

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11532

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮がんの上皮間葉移行と浸潤能にpodoplaninがどう関与するのか

研究課題名(英文) The role of podoplanin in the epithelial-mesenchymal transition and the growth of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

後藤 満雄 (Goto, Mitsuo)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：60645191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株UMSCC81Bを用いた各種のin vitro実験により、podoplanin(PDPN)がOSCCの分化を抑制し、初期の上皮間葉移行(EMT)への誘導と細胞増殖に重要な役割を果たしていることを明らかにした。またin vivo実験として分子標的治療の検討を行い、複数のPDPN抗体のうちNZ-1抗体がUMSCC81B細胞株のヌードマウス皮下腫瘍の発育を有意に抑制することを明らかにした。以上のことからPDPNはOSCCの初期のEMT誘導と増殖に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、podoplanin(PDPN)が口腔扁平上皮癌(OSCC)の初期の上皮間葉移行(EMT)や浸潤に関与する可能性が示唆された。また今回、PDPNは正常扁平上皮では基底層に限局して発現すること、OSCCでは細胞分化の抑制に関与していることから、PDPNはOSCCのステムネス維持において重要な役割を果たしている可能性も示唆された。今回の研究結果は、EMTと癌幹細胞を標的としたOSCCに対する新しい分子標的治療の可能性を示唆するものであり、基礎医学的な意義のみならず、臨床応用の可能性を示唆しており、社会的意義も高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Podoplanin (PDPN), a transmembrane sialomucin-like glycoprotein, is known to be highly expressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC), but its role in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion remains unclear. In this study, we investigated the role of PDPN in EMT and the growth of OSCC using UMSCC81B cell line both in vitro and in vivo. Inhibition of PDPN using siRNA resulted in stimulation of differentiation but decreased the growth in UMSCC81B cells. Immunohistochemical study of 52 OSCC cases showed PDPN expression in both vimentin-negative tumor cell clusters and vimentin-positive mesenchymal tumor cells at invasion front, indicating that PDPN plays a role in the early stage of EMT. In vivo study of PDPN antibody (NZ-1) against sc transplanted UMSCC81B tumor in nude mice revealed significant anti-tumor activity. These results suggest that PDPN plays an important role in EMT and the growth of OSCC, and therefore would be a new potential therapeutic target for OSCC.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：Podoplanin 口腔扁平上皮癌 上皮間葉移行 抗Podoplanin抗体 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Podoplanin はリンパ管内皮細胞、中皮細胞のみならず、種々の悪性腫瘍にも発現し、腫瘍マーカーあるいは治療標的分子として診断、治療においてもその役割が注目されている。Podoplanin は正常口腔扁平上皮では幹細胞が存在する基底細胞のみに出現し、口腔扁平上皮癌 (OSCC) においては分化傾向の乏しい低分化な癌での発現が高いことから、OSCC における癌幹細胞マーカーである可能性も報告されている。一方、podoplanin は血小板凝集を介して、癌の血行性転移を促進する機能が報告されている。また podoplanin 発現は TGF- $\beta$  によって誘導されることから、腫瘍のメタプロテアーゼなどを介した浸潤能との関連も示唆され、実際、OSCC 症例では podoplanin 発現とリンパ節転移や予後との相関が報告されている。しかしながら、これまで OSCC において podoplanin 発現と上皮間葉移行 (EMT) や癌幹細胞との関連については殆ど知られていない。

### 2. 研究の目的

Podoplanin が OSCC の EMT と浸潤、増殖に関与しているのか否か、また関与しているとすればその機構を明らかにし、OSCC に対する新しい診断、治療法の開発を促進することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro 解析

培養 UMSCC81B 細胞に TGF- $\beta$  を添加し、24hr 後に細胞の形態変化や podoplanin、E-cadherin、vimentin mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。また、siRNA により podoplanin 発現をノックダウンし、E-cadherin や扁平上皮マーカー (CK13) などの上皮分化や増殖への影響を検討した。また、癌幹細胞の side population (SP) fraction の解析をフローサイトメトリーを用いて行った。

#### (2) ノードマウスモデルを用いた in vivo 解析

まず UMSCC81B 細胞を皮下に移植し、移植腫瘍の podoplanin、E-cadherin 及び vimentin のタンパク質発現を免疫組織化学により検討した。また、抗体の抗腫瘍効果は治療前後の腫瘍体積 (= 長径 x 短径 x 短径/2) を計算して評価した。

#### (3) 口腔癌症例の免疫組織学的解析

52 症例の OSCC 症例の腫瘍組織のパラフィンブロックから 4 $\mu$ m の厚さの薄切標本を作成し、HE 染色及び podoplanin、E-cadherin、vimentin の免疫染色を酵素抗体法により施行した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト OSCC 細胞株 UMSCC81B を用いた in vitro の podoplanin の機能解析

各種 OSCC 細胞株の podoplanin 発現の検討：

免疫組織化学、ウエスタンブロット法、RT-PCR 法で検討し、podoplanin を高発現する UMSCC81B 細胞を以下の実験に用いた。

UMSCC81B 細胞の皮下移植腫瘍は低分化型扁平上皮癌の組織像を呈し、podoplanin は腫瘍細胞島と先進部の vimentin 陽性の EMT 細胞が陽性であり、EMT の良いモデルであることが判明した (図 1)。

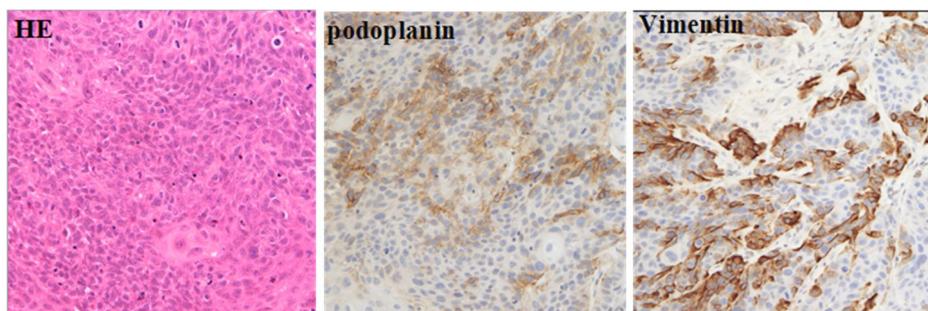


図 1 . HE 染色と podoplanin、vimentin の免疫組織化学。

#### Podoplanin 発現抑制の影響の検討：

UMSCC81B 細胞を用いて siRNA による podoplanin ノックダウン実験を行なった。ノックダウンの確認は蛍光染色により検証した (図 2A 右)。ノックダウンにより増殖は軽度ながら有意に抑制された (図 2B)。また、podoplanin ノックダウンにより上皮細胞マーカーである E-cadherin と扁平上皮マーカーである CK13 の発現が亢進し、逆に vimentin 発現が抑制されたがその程度は軽度であった (図 2C)。このことから podoplanin は分化の抑制と増殖の促進に関与するが、vimentin 発現など EMT の直接的な制御には強く関与していない可能性が示唆された。

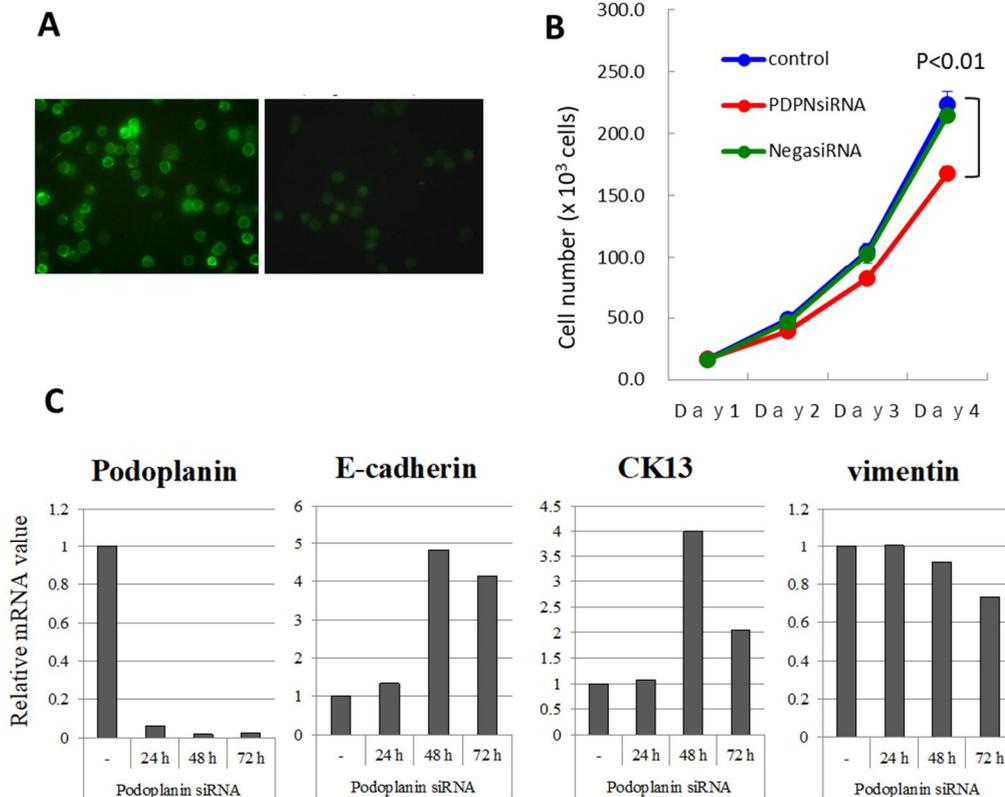


図2 . podoplanin ノックダウン実験

SP fraction の解析 :

UMSCC81B 細胞の podoplanin 発現が癌幹細胞マーカーとして機能しているか否か明らかにするために、フローサイトメトリーを用いて UMSCC81B 細胞の SP fraction の解析を行った。UMSCC81B 細胞中に ABCG2 ポンプ阻害剤である verapamil 処理に感受性を示す 5-10% 程度の細胞集団 (Side population: SP 画分) が認められた (図 3 A)。この SP 画分と non-SP 画分の幹細胞マーカー及び上皮間葉マーカーの mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。

その結果、UMSCC81B 細胞の SP 画分では予想どおり SOX2, Oct4, ALDH などの幹細胞マーカーが高発現していたのに対し、EMT マーカーである vimentin の発現は低かった (図 3 B)。このことから UMSCC81B 細胞には幹細胞様形質を示す小細胞集団が確かに存在するが、この癌幹細胞集団とは異なり vimentin などの上皮間葉形質を示す細胞集団が別に存在する可能性が示唆された。

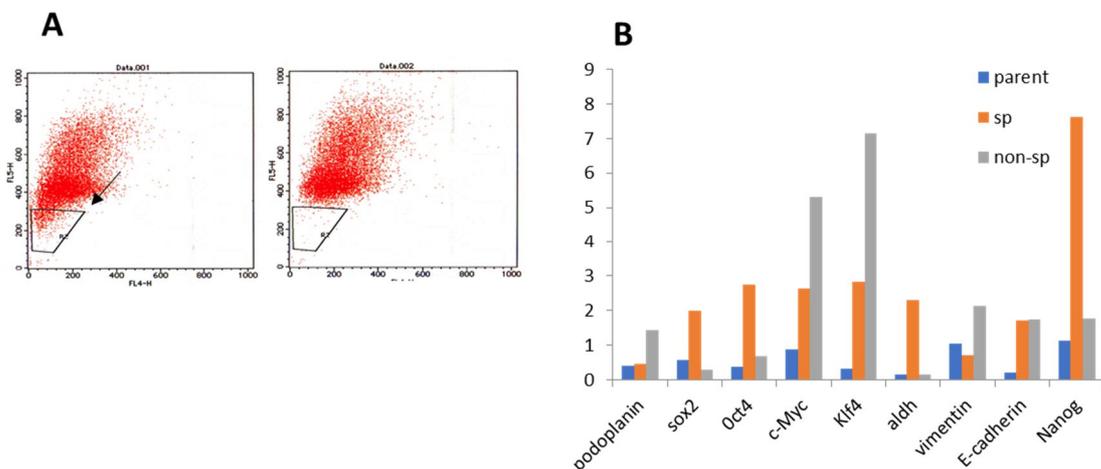


図3 . SP 画分 ( 矢印 ) と non-SP 画分の幹細胞マーカー及び上皮間葉マーカーの mRNA の発現。

in vitro の EMT 解析 :

UMSCC81B 細胞に対する増殖因子 TGF- $\beta$ 、EGF が、細胞形態および podoplanin、vimentin mRNA 発現に及ぼす影響について検討した。培養 UMSCC81B 細胞に TGF- $\beta$  (2.5 ng/ml) および EGF (20 ng/ml) を添加し、24 時間後の形態変化を観察したところ、予想に反して TGF- $\beta$  に比べて EGF 刺激で細胞間の上皮様結合が対照に比べて著明に減弱し、細胞が線維芽細胞様に EMT 化した(図 4)。これに相関して TGF- $\beta$  に比べて EGF 刺激では vimentin mRNA 発現の有意な増強が認められ、この発現促進は EGFR 阻害剤である Gefitinib によって抑制された。しかも podoplanin の発現は TGF- $\beta$  と異なり EGF 刺激では増強されないことから、この EGF による EMT 誘導は podoplanin に依存しないことが明らかとなった。このことから podoplanin は UMSCC81B 細胞の脱分化を促進し、初期の EMT を誘導するものの、単独で形態変化を伴う完全な EMT を誘導する能力はないものと考えられた。

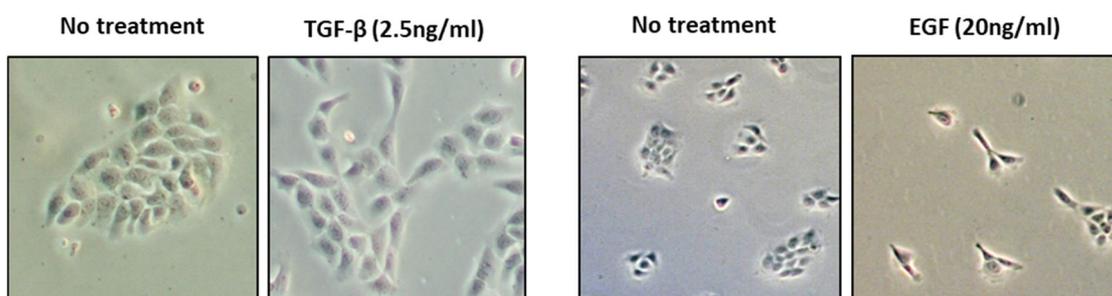


図 4 . 増殖因子による EMT 誘導

### (2) 免疫組織化学を用いた OSCC 患者標本の浸潤先進部における EMT の解析

In vivo の OSCC 患者標本の podoplanin 染色を行ったところ、podoplanin 発現は 52 例中 15 例 (29%) では基底細胞層のみに局限して発現していたのに対し、52 例中 37 例 (71%) では腫瘍胞巣のほぼ全体に発現していた。また浸潤先進部の解析では 52 例中 12 例 (23%) において podoplanin 陽性/vimentin 陰性の癌細胞集団(島)の周囲に podoplanin 陽性/vimentin 陽性の EMT 化した紡錘型細胞が認められた(図 5)。

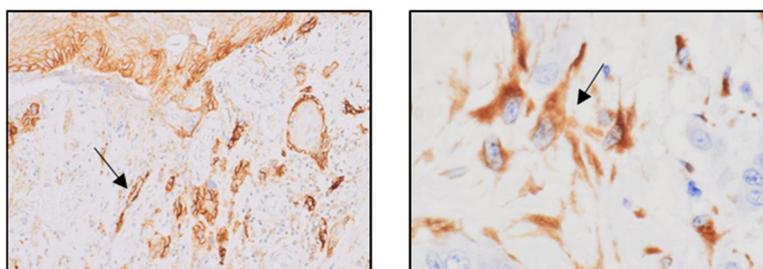


図 5 . OSCC 患者標本の免疫組織像。左 : podoplanin 陽性の小癌細胞島 (矢印)。右 : EMT 変化した vimentin 陽性癌細胞(矢印)。

### (3) OSCC 担癌ヌードマウスを用いた podoplanin 抗体の抗腫瘍効果の検討

抗 podoplanin 抗体の抗腫瘍効果について複数の抗体を用いて検討した。今回用いた NZ-1 抗体(ラット抗ヒト podoplanin MoAb)は、他の抗体に比べ ADCC 活性は強くないものの、UMSCC81B 細胞に対してアポトーシス誘導能があり、実際、マウス皮下移植腫瘍に対して有意な抗腫瘍効果を示した(図 6)。

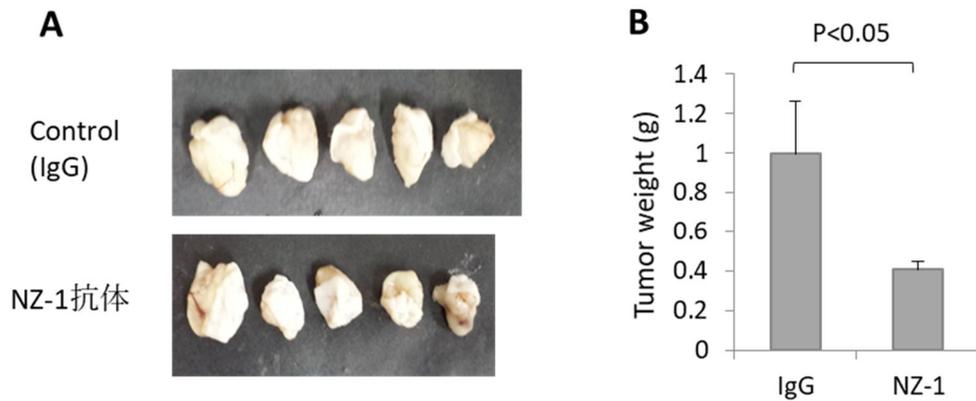


図6 . podoplanin 抗体(NZ-1)の皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果。

以上の一連の *in vitro* および *in vivo* の結果から、OSCC 細胞株 UMSCC81 細胞の EMT は、以下の2段階のプロセスから成り立っているものと考えられた。第1段階 (partial EMT) は扁平上皮癌を基底細胞様の低分化状態に保持しながら、少数の上皮細胞島(集団)を形成するプロセスであり、第2段階 (complete EMT) は細胞集団の細胞間結合を断ち切り、間葉系細胞へと形態変化を起こし、個細胞として浸潤するプロセスである。今回の結果からは、podoplanin は主として前半の“部分的な EMT”と増殖促進に関与するが、EMT の完成にはこれのみでは不十分であり、さらに EGF、その他の増殖因子やサイトカイン刺激が加わって初めて完全な間葉系の形態変化が誘導されるものと考えられた。

以上、podoplanin は OSCC の分化を抑制し、初期の EMT 誘導と細胞増殖に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに podoplanin 抗体等による podoplanin の抑制が OSCC に対する新しい分子標的治療となりうる可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akihiro Ito, Mitsuhiro Ohta, Yukinari Kato, Shunko Inada, Toshio Kato, Susumu Nakata, Yasushi Yatabe, Mitsuo Goto, Norio Kaneda, Kenichi Kurita, Hayao Nakanishi, Kenji Yoshida	4. 巻 17
2. 論文標題 A Real-Time Near-Infrared Fluorescence Imaging Method for the Detection of Oral Cancers in Mice Using an Indocyanine Green-Labeled Podoplanin Antibody	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Technology in Cancer Research & Treatment	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1533033818767936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 後藤満雄、宮地 斉、落合栄樹、齋藤輝海、渡邊 哲、宮部 悟、欄 真一郎、中西速夫、下郷和雄
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるPodoplanin発現とがん幹細胞形質との関連に関する実験的検討
3. 学会等名 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mitsuo Goto, Akihiro Ito, Hitoshi Miyachi, Shigeki Ochiai, Terumi Saito, Satoshi Watanabe, Satoru Miyabe, Satoshi Yamamoto, Shuji Nomoto, Hayao Nakanishi, Kazuo Shimozato
2. 発表標題 Podoplanin Expression and Its Preclinical Application for Near-Infrared Imaging for Oral Squamous Cell Carcinoma
3. 学会等名 The 99th American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	野本 周嗣  (Nomoto Shuji)  (40300967)	愛知学院大学・歯学部・教授    (33902)	

