

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

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 (組織再建口腔外科学 分野)

氏名 羽賀 健太

ここから記入

【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 (CAF) と呼ばれ、様々ながん種において CAF 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 の発現調節機構はい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 (NOF) を対象群とした。まず、CAF と NOF 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 NOF を組み込んだコラーゲンゲルの上部に OSCC 細胞

【別紙 2】

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 NOF 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、CAF の発現と臨床病理学的因子との関連を解析した。

【結果】 CAF は NOF と比較して、CAF マーカーである α -SMA と TGF- β 1 を高発現し、CAF 培養上清は NOF 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、CAF 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、CAF 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 CAF 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、CAF 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、CAF の存在は頸部リンパ節後発転移および無再発生存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 CAF 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、CAF が EMT の誘導を促進したことが示唆された。以上より、CAF 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 CAF を購入して使用したが、今後は OSCC 患者由来の CAF を分離・同定し、口腔癌由来の CAF についてのさらなる研究が必要である。本研究では、CAF・OSCC 細胞の相互作用を評価する

【別紙 2】

ツールとして 3 次元培養モデルの確立に成功し、CAF・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。