

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16846

研究課題名（和文）頭頸部がん微小環境におけるACLPLの機能解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of ACLP function in the head and neck cancer microenvironment and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

萬 顕 (Yorozu, Akira)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：20792120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がん線維芽細胞(CAF)におけるACLPLの解析として頭頸部扁平上皮がんの臨床検体より採取したCAFを用いて、機能解析を行った。まずACLPLが細胞収縮やゲル収縮能などCAFの活性化に関わることやコラーゲン分泌に関与することを明らかにした。がん細胞はCAF由来のACLPLにより上皮間葉転換を介して遊走・浸潤能を促進することやCDDP耐性を亢進することを明らかにした。さらにACLPLをノックダウンさせたCAFと癌細胞を共培養する実験系でCAF由来のACLPLがCD8+ T細胞の腫瘍細胞へのリクルートメントを阻害する可能性が示された。今後は腫瘍微小免疫環境におけるCAFとACLPLの役割について研究を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍は増大する際に腫瘍間質を形成するが、この機能的意義については明らかになっていない。我々はACLPLという分泌タンパクに注目して腫瘍間質細胞の働きに注目して研究を行ってきた。ACLPLは腫瘍間質細胞から分泌され、癌細胞に対しては癌細胞の遊走・浸潤能を亢進することで腫瘍促進的に働くことを明らかにした。また腫瘍免疫に重要なCD8陽性T細胞に対してはACLPLを分泌を介してT細胞の腫瘍内浸潤を阻害するという腫瘍免疫抑制に働く可能性を示した。このようにACLPLは腫瘍腫瘍間質を細胞に発現し多機能的に腫瘍を促進するポテンシャルを持ったタンパクであることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To analyze ACLP in cancer fibroblasts (CAFs), we performed functional analysis using CAFs collected from clinical specimens of squamous cell carcinoma of the head and neck. First, we found that ACLP is involved in the activation of CAFs, such as cell contraction and gel contractility, and in collagen secretion. We found that CAF-derived ACLP promotes migration and invasive ability of cancer cells via epithelial-mesenchymal transition and enhances CDDP resistance. Furthermore, in an experimental system in which cancer cells were co-cultured with CAFs in which ACLPs were knocked down, it was shown that CAF-derived ACLPs may inhibit the recruitment of CD8+ T cells to tumor cells. Future studies will focus on the role of CAF and ACLP in the tumor microimmune environment.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：腫瘍微小環境 がん関連線維芽細胞 細胞外基質 腫瘍微小免疫環境

1. 研究開始当初の背景

癌微小環境は腫瘍増殖、血管新生、浸潤、転移などに重要な役割を担っている。申請者らは新規癌間質関連遺伝子として AEBP1(adipocyte enhancer-binding protein 1)を同定し、腫瘍血管新生を促すことを報告した。AEBP1 は転写因子や分泌型タンパク質をコードすることが知られるが、特に AEBP1 の主要な遺伝子産物である ACLP (aortic carboxypeptidase-like protein) は、細胞外マトリックスと相互作用することや、肺の線維化に関わることが知られている。申請者らは ACLP が頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast, CAF)において高発現し、癌の増殖・浸潤の促進や、腫瘍免疫の抑制に関わることを明らかにしつつある。

2. 研究の目的

申請者らは新規癌間質関連遺伝子として AEBP1 を同定し、腫瘍血管新生を促進することを報告した。本研究は頭頸部癌微小環境における ACLP の機能を解明し、新規治療法開発につなげることを目的とした。そのために ACLP と相互作用する分子とシグナルネットワークを解明し、ACLP が癌細胞・間質・免疫細胞の相互作用に果たす役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

HNSCC の臨床検体を用いて ACLP の発現を免疫組織染色により解析した。次に臨床検体から CAF を樹立し機能解析を行った。CAF の ACLP 発現のメカニズムを探索した。CAF における ACLP の機能解析を行った。次に CAF が分泌する ACLP が癌細胞に与える影響について解析した。癌細胞の遊走能および浸潤能が ACLP により変化するかを *in vivo*, *in vitro* で解析した。ACLP の影響を受けた癌細胞に生じる変化を調べた。CAF が発現する ACLP が腫瘍免疫にかかわるかを臨床検体の免疫組織染色と CD8 陽性 T 細胞と CAF の共培養実験により評価した。

4. 研究成果

(1) ACLP の発現パターンの臨床病理学的検討

HNSCC 特に舌癌臨床検体(49例)における ACLP の発現を免疫組織染色法を用いて解析した。染色面積を imageJ を用いて定量化したデータと臨床情報を統合し臨床病理学的に評価した結果、ACLP が正常間質や腫瘍細胞には発現せず腫瘍間質に特異的に高発現すること、そして ACLP 発現が腫瘍径、リンパ節転移などと相関することを明らかにした。また ACLP が腫瘍組織の分化度・悪性度にも関与している結果をえた。

(2) 培養細胞における ACLP の発現パターンの確認

臨床検体から樹立した CAF を用いて ACLP の発現を qRT-PCR 法、ウェスタンブロットティング法により解析した。CAF の ACLP 発現は線維芽細胞に特異的に観察された。

(3) CAF における ACLP の発現メカニズムの解析

また CAF を癌細胞と共培養することで ACLP の発現が亢進することを見出し、このメカニズムを解析した。TGF- β の転嫁実験により濃度・時間依存的に CAF の ACLP 発現が亢進したことから癌細胞由来の TGF- β が腫瘍微小環境による CAF の ACLP 発現にかかわっていることが示唆された。

(4) CAF における ACLP の機能解析

ACLP に対する siRNA を用いて CAF の ACLP をノックダウンした。ノックダウン効率は qRT-PCR 法、ウェスタンブロットティング法により確認された。ノックダウンした CAF を用いて wound healing assay やコラーゲンゲルで CAF を包埋して培養するゲル・コントラクションアッセイを行ったところ CAF の収縮が抑制されることで創傷治癒の阻害やコラーゲンゲルの収縮の抑制が観察された。これにより CAF の収縮および細胞外マトリックスの再構成能に ACLP 発現がかかわっていることが示された。

(5) CAF 由来の ACLP が癌細胞に当たれる影響の解析

ACLP 過剰発現ベクターを搭載したレンチウイルスを CAF に感染させ ACLP を過剰発現した CAF を作成した。ACLP を過剰発現させた CAF と癌細胞をポイデン・チャンバーを用いて共培養させると癌細胞の遊走・浸潤能を促進した。この結果はコラーゲンゲルに過剰発現させた CAF を包埋して、その上に癌細胞を播種させ癌細胞のゲル内への浸潤能を評価する実験系でも癌細胞の浸潤能が亢進されることが確認された。また過剰発現させた CAF と癌細胞をヌードマウスに共移植するゼノグラフトモデルを作成し *in vivo* での腫瘍形成能を評価したところ ACLP の過剰発現は腫瘍促進にかかわることが示された。以上の実験系は siRNA を用いたノックダウン系においても同様に行われ、CAF の ACLP をノックダウンすると癌細胞の遊走・浸潤能が抑制されることが示された。

(6) リコンビナント ACLP を癌細胞に添加する実験

CAF 由来の ACLP が癌細胞の遊走・浸潤能を促進することが示されたが、より ACLP の影響を正確に評価するためリコンビナント ACLP を癌細胞に添加する実験を行った。ポイデン・チャンバーを使用した実験ではリコンビナント ACLP の添加により癌細胞の遊走・浸潤能が亢進した。このメカニズムを探索したところ、リコンビナント ACLP 処理によって癌細胞において複数の EMT 関連遺伝子の発現パターンが変化することが明らかになった。ACLP 添加により癌細胞の EMT 関連遺伝子が濃度・時間依存的に発現が変化し EMT を促進すること示唆された。さらに薬剤耐性試験

を行ったところリコンビナント ACLP 処理は癌細胞の CDDP 耐性を亢進することが明らかになった。

(7) CAF 由来の ACLP と腫瘍免疫の関係について

CAF と腫瘍免疫の関係において ACLP がどのような役割を果たすかを調べるために、舌癌臨床検体を CD8 で免疫組織染色を行った。ACLP 陽性 CAF が enrich した一部の症例において ACLP と CD8 陽性 T 細胞は相互排他的な染色態度を示した。CD8 陽性細胞の多寡は生命予後に正の相関を示すが、これに ACLP の染色態度を加えて評価すると ACLP の局在と CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内侵入は生命予後に強く影響することが示された。またポイデン・チャンバーを用いた CAF と CD8 陽性 T 細胞の共培養実験では、ACLP をノックダウンした CAF は CD8 陽性細胞のチャンバー間移動を阻害することが示され、腫瘍微小環境において ACLP 陽性 CAF は腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞の侵入を阻害している可能性が示された。以上の知見を *Cancers*, 2023 で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sekiguchi S, Yorozu A, Okazaki F, Niinuma T, Takasawa A, Yamamoto E, Kitajima H, Kubo T, Hatanaka Y, Nishiyama K, Ogi K, Dehari H, Kondo A, Kurose M, Obata K, Kakiuchi A, Kai M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kojima T, Osanai M, Takano K, Miyazaki A, Suzuki H	4. 巻 15
2. 論文標題 ACLP Activates Cancer-Associated Fibroblasts and Inhibits CD8+ T-Cell Infiltration in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 4303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15174303	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 Yoshido A, Sudo G, Takasawa A, Aoki H, Kitajima H, Yamamoto E, Niinuma T, Harada T, Kubo T, Sasaki H, Ishiguro K, Yorozu A, Kai M, Katanuma A, Yamano H, Osanai M, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Serum amyloid A1 recruits neutrophils to the invasive front of T1 colorectal cancers.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 301-310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.16055	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 Yorozu A, Sekiguchi S, Takasawa A, Okazaki F, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Kai M, Toyota M, Hatanaka Y, Nishiyama K, Ogi K, Dehari H, Obata K, Kurose M, Kondo A, Osanai M, Miyazaki A, Takano K, Suzuki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 CXCL12 is expressed by skeletal muscle cells in tongue oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 5953-5963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5392	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 Hatanaka Yui, Niinuma Takeshi, Kitajima Hiroshi, Nishiyama Koyo, Maruyama Reo, Ishiguro Kazuya, Toyota Mutsumi, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Yorozu Akira, Sekiguchi Shohei, Ogi Kazuhiro, Dehari Hironari, Idogawa Masashi, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Miyazaki Akihiro, Suzuki Hiromu	4. 巻 11
2. 論文標題 DLEU1 promotes oral squamous cell carcinoma progression by activating interferon-stimulated genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99736-5	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 Sudo Gota, Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Takasawa Akira, Niinuma Takeshi, Yoshido Ayano, Kitajima Hiroshi, Yorozu Akira, Kubo Toshiyuki, Harada Taku, Ishiguro Kazuya, Kai Masahiro, Katanuma Akio, Yamano Hiro o, Osanai Makoto, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 112
2. 論文標題 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an interleukin 1 serum amyloid A1 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4151 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15080	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萬頭、関口翔平、高澤啓、岡崎史佳、新沼猛、北嶋洋志、山本英一郎、甲斐正広、小山内誠、宮崎晃亘、高野賢一、鈴木拓
2. 発表標題 CXCL12 is expressed by skeletal muscle cells in tongue oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萬頭、関口翔平、高澤啓、山本英一郎、新沼猛、北嶋洋志、甲斐正広、小山内誠、宮崎晃亘、高野賢一、鈴木拓。
2. 発表標題 口腔扁平上皮がんの浸潤と腫瘍間質におけるCXCL12発現の関係について
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口翔平、萬頭、岡崎史佳、山本英一郎、新沼猛、高澤啓、須藤豪太、畠中柚衣、吉戸文乃、北嶋洋志、甲斐正広、小山内誠、廣橋良彦、小島隆、宮崎晃亘、鈴木拓。
2. 発表標題 腫瘍間質のAEBP1は頭頸部扁平上皮がんの進展を促進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡崎史佳, 関口翔平, 萬頭, 新沼猛, 北嶋洋志, 山本英一郎, 甲斐正広, 高野賢一, 宮崎晃亘, 鈴木拓.
2. 発表標題 AEBP1は骨格筋細胞分化の抑制因子である
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関口翔平, 萬頭, 山本英一郎, 新沼猛, 高澤啓, 須藤豪太, 小池和茂, 畠中柚衣, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 高野賢一, 宮崎晃亘, 鈴木拓.
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんの腫瘍微小環境におけるAEBP1の解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畠中柚衣, 新沼猛, 西山廣陽, 北嶋洋志, 山本英一郎, 甲斐正広, 萬頭, 関口翔平, 荻和弘, 宮崎晃亘, 鈴木拓.
2. 発表標題 DLEU1はインターフェロン関連遺伝子の発現とヒストン修飾を制御し口腔扁平上皮癌の進行を促進する.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新沼猛, 北嶋洋志, 畠中柚衣, 関口翔平, 萬頭, 久保俊之, 佐々木基, 原田拓, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 新規頭頸部癌関連long non-coding RNAの同定と機能解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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
研究協力者	高野 賢一 (Takano Kenichi)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	鈴木 拓 (Suzuki Hiromu)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	山本 英一郎 (Yamamoto Eiichiro)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	高澤 啓 (Takasawa Akira)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	宮崎 晃亘 (Miyazaki Akihiro)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	小山内 誠 (Osanai Makoto)	札幌医科大学 (20101)	
研究協力者	鳥越 俊彦 (Torigoe Toshihiko)	札幌医科大学 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	廣橋 良彦 (Hirohashi Yoshihiko)	札幌医科大学 (20101)	

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