

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791520  
 研究課題名 (和文) VEGF-C による上皮・間葉移行を介した扁平上皮癌の高度浸潤能獲得に関する研究  
 研究課題名 (英文) VEGF-C is required for the infiltration of squamous cell carcinoma via epithelial-mesenchymal transition.  
 研究代表者  
 小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)  
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：70379882

研究成果の概要：VEGF-C は高度浸潤型細胞株で高発現が認められた。新鮮凍結組織における VEGF-C の発現を臨床病理学的に解析したところ、リンパ節転移の有無と有意に相関した ( $p < 0.01$ )。recombinant VEGF-C で刺激すると、細胞浸潤能、走化性は亢進した ( $p < 0.05$ )。以上のことから、VEGF-C は EMT 関連遺伝子であり、OSCC の浸潤・転移に重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：口腔扁平上皮癌, 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、世界で年間約50万人が罹患し、全癌中5番目に発生率が高い。口腔癌の組織型の約80%は扁平上皮癌である。口腔扁平上皮癌は、被覆粘膜に由来する悪性腫瘍で周辺組織へ浸潤し、リンパ節や他臓器に転移する。癌の浸潤と転移は、患者の予後を左右する重要な因子であり、病理組織学的にいくつかの浸潤様式による分類が用いられている。特に、

予後が最も悪い高度浸潤型の口腔扁平上皮癌においては、細胞間接着が消失し、個々の癌細胞が散在性に浸潤する像を呈する。申請者らは、口腔扁平上皮癌における上皮・間葉移行 (EMT) を介した接着因子E-カドヘリンの発現消失が、高度浸潤能の獲得に強い相関を示すことを報告し、EMT関連遺伝子を同定するために正常上皮細胞に近い細胞形態を示す扁平上皮癌細胞株とEMTを獲得し線維芽細胞様形

態を示す高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株を分子レベルあるいは細胞レベルで比較検討を重ねてきた。

申請者らは、これら細胞を用いてマイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行い、約60個のEMT関連遺伝子を同定した。この結果は、同定した遺伝子群が、EMTを介した高度浸潤能の獲得に重要な役割を果たしている可能性が強く考えられる。その中で申請者は、VEGF-Cに着目した。近年、VEGF-Cはリンパ管新生因子として注目されている。癌細胞が分泌するVEGF-Cは、既存のリンパ管内皮細胞に発現するそのレセプターであるVEGFR3に作用して、腫瘍周囲あるいは腫瘍内に拡大・増殖したリンパ管を新生させる。申請者の予備実験では、21例の口腔扁平上皮癌症例の臨床検体（広島大学歯学部倫理委員会 承認済）を用いて、VEGF-C mRNAの発現を検討し、臨床病理学的に解析した結果、その発現とリンパ節転移は有意に関連していた（図1）。そこで、マイクロアレイの結果と臨床病理学的検討の結果を合わせて考察するとVEGF-Cは浸潤と転移に密接に関連している可能性が示唆される。申請者は、図2に示すように半定量的RT-PCR法と定量的RT-PCR、それぞれでVEGF-Cが高度浸潤型扁平上皮癌細胞株で高発現していることをすでに確認している。そこで申請者は、VEGF-Cが誘導するEMTが浸潤と転移に大きく関与していることを証明したいと考えた。

図1 VEGF-Cの発現とリンパ節転移の関係

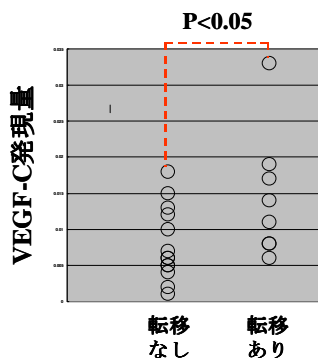
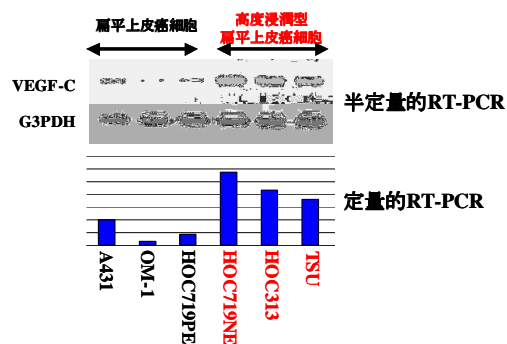


図2. 扁平上皮癌におけるVEGF-C mRNAの発現



## 2. 研究の目的

本研究は、独自に樹立した口腔扁平上皮癌細胞株とEMTを獲得した高度浸潤型口腔扁平上皮癌細胞株（当科で転写因子snailを遺伝子導入し、EMTを獲得した高度浸潤型細胞株を含む）を用いて、以下のことを行う。

- 当科所有の細胞株を用いて、VEGF-Cおよびそのレセプターを含めた関連遺伝子のmRNA・蛋白の発現解析を行う。合わせて、本学倫理委員会の承認と患者の同意を得た臨床検体を用いて、これら遺伝子の発現を解析し、臨床病理学的に解析する。
- 口腔扁平上皮癌細胞株をリコンビナントVEGF-Cで刺激することにより、細胞形態、浸潤能、細胞間接着能、細胞運動能の変化を検討する。

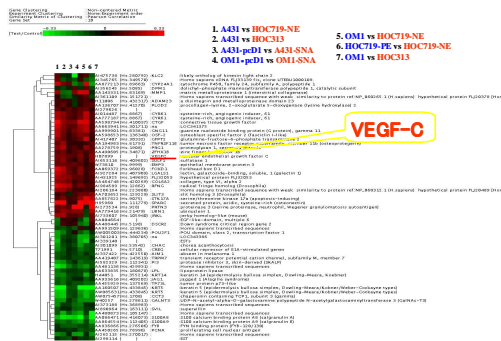
## 3. 研究の方法

- OSCC組織 21例における VEGF - C, VEGFR3 mRNA の発現の検討 : 定量的 RT- PCR 法
- 扁平上皮癌 (SCC) 由来細胞株 11株における VEGF - C, VEGFR3 mRNA の発現の検討 : RT-PCR 法, 定量的 RT-PCR 法
- VEGF - C, VEGFR3 mRNA の発現と臨床病理学的事項の関係 : Student' T test
- リコンビナント VEGF-C 刺激による細胞生物学的解析 : Cell Growth Assay, Wound Healing Assay, Invasion Assay
- 5-Aza-2 ' deoxycytidine の細胞刺激による VEGF-C の発現解析 : RT-PCR 法

4. 研究成果

- EMT 関連遺伝子の 1 つとして、VEGF-C を見出した。

Transcriptome Analysis of EMT-related Genes



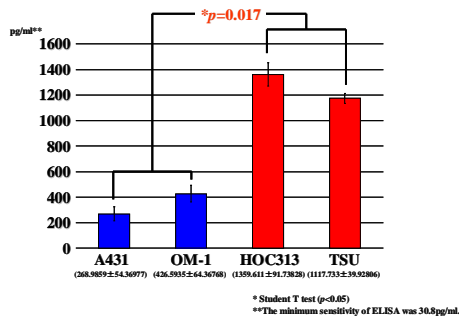
- VEGF-C mRNA の発現レベルと頸部リンパ節転移の有無は有意な相関を認めた ( $p = 0.029$ ).

VEGF-C mRNA Expressions in OSCC Tissues and their Correlations with Clinicopathological Parameters 2

Variable <sup>1</sup>	Category	VEGF-C mRNA	$p$ value <sup>II</sup>
Lymphnode metastasis	present	0.0154±0.009	0.029
	absent	0.008±0.00518	
Size	T1,2	0.0092±0.0066	0.471
	T3,4	0.0117±0.0082	
Stage	I, II	0.00083±0.0069	0.389
	III, IV	0.0115±0.0077	
Diff.	moderate	0.012±0.0083	0.164
	well	0.007±0.0033	

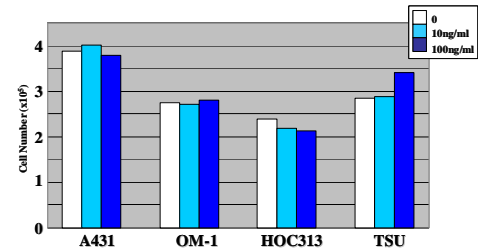
- 高度浸潤型 (EMT 型) 口腔扁平上皮癌で VEGF-C mRNA とタンパクの高発現を認めた。

VEGF-C Protein Expressed in OSCC Cell Culture Medium by ELISA Assay



- リコンビナント VEGF-C ( r VEGF-C ) は、細胞増殖に影響を与えなかった。

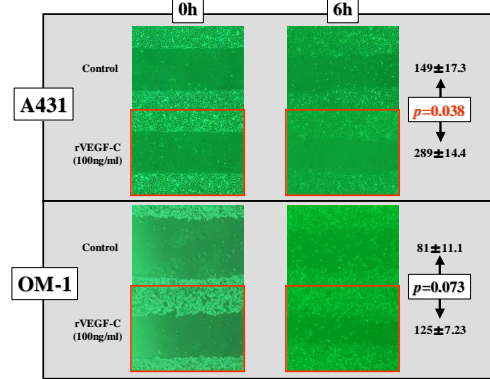
Cell Growth Assay in OSCC Cell Lines Stimulated with rVEGF-C



# After 7 days in culture, the cell proliferation was assessed by cell counting.

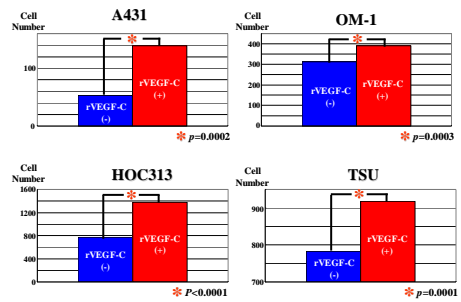
- r VEGF-C 刺激により、細胞の走化性は亢進した。

WOUND HEALING ASSAY in OSCC Cells Stimulated with rVEGF-C



- 上皮様形態を示す扁平上皮癌細胞株は、リコンビナント VEGF-C 刺激により、走化性と浸潤能が亢進した。

Effect of rVEGF-C on Invasive Activity of OSCC Cells

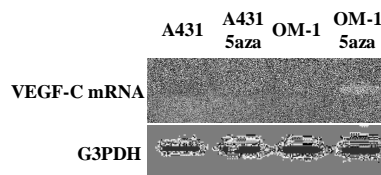


rVEGF-C-stimulated OSCC cells were more invasive than unstimulated cells.

- 脱メチル化剤 (5-aza) 処理により、VEGF-C mRNA の発現は亢進した。

Fig. Regulation of VEGF-C Expression in SCC cell lines

-Treatment with 5aza-de in SCC Cells-



以上の結果より, VEGF-C は EMT 関連遺伝子であり, 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移に重要な役割をはたしている可能性が示唆された。またその発現は, プロモーター領域のメチル化により制御されている可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Shigehiro Ono, Yoshitsugu Mitani, Koichiro Higashikawa, Hideo Shigeishi, Shingo Yoneda, Masayuki Taki, Yasuhiko Kitadai, Nobuyuki Kamata Role and regulation of the EMT target gene VEGF-C expression in Squamous Cell Carcinoma.:67<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer Association, NAGOYA, Oct. 28, 2008.

② 小野重弘, 三谷佳嗣, 東川晃一郎, 重石英生, 米田進吾, 瀧 雅行, 鎌田伸之: 口腔扁平上皮癌における EMT 関連遺伝子 VEGF-C の役割と発現機構: 第 53 回(社)日本口腔外科学会総会, 徳島, 2008 年 10 月 20 日

③ Shigehiro Ono, Yoshitsugu Mitani, Hideo Shigeishi, Shingo Yoneda, Masayuki Taki, Koichiro Higashikawa, Yasuhiko Kitadai, Nobuyuki Kamata: Expression of the EMT target gene VEGF-C and disease progression in oral squamous cell carcinomas.: 66<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer Association, YOKOHAMA, Oct. 3, 2007.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 重弘 (ONO SHIGEHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号: 70379882

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者