様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月 １１ 日現在

機関番号：１６３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０９６５５

研究課題名（和文）血清細胞外小胞へのLOXL2局在を標的とした頭頸部がん転移の新規診断・治療の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic and therapeutic principle by targeting LOXL2 localized on the extracellular vesicle in the head and neck squamous carcinoma patient serum.

研究代表者
矢野　元（Yano, Hajime）

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：００２８４４１４

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）：リジルオキシダーゼ様因子２（LOXL2）に加え、ナトリウムイオン / プロトン交換輸送体１（NHE1）を並列に抑制された腫瘍細胞が、モデル動物への移植の際に強い抗腫瘍効果を宿主に惹起するという知見を得た。この抗腫瘍効果は、NK 細胞がその主体と考えられ、また腫瘍細胞における PD-L1 量の減少に一部依存しながらそれだけでは不十分であり、LOXL2 の抑制が不可欠と言うものであった。この成果により、腫瘍微小環境を標的とすることで NK 細胞活性を制御する、という新たな治療戦略への具体的な端緒を得た可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　がん転移を抑制するという治療は 21 世紀の今日に至っても実現しておらず、がんを依然として人類の脅威たらしめている。その主たる原因は有効な治療標的が判然としないことであるが、今般の成果は「腫瘍微小環境を制御する複数因子」を並列に標的とすることが有効な抗腫瘍効果を宿主に惹起しうるとの示唆を与えた。特に本研究の解析系はヌードマウスをモデルとしているため T 細胞の関与が想定になく、効果の主体は NK 細胞であると考えられる。その活性を制御するものはサイトカイン等とその受容体という認識が主であるなか、腫瘍微小環境を制御する「同時複数因子」を標的とするという考えは、画期的なものとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that tumor cells with simultaneous suppression of sodium ion/proton exchange transporter 1 (NHE1) in addition to lysyl oxidase-like factor 2 (LOXL2) elicit strong antitumor effects in the host upon transplantation into animal models. This anti-tumor effect was thought to be mainly due to NK cells, and while partly dependent on a decrease in the amount of PD-L1 in tumor cells, this was not sufficient, whereas suppression of LOXL2 was essential. These results may provide a concrete beginning to a new therapeutic strategy to control NK cell activity by targeting the tumor microenvironment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腫瘍微小環境　NHE1　LOXL2　NK 細胞　細胞外基質再構成

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

頭頸部がんの大半を占める扁平上皮がんにおいては、頭頸部腺がんと異なりリンパ節転移を伴わない遠隔転移が極めてまれである。したがって頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移は、生命予後の悪化に至るのみならず遠隔転移に対しても何らかの意義を持つ可能性があったため、当研究グループはその抑止を目指した研究を展開してきた。リジルオキシダーゼ様因子２ (LOXL2) はこの研究から見出して (Mayorca-Gilliani et. al., 2012) おり、その含量増加が腫瘍細胞から放出されるエクソソーム様の細胞外小胞に認められる (Sanada et.al., 2019) ことから、患者血清中における存在を診断および「抗-転移」治療標的とすることを本研究では企図していた。一方で、同様に転移に寄与する因子の検索から見出していた Na^+ / H^+ 交換輸送体１ (NHE1) においてもその阻害が転移抑制的であった (Kaminota et.al., 2017) ことから、両者の比較検討、および並列に阻害することによる相加的「抗-転移」効果を併せて検討することで、さらに効果的な「抗-転移」の創出 (図 1) をも期待していた。

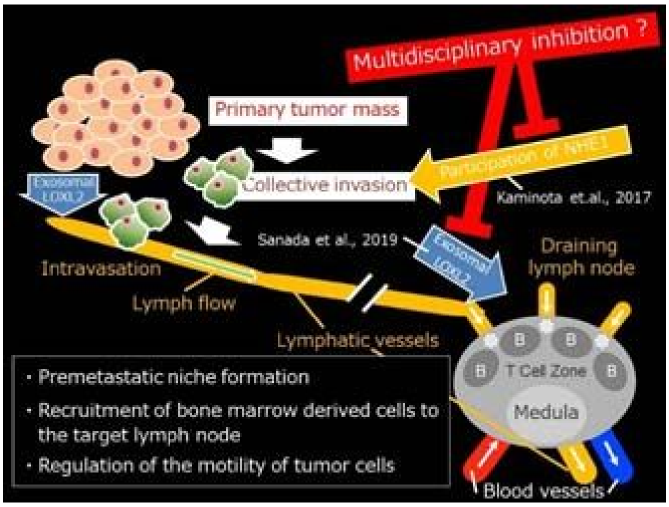

図１ NHE1, LOXL2 を標的とし、開発を目指した抗-転移治療の概念図

２．研究の目的

LOXL2 および NHE1 の並列的抑制 (ダブルノックダウン、以下 dKD) を施した頭頸部扁平上皮がん細胞 (舌がん細胞) は、独自に樹立していたマウス舌移植 – リンパ節転移モデルにおいて、移植原発巣形成の不全を示した。こうした強い抗腫瘍的現象は、この動物モデルにおいて従来観察したことの無い現象であったため、この点についての解析の必要性を強く感じ、dKD 細胞において何が起こっているのかの追求を企図した。移植原発巣の形成が阻害できるなら、転移巣形成も同様に形成阻害できる可能性があると考え、ダブルノックダウンが腫瘍細胞に、あるいは腫瘍微小環境にどのような変化をもたらすのか、LOXL2、NHE1 それぞれ単独のノックダウン細胞、および陰性対照細胞との四群において比較検討・探索を行うことで、何がこの抗腫瘍性を生み出しているのか、を追求することとした。

３．研究の方法

本研究の基盤になっているのは、独自に樹立した前述のマウス舌移植 – リンパ節転移モデルである。抗転移性を示すヒト舌がん由来頭頸部扁平上皮がん細胞 (SASL1m 細胞) をマウス舌に移植し、移植原発巣の形成、および二週間後のリンパ節での腫瘍細胞の定量的検出により、移植原発巣形成効率、転移率を算出した。抗腫瘍効果の実態は宿主の免疫系細胞と考えられ、特に本モデルで使用しているマウスがヌードマウスであって T 細胞の寄与が考えにくいことから、NK 細胞との関わりを PD-1 / PD-L1 系に着目して解析した。SASL1m 細胞を移植したヌードマウス舌に実際に NK 細胞が動員されているか否かを、組織標本における免疫化学染色にて評価・

確認した。SASL1m 細胞は NK 細胞と共培養することで貪食される。ノックダウンに伴うこの貪食効率の変化を測定することで、NK 細胞の活性化状態を評価した。また、LOXL2 が細胞外基質タンパク質に作用する酵素であることから、細胞外基質の構成についても化学染色等にて形態学的に検討した。

４．研究成果

（1）dKD 細胞の樹立と移植原発巣形成不全

レンチウイルスベクターを用いて恒常的 shRNA 発現によるノックダウン SASL1m 細胞を樹立した (図２)。 LOXL2, NHE1 の各単独ノックダウンおよび dKD に伴う顕著な形態変化や、培養下における増殖性の変化は観察されず、一見これら因子の不在は細胞機能にとってさほど重要でないかの印象すら与えた。これらの細胞をマウス転移モデル系にかけ、生体内でのふるまいを観察したところ、dKD においてのみ移植原発巣の形成の不全を認めた (図３A)。図３においてはヒト遺伝子の検出量と宿主であるマウス遺伝子量の比として定量結果を示しているが、実験手技的には、移植からの所定の日数で舌標本を調製した際に通例であれば指先で触知する硬結を見出さない例、という形で従前にない変化として見出していた。転移標的となる顎下リンパ節における転移量をも定量化した (図３B) ところ、dKD に伴い転移量も減少している傾向は観察される (図３B) が、移植原発巣の形成不全がある状況下では、この評価方法が適正であるか否かについては議論の余地があると考えている。しかしながら一方で、移植原発巣形成不全が顕著であった個体においてはそれに呼応して転移量も低いという傾向は見出している (図３A,B 傍線) ことから、両現象に相関がある可能性はあると考えられ、今後さらなる解析を行う予定である。

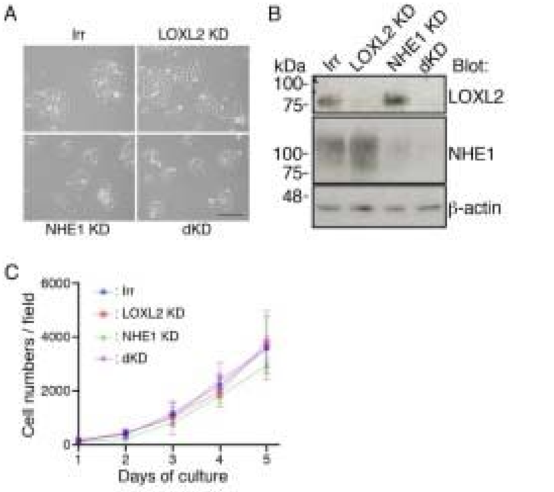

図 2 各ノックダウン細胞の樹立

A: shRNA 発現レンチウイルス導入により樹立した恒常的ノックダウン細胞の形態. Bar, 200 µm. B: イムノブロッティングによる NHE1, LOXL2 発現抑制レベルの確認. C: 各細胞の増殖曲線

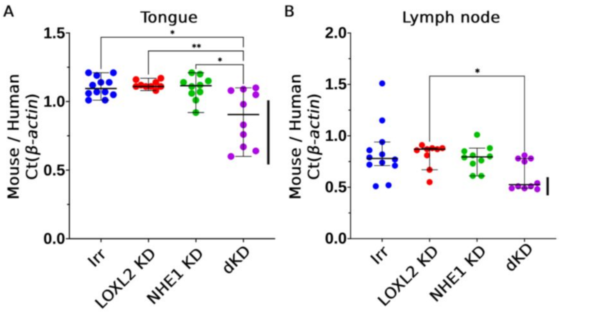

図 3 dKD における移植原発巣形成不全

A: 舌における移植原発巣形成の計測. qPCR によるヒト *β-actin* mRNA 計測の宿主であるマウス *β-actin* mRNA との比. B: 顎下リンパ節において検出されるヒト *β-actin* mRNA 量としての転移量の計測. **: $P<0.01$、*: $P<0.05$.

（2）NHE1 KD に伴う PD-L1 含量の低下

dKD において移植原発巣形成が損なわれる原因を探求した。移植細胞の宿主組織への生着が損なわれている可能性を査定するため、培養下における細胞

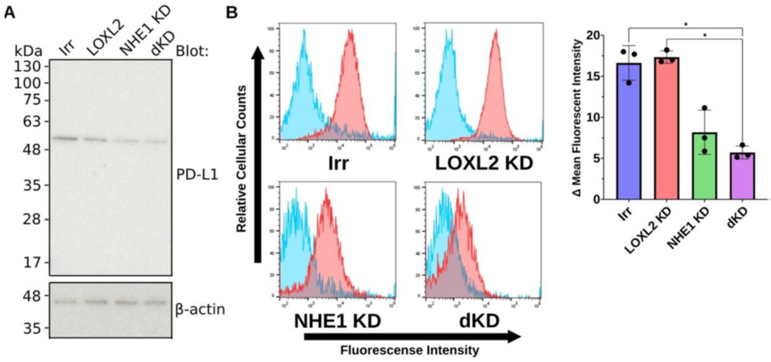

図 4 NHE1KD に伴う PD-L1 量の減少

A: ノックダウンに伴う PD-L1 量変化のイムノブロットによる検討. B: 細胞表面における PD-L1 量変化のフローサイトメトリーによる検討 (左パネル) とその集計 (右パネル). *: $P<0.05$.

接着性を測定したところ、各細胞間において有意な差異は観察されなかった (データ非表示)。このことから、移植原発巣形成の不全は腫瘍細胞側の接着性よりも宿主側の免疫に強く由来すると考え、免疫チェックポイント因子である PD-L1 のノックダウン細胞における発現量変化を査定した (図4)。その結果、NHE1 量のノックダウンに伴う PD-L1 量の減少を見出した。このことは細胞全体における PD-L1 含量 (図4A) のみならず、形質膜に分布する PD-L1 量としても観察された (図4B)。

(3) 移植原発巣における NK 細胞の動員と NK 細胞による SASL1m 細胞の貪食

本研究で用いているモデル系はヌードマウスを宿主としているため、腫瘍細胞に対峙する宿主の免疫細胞として T 細胞は想定しにくく、代わって NK 細胞が関与している可能性を査定した。実際に移植舌組織における NK 細胞の動員状況を査定したところ、CD56 陽性・CD3 陰性の NK 様細胞が移植巣に集積していることが観察された (図5A)。NK 細胞が実際に SASL1m 細胞を貪食等攻撃しうるか否かを、培養下においてヒト NK 細胞株 NK92MI との共培養において観察したところ、明らかな貪食の様子を見出した (図5B)。

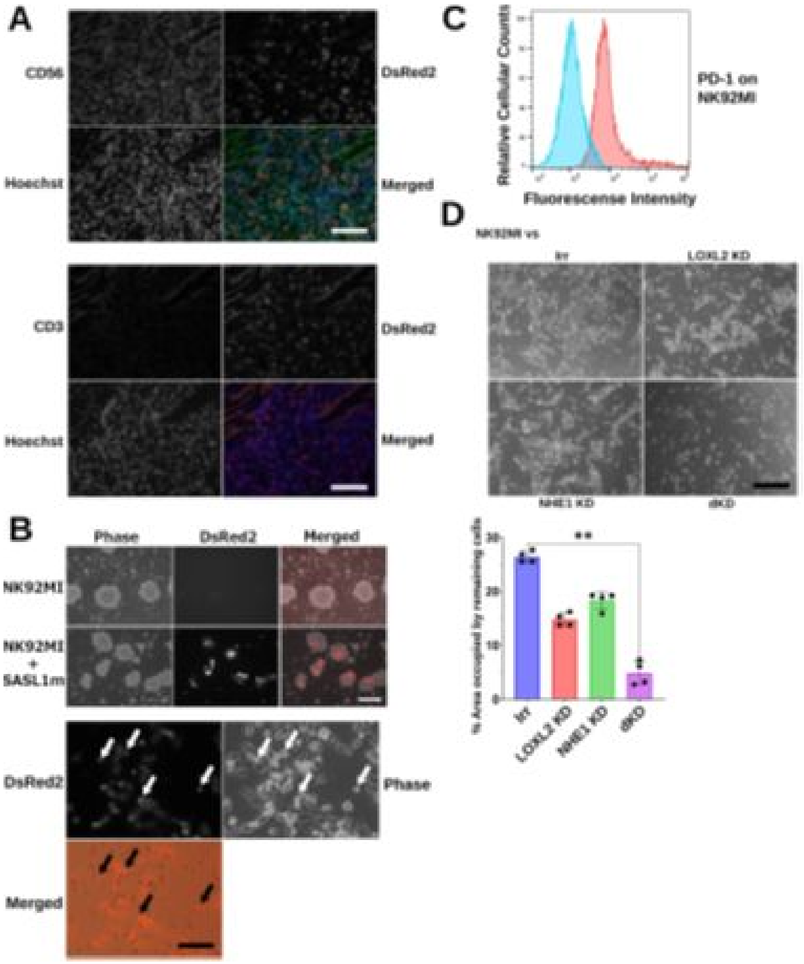

図5 移植原発巣への NK 様細胞の動員と、培養下における NK 細胞による SASL1m 細胞の貪食、およびそのノックダウンに伴う変化
A: 免疫組織化学によるマウスモデル移植原発巣における NK 様細胞の動員の検討. Bar, 200 µm. B: 培養下における NK92MI 細胞と SASL1m 細胞の共培養. 上パネル Bar, 200 µm. 下パネル Bar, 100 µm. C: NK92MI 細胞形質膜上における PD-1 分布の確認. D: NK92MI 細胞によるノックダウン細胞の貪食性の比較. 上パネル、典型的培養像 Bar, 200 µm、下パネル、定量. **: $P<0.01$、*: $P<0.05$.

(4) dKD において顕著な被貪食性

NK92MI 細胞はその形質膜上に PD-1 分子を発現していた (図5C) ことから、この細胞とノックダウン細胞の共培養によりノックダウンと免疫性の相関を査定した (図5D) ところ、dKD において他と異なる被貪食性を見出した。しかしながら、図5D の結果はマウスモデルにおける観察とよく対応するが、図4 における PD-L1 量との関係として考えると、NHE1 単独 KD において dKD 様の被貪食性が観察されないことに疑念が残った。

(5) LOXL2 KD に伴う細胞外基質コラーゲン構築の変化

(4) の結果は、dKD における被貪食性が PD-L1 量のみによって規定されているのでなく、LOXL2 機能が関与する要因によっても制御されうる可能性を示している。LOXL2 がコラーゲン等の細胞外基質再構成に寄与する因子であることから、各ノックダウン細胞の細胞外基質コラーゲンの状態を特異的化学染色によって査定した (図6)。SASL1m 細胞が形成する細胞外基質コラーゲンの構築は、細胞 – 細胞間隙を埋めるように観察された (図6 Irr, NHE1 KD 黒矢

印) が、LOXL2 がノックダウンされている細胞では細胞 – 細胞間隙にコラーゲン不在の領域が多数観察された (図6 LOXL2 KD, dKD 白矢印)。NHE1 KD においても同様の不在領域は散見された (図6 NHE1 KD, 白三角) が、LOXL2 KD, dKD ではより顕著であった。こうした細胞外基質構成の変化が、宿主の免疫性に関与した可能性があり、さらなる検討を加えている。

（6）考察及び今後の展望

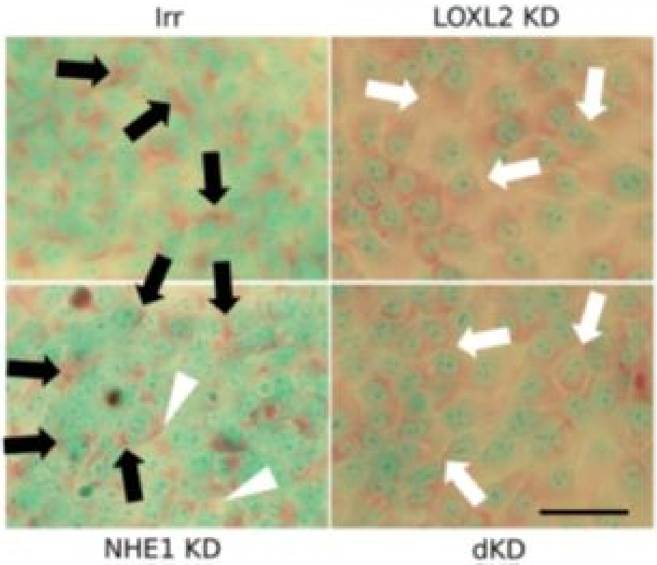

図 6 LOXL2 KD 細胞における細胞外コラーゲン構築の異常
各細胞における細胞外基質コラーゲン構築形態の化学染色による検討. 黒矢印、細胞-細胞間におけるコラーゲンの蓄積. 白矢印、細胞-細胞間におけるコラーゲン染色の不在箇所. 白三角、NHE1 KD において見られるコラーゲン染色不在箇所 Bar, 100 mm.

PD-L1 / PD-1 系は宿主の免疫性の制御系として代表的であるが、一方で、NK 細胞や T 細胞が発現するコラーゲン受容体として機能する LAIR1 という分子が報告されている。この分子はその細胞内領域に ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) を持ち、コラーゲンへとの結合により細胞内に免疫抑制的シグナルを伝達する。今般のわれわれの観察は、NHE1 KD による PD-L1 量減少と LOXL2 KD による細胞外基質コラーゲン構成の変化による LAIR1 – コラーゲン間の結合性の変化が、NK 細胞内への相加的な免疫抑制シグナルの減少を招いたことで NK 細胞活性が向上し、移植腫瘍細胞の効果的な排除に至った可能性があると考えている。今後まず、この仮説を実証することに注力する。一方、NHE1 も LOXL2 も免疫抑制シグナルとの関与はほとんど想定されていない分子であり、NHE1 の細胞内 pH 制御活性の低下と PD-L1 量の減少については渉猟する限りわれわれを含めてわずか二報、LOXL2 活性と LAIR1 シグナルの関連の可能性についてもわずか 1 報の既報があるのみである。さらには NHE1 や LOXL2 といった細胞外環境の制御に寄与しうる分子を複数制御することで腫瘍微小環境に対して働きかけ、今般のわれわれの観察のように効果的な抗腫瘍的効果に至りうるとする類例は知らず、本報告は宿主の免疫性を制御して抗腫瘍的効果を得るための新規の方策として重要であると考えている。上記の LAIR1 の観点などの仮説の実証、および本制御系細部のさらなる証明に努め、新規の、そして効果的な抗腫瘍治療の開発に向けてさらに注力したい。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計9件（うち査読付論文　9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 Choudhury ME, Ozaki S, Miyaue N, Matsuura T, Mikami K, Islam A, Kubo M, Ando R, Yano H, Kunieda T, Nagai M, Tanaka J.	４．巻 13(1)
２．論文標題 Chloride Intracellular Channel Protein 2 Promotes Microglial Invasion: A Link to Microgliosis in the Parkinson's Disease Brain.	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Brain Sci.	６．最初と最後の頁 55 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci13010055.	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 Nishikawa Y, Choudhury ME, Mikami K, Matsuura T, Kubo M, Nagai M, Yamagishi S, Doi T, Hisai M, Yamamoto H, Yajima C, Nishihara T, Abe N, Yano H, Yorozuya T, Tanaka J.	４．巻 163
２．論文標題 Anti-inflammatory effects of dopamine on microglia and a D1 receptor agonist ameliorates neuroinflammation of the brain in a rat delirium model.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Neurochem Int.	６．最初と最後の頁 105479 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.	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 Taguchi S, Choudhury ME, Mikami K, Utsunomiya R, Yano H, Tanaka J.	４．巻 46(6)
２．論文標題 Treadmill Exercise as a Preventive Measure Against Age-Related Anxiety and Social Behavioral Disorders in Rats: When Is It Worth Starting?	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Ann Rehabil Med.	６．最初と最後の頁 320-328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5535/arm.22105.	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 Takeda H, Yoshimura Y, Takagi M, Sato A, Kihara N, Choudhury ME, Yano H, Tanaka J.	４．巻 638
２．論文標題 Bromovalerylurea modulates GABAA receptor-mediated inhibitory neurotransmission while inducing sleep.	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	６．最初と最後の頁 176-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.11.062.	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	4．巻
Utsunomiya R, Mikami K, Doi T, Choudhury ME, Jogamoto T, Tokunaga N, Ishii E, Eguchi M, Yano H, Tanaka J.	11(22)
2．論文標題	5．発行年
Rearing in an Enriched Environment Ameliorates the ADHD-like Behaviors of Lister Hooded Rats While Suppressing Neuronal Activities in the Medial Prefrontal Cortex.	2022年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Cells.	3649 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.3390/cells11223649.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名	4．巻
Nakamura Y, Inoue A, Nishikawa M, Ohnishi T, Yano H, Kanemura Y, Ohtsuka Y, Ozaki S, Kusakabe K, Suehiro S, Yamashita D, Shigekawa S, Watanabe H, Kitazawa R, Tanaka J, Kunieda T.	164(12)
2．論文標題	5．発行年
Quantitative measurement of peritumoral concentrations of glutamate, N-acetyl aspartate, and lactate on magnetic resonance spectroscopy predicts glioblastoma-related refractory epilepsy.	2022年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Acta Neurochir (Wien).	3253-3266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00701-022-05363-y.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名	4．巻
Matsumoto S, Choudhury ME, Takeda H, Sato A, Kihara N, Mikami K, Inoue A, Yano H, Watanabe H, Kumon Y, Kunieda T, Tanaka J.	16
2．論文標題	5．発行年
Microglial re-modeling contributes to recovery from ischemic injury of rat brain: A study using a cytokine mixture containing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3.	2022年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Front Neurosci.	941363 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.3389/fnins.2022.941363.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名	4．巻
Yoshino Y, Kumon H, Shimokawa T, Yano H, Ochi S, Funahashi Y, Iga JI, Matsuda S, Tanaka J, Ueno SI.	25(10)
2．論文標題	5．発行年
Impact of Gestational Haloperidol Exposure on miR-137-3p and Nr3c1 mRNA Expression in Hippocampus of Offspring Mice.	2022年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Int J Neuropsychopharmacol.	853-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1093/ijnp/pyac044.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名 Nishioka R, Nishi Y, Choudhury ME, Miyaike R, Shinnishi A, Umakoshi K, Takada Y, Sato N, Aibiki M, Yano H, Tanaka J.	4．巻 19(1)
2．論文標題 Surgical stress quickly affects the numbers of circulating B-cells and neutrophils in murine septic and aseptic models through a β2 adrenergic receptor.	5．発行年 2022年
3．雑誌名 J Immunotoxicol.	6．最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1547691X.2022.2029630.	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 渡邉 稜、山口 輝昌、武田 遥奈、長塩 皓大、矢野 元、田中 潤也
2．発表標題 Involvement of the glutamine metabolic pathway in microglial proinflammatory responses and significance of its metabolites.
3．学会等名 第 100 回 日本生理学会大会
4．発表年 2022年～2023年

1．発表者名 三好 翔子、武田 遥奈、山口 輝昌、矢野 元、田中 潤也
2．発表標題 Anti-inflammatory effects of bromovalerylurea mediated by the activation of NRF2
3．学会等名 第 100 回 日本生理学会大会
4．発表年 2022年～2023年

1．発表者名 渡邉 稜、長塩 皓大、矢野 元、田中 潤也
2．発表標題 マイクログリアの起炎症反応におけるグルタミン代謝の意義について
3．学会等名 日本病態生理学会 第 1回 UG スプリングフォーラム
4．発表年 2023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