

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09876

研究課題名(和文) 間葉上皮転換(MET)と癌幹細胞特性喪失を同時誘導する頭頸部癌転移制御の研究

研究課題名(英文) Anti-metastatic therapy that simultaneously leads to both loss of cancer stem-like cell property and MET (mesenchymal to epithelial transition) in head and neck cancer

研究代表者

今西 順久 (Imanishi, Yori-hisa)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：80255538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1) 咽頭癌細胞におけるCox2とその下流EP2(PGE2受容体)の選択的阻害は、MET誘導を介した細胞増殖能・遊走能の抑制を含む抗腫瘍効果を示した。下咽頭癌切除標本の組織学的検討より、頸部リンパ節転移におけるE-cadherin発現低下とCox2発現亢進に特徴付けられるEMTの深い関与が示唆された。2) 咽頭癌細胞に対する選択的なCox2およびEP2阻害は、Oct3/4 および Nanogの発現抑制、足場非依存性細胞増殖能抑制により癌幹細胞特性を減弱させた。中下咽頭癌の導入化療前後の検体の免疫組織化学的検討により、治療前のCox2発現と導入化療による組織学的治療効果に有意な逆相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌における治療成績向上の最大の障壁は制御困難な転移にある。本研究の結果は、癌転移と薬剤抵抗性の双方に関わるEMT(上皮間葉転換)と癌幹細胞能を同時に誘導する分子機構の一端を明らかにすることにより、その関連分子を指標とする転移リスク評価の有用性、およびそれらを標的とする治療の有効性を示唆するもので、癌診療の新たな戦略の実現可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：1) In pharyngeal squamous cell carcinoma (PSCC) cells, selective inhibition of Cox2 and its downstream EP2 (PGE2 receptor) showed antitumor effects by suppressing cell proliferation and migration via MET-induction (EMT-reversal) through downregulation of various EMT-TFs. Histopathological analysis of hypopharyngeal carcinoma specimens suggested a profound involvement of EMT, characterized by decreased E-cadherin expression and increased Cox2 expression, in cervical lymph node metastasis.

2) Selective Cox2 and EP2 inhibition of PSCC cells attenuates anchorage-independent cell proliferative ability by down-regulating several CSC-related molecules such as Oct3/4 and Nanog, thereby enhancing chemosensitivity to docetaxel. Immunohistochemical analysis of oro-hypopharyngeal carcinoma specimens before and after induction chemotherapy displayed a significant inverse correlation between pre-treatment Cox2 expression and the histological therapeutic effect of induction chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：頭頸部癌 咽頭扁平上皮癌 転移 頸部リンパ節 EMT(上皮間葉転換) 癌幹細胞特性 Cox-2 EP2

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌治療の最大障壁である転移

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は疫学統計上世界で 890,000 人/年以上の新規患者を認める罹患率第 6 位の悪性腫瘍であるが、近年の集学的治療の進歩にもかかわらずその治療成績は 30 年以上に亘り向上がみられない。その最大の要因の一つは制御困難な転移にある。従って癌転移の分子機構のさらなる解明は、一次治療後の後発性転移のリスク評価と予防、および転移に対する有効な標的治療の開発を進めるうえで、臨床の視点から極めて重要な課題である。

(2) 転移における EMT と幹細胞特性の関与

癌が転移を成立させる現象は多くの点で EMT (epithelial to mesenchymal transition : 上皮間葉転換) に類似しており、上皮性癌細胞における EMT はその形態変化に伴う転移能の獲得を意味する。自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞(CSC)は、腫瘍細胞の発生と維持のみならず、その悪性度に関わる薬剤耐性や転移能を介して、治療抵抗性や治療後再発に重要な役割を占めていると考えられる。近年 EMT と幹細胞能の深い共通性を示唆する報告が重ねられているが、EMT と幹細胞特性を同時誘導する分子機構の詳細は HNSCC を含めてまだ明らかにされていない。

(3) これまでの研究結果

①頭頸部癌における EMT および幹細胞能マーカー分子発現と癌転移

我々は HNSCC 細胞において、転写因子 Oct3/4 および Nanog が幹細胞マーカーの候補分子であり (Fig.1), 細胞遊走能・浸潤能の亢進に寄与している可能性、および Oct3/4 の発現亢進は、細胞接着因子 E-cadherin の発現減弱と E-cad の転写抑制因子 SIP1 の発現亢進とともに、

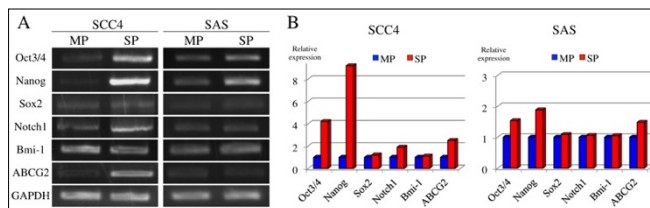


Fig.1: Expression of CSC markers in SP and MP cells

stage I-II 舌癌部分切除症例における後発性頸部リンパ節(LN)転移の独立予測因子であることを報告した。しかしながら幹細胞マーカー分子が転移に寄与する分子機構、および EMT との相互関係はまだ明らかでない。

②Cox2 選択的阻害による MET (間葉上皮転換) の誘導 (=EMT の抑制)

PGE₂ 合成酵素である cyclooxygenase-2 (Cox2)はその多彩な作用を介して癌の発生と進行に寄与しており、その選択的阻害による抗腫瘍効果が期待されている。我々は舌癌細胞における選択的 Cox2 阻害は E-cadherin の転写抑制因子(snail, SIP1, twist)の発現抑制を介して MET を誘導 (EMT を抑制) すること、臨床検体の検討から Cox2 発現亢進と E-cadherin 発現減弱が舌癌の頸部 LN 転移に深く関与している可能性を報告した。しかしながら Cox2 の下流シグナルを標的とする、より選択的な阻害の効果は報告されていない。

③癌細胞自身の Flt-4 発現と VEGF-C オートクリン機構の存在

腫瘍細胞由来の VEGF-C は、従来リンパ管内皮細胞 (LEC) 特異的に発現するとされる受容体 Flt-4 を介して LEC にパラクリン機構で作用すると考えられていた。我々は Flt-4 を発現する HNSCC 細胞 SAS を同定し、そこに Recombinant VEGF-C および Flt-4 選択的 VEGF-C 変異体による Flt-4 activation, 抗 Flt-4 中和抗体および Flt-4 選択的阻害剤による Flt-4 inhibition を行った結果、CNTN-1 と VEGF-C とともに発現亢進/抑制、および細胞増殖能・遊走能の亢進/抑制を認めた。また舌癌臨床検体の検討から、癌細胞自身の Flt-4 陽性が頸部 LN 転移に関する独立相関因子の一つであることを報告した。以上より、HNSCC 自身においても Flt-4 を介したオートクリン機構が存在し、CNTN-1 および VEGF-C 自身の発現亢進による増殖能・遊走能の亢進を介して、頸部 LN 転移を促進している可能性が示唆された (Fig.2)。

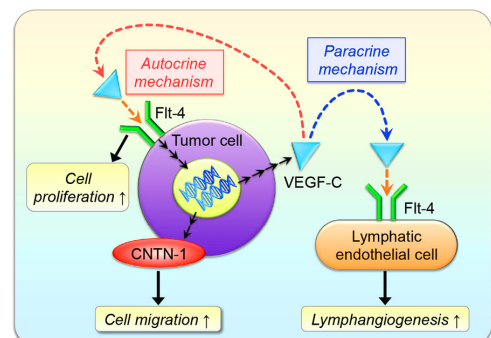


Fig.2: The VEGF-C/Flt-4 autocrine system

2. 研究の目的

本研究の目的は、EMT と幹細胞特性を同時誘導する分子機構を解明することにより、その誘導シグナルに関わる分子標的を制御する新たな抗転移治療および転移予防の戦略を開発するとともに、転移予測および診断における新規バイオマーカーを確立することにより、HNSCC を含めた癌の治療成績を向上させることである。

3. 研究の方法

- (1) 種々の HNSCC 細胞に対し EMT と幹細胞特性に関する発現プロファイリングを行った。
- (2) E-cadherin 低発現咽頭扁平上皮癌細胞を選別し、Cox2/PGE₂/EP2 シグナルの刺激/阻害によって誘導される EMT/MET の表現形質の変化を評価した。
- (3) 同細胞に、Cox2/PGE₂/EP2 シグナルの刺激/阻害によって誘導される幹細胞特性の表現形質の変化を評価した。
- (4) 中下咽頭癌の臨床検体を用い、上記関連各分子の癌細胞発現を免疫組織化学的に評価し、臨床病理組織学的因子および導入化学療法 of 組織学的治療効果との統計学的相関を検討した。

4. 研究成果

(1) 咽頭癌細胞における選択的 Cox2/EP2 阻害による EMT 抑制 (MET 誘導) 効果

種々の HNSCC 細胞に対する qPCR スクリーニングにより、E-cadherin 低発現咽頭扁平上皮癌細胞として BICR6 および FaDu を選別した。Cox2, およびその下流の PGE₂ 受容体である EP2 に対し celecoxib および PF-04418948 を用いて各々の選択的阻害を行った結果、いずれにおいても E-cadherin(CDH-1) の発現回復, E-cadherin 転写抑制因子および vimentin の発現減弱を認めた (Fig.3, 4)。in vitro proliferation assay および migration assay において、細胞増殖能、遊走能ともに抑制

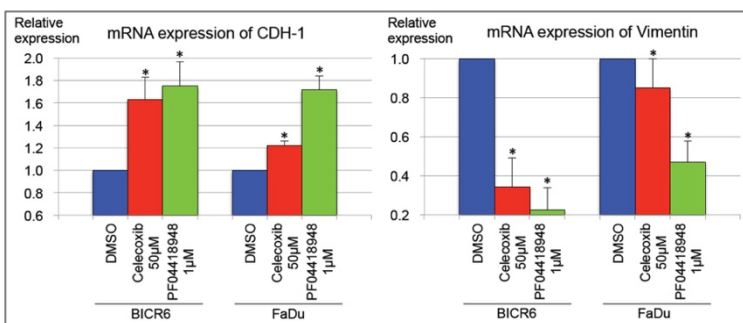


Fig.3: Effects of Cox2 and EP2 inhibition on CDH-1 and vimentin expression

が認められた (Fig.5)。

また、下咽頭癌に対する鏡視下経口切除組織検体の免疫組織化学的検討から、頸部 LN 転移における E-cadherin 発現低下と Cox2 発現亢進に特徴付けられる EMT のへの深い関与が示唆された。

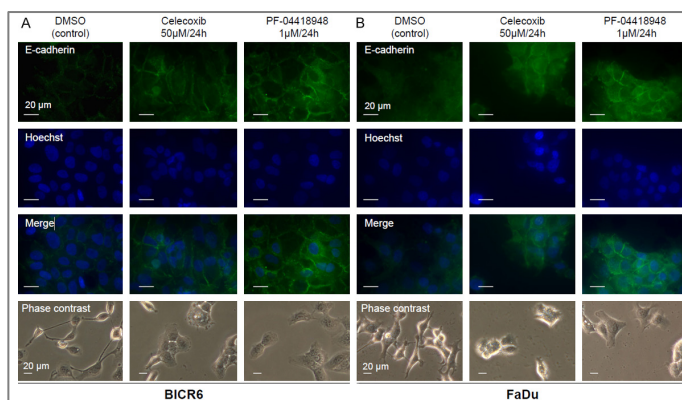


Fig.4: Restoration of intercellular E-cadherin expression and epithelial cell morphology by Cox2 and EP2 inhibition

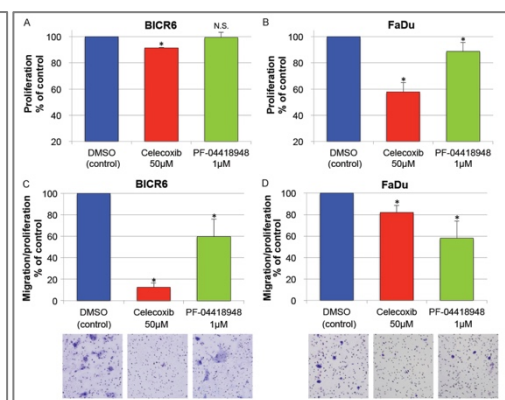


Fig.5: Effects of Cox2 and EP2 inhibition on cell proliferation and migration

以上より、Cox2 のみならず、その下流の EP2 の選択

的阻害が EMT 抑制 (MET 誘導) を介した抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

(2) 咽頭癌細胞における選択的 Cox2/EP2 阻害による癌幹細胞特性減弱効果

咽頭扁平上皮癌細胞 FaDu および Detroit 562 において、Cox2 に対する celecoxib と siRNA による knockdown, および EP2 (PGE₂ 受容体) に対する PF-04418948 を用いた選択的阻害を行った結果、幹細胞マーカー分子である Oct3/4, Nanog, Sox2 の発現抑制, および anchorage-independent な細胞増殖能を反映する sphere formation の抑制が認められた (Fig.6)。MTS assay において、抗癌剤 docetaxel に対する薬剤抵抗性の有意な低下が観察された (Fig.7)。

また、中下咽頭癌の導入化学療法前後のマッチング検体 (化療前生検と化療後手術の組織検体) を用いた免疫組織化学的検討の結果、治療前の癌組織における Cox2 発現と導入化療による組織学的治療効果に有意な逆相関を認めた。

以上より、Cox2 発現が癌幹細胞特性に伴う化学療法抵抗性に寄与し、Cox2 および EP2 の選択的阻害が癌幹細胞特性の減弱を介した抗腫瘍効果を導く可能性が示唆された。

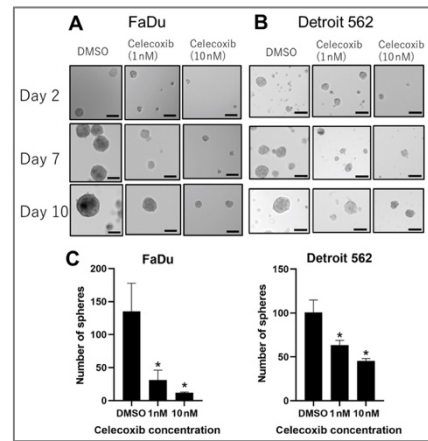


Fig.6: Effects of Cox2 inhibition on sphere formation

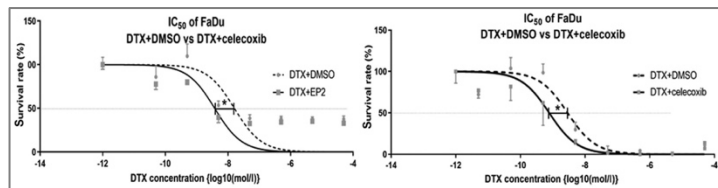


Fig.7: Attenuation of chemoresistance by Cox2 inhibition

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shin Saito, Hiroyuki Ozawa, Yori-hisa Imanishi, Mariko Sekimizu, Yoshihiro Watanabe, Fumihito Ito, Yuichi Ikari, Nana Nakahara, Kaori Kameyama, Kaoru Ogawa	4. 巻 22
2. 論文標題 Cyclooxygenase-2 expression is associated with chemoresistance through cancer stemness property in hypopharyngeal carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Y, Imanishi Y, Ozawa H, Sakamoto K, Fujii R, Shigetomi S, Habu N, Otsuka K, Sato Y, Sekimizu M, Ito F, Ikari Y, Saito S, Kameyama K and Ogawa K	4. 巻 12
2. 論文標題 Selective EP2 and Cox-2 inhibition suppresses cell migration by reversing epithelial-to-mesenchymal transition and Cox-2 overexpression and E-cadherin downregulation are implicated in neck metastasis of hypopharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 1096-1113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

〔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
研究協力者	渡部 佳弘 (WATANABE YOSHIHIRO) (30445374)	国際医療福祉大学・医学部・講師 (32206)	
研究協力者	羽生 昇 (HABU NOBORU) (60365369)	慶應義塾大学・医学部・共同研究員 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	佐藤 陽一郎 (SATO YOICHIRO) (40624440)	慶應義塾大学・医学部・共同研究員 (32612)	
研究協力者	猪狩 雄一 (IKARI YUICHI) (20573471)	慶應義塾大学・医学部・共同研究員 (32612)	
研究協力者	斎藤 真 (SAITO SHIN) (80594522)	慶應義塾大学・医学部・共同研究員 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関