

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670861

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における癌間質の役割

研究課題名(英文) Role of cancer stroma on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

川尻 秀一 (Kawashiri, Shuichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30291371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌の臨床での浸潤および転移を忠実に再現できるマウス正所性移植モデルを用いて、癌間質の線維芽細胞と血管新生を阻害する薬剤を使用し、浸潤転移への効果を検討した。癌細胞は高浸潤高転移性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるOSC-19細胞を使用し、ヌードマウスの口腔底もしくは舌に移植した。線維芽細胞増殖抑制剤はトランラストを血管新生阻害薬はアバスタチンを用いて浸潤と転移の阻止効果を調べた。その結果、腫瘍の大きさ、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移にそれぞれ効果を認め、臨床的にも有意義であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using an orthotopic implantation mice model in which the invasion and metastasis of oral cancer can be reproduced, we investigated the inhibitory effects of cancer stromal fibroblast inhibitor (tranilast) and angiogenesis inhibitor (avastin) on invasion and metastasis. A highly invasive and metastatic human oral squamous cell carcinoma cell line, OSC-19, was implanted into the tongue of nude mice, and tranilast or avastin were administered to the mice after the implantation. The effects of each drug on cancer invasion and metastasis were investigated. Tumor size was significantly reduced. In the control group, the tumors showed grade 4C of mode of invasion, while in the groups treated with tranilast and avastin, grade 3 was observed, with an inhibitory effect on tumor invasion being observed. The rate of metastasis in the cervical lymph node was significantly decreased in the groups treated with tranilast and avastin.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 浸潤 転移 間質 線維芽細胞 血管新生

1. 研究開始当初の背景

癌細胞が浸潤する際には周囲組織にも様々な変化が認められる。この癌間質は癌細胞の浸潤にとって「バリアーの役割をしている」という説が以前は一般的であった。ところが最近、癌間質は「癌細胞の浸潤や転移をサポートしている」という考え方が広まりつつある。その代表的なものは腫瘍血管や線維芽細胞である。しかし、腫瘍血管は腫瘍の増殖には重要であるが、浸潤や転移にはどのような影響があるのか分かっていない。また、間質の線維芽細胞の一部には Cancer associated fibroblasts (CAF)が存在し、癌の浸潤を促進させているといわれている。そこで口腔扁平上皮癌における腫瘍間質と浸潤・転移との関係を明らかにするとともに、腫瘍間質に対する各種阻害剤を使用し癌の浸潤・転移を抑制することを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

悪性腫瘍の生物学的な大きな特徴は局所浸潤と転移である。特に転移の有無は癌患者の予後を左右する最も重要な因子であり、治療が成功するか否かは転移巣を制御できるかどうか深くかかわっている。すなわち癌細胞の転移を阻止できれば治療成績は向上すると思われる。また近年、固形癌における血管新生についての報告が増え Folkman によると腫瘍血管と転移には密接な関係がみられ、腫瘍周囲の血管数が増えるにつれ転移が認められるようになると報告している。しかし口腔扁平上皮癌においては浸潤が軽度の腫瘍で血管数が多くなることもあり、単純に血管数が多い腫瘍で悪性度が高いとはいえないことも報告されている。また、スキルス胃癌では腫瘍の浸潤に線維芽細胞が深く関与しており、その増殖を抑制することで浸潤が抑制できたことが報告されている。そこでわれわれは腫瘍間質および血管と浸潤・転移との関係を明らかにすることで、浸潤・転移機序の一端を解明することを目的に本研究を計画した。癌は間質に浸潤する際に間質反応として線維化を伴うことが知られているが癌にとってこの反応が宿主防御反応か癌細胞の浸潤増殖の足場として機能しているのかは不明である。これまでの口腔癌の研究はそのほとんどが腫瘍の実質に関するものばかりで、間質に主眼をおいたものはほとんどない。われわれは以前、口腔扁平上皮癌の臨床例の間質コラーゲン量を検索している。その結果、最も高度浸潤癌である浸潤様式 4 D 型の癌では間質コラーゲン量が非常に多く、癌の浸潤にとって間質は何らかの相互作用を及ぼしているものと推察された。そこで本研究では、癌間質を構成する重要な、線維芽細胞と腫瘍血管の癌細胞に対する阻害剤を用い、癌細胞の増殖、浸潤、転移に対する影響を検討した。

3. 研究の方法

癌細胞の浸潤過程における間質線維芽細胞および血管・リンパ管新生について調査し、癌細胞が移植後に生着、増殖、浸潤、進展する際に腫瘍間質および血管・リンパ管がどのように変化して、腫瘍の浸潤や進展との関連を詳細に調査する。また、線維芽細胞増殖抑制剤および血管新生阻害剤の効果についても検討し、腫瘍間質線維芽細胞と血管、リンパ管の浸潤や転移に対する役割を検討した。

用いる浸潤・転移モデルは以前の報告において最も高浸潤・高転移性を示した OSC-19 細胞を用いて、ヌードマウスの舌に正所性移植し、浸潤および転移に対する影響を観察した。用いたマウスは6週齢・雌の BALB/c nu/nu のヌードマウス体重は 15~20g で、金沢大学医学部附属動物実験施設内で特定病原体除去環境下、室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ にて飼育して使用した。OSC-19 細胞は 10% となるように牛胎児血清を加えたイーグル最小必須培地でインキュベーター内 (温度 37°C 、湿度 100%、5% CO_2) において継代培養し、必要に応じて使用した。ヌードマウスへの移植方法はまず、OSC-19 細胞を 0.2% トリプシン液で分散し、10% 牛胎児血清加イーグル最小必須培地中で細胞数を 8×10^6 個に調整した後に、その 0.025ml (2×10^5 個) を 26 ゲージ針付きの注射器でジエチルエーテル麻酔を行ったヌードマウスの舌に移植した。OSC-19 細胞を本モデルに応用し、得られた組織を検討したところ、癌浸潤様式は 4C 型で、頸部リンパ節転移はほぼ 100% であることがすでに判明している。細胞移植後、4 日目、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後に屠殺するグループ分けし、移植腫瘍の間質、血管、リンパ管がどのように経時的に変化して、腫瘍の浸潤や進展との関連を調査した。間質線維芽細胞の変化を観察するためにアザン染色をし、画像解析ソフトにて間質量を測定し経時的变化について検討するに加え、筋線維芽細胞の特異的マーカーである抗 SMA 抗体を用いて、間質の線維芽細胞の評価を行う。血管新生の変化には血管のマーカーである CD34 抗体を用い、リンパ管新生の変化にはリンパ管のマーカーである NZ-1 抗体を用いた免疫染色抗体を用いた免疫染色を行い、血管数の変化とリンパ管数の変化を観察した。また、線維芽細胞増殖抑制剤および血管新生阻害剤の効果についても検討し、腫瘍間質と血管、リンパ管の浸潤や転移に対する役割を検討した。線維芽細胞増殖抑制剤には肥厚性癩痕の治療薬として使用されているトラニラストを使用する。血管新生阻害剤は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体である分子標的薬のアパスチンを使用した。投与スケジュールは移植した癌細胞が局所に生着した後の移植後 2 日目から週 3 日腹腔内投与した。なお、浸潤に対する効果は切除した腫瘍の HE 染色標本を用い、光顕的に観察して下里分類に従って分類し組

織学的効果を判定した後に、山本-小浜の癌浸潤様式に準じて化学療法後の浸潤抑制効果について評価した。また、転移に対する効果も同様に、頸部リンパ節の HE 染色標本を用い、光顕的に観察して病理組織学的に転移形成の有無を確認し対照群の転移形成率と薬剤投与群の転移形成率をそれぞれ比較検討した。血管新生の評価には血管のマーカーである CD34 抗体を用い、リンパ管新生の評価にはリンパ管のマーカーである NZ-1 抗体を用いた免疫染色を行い、血管数とリンパ管数の比較検討を行った。

4. 研究成果

癌細胞周囲の間質には、線維芽細胞、血管やリンパ管、リンパ球などの免疫担当細胞などが存在している。本研究では間質の各組織と癌細胞の関係の一端を明らかにしている。すなわち、線維芽細胞には線維芽細胞増殖抑制剤（トラニラスト）、血管には血管新生阻害薬（アバスチン）を使用し癌細胞の増殖、浸潤、転移に対する影響を調査した。また、各種の口腔扁平上皮癌細胞株を用いて癌細胞ならびに周囲の免疫担当細胞の PD-1/PD-L1 発現についても調査している。

移植腫瘍に対するトラニラストの効果ではコントロール群に対して腫瘍の体積が小さく、腫瘍の増殖抑制効果が認められた。移植腫瘍の浸潤像は癌細胞の空胞様変性や壊死、胞巣の破壊などの所見はほとんど認められなかった。おおむね浸潤様式 4C 型の浸潤像を呈していたが、トラニラストにより 3 型にダウングレードしている様子が観察された。アザン染色像ではトラニラスト投与群では線維性結合組織量を検討したところ、トラニラスト投与により、癌胞巣周囲の線維性結合組織の減少が認められた。リンパ節転移率はトラニラスト投与群では 14 匹中 8 匹 (57%) だったのに対して、コントロール群では 14 匹中 14 匹 (100%) で、トラニラスト投与によりリンパ節転移抑制効果が認められた。コントロール群の PCNA 陽性細胞率は平均 29.7% であったのに対して、トラニラスト投与群は平均 18.9% であり、有意にトラニラスト投与群で腫瘍細胞の増殖活性の低下を認めた。血管密度はコントロール群では 1 視野平均 65.7 個であったのに対して、トラニラスト投与群では平均 30.1 個であり、有意にトラニラスト投与群で血管密度の減少を認めた。

血管新生阻害剤（アバスチン）の腫瘍増殖や浸潤・転移に対する抑制効果を検討した結果、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群と血管新生阻害剤投与群では差が認められなかった。しかしながら、リンパ節転移に関してはコントロール群が 8 匹中 8 匹 (100%) の転移率に対し、血管新生阻害剤投与群では 9 匹中 4 匹 (44%) の転移率で、有意差が認められた。病理組織像で移植腫瘍が血管新生阻害薬を投与することで浸潤様式 4C 型や 3 型にダウングレードする傾向は認められなかつ

た。しかし、癌細胞の細胞増殖活性を観察するために増殖細胞核抗原 PCNA 抗体を用い免疫染色を行ったところ血管新生阻害薬投与群で陽性率が低い結果であった。また、血管とリンパ管を CD34 抗体と NZ-1 抗体でそれぞれ免疫組織化学染色した。その結果、血管密度・リンパ管密度のいずれも、血管新生阻害剤（アバスチン）の投与で減少していた。また、腫瘍移植後のマウスの体重減少は、血管新生阻害剤投与群が低かった。以上の結果から、口腔癌モデルにおいて、腫瘍周囲の血管新生を抑制することでは腫瘍そのものに対する増殖抑制効果は低いものの、リンパ節転移が抑制された。したがって、高転移性の癌には血管新生阻害薬が治療に有効である可能性が示唆された。

口腔扁平上皮癌細胞株の PD-1/PD-L1 発現について調査した結果、高浸潤性口腔癌細胞株における PD-L1 の発現は低浸潤癌における PD-L1 発現より低く、さらに EMT の誘導により PD-L1 の発現が減少していた。一方、すべての細胞株において、PD-L2 の発現は PD-L1 の発現と比較して低かった。ヒト口腔扁平上皮癌組織での免疫染色では、低浸潤癌では PD-L1 は癌細胞で発現していたが、高浸潤癌では PD-L1 は癌細胞での発現は見られず、むしろ間質細胞での発現が亢進していた。蛍光免疫共染色でこの PD-L1 が発現亢進している間質細胞はマクロファージと樹状細胞であることを明らかにした。マクロファージまたは樹状細胞と高浸潤性口腔癌細胞株を共培養したところ PD-L1 発現上昇が観察され、免疫染色にて PD-L1 の発現は腫瘍細胞ではなくマクロファージと樹状細胞であることを明らかにした。この共培養での PD-L1 発現亢進は MyD88 阻害ペプチドと TLR4 阻害ペプチドの添加により抑制された。以上、高浸潤口腔扁平上皮癌ではマクロファージおよび樹状細胞で PD-L1 発現を誘導していると考えられる EMT 誘導腫瘍抗原が、PD-1/PD-L チェックポイントの阻害による利益を受けられる可能性がある患者の選択のための潜在的なバイオマーカーとなる可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Hirai M., Kitahara H., Kobayashi Y., Kato K., Bou-Gharios G., Nakamura H and Kawashiri S. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Int J Oncol*, 50 (2017),

41~48, doi: 10.3892/ijo.2016.3785. 査読有

Kitahara H., Hirai M., Kato K., Bou-Gharios G., Nakamura H and Kawashiri S. Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab via induction of the mesenchymal to epithelial transition. *Oncology Reports*, 36 (2016), 3139 ~ 3144, doi: 10.3892/or.2016.5189. 査読有

Mori, T., Murasawa, Y., Ikai, R., Hayakawa, T., Nakamura, H., Ogiso, N., Niida, S., and Watanabe, K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Exp Anim*. 65 (2016), 455~463, 査読有

Kimura I, Kitahara H, Ooi K, Kato K, Noguchi N, Yoshizawa K, Nakamura H, Kawashiri S; Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial mesenchymal transition. *Oncol Lett*. 11 (2016), 201~207, 査読有

Chiba T, Soeno Y, Shirako Y, Sudo H, Yagishita H, Taya Y, Kawashiri S, Okada Y, Imai K.; MALT1 inhibition of oral carcinoma cell invasion and ERK/MAPK activation. *J Dent Res*. 95 (2016), 446 ~ 452, doi: 10.1177/0022034515621740. 査読有

Nakamura H., Kimura I., Kitahara H., Kawashiri S. Loss of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition. *Eur J Cancer* 51 (2015), S23, 査読無

Shibata M, Chiba T, Matsuoka T, Mihara N, Kawashiri S, Imai K.; Krüppel-like factors 4 and 5 expression and their

involvement in differentiation of oral carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 8 (2015), 3701~3709, 査読有

Lo Cascio L, Liu K, Nakamura H, Chu G, Lim NH, Chanalaris A, Saklatvala J, Nagase H, Bou-Gharios G: Generation of a mouse line harboring a Bi-transgene expressing luciferase and tamoxifen activatable creER (T2) recombinase in cartilage. *Genesis* 52 (2014), 110~119, doi: 10.1002/dvg.22734. 査読有

Yanase M, Kato K, Yoshizawa K, Noguchi N, Kitahara H, Nakamura H: Prognostic value of vascular endothelial growth factors A and C in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 43 (2014), 514-520, 査読有

Takino T, Yoshimoto T, Nakada M, Li Z, Domoto T, Kawashiri S, Sato H. Membrane-type 1 matrix metallo proteinase regulates fibronectin assembly and N-cadherin adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 450(2014), 1016~1020, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.100. 査読有

[学会発表](計18件)

加藤広祿, 宮澤広樹, 加藤阿希, 平井真理子, 吉本泰祐, 木村依世, 北原寛子, 野口夏代, 中村博幸, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌細胞の Invadopodia 形成と癌関連線維芽細胞 (CAF) との関連, 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016年11月26日, 幕張メッセ (千葉県)

Kitahara K, Hirai M, Nakamura H and Kawashiri S, Eribulin differentiates cetuximab resistant oral squamous cell carcinoma cells to sensitive by inducing mesenchymal epithelial transition (MET). 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2016.7.10, Manchester congress center, (UK)

Hirai M, Kitahara K, Kimura I, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S, The regulation of PD-L1 expression at

microenvironment of high grade invasive human oral squamous cell carcinoma. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2016.7.10, Manchester congress center, (UK)

北原寛子, 中村博幸, 加藤広祿, 野口夏代, 大井一浩, 川尻秀一, エリプリンのセツキシマブ非感受性口腔癌細胞での作用検討, 第40回日本頭頸部癌学会, 2015年6月10日, ソニックシティー(埼玉県)

平井真理子, 中村博幸, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌におけるPD-L1発現の検討, 第52回日本口腔組織培養学会学術大会, 2015年11月21日, 徳島大学長井記念ホール(徳島県)

中村博幸, 北原寛子, 木村依世, 川尻秀一, セツキシマブ非感受性口腔癌の解析と新しい治療法の検討, 第60回日本口腔外科学会総会学術大会, 2015年10月17日, 名古屋国際会議場(愛知県)

北原寛子, 木村依世, 中村博幸, 川尻秀一, セツキシマブ非感受性口腔癌細胞でのエリプリンの作用検討, 第60回日本口腔外科学会総会学術大会, 2015年10月17日, 名古屋国際会議場(愛知県)

中村博幸, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌におけるEGFR発現と浸潤様式の相関と上皮間葉移行の関与, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月10日, 名古屋国際会議場(愛知県)

吉本泰祐, 滝野隆久, 堂本貴寛, 川尻秀一, 佐藤博, Vinculin は MEK/ERK 経路を介した MT1-MMP の転写を負に制御する, 第74回日本癌学会学術総会, 2015年10月10日, 名古屋国際会議場(愛知県)

Hiroyuki Nakamura, Iyo Kimura, Hiroko Kitahara, Shuichi Kawashiri, Loss of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial mesenchymal transition. European Cancer Congress 2015, 2015.9.25, Vienna Congress Center, (Austria)

吉本泰祐, 滝野隆久, 堂本貴寛, 川尻秀一, 佐藤博, Vinculin は MEK/ERK 経路を介した MT1-MMP の転写を負に制御する, 第24回日本がん転移学会学術集会, 2015年7月23日, シティープラザ大阪(大阪)

平井真理子, 野口夏代, 加藤広祿, 北原寛子, 木村依世, 中村博幸, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌におけるBevacizumabの抗腫瘍効果の実験的検討, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014年10月18日, 幕張メッセ(千葉県)

吉本泰祐, 滝野隆久, 川尻秀一, 佐藤博, MT1-MMP によるフィブロネクチン重合とN-カドヘリン接着の制御, 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014年7月10日, 金沢文化ホール(石川県)

加藤広祿, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌におけるCaveolin-1発現の臨床的意義, 第23回日本がん転移学会学術集会・総会, 2014年7月10日, 金沢文化ホール(石川県)

吉澤邦夫, 能崎晋一, 柳瀬瑞希, 木村依世, 北原寛子, 野口夏代, 加藤広祿, 中村博幸, 川尻秀一, 口腔扁平上皮がん浸潤様式4D型におけるがん悪性化に関わる各タンパク発現についての検討, 第38回日本頭頸部癌学会総会, 2014年6月12日, 東京ファッションタウンビルホール(東京)

柴田征紀, 川尻秀一, 今井一志, 口腔癌におけるKLF4/5の発現と上皮-間葉移行への関与, 第68回日本口腔科学会学術集会, 2014年5月8日, 京王プラザホテル(東京)

木村依世, 中村博幸, 加藤広祿, 平井真理子, 柳瀬瑞希, 川尻秀一, 口腔扁平上皮癌におけるEGFR発現の免疫組織化学的検討, 第68回日本口腔科学会学術集会, 2014年5月9日, 京王プラザホテル(東京)

Kunio Yoshizawa, Hiroko Kitahara, Natsuyo Noguchi, Hiroyuki Nakamura, Shuichi Kawashiri, Expression of various canceration related proteins on highly invasive oral squamous cell carcinoma showing type 4D (YK-criteria: Mode of invasion). 6th European Congress on Head & Neck Oncology. 2014年4月24日~26日, BT Convention Center Echo Arena Liverpool (UK)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川尻 秀一 (KAWASHIRI SHUICHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30291371

(2) 研究分担者

中村 博幸 (NAKAMURA HIROYUKI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30542253

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()