

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10102

研究課題名（和文）口腔癌におけるDPP4によるIFN誘導性ケモカインの不活化作用とその臨床的意義

研究課題名（英文）Inactivation of IFN-induced chemokines by DPP4 and its clinical significance in oral cancer

研究代表者

森 一将（MORI, Kazumasa）

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：80372902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：IFN誘導性ケモカインCXCL9、CXCL10、CXCL11の安定発現細胞株の抗腫瘍作用は、CXCL9、CXCL11発現細胞は、腫瘍増殖を抑制したが、CXCL10には抑制作用は認めない。CXCL9、CXCL11発現腫瘍組織は、NK1.1の発現上昇とVEGFの発現低下が認められた。CXCL10発現腫瘍組織では、ケモカイン切断酵素DPP4の発現が認められた。この結果から、IFN誘導性ケモカインCXCL9、CXCL10、CXCL11の抗腫瘍作用には違いがあり、ケモカインを切断するDPP4の発現とその酵素に対するケモカインの感受性の違いに依存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

IFN誘導性ケモカインCXCL10の腫瘍増殖能の要因を検討した。結果、CXCL10発現腫瘍組織は、ケモカインを切断する酵素DPP4の発現が多く認められた。これはDPP4によって切断された短縮型CXCL10が、癌関連線維芽細胞（CAFs）の動員あるいは分化に関与している可能性を考えた。現在癌治療に用いられる免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法の有効性は、腫瘍組織への細胞傷害性T細胞（CTL）の動員が必要であり、その動員にはIFN誘導性ケモカインが重要で、本研究で得られた知見は、DPP4を標的とした新たな免疫療法の奏功性改善の分子基盤の理解に貢献するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Stable expression cell lines of IFN-inducible chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 were constructed, and the following results were obtained regarding their antitumor effects. (1) CXCL9- and CXCL11-expressing cells inhibited tumor growth, but CXCL10 did not show any inhibitory effect. (2) Tumor tissues expressing CXCL9 and CXCL11 showed increased expression of NK1.1 and decreased expression of VEGF. (3) Tumor tissues expressing CXCL10 showed increased expression of DPP4, a chemokine cleaving enzyme. These results suggest that the anti-tumor effects of IFN-inducible chemokines, CXCL9, CXCL10, and CXCL11, are different and depend on the expression of DPP4, which cleaves chemokines, and the sensitivity of chemokines to this enzyme.

研究分野：口腔外科学

キーワード：DPP4 口腔扁平上皮癌 CXCL10 IFN誘導性ケモカイン T細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、第4の治療法として免疫チェックポイント阻害剤による免疫療法が頭頸部癌を含めた多くの悪性腫瘍の標準治療法として臨床応用されている。この免疫療法に対して耐性を示すのは、T細胞の活性化や増殖を抑制する分子の発現、IFN誘導性ケモカインCXCL9、CXCL10の発現抑制による浸潤リンパ球の低下、制御性T細胞(Treg)、腫瘍関連マクロファージなどの浸潤などが知られている。抗PD-1抗体による頭頸部癌に対する免疫療法の奏功性は、腫瘍局所へのCD8⁺T細胞の浸潤が多いほど良好とされている。従って腫瘍局所へのCD8⁺T細胞の浸潤を促進させる方策を探索することは、有効な免疫療法を確立する上できわめて重要な研究課題といえる。

2. 研究の目的

本研究では マウスモデルを用いてDPP4に対するIFN誘導性ケモカインの切断感受性が、抗腫瘍作用に影響を及ぼすのか検討する。そして臨床的見地から、ヒト口腔扁平上皮癌症例におけるDPP4の発現と浸潤リンパ球、臨床的背景との関連性について検討する目的であった。

3. 研究の方法

本研究は、明海大学歯学部遺伝子組換え安全実験委員会（承認番号 0083）、及び明海大学歯学部実験動物倫理委員会（承認番号 A1843）の承認を受け、実施した。

1) 細胞培養

マウス扁平上皮癌細胞株SCCVIIは、C3H/Heマウス由来の皮膚扁平上皮癌より樹立された細胞株であり、マウス口腔扁平上皮癌モデルに広く用いられておりこの培養細胞を使用した。

2) レンチウイルス発現ベクターの作製

マウスIFN誘導性ケモカイン遺伝子 *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11*のIFN誘導性ケモカインのレンチウイルス発現系を構築した。

3) IFN誘導性ケモカインの安定発現細胞株の作製

マウス扁平上皮癌細胞 SCCVII細胞のケモカイン発現量をELISA kit (CXCL9 Mouse Simple Step ELISA kit, IP10(CXCL10) Mouse Simple Step ELISA kit, CXCL11(ITAC) Mouse Simple Step ELISA kit, abcam, Cambridge, UK)を用いて測定した。

4) IFN誘導性ケモカインの安定発現細胞株の*in vitro*における細胞増殖

上記で作製したケモカイン安定発現細胞, empty vector導入細胞 (以下Vector)および親株SCCVII細胞を測定した。

5) IFN誘導性ケモカインの安定発現細胞株のヌードマウス背部への移植

ケモカイン安定発現細胞, Vector導入細胞, および親株SCCVII細胞をヌードマウス背部に移植し、経日的に腫瘍の大きさを計測した。腫瘍の大きさは、ノギスを用いて長径及び短径を測定し、腫瘍の大きさを以下の計算式より求めた。

Tumor volume mm³ = 長径 × (短径×短径)/2、対照群 (Vector)の腫瘍の大きさが最大に達した3週間後にすべてのマウスを安楽死させ、移植部組織を摘出し、パラフィン包埋を行

い,免疫組織化学的検討のための試料とした.

6) 免疫組織学的検

得られたパラフィン包埋材料から,各一次抗体を用い免疫染色を行った.免疫染色の定量化は光学顕微鏡を用いて200倍で観察し,画像をイメージングソフトウェアを用いてデジタル化した.デジタル画像は,レベル補正を行い,その後,核染色部と抗体染色陽性部を二値化し,画像総面積に占める抗体染色陽性部の割合を算出した.

4. 研究成果

1) IFN誘導性ケモカインの安定発現細胞株の作製および*in vitro*における細胞増殖能の検討

IFN誘導性ケモカインCXCL9, CXCL10, CXCL11の抗腫瘍作用について検討するため,マウス扁平上皮癌細胞SCCVIIを用いてこれらのIFN誘導性ケモカインを産生する安定発現細胞株を作製した.その結果,それぞれのケモカイン遺伝子を導入した細胞株から有意なケモカインの産生が認められた ($p < 0.001$) (Figure 1).

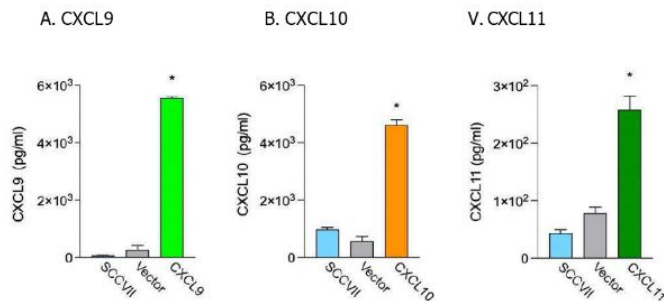


Figure 1

2.ヌードマウスにおけるIFN誘導性ケモカインの抗腫瘍作用の検討

IFN誘導性ケモカインの*in vivo*における抗腫瘍作用を検討するため,作製したケモカイン発現細胞株をヌードマウスの背部へ移植し,移植後8日,11日,15日,18日目に腫瘍の大きさを測定した.(Figure 2).CXCL9, CXCL11発現細胞株では,Vectorと比べて接種後11日目ですでに腫瘍の増大が有意に抑制され,その抑制は18日目まで認められた ($p < 0.05$).一方, CXCL10発現細胞株では,腫瘍の増殖抑制作用は認められず,Vectorとほぼ同様に腫瘍の増大が認められた.これはIFN誘導性ケモカインCXCL9, CXCL10, CXCL11の抗腫瘍作用は*in vivo*において,違いが認められること示すものである.

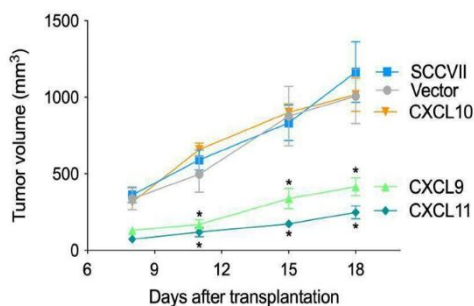


Figure 2

3. IFN誘導性ケモカイン発現腫瘍組織におけるNK1.1 (CD161)の免疫組織化学的検討

次にこのIFN誘導性ケモカインの抗腫瘍作用の違いが何に起因しているのか明らかにするため、NK細胞のマーカーNK1.1 (CD161)に対する抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。CXCL9 ($p = 0.0001$), CXCL11 ($p = 0.0059$)は、Vectorと比較して有意なNK1.1の発現上昇が認められた(Figure 3).

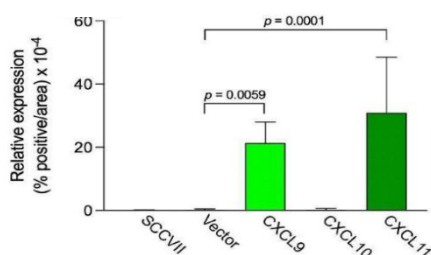


Figure 3

4. IFN誘導性ケモカイン発現腫瘍組織におけるVEGFの免疫組織化学的検討

IFN誘導性ケモカインの抗腫瘍作用の違いに血管新生抑制作用も関与しているか、VEGFの発現について免疫組織化学的検討を行った。この発現量の違いを定量的に解析したところ、Vectorと比較してCXCL9 ($p = 0.0059$), CXCL11 ($p = 0.0033$)は、有意なVEGFの発現抑制が認められた。またCXCL10は、逆に有意なVEGFの発現上昇が認められた($p = 0.0188$) (Figure4).

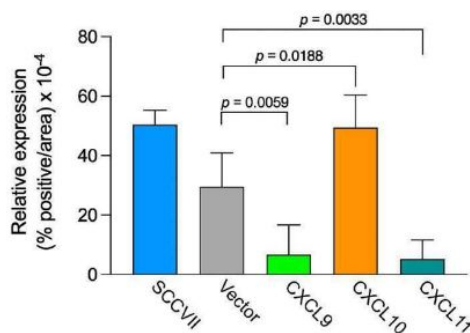


Figure 4

5. IFN誘導性ケモカイン発現腫瘍組織におけるDPP4の免疫組織化学的検討

このIFN誘導性ケモカインの抗腫瘍作用の違いが何に起因しているか明らかにするため、ケモカインのペプチド鎖を切断する酵素DPP4の関与について、免疫組織化学的検討を行った。この結果、DPP4陽性領域について定量解析を行ったところこれらの腫瘍組織間に統計学的有意差は認められなかった(Figure5)。Vectorと比較してCXCL10発現腫瘍組織では有意な発現上昇が認められた($p < 0.0001$) (Figure6).

腫瘍組織間

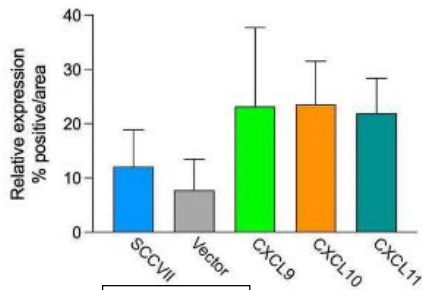


Figure 5

腫瘍実質組織

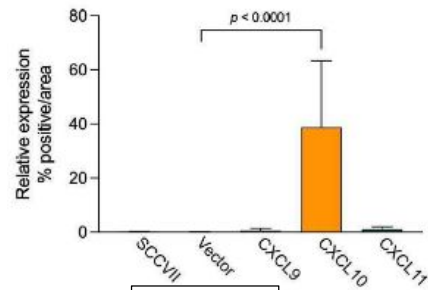


Figure 6

【まとめ】

IFN誘導性ケモカインCXCL9, CXCL10, CXCL11の安定発現細胞株を構築し、ヌードマウスに移植し、その抗腫瘍作用について検討し、以下の知見が得られた。

1. CXCL9, CXCL11発現細胞は、腫瘍の増殖を抑制したが、CXCL10には抑制作用は認められなかった。
2. CXCL9, CXCL11発現腫瘍組織では、NK1.1の発現上昇とVEGFの発現低下が認められた。
3. CXCL10発現腫瘍組織では、ケモカイン切断酵素DPP4の発現が認められた。

以上の結果から、IFN誘導性ケモカインCXCL9, CXCL10, CXCL11の抗腫瘍作用には違いが認められ、その違いは、腫瘍組織に発現しているケモカインを切断するDPP4の発現とその酵素に対するケモカインの感受性の違いに依存していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hana Yamaguchi, Miki Hiroi, Kazumasa Mori et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Simultaneous Expression of Th1- and Treg-Associated	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 Issue 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13081835	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 -

1. 著者名 廣井 美紀, 松本 安史, 牛尾 亮介, 森 一将, 大森 喜弘	4. 巻 50
2. 論文標題 グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3はヒト口腔扁平上皮癌細胞のインターフェロン誘導性ケモカインCXCL9遺伝子の発現を制御する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 明海歯科医学雑誌	6. 最初と最後の頁 126-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ryosuke Ushio, Miki Hiroi, Ari Matsumoto, Kazumasa Mori, Nobuharu Yamamoto, Yoshihiro Ohmori	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced Cytotoxic Effects in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Treated with Combined Methyltransferase Inhibitors and Histone Deacetylase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10040763	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 一将 松本安史 廣井美紀 山本信治 大森喜弘
2. 発表標題 口腔癌における腫瘍関連マクロファージの分化誘導に関わる浸潤T細胞の検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazumasa MORI, Miki HIROI, Ari MATSUMOTO, Ryouyuke USHIO, Yoshihiro OHMORI
2. 発表標題 Investigation of chemokines involved in the infiltration of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the mouse tongue cancer model
3. 学会等名 Japanese Association for Oral Biology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ari MATSUMOTO, Kazumasa MORI, Miki HIROI, Yoshihiro OHMORI
2. 発表標題 Differential antitumor effects of IFN-inducible chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 on mouse squamous cell carcinoma
3. 学会等名 Japanese Association for Oral Biology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 一将、廣井美紀、松本安吏、嶋田 淳、大森喜弘
2. 発表標題 口腔癌に対するインターフェロン誘導性ケモカインの抗腫瘍作用の分子機構の解明
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牛尾亮介 廣井美紀 松本安吏 森一将 嶋田淳 山本信治 大森喜弘
2. 発表標題 メチル化阻害剤によるIFN耐性ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する細胞増殖抑制作用
3. 学会等名 第65回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 松本 安史, 森 一将, 廣井 美紀, 嶋田 淳, 山本 信治, 大森 喜弘
2. 発表標題 IFN誘導性ケモカインCXCL9、CXCL10、CXCL11のマウス扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍作用の違い
3. 学会等名 第76回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 一将 松本安史 廣井美紀 山本信治 大森喜弘
2. 発表標題 口腔癌におけるMyeloid-derived suppressor cellとケモカインの影響についての検討
3. 学会等名 第67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 2022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	廣井 美紀 (HIROI Miki) (30419717)	明海大学・歯学部・准教授 (32404)	
研究分担者	大森 喜弘 (OHMORI Yoshihiro) (50194311)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	

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