

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592343
 研究課題名(和文)ヌードマウス可移植株高転移ヒト腺様嚢胞癌の転移機構の解析と転移抑制の検討
 研究課題名(英文) Analysis of the metastasis mechanism and inhibition of the high metastatic potential nude mouse transplantable model of a human adenoid cystic carcinoma
 研究代表者
 橋谷 進 (HASHITANI SUSUMU)
 兵庫医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00330449

研究成果の概要：

CXCR4 高発現患者は肺転移がみられ予後が悪かった。病理組織学的に充実型と転移がみられた篩状型は CXCR4 の発現が高かったが、管状型と転移がなかった篩状型は低かった。継代により組織型が篩状型から充実型に変化するヌードマウス可移植性腺様嚢胞癌株では CXCR4 発現の上昇が見られた。また、自然転移ヌードマウス可移植性腺様嚢胞癌株において親株より転移株で CXCR4 が高発現であった。これらのことから、腺様嚢胞癌の転移や予後および組織型と CXCR4 には強い関連があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：腺様嚢胞癌，転移，ヌードマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 腺様嚢胞癌 (ACC) は頭頸部腫瘍において病理学的に 1% を占める比較のまれな唾液腺腫瘍である。ACC は通常緩徐に増殖するが高悪性に浸潤、転移する。ACC には 3 つの組織型が存在する。(篩状型, 管状型, 充実型)。臨床的には悪性度はこの 3 つによって推し量られるといわれており、充実型は他の 2 型よりも生存率などの因子において予後不良

といわれている。病理所見がいずれであっても、外科切除後数十年たって、肺などの臓器に遠隔転移をおこすことが多いが、そのメカニズムは解明されていない。

(2) 転移は悪性腫瘍患者において、主要な死因である。腫瘍がどのように浸潤、増殖し、血管新生を開始し、新たに転移臓器に定着して増殖していくには複雑な過程を経ているといわれている。CXCR4 は SDF1 α (CXCL12)

をリガンドとするケモカインレセプターである。CXCL12は複数の臓器、皮膚、リンパ節、肺、肝、骨髄に存在している。CXCR4は乳がん、悪性黒色腫の転移においてその働きが指摘されている。

(3) 口腔癌では、多数のヌードマウス可移植株が樹立され、浸潤・転移像などのメカニズムの解明が進められている。しかしながら腺様嚢胞癌では腫瘍増殖が緩慢なため、移植株として樹立された系は非常に少ない。われわれは、現在、口底部原発の腺様嚢胞癌患者の摘出片をヌードマウス皮下に移植し、継代可能な移植株の樹立に成功している。継代が進むにつれ腫瘍増殖速度は増加し、15代目で初代ヌードマウス移植腫瘍に比べて約5倍となり、病理組織学的に初代移植時に篩状型であった腫瘍の約30%が充実型に移行している所見が認められている。また、それに伴ってPCNA、Ki-67、p53、bc1-2の各LIは徐々に増加し、蛋白レベルにおいてはbc1-2が増加していた。また、TUNEL法にて継代依存的にアポトーシスの減少がみられた。これらのことから、継代による腺様嚢胞癌移植株の増殖や組織学的変化にはアポトーシスの減少が関与していることをすでに報告している。

(4) 別のヌードマウス可移植口底腺様嚢胞癌株も樹立しており、この腫瘍は組織学的に篩状型を示すが、継代2代目において、頸部に自然転移がみられた。転移腫瘍は組織学的に未分化癌であったが、原発腫瘍同様、RT-PCRにおいてヒトβ-アクチンの発現を認めた。転移株は原発株に比べ、ヌードマウスにおける腫瘍増殖能が高く、PCNA LIも高値を示した。転移株皮下移植5ヶ月後にリンパ節や肺に多発転移を生じ、6ヶ月後にはすべて腫瘍死した。また、舌や顎下部への同所性移植においても高率にリンパ節と肺に転移した。

2. 研究の目的

これまで、腺様嚢胞癌においては生検や手術材料による臨床病理学的検索および免疫組織化学的検索、および培養細胞の尾静脈注射による転移モデルは散見されるが、ヌードマウス継代皮下腫瘍の自然転移モデルについて転移メカニズムをとらえた報告はみられない。そのため、本研究では、腺様嚢胞癌の臨床検体と2つのヌードマウス可移植ヒト腺様嚢胞癌を利用し、転移に関連する因子を分子生物学的に解明したいと考えている。

3. 研究の方法

(1) ヌードマウス移植継代株を用いてウエスタンブロット、RT-PCRを施行し、CXCR4およびCXCL12の発現を確認する。

(2) 高転移腫瘍株をヌードマウス皮下や舌、顎下部に同所性移植し、原発部の切除と非切除群に分ける。2群間のマウス肺、リンパ節における転移に差があるかどうか経時的に確認する。転移が見られれば摘出し保存する。転移が見られなくてもマウスの血液を採血し保存する。

(3) CXCR4が高発現する腺様嚢胞癌細胞はinvasion assayにてCXCL12の濃度依存性に移動能が高いことが報告されている。これをin vivoで証明するために移植前後のヌードマウス肺にCXCL12を濃度別に注射し、転移時期に差が生じるか検討する。また、各種抗癌剤を投与し、原発部位の腫瘍抑制を生じるものを確認し、その腫瘍内にCXCR4の発現抑制が生じているかを確認する。同抗癌剤投与時に転移抑制があるかを検討する。さらに抗CXCR4抗体あるいはsiRNAを投与し転移の抑制を検討する。

(4) 上記の腫瘍細胞を摘出時に一部を培養細胞に樹立する。

(5) invasion assayにより細胞の浸潤能がin vivoと同様であるか検討する。

(6) 腺様嚢胞癌の切除標本でCXCR4の免疫染色を施行し発現の有無を確認する。

(7) 樹立した培養細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成が見られるかを確認するとともに、肺への転移も生じているか検討する。

(8) 蛋白プロファイリングとDNAマイクロアレイで同定された蛋白や遺伝子で存在するものを利用し、高転移腫瘍株の継代前後に投与し、in vivoで転移の抑制や促進に関与しているか確認する。

4. 研究成果

腺様嚢胞癌において臨床検体、ヌードマウス可移植性腺様嚢胞癌株を用いて CXCR4 との関係を検討した。その結果 CXCR4 が高発現していた患者は肺転移がみられ予後が悪かった。病理組織学的に充実型と転移がみられた篩状型は CXCR4 の発現が高かったが、管状型と転移がみられなかった篩状型は低かった。継代により組織型が篩状型から充実型に変化するヌードマウス可移植性腺様嚢胞癌株では CXCR4 発現の上昇が見られた。また、自然転移ヌードマウス可移植性腺様嚢胞癌株において親株より転移株で CXCR4 が高発現であった。これらのことから、腺様嚢胞癌の転移や予後および組織型と CXCR4 には特に強い関連があることを報告した。今後この CXCR4 が腺様嚢胞癌の腫瘍マーカーの一つになる可能性があると考えられる。

The percentage of CXCR4 positive tumor cells was classified as below.

Grade 0 (G0) : undetectable or negligible expression

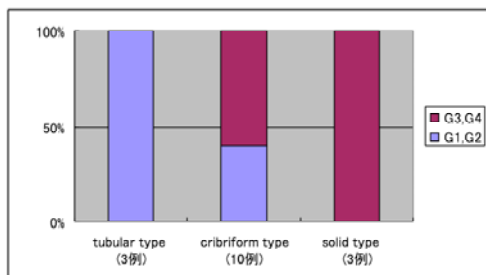
Grade 1 (G1) : 1-25% of positive cells (low expression)

Grade 2 (G2) : 26-50% of positive cells

Grade 3 (G3) : 50-75% of positive cell

Grade 4 (G4) : \geq 76% of positive cells

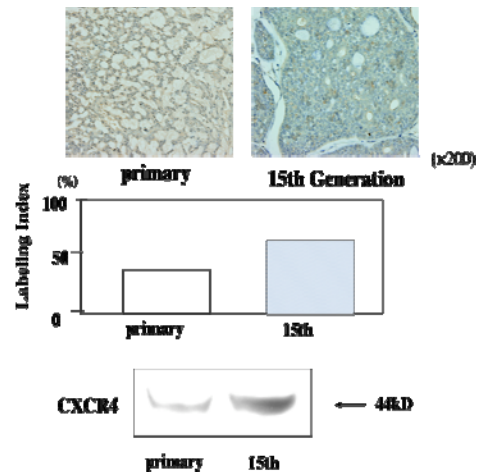
CXCR4 grade and histological characteristics of sixteen patients with ACC of the head and neck



CXCR4 expression by the ACCY tumor line in nude mice.

Immunohistochemistry of the ACCY tumor at passage 1 and passage 15 (original magnification,

x200). Western blot analysis of CXCR4 protein in the ACCY tumor at passages 1 and 15.

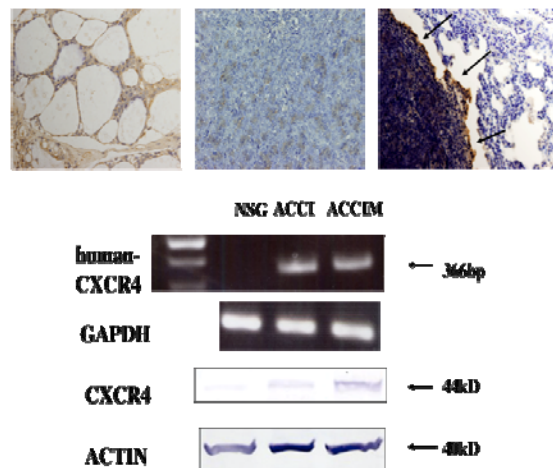


CXCR4 expression of the ACCI tumor line in nude mice.

Immunohistochemical staining of CXCR4.

Nests of tumor cells at the lesion border showed strong CXCR4 expression (arrows). RT-PCR analysis of human CXCR4 in the ACCI and ACCIM tumors.

Western blot analysis of CXCR4 protein in the ACCI and ACCIM tumors.



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1件)

ZUSHI Y, NOGUCHI K, HASHITANI S,
SAKURAI K, SEGAWA E, TAKAOKA K,
TOYOHARA Y, TANAKA N, KISHIMOTO H and
URADE M, Relations among expression of
CXCR4, histological patterns, and
metastatic potential in adenoid cystic
carcinoma of the head and neck,
International Journal of Oncology 査読有
33, 1133-1139, 2008.

〔学会発表〕 (計 1 件)

Zushi Y, Noguchi K, Hashitani S,
Sakurai K, Takaoka K, Tanaka N,
Kishimoto H, Urade M,
Relationship between expression of
CXCR4 and histological type in adenoid
cystic carcinoma of the head and neck,
14th the European Cancer Conference (ECCO),
9.23-27, 2007, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋谷 進 (HASHITANI SUSUMU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00330449

(2) 研究分担者

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70104883