

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10329

研究課題名(和文) 口腔癌進展における癌関連線維芽細胞(CAF)の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of the function of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the invasion of oral cancer.

研究代表者

船山 昭典(Funayama, Akinori)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80529686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞と癌関連線維芽細胞(CAFs)を共培養した3次元培養モデルを開発し、CAFを介したin vitroでの癌の遊走能と浸潤能を検討した。さらに、ヒト外科標本65例を用いてα-SMAとSOX9の発現を免疫組織化学的に解析した。CAFsはin vitroにおいて、癌の遊走および浸潤を促進し、浸潤した癌細胞ではSOX9の顕著な発現を認めた。またTGF-β1シグナルを阻害することで、SOX9の発現と癌浸潤は減少した。さらにヒト外科標本では、CAFsの存在は、浸潤部におけるSOX9の高発現と相関し、局所再発に関連を認めた。CAFsはTGF-β/SOX9経路を介して癌の遊走と浸潤を促進する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの悪性化を制御するCAFとその細胞が分泌するTGF-βを標的とすることで、がん組織周囲の微小環境も新たにかん治療のターゲットとして加えることができることになり、がん細胞を標的とした抗がん剤との併用による新規治療法開発への応用に期待できる。またCAFの機能解析がさらに加速して進めていくことで治療方針や予後予測にCAFの存在を考慮するなどの新たな治療戦略の立案の一助になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblasts (CAFs) have important roles in promoting cancer development and progression. This study developed three-dimensional (3D) in vitro models co-cultured with oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and CAFs to examine CAF-mediated cancer migration and invasion. Moreover, we performed an immunohistochemical analysis of alpha-smooth muscle actin and SOX9 expression in surgical specimens from 65 OSCC patients. The results indicated that CAFs promote cancer migration and invasion in migration assays and 3D in vitro models. The invading OSCC cells exhibited significant SOX9 expression. TGF-β1 signaling inhibition reduced SOX9 expression and cancer invasion. In surgical specimens, the presence of CAFs was correlated with SOX9 expression in the invasive cancer nests and had a significant impact on regional recurrence. These findings demonstrate that CAFs promote cancer migration and invasion via the TGF-β/SOX9 axis.

研究分野：口腔外科

キーワード：癌関連線維芽細胞 口腔癌 癌微小環境 TGF-β SOX9

## 1. 研究開始当初の背景

国立がん研究センターの報告では、本邦におけるがんと診断された患者は 2014 年には約 87 万人であり、2016 年にがんで死亡した患者数は 37 万人もいる現状があり、国民の死亡原因の 1 位を占めている。口腔がんにおける口腔がん罹患患者数は、1975 年に 2100 人であったが 2015 年には約 7800 人と増加傾向にあり、新たな治療戦略や悪性度の評価は喫緊の課題である。

がん組織はがん細胞のみでは構成されておらず、がん細胞の周囲には線維芽細胞、免疫炎症細胞、血管構成細胞なども多数動員されてがん間質細胞とも呼ばれ、がんの発生・進行にはがん微小環境が重要な役割を果たしていると言われている。がん組織内に存在する線維芽細胞は、がん関連線維芽細胞 cancer associated fibroblasts (CAFs) と呼ばれており、非がん組織の線維芽細胞とは生物像が異なっていることが明らかとなり、悪性像に決定的な影響を与える細胞集団であることが示されてきている。例えば、コラーゲンゲル上で扁平上皮がん組織中から分離した CAFs と扁平上皮がん細胞とを共培養すると、扁平上皮がん細胞は浸潤能を獲得し、CAFs が先頭に立って浸潤しており、CAFs は細胞外マトリックス分解酵素 (matrix metalloproteinases : MMPs) の分泌、活性化を介して、がん細胞の浸潤能を促進していた。これは扁平上皮がん細胞に対して MMP 阻害剤を投与しても浸潤は抑制しないが、CAFs に対して MMP 阻害剤を投与すると浸潤が抑制されることから、CAFs が細胞外基質を再構築し浸潤能を担っている (Gaggioli, 2007)。また口腔扁平上皮癌がん患者 152 症例で、腫瘍間質における筋線維芽細胞の発現頻度は  $\alpha$ -SMA 免疫組織化学で評価し、局所再発の有無、遠隔転移の有無において  $\alpha$ -SMA 陽性高値と低値で有意差を認めたと報告している (Luksic, 2015)。このことから CAFs の存在ががん細胞の悪性度は、がん細胞自身が有する遺伝的、生物学的因子 (内因性因子) だけでなく、がん間質細胞により影響を受ける因子 (外因性因子) にも規定されると考えられる。がん細胞は、腫瘍組織中においてがん間質とともに構成される微小環境内で、3 次元構造を構成して増殖している。固形がん細胞の *in vitro* での解析には、従来血清培地下で接着性プレートを用いた 2 次元平面培養が標準的に用いられていたが、生体内における培養状態とは大きく違っており、がん細胞が本来持っている特性も多くの場合失われていると推測され、がん細胞の本来の生育状態を正確に反映しているとは言い難い面があり、より生体と意識した実験系の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

以上より、癌微小環境を構成する CAFs を組み込んだ口腔癌 3 次元培養モデルの開発に取り組み、CAFs の機能的・免疫組織化学的解析を行うことで、がんの進展に関する CAFs の役割について次の 3 点について明らかにしていく。

1. 3 次元培養モデル作製および組織学的評価
2. 3 次元培養環境におけるがん細胞の浸潤能の評価
3. ヒト外科標本における CAFs の存在と臨床的相関について

## 3. 研究の方法

### 1. 3D 培養モデル作製および組織学的評価

4 種類の口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株 (HSC-3, Ca9-22, HSC-2, HSC-4) を使用した。CAFs 市販されている非小細胞肺癌由来線維芽細胞を用いた。また、ヒト口腔粘膜から分離した口腔線維芽細胞 (NOFs) を対象群とした。

まず、CAFs と NOFs の培養上清中の増殖因子である TGF- $\beta$ 1 濃度を ELISA にて定量し、両者の培養上清が OSCC 細胞の遊走能に及ぼす影響を scratch assay にて検討した。次に口腔癌 3 次元培養モデルは、CAFs をコラーゲンゲルに混ぜ、培養インサート内で 7 日間液相培養。そこから、ゲル上に癌細胞を播種して 7 日間液相培養し、さらに 7 日間を気相 液相培養して作成した。固定後、HE 染色で組織像を観察した。対照としては、CAFs に替えて、正常の口腔線維芽細胞を組み込んだモデルとした。

### 2. 3D 培養環境におけるがん細胞の浸潤能の評価

作成した口腔癌 3 次元培養モデルのパラフィン包埋薄切標本上で組織形態を計測し、OSCC 細胞の浸潤能を解析するとともに、転写因子 SOX9 および上皮間葉転換 (EMT) マーカー (vimentin, fibronectin, TWIST2, E-cadherin) の発現状況を免疫組織化学的に検討した。さらに CAFs の分泌する TGF- $\beta$ 1 に着目し、CAFs はがん細胞において SOX9 発現を促進することで癌の浸潤に関与するとの仮説を立てた。TGF- $\beta$ 1 シグナルの阻害や癌細胞の SOX9 のノックダウンを行い、浸潤能に影響があるかを検討した。

### 3. ヒト外科標本における CAFs の存在と臨床的相関について

ヒト外科標本において、CAFs のマーカーである  $\alpha$ -SMA と SOX9 の発現を免疫染色で評価し、CAFs の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。

## 4. 研究成果

### 1. 3 次元培養モデル作製および組織学的評価

CAFs は NOFs と比較して、CAFs マーカーである  $\alpha$ -SMA と TGF- $\beta$ 1 を高発現し、CAFs 培養上清 (CAF-CM) は NOFs 培養上清 (NOF-CM) の 5 倍量の TGF- $\beta$ 1 を含んでおり、CAFs 培養上清は OSCC 細胞の遊走を有意に促進した (図 1)。3 次元培養モデルにおいて、CAFs はコントロール群では、癌細胞層と下部のコラーゲンゲルの境界が比較的明瞭で間質への進展が少ないのに対し、CAFs を用いると、ゲル上の播種した癌細胞がコラーゲンゲル内に著明に進展しており、上部の癌細胞層から離れて存在し、著明な浸潤像を認めた (図 2)。ゲル内に浸潤した OSCC 細胞に SOX9, vimentin, fibronectin, TWIST2 の高発現と E-cadherin の発現低下を認めており、がん細胞において上皮間葉転換が誘導されていることが示された (図 3)。

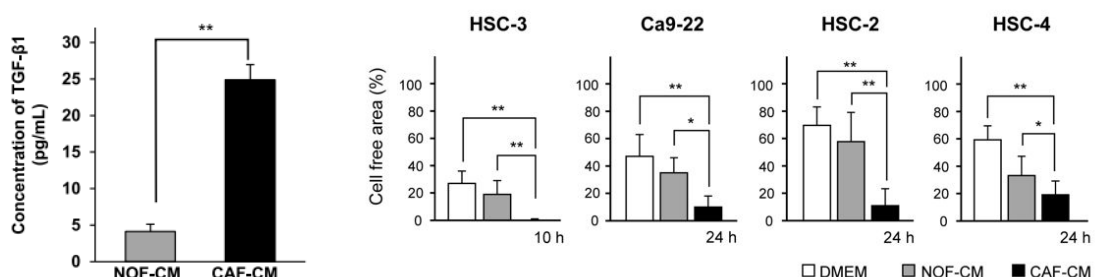


図 1: 培養上清内の TGF- $\beta$ 1 の含有量と各培養上清による遊走能について

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$

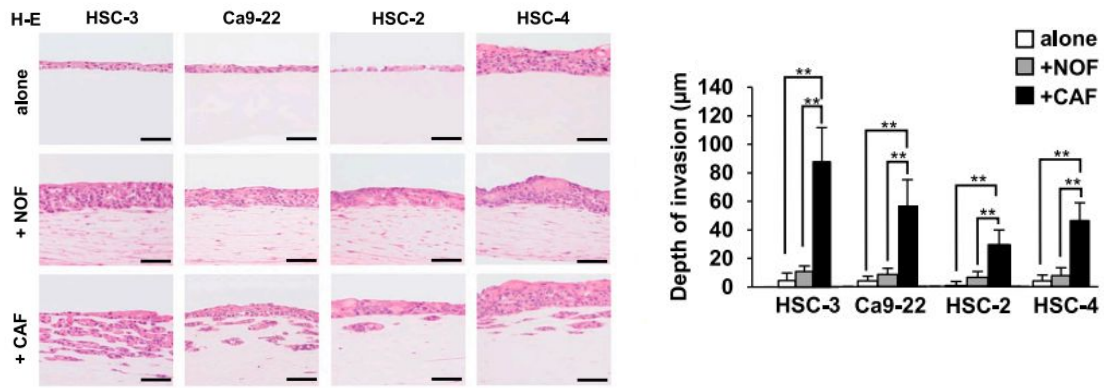


図 2: 3次元培養モデルの HE 染色像と浸潤について

alone: 癌細胞のみ培養 +NOF: 癌細胞と NOF を培養 +CAF: 癌細胞と CAF を培養

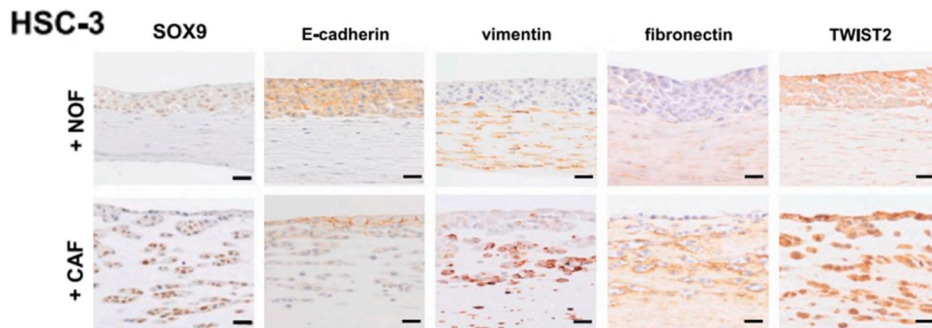


図 3: 3次元培養モデルの免疫染色像について

### 2. 3次元培養環境におけるがん細胞の浸潤能の評価

本モデルで SB431542 添加による TGF- $\beta$ 1 経路遮断または siRNA による SOX9 のノックダウンを行ったところ、ともに癌細胞の浸潤が有意に阻害された (図 4)。

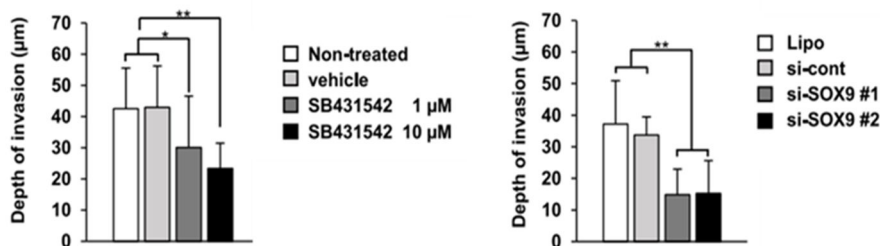


図 4: 3次元培養モデルにおける TGF- $\beta$ 1 阻害薬および SOX9 のノックダウンによる浸潤能の変化について

### 3. ヒト外科標本における CAFs の存在と臨床的相関について

SOX9 陽性細胞が多く認められた口腔がん組織の間質には CAF の存在割合が高いこと、かつ、CAF が多く認められた口腔がん患者では再発率が高いという関連性を見出した。

CAFs は SCC 浸潤部間質で誘導されており、浸潤部の OSCC 細胞では SOX9 の高発現を認め、CAFs の存在は頸部リンパ節後発転移および無再発生存率と有意に相関していた。(図 5)。

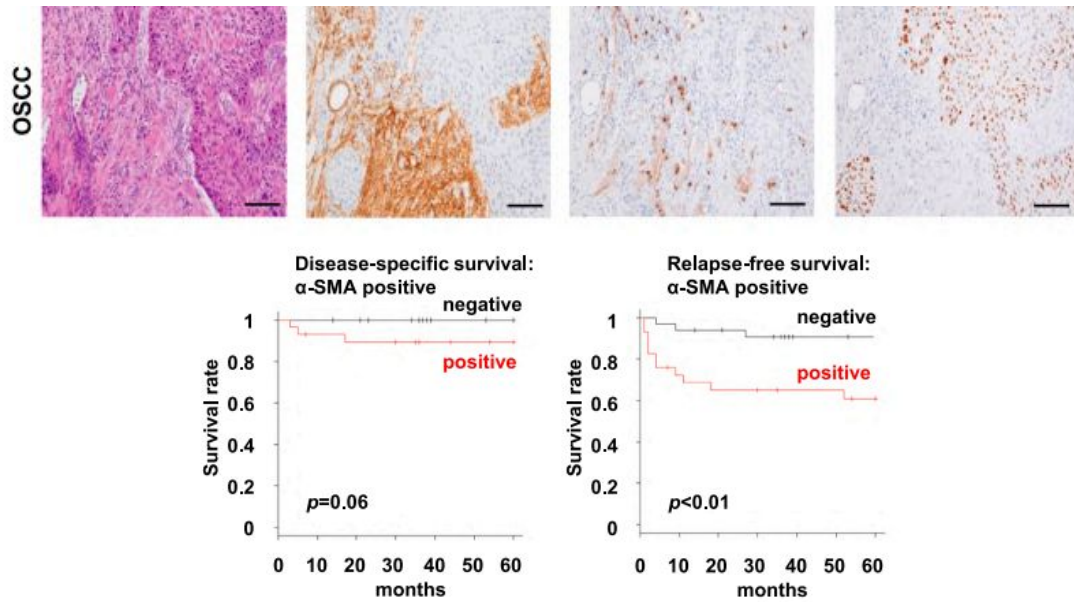


図 5: ヒト外科標本の浸潤先端部の HE および免疫染色像と患者予後との関係

今回の研究により、がん間質に存在する CAF が分泌する増殖因子 TGF- $\beta$  により、口腔がん細胞で SOX9 転写因子発現が亢進し、がん細胞に上皮間葉転換が誘導され、口腔がん細胞の悪性度（浸潤、遊走能）が増すことが示された。このことは、以前報告した SOX9 陽性細胞と患者予後の関連に TGF- $\beta$  /SOX9 経路が作用していることの実証につながった。がんの悪性を制御する CAF とその細胞が分泌する TGF- $\beta$  を標的とすることで、がん組織周囲の微小環境も、新たにかん治療のターゲットとして加えることができることになり、がん細胞を標的とした抗がん剤との併用による新規治療法開発への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Haga Kenta, Yamazaki Manabu, Maruyama Satoshi, Kawaharada Masami, Suzuki Ayako, Hoshikawa Emi, Chan Nyein Nyein, Funayama Akinori, Mikami Toshihiko, Kobayashi Tadaharu, Izumi Kenji, Tanuma Jun-ichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- /SOX9 axis in cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101236 ~ 101236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101236	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 船山昭典, 金丸祥平, 三上俊彦, 新美奏恵, 小林正治, 田沼順一
2. 発表標題 関連線維芽細胞は口腔扁平上皮癌においてTGF- /SOX9経路介して遊走および浸潤を促進する
3. 学会等名 第74回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 丸山智, 船山昭典, 小林正治, 田沼順一
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞と口腔扁平上皮癌細胞の相互作用におけるTGF- /SOX9経路の役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 丸山智, 船山昭典, 三上俊彦, 小林正治, 田沼順一
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞による口腔扁平上皮癌の遊走および浸潤の制御機構の役割
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 丸山智, 鈴木絢子, 干川絵美, 船山昭典, 三上俊彦, 田沼順一, 小林正治, 泉健次
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞は口腔扁平上皮癌細胞の遊走および浸潤を促進する-3次元培養モデルを用いた検討-
3. 学会等名 第79回新潟癌治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 丸山智, 船山昭典, 金丸祥平, 三上俊彦, 新美奏恵, 小林正治, 田沼順一
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞は口腔扁平上皮癌においてSOX9を高発現させ遊走および浸潤を促進する
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽賀健太, 山崎学, 丸山智, 鈴木絢子, 干川絵美, 船山昭典, 三上俊彦, 小林正治, 泉健次, 田沼順一
2. 発表標題 がん関連線維芽細胞は口腔扁平上皮癌においてSOX9発現を増強させ浸潤を促進する
3. 学会等名 令和元年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Haga, Manabu Yamazaki, Satoshi Maruyama, Ayako Suzuki, Emi Hoshikawa, Akinori Funayama, Toshihiko Mikami, Tadaharu Kobayashi, Kenji Izumi, Jun-ichi Tanuma
2. 発表標題 Cancer-associated fibroblasts promote the invasion of oral squamous cell carcinoma cells via the TGF- /SOX9 axis
3. 学会等名 The International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment
4. 発表年 2020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	田沼 順一 (Tanuma Jyunichi)  (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji)  (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	三上 俊彦 (Mikami Toshihiko)  (90595745)	新潟大学・医歯学系・非常勤研究員  (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
---------	---------