

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 羽賀健太
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第492号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Cancer-associated fibroblasts promote the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via the TGF- β /SOX9 axis
(がん関連線維芽細胞はTGF- β /SOX9経路を介して口腔扁平上皮癌細胞の遊走および浸潤を促進する)

論文審査委員 主査 田沼 順一 教授
副査 泉 健次 教授
副査 小林 正治 教授

博士論文の要旨

【緒言】「がん」は、がん細胞からなる実質に加えて、線維芽細胞や免疫担当細胞、血管内皮細胞などの間質からなる不均一な組織で構成されており、このような特殊な環境は「がん微小環境」と呼ばれている。がん微小環境内では、細胞間相互作用により産生された様々なサイトカインや成長因子、細胞外基質が、細胞外基質のリモデリングや血管新生、がん細胞増殖を促し、がんの進行が促進される。近年、がん間質の主要な細胞成分である線維芽細胞はがん関連線維芽細胞(CAFs)と呼ばれ、様々ながん種においてCAFsの存在が臨床的予後不良に相関することが報告されている。われわれは、先行研究で口腔扁平上皮癌(OSCC)では転写因子の1つであるSRY-box 9(SOX9)高発現が腫瘍進展度と正の相関を示し、OSCC患者の予後不良因子であることを明らかにしてきたが、SOX9の発現調節機構はまだまだ明らかになっていなかった。

本研究では、「CAF由来の液性因子、特にTGF- β がOSCC細胞におけるSOX9発現を増強させることで、がんの進展を促進する」との仮説を立て、がん微小環境を再現した3次元培養モデルとマウス移植腫瘍モデルを用いて、CAFとOSCC細胞の相互作用におけるTGF- β /SOX9経路のがん進展に果たす役割を検証する。

【材料と方法】4種類のOSCC細胞株(HSC-3, Ca9-22, HSC-2, HSC-4)を使用した。CAFとして、Cellular Engineering Technologies社から市販されている非小細胞肺癌由来線維芽細胞を用いた。また、ヒト口腔粘膜から分離した口腔線維芽細胞(NOFs)を対象群とした。

まず、CAFとNOFsの形質を蛍光抗体法にて確認した後、培養上清中のTGF- β 1濃度をELISAにて定量し、両者の培養上清がOSCC細胞の遊走能に及ぼす影響をscratch assayにて検討した。次に、CAFまたはNOFsを組み込んだコラーゲンゲルの上部にOSCC細胞を播種した3次元培養モデルを作製し、パラフィン包埋薄切標本上で組織形態を計測し、OSCC細胞の浸潤能を解析するとともに、SOX9および上皮間葉転換(EMT)マーカー(vimentin, fibronectin, TWIST2, E-cadherin)の発現状況を免疫組織化学的に検討した。また、OSCC細胞とCAFまたはNOFsをヌードマウス皮下に注入した移植腫瘍モデルで

経時的な腫瘍増大を比較し、TGF- β 1 受容体特異的阻害薬 SB431542 の腹腔内投与による影響を解析した。さらに、OSCC 患者 65 症例の病理組織検体を用いて、 α -SMA, SOX9, TGF- β 1 の免疫組織化学を行って、CAFs の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。

【結果】CAFs は NOFs と比較して、CAFs マーカーである α -SMA と TGF- β 1 を高発現し、CAFs 培養上清は NOFs 培養上清の 5 倍量の TGF- β 1 を含んでいた。遊走試験の結果、CAFs 培養上清は OSCC 細胞の遊走を有意に促進した。3次元培養モデルにおいて、CAFs は OSCC 細胞の間質への浸潤を促進し、ゲル内に浸潤した OSCC 細胞に SOX9, vimentin, fibronectin, TWIST2 の高発現と E-cadherin の発現低下を認めた。また本モデルで SB431542 添加による TGF- β 1 経路遮断または siRNA による SOX9 のノックダウンを行ったところ、ともに浸潤が有意に阻害された。マウス移植腫瘍モデルにおいては、CAF は腫瘍増大を促進し、SB431542 投与によって CAFs による腫瘍増大が有意に抑制された。また OSCC 切除標本において、CAFs は SCC 浸潤部間質で誘導されており、浸潤部の OSCC 細胞では SOX9 の高発現を認め、CAFs の存在は頸部リンパ節後発転移および無再発生存率と有意に相関していた。

【考察】TGF- β は SOX9 の上流に位置しており、SOX9 は EMT を促進することが肺癌などで報告されてきている。本研究では CAFs が分泌した TGF- β が、OSCC 細胞の遊走および浸潤を促進し、SOX9 の発現が浸潤に関与することが示された。また浸潤した細胞で EMT マーカーの発現度の変化を認め、CAFs が EMT の誘導を促進したことが示唆された。以上より、CAFs と OSCC 細胞の相互作用において、TGF- β /SOX9 経路ががん浸潤機構を調節することが示された。一方で、本研究では再現性を確保するために、肺癌由来の CAFs を購入して使用したが、今後は OSCC 患者由来の CAFs を分離・同定し、口腔癌由来の CAFs についてのさらなる研究が必要である。本研究では、CAFs・OSCC 細胞の相互作用を評価するツールとして 3次元培養モデルの確立に成功し、CAFs・OSCC 細胞相互作用に注目した新期治療法や治療薬開発への展望が示された。

審査結果の要旨

国立がん研究センターの報告では、口腔癌患者数は 1975 年に 2100 人であったが 2015 年には約 7800 人と明らかに増加している。5 年生存率は Stage I では 90%であるが、Stage が上がるにつれて 5 年生存率は下がり、Stage IV では 45%で、治療成績の向上のため、新たな治療戦略、悪性度の新しい評価基準や、予後を予測する評価法の開発は喫緊の課題である。学位申請者の所属する研究室ではこれまで、転写因子である SOX9 が口腔扁平上皮癌の進展とともに発現が亢進することを免疫組織化学的に明らかにしてきたが、その分子生物学的な発現調節機構については明らかになっていなかった。そこで学位審査者はがん微小環境内に存在する CAFs に着目し、*in vitro* および *in vivo* において CAFs とがん細胞との相互作用を解明する研究を遂行した。

本研究では 1) *in vitro* ではがん微小環境を模倣した 3次元培養モデルの製作および評価法を確立し、CAFs は TGF- β を分泌し SOX9 の発現を促進することで遊走能および浸潤能を亢進させること、2) *in vivo* では CAFs は腫瘍形成を促進する一方で、TGF- β シグナルを阻害することで腫瘍形成および SOX9 の発現が抑制されること、3) 外科標本では CAFs 周囲の癌胞巣で SOX9 の高発現を認め、CAFs の存在は頸部リンパ節後発転移との相関することを明らかにした。本研究の特筆すべき点として口腔扁平上皮癌における SOX9 の発現調節機構に CAFs が関与することを *in vitro*・*in vivo*・外科標本と多角的に検討し明らかにした点である。がん微小環境における CAFs とがん細胞の相互作用はがんの進展に重要な役割を果たすことから、この相互作用に TGF- β /SOX9 経路が関与するという分子生物学的メカニズムを一部解明した

ことは新規性が高いと考えられる。研究の結果より CAFs は SOX9 の発現を調節する役割があり、CAFs の存在や SOX9 の発現が口腔扁平上皮癌の患者予後予測因子としての応用への貢献が期待される。また CAFs や TGF- β /SOX9 経路を標的とした新しい治療薬や治療戦略に寄与できると考えられる。さらに今回確立した3次元培養モデルは抗がん剤や放射線照射による影響などを評価するツールとしても応用可能であり、CAFs とがん細胞の相互作用を評価するための研究をさらに発展させていくことが期待される。

審査員3名の口頭試問の結果（別紙：最終審査結果の要旨参照）、本論文が博士の学位論文として十分な価値を持ち、さらに申請者が大学院医歯学総合研究科博士課程修了者としての学力ならびに見識を有し、博士（歯学）の学位を有するものと判定した。