

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10095

研究課題名(和文) CXCR4システムと癌関連線維芽細胞を標的とした口腔癌に対する集学的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a comprehensive treatment approach targeting the CXCR4 system and cancer-associated fibroblasts for oral cancer

研究代表者

栗林 伸行 (Nobuyuki, Kuribayashi)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80617332

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)：実験で使用するCAFsにおいて、口腔癌症例から初代培養をおこない腫瘍部から培養したCAFsの培養を施行した。抗線維化薬を用いてCAFsの細胞増殖に及ぼす影響を検討した結果、pirfenidoneによるCAFsの増殖抑制傾向が認められた。次いで、CAFsおよびB88細胞接触下での口腔癌細胞の細胞増殖における抗線維化薬の影響を検討したが、口腔癌細胞の細胞増殖抑制に有意な差を認めなかった。従って、これらの結果からCXCR4システムを介した口腔癌細胞における増殖は癌微小環境による影響ではなく、口腔癌細胞自身の増殖因子による影響が主である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところ、SDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌におけるCAFsの特性を明らかになっていない。従って、本研究結果でのSDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌におけるCAFsの細胞増殖の影響を明らかにしたことは学術的意義があると考えられる。さらに、CAFsの特性を明らかにすることは、がん患者の生存率向上につながる可能性があり、口腔癌の治療において社会的に意義のある事と思われる。

研究成果の概要(英文)：In the experiment, primary cultures were established from oral cancer cases to obtain cultured CAFs from the tumor region. The effect of an anti-fibrotic drug on the proliferation of CAFs was investigated. As a result, a tendency of growth inhibition in CAFs was observed with pirfenidone. Subsequently, the impact of anti-fibrotic drugs on the cell proliferation of oral cancer cells was examined under CAFs and B88 cell co-culture conditions, but no significant difference in the inhibition of oral cancer cell proliferation was observed. Therefore, these results suggest that the proliferation of oral cancer cells, mediated through the CXCR4 system, is primarily influenced by the growth factors produced by the oral cancer cells themselves, rather than the cancer microenvironment.

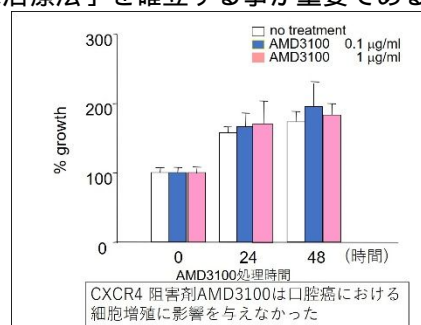
研究分野：口腔癌

キーワード：CXCR4 癌関連線維芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は所属リンパ節転移である。そのため、当研究室では口腔癌の転移機構に関する研究を行ってきた。その中で、口腔癌細胞をヌードマウス咬筋内に移植する同所性移植モデルシステムを構築し (Int J Cancer 70: 120, 1997), ケモカインレセプターCXCR4 を発現する口腔癌細胞が、転移先臓器の産生するリガンドstromal-cell derived factor (SDF)-1 に引き寄せられながら転移することを明らかにした (Exp Cell Res 290:289, 2003, Lab Invest 84:1538, 2004, Int J Oncol 25:65, 2004, Mol Cancer Res 5:685, 2007)。さらに、この転移が CXCR4 阻害剤である AMD3100 および AMD070 により抑制できることを証明した (Mol Cancer 8:62, 2009, Eur J Cancer 47:452, 2011, Clin Exp Metastasis 30:133, 2013, Oncol Rep 40:303, 2018)。これらの結果から、SDF-1/CXCR4 システムは主に走化性の亢進に関与していることを明らかにしたが、CXCR4 阻害剤は *in vitro* での実験において癌細胞の増殖に影響を与えず (図), さらにマウスによる実験的治療において、転移抑制効果を有するが、原発腫瘍に対する増殖抑制効果を有しないため、マウスの生存日数を改善できなかった。従って、「CXCR4 システムを介した口腔癌細胞における細胞増殖を抑制する新たな治療法」を確立する事が重要である。

近年、癌細胞が持続的な増殖を行うためには間質細胞のような癌微小環境との連携が重要であり、その主要な構成成分である癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) は癌間質細胞のなかにおいて癌組織を充填する主要な細胞として、浸潤・転移の他に局所の癌細胞の増殖に重要な役割を担っている (Trends Genet 25:30, 2009)。Takai らは、肺癌において CAFs が誘導する癌細胞の増殖に対し、抗線維化薬である pirfenidone が増殖抑制に作用するとことを報告した (Oncotarget 7:50, 2016) また、当研究室では、口腔癌における CAFs において、CAFs から分泌される IL-6 が微小環境下における血管新生に関わっていることを見出し、IL-6 レセプターに対する抗体薬 (tocilizumab) による *in vivo* 腫瘍増殖抑制効果を報告した (ESMO in Asia 2015 発表)。従って、CXCR4 システムを介した口腔癌に対して CXCR4 システムと CAFs をブロックすることができれば、癌細胞の転移・増殖の両者を阻害できる可能性がある。



### 2. 研究の目的

CAFs は癌の進展に有利な微小環境を構築する主要成分であることが明らかになっている (J Cell Biochem 101:805, 2007)。さらに、われわれの研究室において CAFs の分泌する IL-6 を抑制する事により口腔癌細胞の増殖が抑制されることを報告した。従って、CXCR4 システムにおける口腔癌細胞の増殖においても CAFs が何らかの関与をしていることが予想される。

本研究では、SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌において CXCR4 システムと CAFs を標的とした集学的治療の開発を行うことを目的とする。

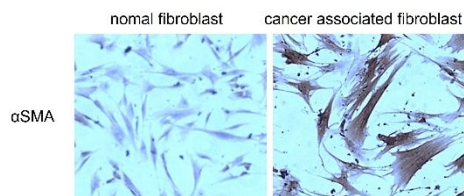
### 3. 研究の方法

本研究では、抗線維化薬である pirfenidone が CAFs の細胞増殖に及ぼす影響を MTT assay にて検証する。CAFs は当研究室で口腔癌にて樹立したものを使用する。さらに、抗線維化薬での CAFs の増殖抑制が確認できた後、CAFs が CXCR4 高発現株である B88 細胞接触下において癌細胞の増殖に与える影響、さらに、pirfenidone を用いた増殖抑制を MTT assay にて検討する。また、CAFs が CXCR4 高発現株である B88 細胞非接触下における各々の影響も検討する。*In vivo* として、B88 細胞あるいは SCC9 細胞をヌードマウス咬筋内に移植した群と癌細胞に CAFs を combine させた群における腫瘍増殖能の検討する。さらに、マウスに CXCR4 阻害剤 AMD3100 および pirfenidone を投与し、腫瘍の増殖・転移に及ぼす影響を検討する。

### 4. 研究成果

まず、実験で使用する CAFs において、口腔癌症例から初代培養をおこない腫瘍部から培養した CAFs の培養を施行した。CAFs の評価として、SMA を用い免疫組織染色化学染色にて確認した (図)。次いで、抗線維化薬である pirfenidone を用いて CAFs の細胞増殖に及ぼす影響を MTT assay にて測定した。まず、pirfenidone の最終濃度を 1.5mg/ml とし測定を行った。結果、pirfenidone による CAFs の増殖抑制傾向が認められた、しかしながら、有意な差は得られなかった。pirfenidone の最終濃度を 2.0mg/ml および 2.5mg/ml で同様の検討を行ったが同様の結果で

あった。次いで、プレートに CAFs を播種し、単層上に B88 細胞を播き細胞接触下での口腔癌細胞の細胞増殖における pirfenidone の影響を検討したが、口腔癌細胞の細胞増殖抑制に有意な差を認めなかった (data not shown)。今回われわれは、CXCR4 システムを介した口腔癌細胞における細胞増殖の抑制を CAFs の抑制による研究を試みた。使用した



抗線維化薬は特発性線維症の治療薬として保険認可されている薬剤であり、TGF- $\beta$  の産生抑制を作用機序としており、本研究においても CAFs の細胞増殖抑制傾向を示した。従って、これらの結果から CXCR4 システムを介した口腔癌細胞における増殖は癌微小環境による影響ではなく、口腔癌細胞自身の増殖因子による影響が主である可能性が示唆された。

われわれは、口腔癌細胞において SDF-1/CXCR4 システムは主に走化性の亢進に關与していること、および本システムが細胞増殖能に關与しないことを明らかにした。本研究では CAFs における SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌細胞の細胞増殖への影響はなかったが、他の癌細胞において、TGF- $\beta$  が癌細胞における CXCR4 の発現を選択的に発現させるという報告もあり、癌微小環境は本システムにおいて走化性のさらなる亢進に關与している可能性も考えられ、遊走能および浸潤能への影響の検討も今後必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hyodo T, Kuribayashi N, Fukumoto C, Komiyama Y, Shiraishi R, Kamimura R, Sawatani Y, Yaguchi E, Hasegawa T, Izumi S, Wakui T, Nakashiro K, Uchida D, Kawamata H	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25744-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kojima Sayaka, Tokuzen Norihiko, Kuribayashi Nobuyuki, Hino Satoshi, Uchida Daisuke
2. 発表標題 Investigation of the antimicrobial effects of various oral care supplies
3. 学会等名 The 1st Annual Meeting of the International Society of Oral Care（国際学会）
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
---------	---------