

令和元年5月30日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11529

研究課題名(和文) 神経 癌細胞間クロストークの解析：口腔癌細胞による神経新生誘導と末梢神経浸潤

研究課題名(英文) Nerve/tumor interaction during perineural invasion of human oral carcinoma cells in mouse tongue xenograft model

研究代表者

添野 雄一 (SOENO, Yuuichi)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：70350139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔癌細胞と間質に介在する末梢神経線維との相互作用の解明を目指して、担癌動物モデルを用いた病態解析を行った。口腔癌細胞株HO-1-u-1はマウス舌への移植により腫瘍塊を形成、転移能は低いものの、筋線維間や神経周囲隙などの組織間隙に侵入する特徴的な浸潤様式を示した。免疫組織学的検索と3次元形態解析により、HO-1-u-1は組織破壊能・脈管誘導能に乏しいが、サイトケラチン・ヒメントチン共陽性で上皮・間葉の中間形質を維持しており、特に神経線維束には親和性を有し選択的に浸潤することから、神経浸潤モデルとして有用であることを実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで神経と口腔癌細胞との相互作用を解析するモデルは希少であり、多くは唾液腺組織に由来する腺様嚢胞癌での神経浸潤例を用いるにとどまっていた。HO-1-u-1移植ではマウス舌組織において再現性高く神経浸潤を起こすことから、神経-癌細胞間相互作用を解析するうえで画期的なIn vivo実験系となる。今後の癌浸潤、癌性疼痛の研究推進に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：To investigate the cellular and molecular bases of nerve/tumor interactions during tumor progression, we transplanted oral carcinoma cell line HO-1-u-1 into the tongue of nude mice and determined tumor growth and micro-metastatic dissemination. HO-1-u-1 was tumorigenic in mouse tongue and showed low (< 40%) metastatic potential. HO-1-u-1 tumors displayed a unique invasion mode: tumor cells grew in a cord-like fashion, penetrated into the intermuscular spaces, and in particular, exhibited active perineural invasion. The prominent vimentin expression in HO-1-u-1 tumors at the periphery of the tumor mass and was maintained in nodal metastatic sites. Three-dimensional reconstruction highlighted the perineural invasive property in tumor microenvironment. Based on 2D and 3D histological observations, we found that HO-1-u-1 provided a useful model of oral cancer development with respect to perineural invasion.

研究分野：実験病理学

キーワード：病理学 扁平上皮癌 癌微小環境 神経浸潤 同所移植モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の癌研究分野では“癌微小環境”の理解が進み、古くから知られる腫瘍血管新生に加えて腫瘍リンパ管新生についても知見が得られ、さらには腫瘍組織内に神経が進入して新たな神経終末を形成していく腫瘍神経新生 (tumor neurogenesis) の可能性も指摘されはじめている。この機序として、癌細胞では神経増殖因子や軸索誘導因子を産生しており、これらの分子を介した神経組織との相互作用が癌病態に関わっていると想定されている。最近になり、癌と神経との相互作用を示す新たな知見として、前立腺癌や胃癌の進展に神経の介在が必要であることを示されたが、神経新生を促すシグナルは同定できていない。また、癌性疼痛とも関連する感覚 (知覚) 神経の役割については適切な解析モデルが得られておらず詳細は不明となっている。

口腔粘膜に発生する扁平上皮癌 (口腔癌) では、早期から疼痛などの自覚症状を訴える患者も少なくない。口腔癌の疼痛については、進行癌では著しい浸潤活性に伴う神経組織の圧迫・破壊によるとされているが、症例により癌細胞の能動的な神経浸潤をみる場合も存在する。臨床病理学的には、癌細胞の神経浸潤は高悪性度の病態と相関が強く、年齢の若い口腔癌患者ほど高い転移率とともに神経浸潤が頻発していることも報告されている。ただし、神経浸潤の診断的重要性についてはコンセンサスが得られておらず、浸潤機序の解明が課題となっている。

研究代表者らはこれまでにヒト口腔粘膜由来の扁平上皮癌細胞株を用いたヌードマウス舌組織への移植モデルを確立し、異なる癌細胞株について造腫瘍活性、局所浸潤様式と脈管新生誘導、リンパ節転移能について比較してきた。この解析では、観察期間内 (約3週間) で比較的緩やかに腫瘍塊形成が進行しリンパ節転移率も低く留まる癌細胞株群 (KOSC2、H0-1-u-1) と、移植後約1週間で急速に腫瘍塊の増大を来し高頻度に頸部リンパ節転移病巣を形成する癌細胞株群 (OSC19、OSC20 など) とを選別できた。特に OSC19 の移植によって胞巣内に多量のリンパ管が新生誘導されることを見出し、腫瘍リンパ管内皮の解析モデルとして活用を開始している (Shirako ら, J Oral Pathol Med, 2015)。この比較解析のなかで、口底癌由来の H0-1-u-1 をマウス舌に移植すると、移植部位における癌胞巣の拡大とともに、周囲の神経線維束に沿った浸潤傾向を示すことが判明した。これらの成果から、H0-1-u-1 移植を口腔癌の神経浸潤モデルとして癌 - 神経細胞間のクロストーク解明に活用することを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌の進展過程における末梢神経線維との相互作用を明らかにすることを目的とした。この目的に向けて、ヌードマウス舌へ神経浸潤傾向の強い H0-1-u-1 癌細胞株を移植し、癌細胞の神経浸潤および癌胞巣での神経新生誘導について病理組織学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) マウス舌への口腔癌細胞移植

ヌードマウス (BALB/c-*nu/nu*) の飼育管理は日本歯科大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会のガイドラインに従って、生物科学施設 SPF 室内において癌細胞移植と試料採取を行った。口腔癌細胞株 H0-1-u-1 は、RPMI1640 培地 + 10%ウシ胎仔血清に懸濁し、5% CO₂ 雰囲気下 (37 °C) で培養した。マウス舌への移植では、 8×10^6 細胞/ml PBS に調製した癌細胞浮遊液 25 μ l (2×10^5 細胞) をヌードマウス舌側縁部に 26G シリンジで注入した。移植後 1~4 週間、腫瘍塊の増大を視診によりモニタリングし、試料採取時期を判定した。

(2) 癌組織試料採取・標本作製

直径 2 ミリメートル程度の腫瘍塊形成を指標として試料採取時期を決定、頸椎脱臼による安楽死後速やかに舌組織および頸部リンパ節 (4~6 個/個体) を摘出した。組織形態学的解析用試料は、組織変形を防止するためコルク台にピン留めして 4%ホルムアルデヒド固定した。固定後、腫瘍塊の最大径で割断し、パラフィン包埋した。移植個体におけるリンパ節転移については、同時に摘出したリンパ節をすべて連続薄切・染色観察して微小転移巣の有無を厳密に判定した。遺伝子発現解析用試料については OCT コンパウンド包埋後に冷アセトンで凍結した。3次元構造解析 (組織立体構築) に向けたパラフィン包埋試料では、セクショントランスファー装置付き回転式マイクロトームで 4 μ m 厚、150~200 枚の連続薄切を行った。

(3) 免疫染色・組織観察

癌病巣の連続薄切片については、癌細胞形質の検出を目的として、ヒト上皮形質マーカー (サイトケラチン、E カドヘリン) 間質細胞マーカー (ビメンチン) 癌幹細胞マーカー (CD44) 細胞増殖マーカー (Ki-67) また、マウス間質要素として、血管内皮細胞 (PECAM) リンパ管内皮細胞 (Lyve1) 神経線維 (ニューロフィラメント; NFP) の特異抗体を用いて、異なる発色剤 (青色の Vector blue、茶色の DAB、赤色の AEC) を組み合わせて ABC 法による多重免疫標識を施した。染色画像はパーチャルスライド装置 (NanoZoomer、浜松ホトニクス) でデジタル記録した。立体構築に関しては、画像処理システム (ImageJ/Fiji; NIH, TRI-SRF2; RATOC Inc.) にて連続組織画像の位置あわせ操作 (組織輪郭形状から重心を求め、Z 軸方向での重心位置合せと重心軸での回転補正を自動演算処理する方法を採用) RGB 色調に基づく特定の組織要素分画を行った。

(4) 遺伝子発現プロファイルの解析

宿主環境下で癌細胞形質に生じる変化と浸潤・転移に優位に働く表現型について遺伝子発現解析による検証を行うため、増生した腫瘍塊(移植後3~4週)から凍結切片を作製した。レーザーマイクロダイセクションでは、薄膜(4 µm厚さ)を貼ったスライドガラスにRNase free条件下で凍結切片(8 µm厚さ)を貼付し、メタノール処理後に1%トルイジンブルーで染色、DEPC処理水で洗浄、検鏡下でレーザービームにより癌細胞領域を切り出し、RNA抽出カラム(RNeasy)で精製し解析まで-80℃で保存した。移植前の培養細胞についてもRNAを精製・抽出、解析に供した。マイクロアレイデータの検証の目的では、得られたtotal RNAからcDNAを合成し、リアルタイムPCRによる発現量の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 移植癌細胞の増腫瘍能と転移能

ヒト口腔癌由来細胞株H0-1-u-1をヌードマウスの舌組織へ移植し、形成された腫瘍組織塊の形態学的特徴を解析した。H0-1-u-1移植の初期段階(移植後10~14日間)では、目視による舌表面の観察で腫瘍塊を認めなかったが、採取した舌試料のHE組織観察によって移植部に癌細胞の小集塊を見出すことができた。移植後日数と舌に形成された腫瘍サイズとの関連では、強い浸潤活性を持つ癌細胞株では移植後10~14日で腫瘍塊を検知できるのに対し、H0-1-u-1の腫瘍塊検知では移植後20-30日を要した。また、リンパ節転移の解析では、移植部に直径2mm超の腫瘍塊を形成した個体における転移病巣形成率は38%(3/8)に留まり、転移傾向が比較的低いことも判明した。腫瘍細胞の組織所見は、角化を伴わない中分化型の扁平上皮癌と判定でき、舌の移植部(原発巣を想定)とリンパ節の転移巣において同等の形質であることが判った。

(2) 移植癌細胞の浸潤様式

癌細胞の形質

舌に形成されたH0-1-u-1腫瘍塊の組織所見の特徴として、母体となる腫瘍組織塊から、癌細胞が3~10細胞程度連なって基質成分の乏しい舌筋線維の間隙を放射状に進行する様子を認めた。癌細胞の上皮形質(サイトケラチン、Eカドヘリン、CD44)を免疫染色で確認した結果、腫瘍塊の周縁(浸潤先端部)においてEカドヘリン発現の減弱を認めた。また、癌細胞の悪性形質の指標とされるCD44もEカドヘリンの減弱がみられた胞巣周縁部で強発現しており、宿主組織との近接部において癌細胞の移行形質が高まっていることが示された。この浸潤先端部では上皮細胞骨格のサイトケラチンと間葉細胞骨格のビメンチンの二重陽性を示すH0-1-u-1が占めていた。リンパ節転移病巣の解析から、転移後の間質環境においても原発巣における癌細胞形質が維持されていることが明らかとなった。これらの観察から、H0-1-u-1は上皮と間葉の骨格を持つ中間形質を示し、組織破壊能が弱い性質により、進展過程において基質の乏しい筋線維間、神経線維周囲隙に沿って進行していると考えられた。

神経浸潤と腫瘍間質の応答

移植後1~4週におけるH0-1-u-1腫瘍塊の形成過程では、舌に分枝する末梢神経線維の周囲に沿って伸展する傾向が確認でき、H0-1-u-1の普遍的形質と捉えられた。神経浸潤に至る癌組織の成り立ちを調べる目的で、癌形質マーカー(サイトケラチン、ビメンチン)、神経マーカー(NFP)の多重免疫染色を実施して形態観察を行った結果、末梢神経の細線維にも数細胞規模でH0-1-u-1が侵入し、これらの細胞はサイトケラチン・ビメンチン二重陽性を示すことが明らかとなった。H0-1-u-1の増殖・浸潤活性(Ki-67, catenin)や間質誘導活性(VEGFA, VEGFC)について検索した結果、一般に腫瘍間質では血管新生による血管密度の亢進やリンパ管の増生・拡張を伴うことが知られるが、H0-1-u-1腫瘍塊ではVEGFAおよびVEGFCの発現はほとんど認められず、脈管の誘導活性は低いと考えられた。

(3) 癌胞巣の3次元構造解析

神経・脈管の分布に関して、2次元平面画像では得がたい走行経路や分布局在などの属性を分析するため、連続薄切切片200枚の多重免疫染色画像データから組織立体構築を行い、これまでに得られた2次元組織観察結果と照らして腫瘍実質と間質間の相互作用について検証した。ここでは、癌・宿主間質境界面情報を最大限に得る方策として、腫瘍塊の半側端部全域(本解析では円錐状に拡大伸展する腫瘍の舌尖側を選択)を立体構築することにより、半円形ドーム状に広がる癌胞巣表面を得る工夫をした。この立体構造解析では、舌側縁部に注入移植したH0-1-u-1細胞が舌下神経(舌根部から舌尖方向に向かって走行)の分枝に沿って局在している様子を捉えることができた。H0-1-u-1は神経線維の走行・分枝に忠実に並走しており、3次元形態計測によって、H0-1-u-1腫瘍間質の血管密度およびリンパ管密度に変化が無いことも再確認できた。また、神経分布は左右対称性を維持しており、癌細胞の存在下での神経新生誘導を示唆する所見は認められなかった。

(4) 癌細胞浸潤の分子基盤

H0-1-u-1の神経親和性に関わる分子発現について解析を目指した。H0-1-u-1を移植し、直径

2 mm 超に増生した腫瘍塊を切除・分離し、核酸抽出を行った。遂行したなかで、H0-1-u-1 細胞は組織破壊能が乏しいため、腫瘍塊中の神経・筋組織により核酸抽出精度が安定しないという技術的な課題が浮上した。間質組織の影響を最小限に抑えるための試料調整の最適化を行ったが、qPCR 解析で検証したところ、安定したデータを得難いことに遭遇し、計画していたマイクロアレイ解析を実施することができなかった。これは、ヒトとマウスの細胞が混在する試料、また、比較的癌細胞密度の低い腫瘍組織を対象とした解析に向けた技術的課題として、今後の申請研究課題に継承することとした。

(5) 総括

本研究では、口腔癌細胞と間質に介在する末梢神経線維との相互作用の解明を目指して、担癌動物モデルを用いた病態解析を行った。H0-1-u-1 口腔癌細胞移植による担癌舌組織の2次元・3次元形態解析を行った結果、神経線維束の間隙に非破壊的に親和的に侵入していることを明らかにした。神経親和性に関する分子基盤の解明には至っていないが、H0-1-u-1 が口腔癌の神経浸潤モデルとして有用であることを実証できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Migration of lymphatic endothelial cells and lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice, *Int J Dev Biol* (査読有), 2018;62: 293-301, doi: 10.1387/ijdb.170218yt.

辺見卓男, 柳下寿郎, 添野雄一: 口腔粘膜早期悪性病変の異型上皮プロファイリング, *歯学* (査読無), 2018; 105: 99-102.

Henmi T, Yagishita H, Sato K, Taya Y, Soeno Y: A novel approach for histopathological inspection of surgically excised oral mucosal lesions: Topographical mapping of premalignant epithelium, *Cancer Sci* (査読有), 2016; Open Acc 2 (1): 009.

Chiba T, Soeno Y, Shirako Y, Sudo H, Yagishita H, Taya Y (9 authors): MALT1 inhibition of oral carcinoma cell invasion and ERK/MAPK activation, *J Dent Res* (査読有), 2016; 95(4): 446-452, doi: 10.1177/0022034515621740.

〔学会発表〕(計10件)

添野雄一, 田谷雄二, 佐藤かおり, 白子要一: 日本歯科大学における研究の現在 生命歯学部病理学講座研究紹介, 日本歯科大学校友会学術フォーラム 2019, 2019.

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice Migration of lymphatic endothelial cells from cardinal veins into mandibular arches, Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB Program Book, Cell Struct. And Funct., Supple: 150 (No. P3-031), 2018.

Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y: Molecular switches of differentiation from myogenic progenitors into myoblasts and satellite cells in the mouse developing tongue, Society for Developmental Biology 77th Annual Meeting Program Book, *J Dev Biol, Suppl.*: 46-47 (No. 109), 2018.

田谷雄二, 佐藤かおり, 白子要一, 添野雄一: マウス顎顔面領域へのリンパ管内皮細胞の移住とリンパ管形成, 第60回歯科基礎医学会学術大会プログラム・抄録集, p.155 (No. 02-22), 2018.

辺見卓男, 柳下寿郎, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一: Ki-67 陽性核の上皮内局在様式に基づく舌粘膜上皮の病態評価, *日本病理学会会誌*, 106 (1): p.349 (3-G-10), 2017.

Taya Y, Sasaki Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y: Tongue morphogenesis through epithelial-mesenchymal interaction in mouse embryos, *Mech Develop*, 145 (Suppl): S153 (doi.org/10.1016/j.mod.2017.04.433), 2017.

Taya Y, Sasaki Y, Sato K, Soeno Y: Tongue myogenic cell differentiation regulated by Nfix and its related factors in embryonic mice, *J Oral Biosci*, 59 (Suppl): 484 (No. P2-86), 2017.

Shirako Y, Taya Y, Sato K, Soeno Y : Lymphangiogenic dynamics in oral cancer microenvironment ,平成 29 年度日本歯科大学歯学会第 4 回ウィンターミーティング プログラム・抄録集 : 13 (No.2-3), 2017 .

添野雄一, 白子要一, 島津徳人, 田谷雄二, 佐藤かおり : ヒト口腔扁平上皮癌細胞による癌微小環境の構築 , 日本病理学会会誌 , 105 (1) : p.106 (p2-103), 2016 .

添野雄一 : 舌粘膜表在性病変における発癌 Field 解析 , 歯科基礎医学会会誌プログラム , p.199 (01-D7), 2016 .

〔図書〕(計 1 件)

佐藤かおり, 田谷雄二, 白子要一, 添野雄一 : ポイントレビュー病理学・口腔病理学 , キタメディア , 東京 , 2018 .

〔その他〕

ホームページ等

[http:// www.ndu.ac.jp/~pathhome/](http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 島津 徳人
ローマ字氏名 : (SHIMAZU, Yoshihito)
所属研究機関名 : 麻布大学
部局名 : 生命・環境科学部
職名 : 准教授
研究者番号 (8 桁) : 10297947

研究分担者氏名 : 白子 要一
ローマ字氏名 : (SHIRAKO, Youichi)
所属研究機関名 : 日本歯科大学
部局名 : 生命歯学部
職名 : 助教
研究者番号 (8 桁) : 50756377

研究分担者氏名 : 佐藤 かおり
ローマ字氏名 : (SATO, Kaori)
所属研究機関名 : 日本歯科大学
部局名 : 生命歯学部
職名 : 講師
研究者番号 (8 桁) : 90287772

研究分担者氏名 : 田谷 雄二
ローマ字氏名 : (TAYA, Yuji)
所属研究機関名 : 日本歯科大学
部局名 : 生命歯学部
職名 : 准教授
研究者番号 (8 桁) : 30197587

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。