

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09718

研究課題名(和文) がん微小環境における頭頸部がん幹細胞のEMTを介した腫瘍免疫抑制と回避の解明

研究課題名(英文) EMT-mediated tumor immunosuppression and evasion of head and neck cancer stem cells in the cancer microenvironment

研究代表者

太田 一郎 (Ota, Ichiro)

近畿大学・奈良病院・准教授

研究者番号：00326323

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)：がん微小環境においてがん細胞がEMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)を誘導するとともにがん幹細胞の活性化を促進し、どのようにして腫瘍免疫抑制・回避能を獲得するのかを検討した。EMTのがん微小環境における免疫逃避能獲得の関与が示唆され、EMT亢進とPD-L1発現は一方向性ではなく、複雑な双方向性であることが示唆された。またPD-L1/PD-L2をノックダウンすることでEMTを抑制することが示唆された。がん細胞のEMTの発現誘導がPD-L1/PD-L2を介した腫瘍免疫抑制・回避能と密接に相互関係を保ちながら制御され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

Wntシグナル伝達経路がSnailを介してEMTを誘導することで、MT1-MMPおよびMT2-MMPを活性化させるとともに、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを示した。頭頸部がん細胞においていかにしてがん微小環境がEMTを誘導し、がん幹細胞を活性化させ浸潤・転移を促しているかを、in vitroおよびin vivoのレベルで分子生物学的手法および独自の浸潤・転移モデルを用いて解明の糸口を見出した。今後、その経路の分子標的薬の開発により、一層の治療効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated how cancer cells induce Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and promote cancer stem cell activation in the cancer microenvironment and how they acquire tumor immunosuppression and evasion ability. The involvement of EMT in the acquisition of immune escape capacity in the cancer microenvironment was suggested. The results indicated that EMT enhancement and PD-L1 expression are not unidirectional, but rather complex and bidirectional. Knockdown of PD-L1/PD-L2 was found to suppress EMT. These data suggested that the induction of EMT expression in cancer cells is regulated in close interrelation with tumor immunosuppression and evasion ability via PD-L1/PD-L2.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：EMT がん微小環境 がんの浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

- (1) 頭頸部がんにおいて、これまでの治療の進展により臓器温存を含めて患者の QOL は改善しつつあるものの、生存率の大きな改善に至っていないのが現状である。その死因の多くは局所再発と遠隔転移であり、つまり、いかにがんの浸潤・転移を制御するかが治療の要であると考えられる。
- (2) がんが浸潤・転移していく過程で、上皮の基底膜や周囲の間質を突き破り増殖していくためにはタンパク質分解酵素が必要であり、特にその浸潤・転移のあらゆる局面において Matrix metalloproteinase (MMP) が関与していると言われている。我々は、これまでにとりわけ細胞膜結合型の MMP である MT1-MMP が、がん細胞自身に強発現し、がん細胞の浸潤・転移の直接的な担い手になっていることを報告してきた (Sabeh F, Ota I, et al. J Cell Biol, 2004)。さらに、Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT を誘導することで、MT1-MMP 及び MT2-MMP を誘導し、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出してきた。 (Ota I, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2009; Yook JI, Ota I, et al. Nat Cell Biol, 2006) さらに、EMT ががんの浸潤・転移の Key Factor であるとともに、がん幹細胞の重要な制御因子であることが示唆された。 (Ota I, et al. Oncol Rep, 2016)
- (3) 一方、「がん」はがん細胞と炎症細胞、血管・リンパ管、線維芽細胞、細胞外基質などの間質組織より作られている。がんの浸潤・転移を代表とする「がん」の特性は、がん細胞自身とその周囲組織から作られる微小環境との相互関係(ネットワーク)が重要な役割を果たしていることが明らかになってきている (図 1, Hanahan D and Weinberg RA, Cell, 2011)。したがって、このようながん微小環境の形成機構を明らかにすることは、新しいがん診断法や治療法開発のためにも重要な課題と考えられる。



図 1 がんの特性と微小環境ネットワーク

2. 研究の目的

これまでに Wnt シグナル伝達経路が Snail を介して EMT を誘導することで、MT1-MMP および MT2-MMP を活性化させるとともに、がん細胞の浸潤・転移能を獲得させることを見出してきた。今回、がん微小環境ネットワークにおいて、いかにして頭頸部がん細胞が EMT を誘導し、がん幹細胞を活性化させ浸潤・転移を促しているか、そして、いかに免疫監視機構の逸脱を起こしているかを、in vitro および in vivo のレベルで分子生物学的手法および独自の浸潤・転移モデルを用いて解明する。

3. 研究の方法

- (1) 頭頸部がん細胞における微小環境下の Snail、MT1-MMP、PD-L1、PD-L2 の発現に伴うがん幹細胞の同定とその活性化の解析
生化学的な機能解析

頭頸部扁平上皮癌細胞 (UM-SCC-1、HSC3、HSC4、SAS など) を用いて、微小環境下での Wnt, Snail, E-Cadherin, MT1-MMP などの発現および相互作用を RT-PCR、ウェスタン・ブロット、免疫沈降法、レポーターアッセイなどを用いて検討する。また、siRNA によるヒト Wnt1 あるいはヒト Snail の発現抑制はコントロールを含め、electroporation 法(Amaxa Biosystems)で細胞内に導入する。その導入効率率は蛍光の nucleotide で 90%以上あることを確認している。また siRNA の抑制効果は導入後 20 時間から 72 時間まで維持できることも確認している(Sabeh F, Ota I, et al. J Cell Biol. 167:769-781, 2004)。

癌幹細胞の同定

上記遺伝子導入細胞において、CD44、ALDH などの癌化細胞マーカーの同定、SP 細胞の同定、スフェロイド形成を確認することで癌幹細胞分画を同定する。

細胞浸潤実験 collagen invasion assay

rat tail tendon より抽出した type I collagen を 24-mm Transwell dish (3- μ m pore size; Corning, Inc) の upper chamber に 1 ml 加え(最終濃度 2.2 mg/ml)、ゲル化後、その上に上記で作製した遺伝子導入がん細胞 (1.5-2 x 10⁵ 個) を培地とともに加え、lower chamber には同様の培地とともにケモアトラクタントとして HGF (50 ng/ml) を加え、7 日間培養する。その間、隔日に培地を交換し、倒立顕微鏡でその浸潤度を解析する。最終的には collagen gel の cross section を作製し、浸潤度を評価する。

- (2) がん浸潤・転移モデルを用いた頭頸部がん移植腫瘍における微小環境での Snail シグナル伝達経路によるがん幹細胞の同定とその活性化(浸潤・転移能および腫瘍免疫抑制・回避能)の解析

我々が開発・確立した鶏卵による in vivo がん浸潤・転移モデルなどを用いて、がん微小環境下で Snail あるいは PD-L1/2 を強発現させたがん細胞が、活性化がん幹細胞として生体において浸潤・転移能、さらには腫瘍免疫抑制・回避能を獲得するかどうかを確認する。

4. 研究成果

- (1) 頭頸部がん細胞における微小環境下の Snail、MT1-MMP、PD-L1、PD-L2 の発現に伴うがん幹細胞の同定とその活性化の解析

EMT のがん微小環境における免疫逃避能獲得の関与が明らかになりつつあり、EMT 亢進と PD-L1 発現は一方向性ではなく、複雑な双方向性であることが示唆された。また PD-L1/PD-L2 をノックダウンすることで EMT を抑制することが示唆された。さらに、PD-L1/PD-L2 が癌細胞内外のシグナル伝達に参与している可能性が示唆された。

- (2) がん浸潤・転移モデルを用いた頭頸部がん移植腫瘍における微小環境での Snail シグナル伝達経路によるがん幹細胞の同定とその活性化(浸潤・転移能および腫瘍免疫抑制・回避能)の解析

これまでの in vitro 実験結果を踏まえて、鶏卵による in vivo 癌浸潤・転移モデルを用いての動物実験を施行した。in vivo において微小環境状態は Wnt-Snail シグナル経路を介して EMT を誘導し、癌幹細胞様の機能を獲得することが示唆された。また、in vitro と同様に、in vivo においても PD-L1/PD-L2 をノックダウンすることで、癌の増殖、および浸潤・転移を抑制することが示唆された。

以上の結果から、がん細胞の EMT の発現誘導が PD-L1/PD-L2 を介した腫瘍免疫抑制・回避能と密接に相互関係を保ちながら制御されていることが示唆された。したがって、EMT に関わるこれらのシグナル伝達経路を制御することは頭頸部癌の浸潤・転移を制御することに繋がると考えられ、本研究が今後の癌浸潤・転移抑制薬の創薬への試金石となり得ることが期待できる。

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 木村隆浩、太田一郎、榊井貴史ら
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮癌細胞におけるPD-L1・PD-L2とEMTの関係
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
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	高橋 昭久 (Takahashi Akihisa) (60275336)	群馬大学・重粒子線医学推進機構・教授 (12301)	
研究分担者	森 英一朗 (Mori Ei-ichiro) (70803659)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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