

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09883

研究課題名(和文) 口腔癌微小環境における間葉系幹細胞を司令塔とした癌浸潤・転移誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying oral cancer invasion and metastasis promoted by mesenchymal stem cells in tumor microenvironment

研究代表者

石崎 明 (Ishisaki, Akira)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：20356439

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)： 癌細胞は、体内では炎症性細胞、血管組織、線維芽細胞ならびに細胞外基質などの間質組織により構成される癌微小環境に取り囲まれて存在する。近年、その微小環境を制御して癌を悪性化に向かわせる司令塔としての間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell (MSC))の働きが注目されている。今回我々は、口腔扁平上皮癌細胞(hOSCC) HSC-3やHSC-3細胞から派生した高浸潤能・高転移性LMF-4細胞と、ヒトMSCとの非接触性共培養系を用いて、MSCによるhOSCCの腫瘍浸潤制御メカニズムの一部を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、METにホーミングした間葉系幹細胞(MSC)は、癌細胞の増殖ならびに浸潤・転移にポジティブに働くことが報告されている。しかし、MSCが、どのような分子メカニズムで口腔扁平上皮癌細胞(hOSCC)細胞を増悪化するのかについては不明である。今回我々は、腫瘍の増悪化を制御すると考えられる遺伝子のhOSCC細胞における発現が、MSCとの非接触性共培養で変動することを明らかとした。本研究成果は、hOSCC細胞の浸潤・転移を抑制する新規治療法開発に貢献しうるものと期待される。

研究成果の概要(英文)： Cancer cells construct tumor microenvironment (TME) consisting of inflammatory cells, endothelial cells, fibroblasts, and extracellular matrix. Recently, it has been reported that MSCs made human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) cells retain invasive-, and metastatic-abilities. This study partially revealed the molecular mechanism underlying the MSC-promoted hOSCC invasion.

研究分野：歯学 生化学

キーワード：口腔扁平上皮癌細胞 癌浸潤 癌転移 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は MCP-1/CCL2 をはじめとしたケモカインを分泌することにより、その増殖や浸潤・転移の能力を向上させる働きを有する間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell (MSC) を癌微小環境 tumor microenvironment (TME) にホーミングさせることが知られている (Dwyer *et al*, Clin Cancer Res 13: 5020-5027, 2007)。ホーミング後の MSC は、1) 癌間質線維芽細胞 (CAF) に分化して血管内皮細胞増殖因子 VEGF の分泌により血管新生を促進し、さらなる MSC や炎症性細胞のホーミングを誘導すること、2) MSC から 1) のごとく分化した CAF から分泌される TGF- $\beta$  をはじめとするサイトカインにより、癌細胞の上皮間葉転換 (EMT) を誘導してその浸潤・転移能力を向上させること、3) MSC から分泌されるサイトカインの働きにより M2 マクロファージ (M2-M) への極性化が誘導され、腫瘍随伴マクロファージ (TAM) が形成され、この TAM の働きにより宿主の癌細胞に対する免疫反応が抑制されること、4) MSC から放出されるエクソソーム中の miRNA 等を介して癌細胞の増殖や浸潤・転移を促進することが知られている (Melzer *et al*, Stem Cells 36: 951-968, 2018)。このように、癌微小環境の司令塔としての MSC が周囲の細胞に働きかけて、癌細胞の浸潤能や転移能を亢進する分子メカニズムについてはいくつかの報告がなされているが、その前段階として、癌細胞が MSC にどのように働きかけて MSC を癌細胞に有利な「浸潤・転移誘導型 MSC」となるように『教育』をするのかについては細胞・分子レベルで不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究代表者は、これまでにヒト口腔扁平上皮癌 human oral squamous cell carcinoma (hOSCC) 細胞の浸潤・転移機構の解明を目指して、研究を進めてきた。しかし、近年、癌細胞の浸潤・転移には、その周囲に存在する結合組織、血管組織、TAM、CAF ならびに MSC 等が構成する TME ネットワークが大きな役割を果たすことが明らかとされつつある (Melzer *et al*, Mol Cancer 16: 28, 2017)。つまり、hOSCC 細胞の浸潤・転移機構を理解するためには、この TME ネットワークと癌細胞との相互作用を統合的に研究し解明しなくてはならない。そこで現在注目されるのが、TME に存在する MSC の役割である。MSC は癌細胞が分泌するケモカインにより癌組織にホーミングした後、CAF や血管構成細胞に分化して結合組織や血管組織を形成することにより TME の基盤を築く。加えて、MSC は TME にホーミングした免疫細胞に働きかけてその免疫抑制的機能を増強することにより宿主から癌組織に対する免疫反応を回避する。このように、MSC は TME ネットワークの中心に位置して癌細胞の浸潤・転移を制御すると考えられている。

興味深いことに、癌微小環境にホーミングした MSC は、必ずしも癌細胞の増殖ならびに浸潤・転移にポジティブに働き癌の「味方細胞」になるだけではなく、癌組織の腫瘍血管の形成やがん細胞のアポトーシスを誘導して「敵細胞」にもなりうるということが報告されている (Pakravan *et al*, Cell Oncol 40: 457-470, 2017; Reza *et al*, Sci Rep 6: 38498, 2016)。しかし、口腔癌細胞がどのような分子メカニズムで MSC を「味方細胞」や「敵細胞」のように『教育』をするのかについては不明である。

本研究では、hOSCC 細胞が TME 内の MSC をどのような分子メカニズムで「浸潤・転移誘導型 MSC」あるいは「浸潤・転移抑制型 MSC」に変化させるのかについて、細胞間相互ネットワーク環境下で明らかとすることを目的とする。本研究により、これまでに報告のない「浸潤・転移誘導型 MSC」を中心とした口腔癌 TME ネットワークの詳細を分子レベルで明らかとし、革新的な口腔癌の浸潤・転移阻害療法樹立のための分子ターゲットを特定したい。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* 非接触性共培養系を利用して、高浸潤・転移型 hOSCC 細胞が MSC を「浸潤・転移誘導型 MSC」に変化させるために働く MSC 細胞由来遺伝子を特定する。

本研究は、低転移型の hOSCC 細胞株 HSC-3、並びに、この HSC-3 細胞をヌードマウス皮下に移植した後に所属リンパ節に転移した癌細胞を採取し、これを再び移植するということを繰り返して得られた高浸潤・転移型 hOSCC 細胞株 LMF-4 (Momose *et al*, J Oral Pathol Med 7: 391-395, 1989) を利用して実施した。

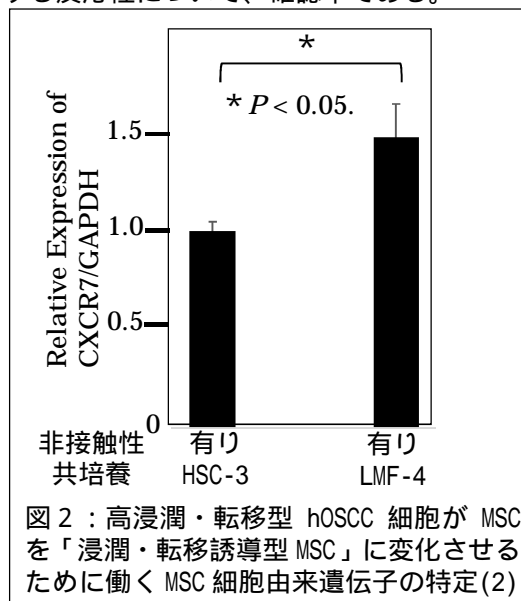
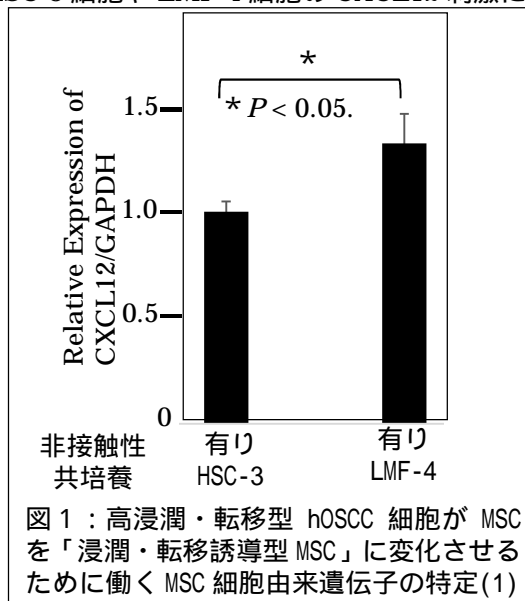
ヒト骨髄由来 MSC 細胞株 UE7T-13 と HSC-3 細胞あるいは LMF-4 細胞との非接触性共培養 (0.4  $\mu$ m のポア直径を有しており、細胞の通過が不可能なセルカルチャーインサートを使用) を実施した。UE7T-13 細胞の単独培養環境下でのこの細胞内の遺伝子発現レベルと比較して、HSC-3 細胞あるいは LMF-4 細胞との共培養環境下での UE7T-13 細胞内の遺伝子発現レベルが有意に変化した遺伝子を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて捉えた。

(2) *in vitro* 非接触性共培養系を利用して、MSC が高浸潤・転移型 hOSCC 細胞を「浸潤・転移誘導型 MSC」に変化させるために働く hOSCC 由来遺伝子を特定する。

(1) の実験方法と同様に、UE7T-13 と HSC-3 細胞あるいは LMF-4 細胞との非接触性共培養を実施した。HSC-3 細胞あるいは LMF-4 細胞の単独培養環境下でのこれらの細胞内の遺伝子発現レベルと比較して、MSC との共培養環境下での HSC-3 細胞内あるいは LMF-4 細胞内の遺伝子発現レベルが有意に変化した遺伝子を RT-PCR 法を用いて捉えた。

#### 4. 研究成果

(1) MSC との非接触性共培養環境下の LMF-4 細胞は、同共培養環境下の HSC-3 細胞に比べて、MSC における腫瘍増悪化ケモカインである CXCL12 の発現をより強く促進した(図 1)。なお、単独培養時の MSC の CXCL12 の発現量は、HSC-3 細胞と共培養された MSC における CXCL12 の発現量と変化が無いことを確認している(データ示さず)。一般的に、ケモカインは、8 kDa から 12 kDa の大きさのタンパク質であり、免疫細胞などの走化性を亢進する因子として知られている。また、ケモカインは、その「chemokine domain」のシステイン残基の並び方の違いから、C、CC、CXC 並びに CX3C で構成されるサブファミリーに分類される(Göita AA, and Guenot D: *Cancers* 14: 1810, 2022)。CXCL12 は、このサブファミリーの中の CXC ファミリーに属している。加えて、CXCL12 の受容体は、CXCR4 と CXCR7 の二種類が知られている。興味深いことに、大腸癌の悪性度と、CXCL12 や CXCR4 あるいは CXCR7 の発現との間には、相関性が認められると注目されている(Göita AA, and Guenot D: *Cancers* 14: 1810, 2022)。一方、MSC 由来の CXCL12 は、大腸癌や乳癌の転移を増強することが知られている(Shinagawa K *et al*, *Int J Cancer* 127: 2323-2333, 2010; Yu PF *et al*, *Oncogene* 36: 840-849, 2017)。今回の我々の研究結果と、これまでの他の研究グループによる研究結果を総合して考察すると、悪性度の高い(浸潤・転移能力の高い)hOSCC 細胞は、悪性度の低い(浸潤・転移能力の低い)hOSCC 細胞に比べて、TME 内の MSC における CXCL12 の発現をより強く促進することにより、hOSCC 細胞自身の悪性度を増強する可能性が示唆された。現在、HSC-3 細胞や LMF-4 細胞の CXCL12 刺激に対する反応性について、確認中である。



また、MSC との非接触性共培養環境下の LMF-4 細胞は、同共培養下の HSC-3 細胞に比べて、MSC における腫瘍増悪化ケモカイン受容体である CXCR7 の発現をより強く促進した(図 2)。なお、単独培養時の MSC における CXCR7 の発現量は、HSC-3 細胞と共培養された MSC における CXCR7 の発現量と変化が無いことを確認している(データ示さず)。この結果より、癌細胞の浸潤・転移能力を促進するとされている MSC 由来の CXCL12 が TME 内の癌細胞にパラクリン的に働いて、その悪性度を増強するばかりではなく、MSC 自身にオートクリン的に働いて、腫瘍細胞増悪化促進的な作用を及ぼす可能性が示唆された。現在、MSC を CXCL12 で刺激し、腫瘍増悪的に働くとの報告がある CXCL12 以外のケモカインの発現が増強されるかどうかについて、調査中である。

(2) 単独培養環境下の LMF-4 細胞における腫瘍増悪性ケモカインである CXCL8 (Han ZJ *et al*, *Molecules* 27: 137, 2021) の発現レベルは、単独培養環境下の HSC-3 細胞の CXCL8 の発現レベルよりも有意に高いことが明らかとなった(図 3)。また、MSC 由来の液性因子は、単独培養環境下の LMF-4 細胞で発現する CXCL8 の発現量と同等のレベルまで、HSC-3 細胞で発現するケモカイン CXCL8 の発現を増強した(図 3)。なお、CXCL8 は IL-8 と同じ構造を有する分子であり、唾液中の IL-8 の発現量が、hOSCC の診断マーカーとして有用であるとの報告がなされている(Sahibzada HA *et al*, *Diagnostics (Basel)* 7: 21, 2017)。これらの研究結果より、悪性度の高い hOSCC 細胞では、CXCL8 がオートクリン的に自己の細胞に働いて、

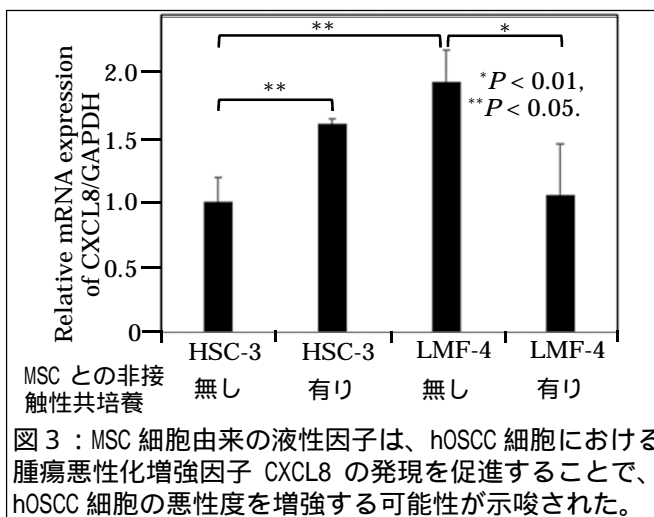
その増殖能、浸潤能あるいは転移能を増強する可能性が示唆された。加えて、MSC 由来の水溶性因子が、悪性度の低い hOSCC 細胞に作用して、この hOSCC 細胞における CXCL8 の発現を増強することにより、その悪性度を増強する可能性が示唆された。今後は、低い転移型の hOSCC 細胞である HSC-3 細胞に CXCL8/IL-8 を投与して、この細胞の増殖能、浸潤能が増強するかどうかについての調査を進めたい。

以上の(1)と(2)の研究成果により、hOSCC 細胞の TME では、hOSCC 細胞-MSC 相互作用により、腫瘍増悪性サイトカインである CXCL8 や CXCL12 の発現が増大することにより、hOSCC の悪性度が高められる可能性が示唆された。

一方、本研究代表者は、これまでに、hOSCC 細胞と M との細胞間相互作用による hOSCC 細胞の増悪化誘導機構の一部について、明らかとしている。具体的には、hOSCC 細胞と M との非接触性共培養系において、M 由来の腫瘍増悪性サイトカイン CCL20 が hOSCC 細胞に働いて、

hOSCC 細胞における腫瘍増悪化抑制因子として知られる CXCL14 の発現を抑制し、その結果、hOSCC 細胞の遊走能を増強することを明らかにした (Takeda K *et al*, Dent J Iwate Med Univ 46: 19-32, 2021)。また我々は、同様の非接触性共培養系を利用して、hOSCC 細胞由来のサイトカイン様因子 Sclerostin が、M における IL-6 の発現を増強することを明らかとした。加えて、M に、この IL-6 を投与すると、IL-17A の発現増強効果が認められた。興味深いことに、IL-6 と IL-17A で M を刺激すると、TAM 様腫瘍増悪性 M (M2-M) への極性化が促進されることを明らかとした (Ishikawa Y *et al*, Dent J Iwate Med Univ 47: 34-50, 2022)。今後は、これらの hOSCC 細胞と M との細胞間相互作用による hOSCC 細胞の増悪化誘導機構に MSC がどのように影響を及ぼすかについて、細胞・分子レベルで明らかとしたい。

これらの研究結果により、これまでに報告のない MSC を中心とした口腔癌 TME 細胞間ネットワークの一部が、細胞・分子レベルで明らかとなった。本研究成果は、革新的な口腔癌の浸潤・転移阻害療法樹立のための分子ターゲットの一部が特定されたものとして、評価される。



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 3件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Kanna Asanuma, Seiji Yokota, Naoyuki Chosa, Masaharu Kamo, Miho Ibi, Hisayo Mayama, Tarou Irie, Kazuro Satoh, Akira Ishisaki  | 4. 巻<br>65           |
| 2. 論文標題<br>Hydrogen peroxide-induced oxidative stress promotes expression of CXCL15/Lungkine mRNA in a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint              | 5. 発行年<br>2023年      |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Oral Biosciences   | 6. 最初と最後の頁<br>97～103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.job.2022.12.002  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |
| 1. 著者名<br>Yuudai Ishikawa, Taifu Hirano, Hiroyuki Yamada, Akira Ishisaki, Masaharu Kamo   | 4. 巻<br>47           |
| 2. 論文標題<br>Sclerostin derived from EMT-promoted human oral squamous cell carcinoma cells induces IL-6- and IL-17A-mediated M1 to M2 polarization shift in THP-1-derived macrophages                                     | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>岩手医科大学歯学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>34～50  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |
| 1. 著者名<br>Kei Takeda, Yuudai Ishikawa, Yuko Komatsu, Hiroyuki Yamada, Akira Ishisaki, Masaharu Kamo   | 4. 巻<br>46           |
| 2. 論文標題<br>CCL20 derived from PMA-differentiated macrophages abrogates TGF- $\beta$ 1-induced expression of cancer progression suppressor CXCL14 in HSC-4 cells in PI3K-, MEK1/2-, and NF- $\kappa$ B-dependent manners | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>岩手医科大学歯学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>19～32  |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>-            |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>浅沼莞奈、横田聖司、間山寿代、帖佐直幸、桑島幸紀、松本識野、阿部カレン、吉田弘法、衣斐美歩、加茂政晴、入江太郎、佐藤和朗、石崎 明 |
| 2. 発表標題<br>酸化ストレスを介した顎関節周囲滑膜炎の発症メカニズムの解明                                     |
| 3. 学会等名<br>第60回特定非営利活動法人 日本口腔科学会北日本地方部会                                      |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>浅沼莞奈、横田聖司、帖佐直幸、衣斐美歩、入江太郎、佐藤和朗、石崎 明   |
| 2. 発表標題<br>Oxidative stress increased expression of CXCL15 mRNA via a MEK/ERK-dependent manner in fibroblast-like synoviocytes derived from mouse temporomandibular joint |
| 3. 学会等名<br>第64回歯科基礎医学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>石崎 明、客本齊子、横田聖司、加茂政晴、帖佐直幸 |
| 2. 発表標題<br>間葉系幹細胞を用いた新たな再生医療の樹立戦略   |
| 3. 学会等名<br>第57回日本口腔組織培養学会           |
| 4. 発表年<br>2021年                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>石川雄大、平野大輔、山田浩之、石崎 明、加茂政晴  |
| 2. 発表標題<br>ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-4由来のTGF- $\beta$ 1誘導性sclerostinは、IL-17Aを介してマクロファージのM1からM2への分極を促進する |
| 3. 学会等名<br>第44回日本分子生物学会年会  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>武田 啓, 石川 雄大, 山田 浩之, 石崎 明, 加茂 政晴                                  |
| 2. 発表標題<br>腫瘍関連マクロファージはヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるCXCL14の発現を抑制しTGF- $\beta$ 1誘発EMTを促進する |
| 3. 学会等名<br>第43回 日本分子生物学会年会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)              | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)         | 備考 |
|-------|--|-------------------------------|----|
| 研究分担者 | 入江 太郎<br>(Irie Tarou)<br>(00317570)    | 岩手医科大学・歯学部・教授<br><br>(31201)  |    |
| 研究分担者 | 加茂 政晴<br>(Komo Masaharu)<br>(40214564) | 岩手医科大学・歯学部・准教授<br><br>(31201) |    |
| 研究分担者 | 横田 聖司<br>(Yokota Seiji)<br>(50802401)  | 岩手医科大学・歯学部・助教<br><br>(31201)  |    |
| 研究分担者 | 帖佐 直幸<br>(Chosa Naoyuki)<br>(80326694) | 岩手医科大学・歯学部・准教授<br><br>(31201) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|