能との関係を、siRNA 法による HIF-1 発現抑制下での ECM 合成および ECM

合成抑制下での CD73 発現から検討する。

- (2) CD73 発現動態と腫瘍細胞の機能評価：低酸素下での腫瘍細胞における CD73 の機能を解析するために、低酸素培養条件下と通常培養条件下での SM-AP 細胞系の CD73 の発現動態を詳細に検討する。さらに siRNA 法による腫瘍細胞での CD73 発現及び ECM 合成抑制下での、CD73 の発現動態および細胞の増殖及び遊走能を検討する。
- (3) 細胞増殖関連液性因子の網羅的解析：腫瘍間質に存在する細胞増殖関連液性因子を抽出するために、SM-AP 細胞を低酸素培養条件下と通常培養条件下及び siRNA 法による CD73 発現抑制下で培養した後、培養上清を回収し、Proteome Profiler™ 抗体アレイキット (R&D systems) を用いて細胞増殖関連液性因子の網羅的解析を行い、(1)、(2)の結果と合わせて、CD73 を介した増殖に関わる低酸素応答性増殖機構の分子機構を見出す。
- (4) ヒト腫瘍組織材料を用いた組織学的解析：ヒト手術外科材料での CD73 の発現パターンを確認するために、ヒト多形腺腫組織をはじめとした、ヒト唾液腺腫瘍組織手術材料パラフィンブロック等から切片を作製し、免疫組織化学的染色にて検証する。特に CD73 の発現がみられる腫瘍細胞性格や腫瘍間質に注目した発現パターンを具体的に検討する。

4. 研究成果

- (1) SM-AP 細胞系の HIF-1 遺伝子発現抑制による ECM 発現動態の検証：HIF-1 が SM-AP 細胞系の ECM 発現動態にどのように関わっているのかを検討するために、siRNA を用いて HIF-1 発現を抑制した SM-AP 細胞系から RNA を抽出・精製し、cDNA を調整して定量的 RT-PCR 法にて、ECM 分子の一つである perlecan や fibronectin の発現を比較した。その結果、SM-AP1 細胞系の HIF-1 の発現を抑制することで、perlecan や fibronectin の発現も抑制される傾向があることが示された。
- (2) CD73 の発現動態及び腫瘍細胞の機能評価：低酸素培養条件下における SM-AP1 と SM-AP4 の CD73 遺伝子発現について試験管内で比較した。両細胞を通常の培養条件と低酸素条件 (1% O₂ / 5% CO₂ / 94% N₂) で 48 時間培養の後、RNA を抽出・精製し、cDNA を調整して定量的 RT-PCR 法にて検討した。その結果、SM-AP1/4 とともに通常の培養条件下に比べて高発現が確認された。さらにトランスウエルチャンバーに細胞をまきなおした後、通常の培養条件と低酸素条件 (1% O₂ / 5% CO₂ / 94% N₂) で 24 時間培養後の細胞遊走能を比較したところ、SM-AP1/4 とともに、細胞の遊走能が促進される傾向にあることがわかった。CD73 が SM-AP 細胞系の機能にどのように関わっているのかを検討するために、siRNA を用いて CD73 の発現を抑制した SM-AP 細胞系を作成し、細胞増殖能の比較検討をおこなった。その結果、siRNA で SM-AP1/4 細胞系の CD73 の発現を抑制したうえで、細胞を同量にまきなおした後の 3 日間の細胞増殖を比較したところ、SM-AP1 及び SM-AP4 とともに、CD73 の発現を抑制した細胞の増殖が、コントロールに比して抑制されることが示された。
- (3) 細胞増殖関連液性因子の網羅的解析：腫瘍間質に存在する細胞増殖関連液性因子を抽出するために、SM-AP1/4 細胞を低酸素培養条件下と通常培養条件下で培養したのち、培養上清を回収し、Proteome Profiler™ 抗体アレイキット (R&D systems) を用いて細胞増殖関連液性因子の網羅的解析をおこなった。その結果、SM-AP1/4 とともに、低酸素培養条件下で emmprin や Angiogenin の発現が増加するとともに、逆に GDF-15 や Pentraxin3 など発現の減少がみられた因子などが明らかとなった。低酸素培養条件下で emmprin や Angiogenin の発現が増加することが確認できたので、SM-AP1 細胞系をヌードマウス背部皮下に移植して形成させた腫瘍組織を切除、固定後にパラフィン切片を作製し、免疫組織化学的に検討した。その結果、腫瘍組織内の SM-AP1 細胞の核に HIF-1 陽性が、細胞膜に CD73 及び emmprin の発現もみられることがわかった。
- (4) ヒト腫瘍組織材料を用いた組織学的解析：ヒト多形腺腫瘍組織手術材料パラフィンブロックから切片を作製し、免疫組織化学的染色にて CD73 および細胞増殖関連液性因子の網羅的解析にて低酸素培養条件下で発現の増加が認められた emmprin の発現を検証した。その結果、ヒト多形腺腫瘍組織においても、腫瘍細胞に CD73 および emmprin の発現が認められると共に、さらに主に筋上皮分化を示す腫瘍細胞においては、SM-AP 細胞移植腫瘍での免疫組織学的解析結果と同様に、CD73 および emmprin の共在が確認された。
- (5) 実験結果の評価と研究の総括：これまでの実験結果より以下のように結論した。細胞外基質 (Extracellular Matrix: ECM) 豊富な腫瘍間質の中で、腫瘍細胞自身が HIF 活性化機構の標的分子の一つである CD73 を発現することで、腫瘍細胞の増殖が維持されている可能性が示された。よって、CD73 による低酸素環境下での腫瘍の低酸素応答性増殖機構を解明できれば、CD73 による細胞外アデノシンの産生を介した免疫抑制機構を標的とした免疫療法とは異なる、ECM の存在下での CD73 を介した腫瘍細胞自身の腫瘍特異的な低酸素応答性増殖機構を標的とした新たな抗腫瘍治療法を創出できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe T, Kitagawa N, Yoshimoto S, Maruyama S, Yamazaki M, Inai T, Hashimoto S, Saku T.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Keratin 17-positive Civatte bodies in oral lichen planus-distribution variety, diagnostic significance and histopathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 14586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71496-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Tsuneki M, Kato H, Izumi K, Tanuma JI, Cheng J, Saku T.	4. 巻 392(1)
2. 論文標題 Rac1-dependent phagocytosis of apoptotic cells by oral squamous cell carcinoma cells: A possible driving force for tumor progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Exp Cell Res.	6. 最初と最後の頁 112013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito K, Iioka H, Maruyama S, Sumardika IW, Sakaguchi M and Kondo E.	4. 巻 21(12)
2. 論文標題 PODXL1 promotes metastasis of the pancreatic ductal adenocarcinoma by activating the C5aR/C5a axis from the tumor microenvironment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 1121-1132.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2019.09.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito K, Sakaguchi M, Maruyama S, Iioka H, Putranto EW, Sumardika IW, Tomonobu N, Kawasaki T, Homma K, Kondo E.	4. 巻 9(16)
2. 論文標題 Stromal mesenchymal stem cells facilitate pancreatic cancer progression by regulating specific secretory molecules through mutual cellular interaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cancer.	6. 最初と最後の頁 2916-2929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.24415. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sumita Y, Yamazaki M, Maruyama S, Abe T, Cheng J, Takagi R, Tanuma JI.	4. 巻 40(5)
2. 論文標題 Cytoplasmic expression of SOX9 as a poor prognostic factor for oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 2487-2496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6665. Epub 2018 Aug 22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takata K, Saito K, Maruyama S, Miyata-Takata T, Iioka H, Okuda S, Ling Y, Karube K, Miki Y, Maeda Y, Yoshino T, Steidl C, Kondo E.	4. 巻 110(1)
2. 論文標題 Identification of TRA-1-60-positive cells as a potent refractory population in follicular lymphomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 443-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13870. Epub 2018 Dec 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 田沼順一
2. 発表標題 低酸素環境下における唾液腺多形腺腫由来細胞は増殖・遊走を亢進する.
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 田沼 順一
2. 発表標題 唾液腺多形腺腫における低酸素応答性増殖機構.
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山 智, 山崎 学, 阿部達也, 田沼順一
2. 発表標題 口腔粘膜悪性境界病変におけるp53免疫組織科学的検索の取り組み
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 智, 加納 浩之, 山崎 学, 常木 雅之, 田沼 順一
2. 発表標題 腺性歯原性嚢胞より発生した顎骨中心性粘表皮癌の1 例
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会 第11回日本口腔検査学会 総会・共催学術大会
4. 発表年 2018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
研究分担者	山崎 学 (Yamazaki Manabu) (10547516)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	田沼 順一 (Tanuma Jun-ichi) (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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