

令和 6 年 9 月 18 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20849

研究課題名（和文）FOXO1抑制によるCAFの特異的細胞死誘導のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of CAFs-specific cell death induction by FOXO1 inhibition

研究代表者

小山 拓洋（KOYAMA, TAKUMI）

東京歯科大学・歯学部・非常勤歯科医師

研究者番号：50906386

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：AS1842856によるCAFにおけるFOXO1の抑制は、CAFの腫瘍促進能シグナルであるTGF- $\beta$ 、SDF-1などのサイトカインの分泌を抑制することをin vitroで示すことができた。またATAC-seqやメタボローム解析によりFOXO1の抑制に関与する転写因子やシグナルの候補を絞ることができた。しかしながら、in vivo実験におけるがん細胞とCAFの共移植実験では腫瘍内のFOXO1のみ抑制することは困難であり、腫瘍促進能を抑制することを示唆する結果を見出すことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究ではFOXO1の機能が抑制されたCAFにおいて、がん促進性サイトカインなどの産生能が低下することが示され、CAFのがん促進能も失われていることがin vitroでは示されたが、in vivoにおけるがん細胞との共移植では腫瘍増殖を制御する結果とはならず、今後さらなる動物実験モデルの開発や他因子との関連、シグナルについての探索が急務である。FOXO1抑制に焦点を絞りCAFに細胞死を誘導する新規CAF標的治療法を動物モデルで開発する点で、国内外の従来の研究と比較し新規性および独創性が高く、より効果的な治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：We were able to show in vitro that inhibition of FOXO1 in CAFs by AS1842856 suppresses the secretion of cytokines such as TGF- $\beta$  and SDF-1, which signal the tumor-promoting ability of CAFs. Furthermore, ATAC-seq and metabolome analysis enabled us to narrow down candidates for transcription factors and signals involved in FOXO1 suppression. However, in in vivo co-transplantation experiments of cancer cells and CAFs, it was difficult to suppress only FOXO1 within the tumor, and no results were found suggesting that FOXO1 suppresses the tumor-promoting ability.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：FOXO1 CAFs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト癌組織は、腫瘍細胞および非腫瘍性間質細胞の線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症性免疫細胞などから構成され、腫瘍微小環境 (Tumor Micro Environment) を形成しています。TME に豊富な癌関連線維芽細胞 (Carcinoma-Associated Fibroblasts, CAFs) は、多数の成長因子とサイトカインを産生し、腫瘍の成長、浸潤、転移、および薬剤耐性に影響を与えます。しかしながら、CAFs の腫瘍悪性化誘発の根底にある詳細な分子メカニズムはまだ完全に理解されていません。腫瘍促進性 CAFs に対する治療は腫瘍の根絶に寄与すると考えられています。

またフォークヘッドボックスタンパク質 O (FOXO) は、フォークヘッドドメインを持つ転写因子の O サブファミリーに属しています。また 4 つの FOXO 遺伝子が哺乳類で同定されており、その中の FOXO1 は酸化ストレスによって活性化され、核に移行し、転写を活性化します。しかし、成長因子シグナルの下では不活性化され、細胞質に移行され、ユビキチン化されます。FOXO1 は、これまでの研究によって細胞調節、糖新生、ストレス応答、血管新生、アポトーシスを促進すると報告されています。

### 2. 研究の目的

- ・ CAFs における FOXO1 発現がヒト乳がんが増加しているかどうか
- ・ ヒト乳癌 CAFs における FOXO1 の役割
- ・ FOXO1 阻害によって誘導される CAFs の細胞死を媒介する分子メカニズムの解明

### 3. 研究の方法

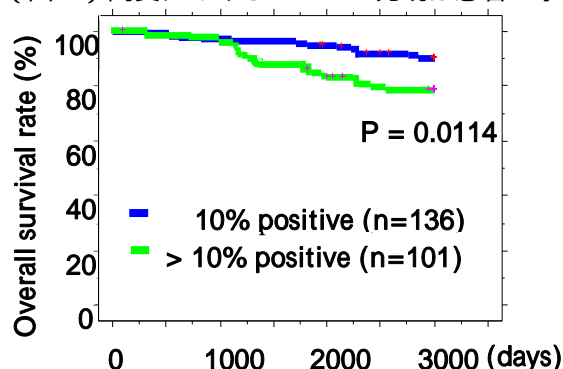
- ・ ヒト乳癌組織切片における免疫組織化学染色、RT-PCR、W.B. による FOXO1 の発現確認
- ・ 乳がん 237 症例の tissue microarray を施行し、間質 FOXO1 の発現による患者の予後測定
- ・ Boyden chamber cell migration assay によるがん培養上清液が、がん細胞の遊走能に与える影響を確認

### 4. 研究成果

#### (1)

ヒト乳癌の間質における FOXO1 発現を確認するために、ヒト乳癌組織の免疫組織化学染色を施行したところ、癌部の間質において FOXO1 の発現が陽性であることが明らかになりました。次に CAFs は活性化線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を高発現する線維芽細胞である myofibroblastic CAFs (mCAF)、および炎症性サイトカインを高発現する線維芽細胞である inflammatory CAFs (iCAF) などの様々な亜集団で構成されているため、切片をそれぞれ mCAF のマーカーである  $\alpha$ -SMA、iCAF のマーカーである血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR- $\beta$ ) 抗体と FOXO1 での共染色を施行し、共陽性となりました。これらの結果より FOXO1 は mCAF と iCAF、両方の CAFs で発現をしていることが確認されました。また、乳がん 237 症例の tissue microarray を施行し、間質における FOXO1 の発現は患者の予後不良因子であることが示されました。Figure1d, e, では CAF で FOXO1 の発現が上昇、特に核での発現が高いことを RT-PCR で示しました。(図 1)

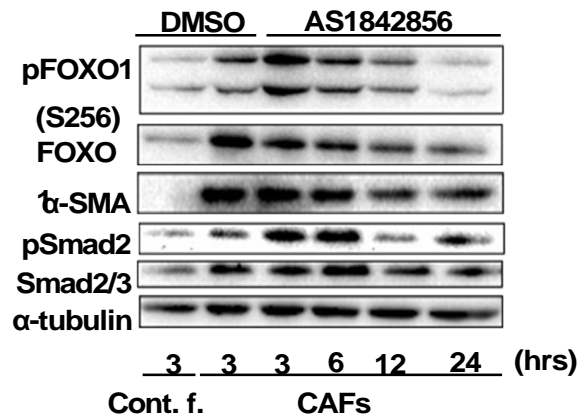
(図 1) 間質における FOXO1 の発現は患者の予後不良因子である



#### (2)

CAFs における FOXO1 の機能を FOXO1-shRNA を CAFs に導入、および FOXO1 の阻害剤である AS1842856 (AS) を処理して調べました。FOXO1 の阻害は mCAF、および iCAF の両方の state を抑制したことにより、CAFs における FOXO1 の発現が mCAF、iCAF state の両方を維持することに必要であると示唆されました。(図 2)

(  
(図2) CAFs における FOXO1 の発現は、mCAF<sub>s</sub>, iCAF<sub>s</sub> state の両方を維持することに必要である



3)  
これまでの結果より、活性化された線維芽細胞の表現型が FOXO1 の阻害によって減衰したことを受けて、我々はこれらの細胞において FOXO1 阻害の影響が CAF<sub>s</sub> の成長および生存度にどの様に関与するのかを調べました。その結果として、CAF<sub>s</sub> 特異的な細胞増殖の減衰と細胞死の増加を認め、その細胞死はアポトーシスであることが確認されました。対照的に、このような効果はほとんどコントロール線維芽細胞では観察されませんでした。この発見は東京歯科大学、順天堂大学で特許申請、および PCT 出願(国際特許)しております。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山拓洋
2. 発表標題 FOXO1 expression mediates activated, tumor-promoting traits in CAFs
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 癌関連線維芽細胞の細胞増殖阻害剤又は細胞死誘導剤	発明者 学校法人順天堂、学 校法人東京歯科大学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-552473	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------