

## 腺様嚢胞癌の被膜化解析による浸潤・転移の制御法の開発

先端研究推進センター

藏満保宏

### <研究の背景>

腺様嚢胞癌 (ACC) は、頭頸部領域すべての悪性腫瘍の約 1% を占め、主に唾液腺で発生する。ACC の進行は緩徐であるが、局所再発や遠隔転移がしばしば発生し、長期予後は不良である。5 年生存率は比較的高いが、10 年から 20 年の生存率は著しく低い。したがって、ACC の特徴的な生物学的挙動と分子遺伝学をさらに理解することで、ACC の治療法及び長期予後改善に対する新たな知見が得られる可能性がある。

この ACC 研究に先立って我々は癌細胞の浸潤・転移を阻害する治療法開発に向けて腫瘍組織被包化の開発研究を行ってきた。そのために着目したのが、肝細胞癌 (HCC) の成長過程の組織学的特徴の一つである。HCC では、腫瘍周囲に線維性の被膜を形成することが多く見られる (図 1)。被膜破綻している HCC は予後不良であり浸潤転移に影響すること (Iguchi T, et al. 2009)、被膜維持の HCC 患者の予後は被膜破綻の HCC 患者よりも有意に予後良好であること (Wu T-H, et al. 2012) が報告されている。そこで HCC の被膜維持が癌の浸潤・転移抑制の一因となる可能性を仮定し、HCC の被膜維持と破綻を分子レベルでの比較により HCC の被膜維持に関与する分子を同定し、OSCC 組織の被包化を試みようとして被包化 (+) と被包化 (-) 組織のプロテオーム解析を行って候補蛋白質として LAP3 を同定した。このようなストラテジーで ACC の被膜化解析による浸潤・転移の制御法の開発を行う。

### <研究の目的>

本研究の目的は下記の 3 項目である。

- 【項目 1】被膜 (+) vs 被膜 (-) ACC 組織の比較プロテオーム解析
- 【項目 2】被膜 (+) vs 被膜 (-) ACC 組織の比較トランスクリプトーム解析
- 【項目 3】被膜維持関連分子制御による ACC 被包化の実験的試み

最終的に、

- 【総括】ACC を標的とした癌組織被包化による浸潤・転移予防法の確立を目指す。

## <本研究の学術的独自性と創造性>

**【独自性】** 癌の浸潤・転移は様々なメカニズムで起こる。1) まず EMT (上皮間葉系移行) によってバラバラになり移動しやすくなる。2) MMP (マトリクスメタロプロテアーゼ) 産生によって細胞外マトリクスを溶かしながら浸潤して行く。3) 細胞外マトリクスとの接着喪失に誘導される細胞死 (anoikis) に対するの抵抗性を持つ。4) 血管内皮に接着して組織に侵入。5) MET (間葉上皮移行) によって 一度ばらばらになったものが最終的にまた塊になって転移巣が増えて浸潤を再開。これらのプロセスを阻害する試みも行われているが臨床応用が難しいのが現状である。本研究では、これまでの転移抑制の試みとは全く異なるアプローチで『**外科的切除で完全に切除できなかった腺様嚢胞癌をまるごと包み込んで周りの組織に浸潤できなくする**』ことを目的としている。即ち残余癌を被包化することで、周辺の組織に浸潤するのを阻害させる。残余癌は当然 MMP 等によって被膜を分解して浸潤を試みるが、さらに被包化を繰り返すことで残余癌の浸潤を抑える。これまでこのような試みは世界でも皆無である。

**【創造性】** ACC を被包化して浸潤阻害するために、初期の ACC 被膜保持のメカニズムを利用することが非常にユニークな研究であるが、この ACC の被膜維持に必須の分子を同定し、活性化させることで被膜形成を行い ACC 組織を再被包化することができれば、外科切除術後に再発・浸潤・転移する癌から患者を守ることが期待できる。もし実用化まで行かない場合でも、被膜維持に必須の分子を同定し、これまで明らかになっていなかった初期の ACC 組織がどういったメカニズムで線維組織によって被包化されているのかが解明できれば、将来、癌以外の線維化が問題となる他の疾患の治療にも応用でき、様々な疾患への応用も期待できると考えている。

## <本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか>

### 【項目 1】被膜(+)vs 被膜(-)ACC 組織の比較プロテオーム解析

- 1) 本学口腔外科から供与された被膜維持と被膜破綻 ACC 組織各 30 検体から蛋白質抽出後に二次元電気泳動を行い、蛍光染色後に画像解析ソフトを用いて被膜(+)vs 被膜(-)ACC 組織の蛋白スポットの比較解析を行う。
- 2) 選定したスポットを質量分析で同定した後に特異抗体によるウェスタンブロットでバリデーションを行う。

### 【項目 2】被膜(+)vs 被膜(-)ACC 組織の比較トランスクリプトーム解析

- 1) 項目 1 と同様に本学口腔外科から提供された被膜維持 ACC と被膜破綻 ACC 組織各 30 検体から RNA を抽出後に次世代シーケンサーでの RNA シーケンスで比較解析を行い、定量 PCR で確認後に、特異抗体によるウェスタンブロットでバリデーションを行う。

### 【項目 3】被膜維持関連分子制御による ACC 被包化の実験的試み

1) 項目 1、2 で同定された遺伝子や蛋白質の中で被膜維持に関与する可能性がある候補分子の発現細胞を免疫組織染色で確認するが、癌組織周辺の非 CAF の線維芽細胞と予想されるので、申請者が保持している数種類の線維芽細胞株に過剰発現させ、コラーゲン産生への影響を qPCR で調べて被膜維持に関与する候補分子のスクリーニングを行う。

2) 本学口腔外科から供与された ACC 組織中の癌細胞、周辺部の正常細胞からオルガノイドを作製し正常細胞のオルガノイドに候補分子を過剰発現させ ACC オルガノイドとの 3 次元共培養で被包化が行われるか否かを観察する。

3) さらにヌードマウスに ACC 細胞と候補分子過剰発現させた線維芽細胞（免疫組織染色で候補分子を発現している細胞が他の細胞である場合はその細胞種株）を共に皮下移植し、ACC 細胞単独で皮下移植したコントロール群の腫瘍径が 5mm になった時点で犠牲死後に組織の病理観察を行い、被包化への影響を確認する。

**【総括】**ACC を標的とした癌組織被包化による浸潤・転移予防法の確立を目指す。

**【項目 1-3】**で得た ACC の被膜維持への関与が予想される分子の同定により、初期 ACC の被包化のメカニズムを明らかにすることができ、さらに**【項目 3】**で候補分子制御（実際には強制過剰発現）によつての ACC の被包化を In vitro と In vivo で再現できれば今後の続く研究で、(1) 薬剤によつての候補分子活性化での癌の被包化の現実化、(2) 基礎的には癌細胞の何が被包化を誘導するのかの基礎的検討がさらに期待できる。