

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18977

研究課題名(和文) 口腔癌細胞におけるVEGF-A/VEGFR-2autocrine機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of VEGF-A/VEGFR-2 autocrine loop in oral cancer cells

研究代表者

川邊 睦記(KAWABE, MUTSUKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：10760720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の発生と進行における腫瘍の血管新生は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)が担っており、その受容体であるVEGF-Rが血管内皮細胞だけでなく腫瘍細胞にも存在し、VEGF-Aと結合することで、自身の細胞周期や転移浸潤に寄与することが明らかになりつつある。そこで、われわれはVEGF-A, R1およびR2を同時に発現する上顎歯肉癌から樹立した細胞に対し、オートクラインまたはパラクラインで細胞増殖するかなど、その機序について検討した。その結果、VEGF-Rの制御を治療戦略に含めることがよいと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんは主に扁平上皮癌であり、生存率はリンパ節転移や遠隔転移の有無に依存し、転移メカニズムの病態解明が課題となっている。癌の発生と進行における腫瘍の血管新生は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF-A)が担っており、その受容体として、血管内皮細胞に存在するVEGF-Rが挙げられ、近年、VEGF-Rは腫瘍細胞にも存在し、VEGF-Aと結合することで、自身の細胞周期や転移浸潤に寄与することが肺癌などで明らかになった。そこで、われわれはVEGF-A, VEGF-Rを同時に発現する上顎歯肉癌から樹立した扁平上皮癌培養細胞を解析することで、新たな口腔がん治療戦略を考える可能性について考え、本研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) is responsible for tumor angiogenesis in the development and progression of oral squamous cell carcinomas, and its receptor, VEGF-Rs, is present not only in vascular endothelial cells but also in tumor cells themselves. However, it has become clear that it contributes to its own cell cycle and metastatic invasion by binding to VEGF-A. Therefore, we investigated the mechanism of cells established from maxillary gingival cancer that simultaneously expresses VEGF-A, R1 and R2, such as cell proliferation through autocrine or/and paracrine. The results suggested that VEGF-R regulation should be included in the therapeutic strategy.

研究分野：血管新生

キーワード：VEGF-A VEGF-R オートクライン パラクライン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの 90%以上を占める口腔扁平上皮癌 (OSCC) 治療の課題はリンパ節転移の制御であり、転移のメカニズムを明らかにすることは重要である。がんの血管新生が誘導されると、癌の生存と転移を促進することが知られている。癌の発生と進行における血管新生を担う血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) が結合する受容体として、血管内皮細胞に存在する VEGF-R が挙げられ、近年、VEGF-R は腫瘍細胞にも存在し、VEGF-A と結合することで、自身の細胞周期や転移浸潤に寄与することが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

近年、腫瘍細胞自体も VEGF-R を有し、VEGF-A / VEGF-R オートクラインループが血管新生およびリンパ節転移の pre metastatic niche 形成に深く関わっていることが明らかになりつつある。そこで、腫瘍細胞由来の低分子エンドソーム由来の小胞体であるエクソソームがこの autocrine loop に関与し、pre metastatic niche 形成に関与すると考えられた。本研究は、ヒト口腔癌から樹立した腫瘍細胞が、腫瘍自身の VEGF-A / VEGF-R によるオートクラインループを介して細胞増殖を制御する機構、およびエクソソームとその autocrine loop との関連性を明らかにすることを目的とし、上顎歯肉癌から樹立した VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 を同時に発現する扁平上皮癌培養細胞 (HCM-SqCC010) に対する検討を行った。

3. 研究の方法

患者背景

80 歳, 男性. 上顎歯肉の腫脹を主訴に受診。潰瘍形成を伴うびまん性の肉芽腫性腫瘍を認めた。MRI で不規則な腫瘤を認め、PET-CT で原発巣に集積を認め、生検にて扁平上皮癌の診断を得た。最終診断は (pT4aN2bM0) であった。

免疫組織学染色 (IHC)

手術標本を VEGF-A 抗体, VEGF-R1 抗体および VEGF-R2 抗体を用いて免疫染色を行った。

HCM-SqCC010 の樹立と 3 次元培養

切除した腫瘍組織より細胞を採取し、outgrowth 法で HCM-SqCC010 を樹立した。HCM-SqCC010 の 3 次元培養を行ったところ、高分化状態を示した。同細胞に対し、VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 抗体で免疫染色を行った。

RT-PCR

HCM-SqCC010 と同様に樹立した 5 つの OSCC 株から RNA を抽出し、逆転写して得られた cDNA における VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて評価した。

RealtimePCR

HCM-SqCC010 を VEGF-A 存在下で培養した。と同様に RNA を抽出および逆転写し、RealtimePCR で *VEGFA*, *VEGFR1* および *VEGFR2* の発現を定量評価した。また抗 VEGF-R1 抗体あるいは抗 VEGF-R2 抗体存在下で培養し、*VEGFA* の発現量を定量評価した。

Proliferation assay

VEGF-R1 抗体または VEGF-R2 抗体存在下で HCM-SqCC010 を培養し、細胞増殖の評価を行った。また選択的 VEGF-R1 および選択的 VEGF-R2 キナーゼ阻害剤を加えて培養し、細胞増殖の評価を行った。

エクソソームの抽出

培養液から HCM-SqCC010 内のエクソソームを単離した。Western blot 法でエクソソームマーカー (CD9, CD63, TSG101) を評価し, PCR 法にて *VEGFA* の存在を評価した。

4. 研究成果

同腫瘍組織は免疫組織染色にて VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 を発現していた。そこで, outgrowth 法で細胞樹立し, 3次元培養したところ, 上皮の形態を持った多角形の細胞が主体で形成された。樹立した細胞株 HCM-SCC010 は, E-cadherin を発現し Vimentin は軽度に発現していた。免疫蛍光染色でもまた, VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 を発現していた。3次元培養では扁平上皮癌様の spheroid を形成し, 形態を保持しており免疫組織染色で VEGF-A, VEGF-R1 および VEGF-R2 の発現していた (図1)。

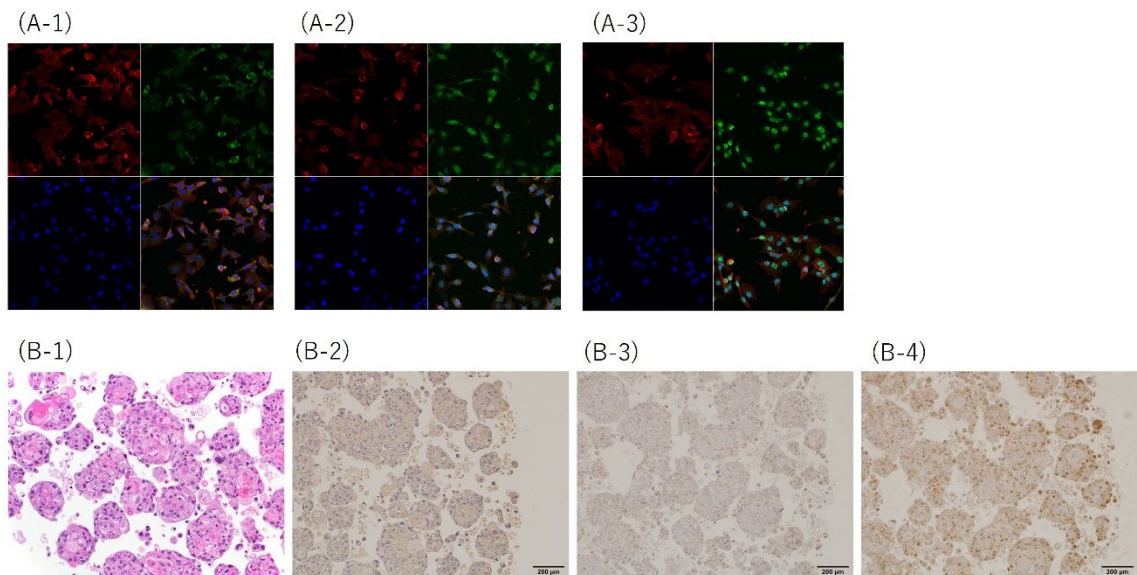


図1 : (A) 樹立細胞 HCM-SCC010 の免疫蛍光染色画像。(A-1) VEGF-A, (A-2) VEGF-R1, (A-3) VEGF-R2 (それぞれ $\times 200$)。 (B-1) 3次元培養した HCM-SCC010 の H-E 染色。以下, 免疫組織染色画像。(B-2) VEGF-A, (B-3) VEGF-R1, (B-4) VEGF-R2 (それぞれ $\times 100$)。

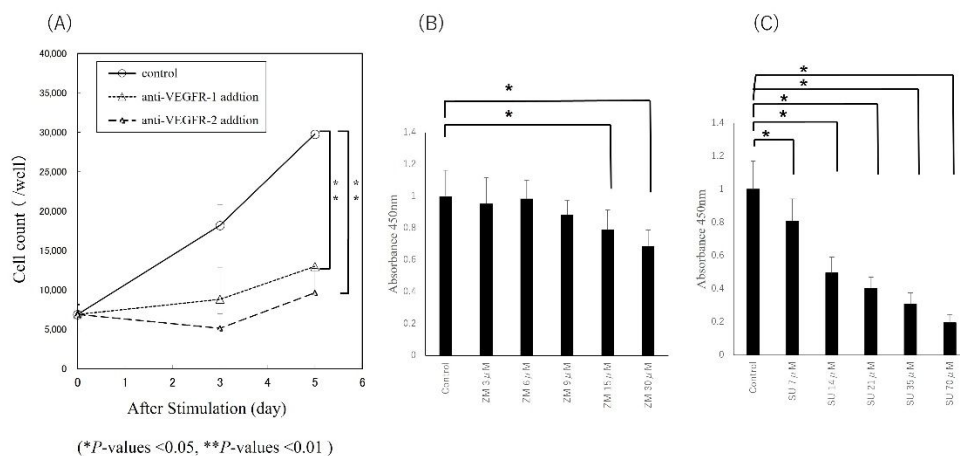


図2 : (A) 抗 VEGFR-1 抗体あるいは抗 VEGFR-2 抗体存在下で培養した際の細胞増殖曲線。(B, C) 選択的 VEGFR-1 阻害薬 (ZM) および VEGFR-2 キナーゼ阻害薬 (SU) により HCM-SqCC010 は用量依存的に細胞増殖が抑制された。

今回評価した 6 つの OSCC のうち, HCM-SqCC010 のみ RT-PCR で *VEGFA*, *VEGFR1* および *VEGFR2*

を同時に発現していた。VEGF-A 存在下で培養すると、RealtimePCR で *VEGFR1* および *VEGFR2* の発現は上昇し、さらに抗 VEGF-R1 抗体存在下で培養すると、細胞増殖は抑制され(図 2)、*VEGFA* は 48 時間で発現が 66%低下し、同様に抗 VEGF-R2 抗体存在下で培養すると、細胞増殖は抑制され、*VEGFA* は 48 時間で発現が 80%低下した。抗 VEGF-R1 抗体および抗 VEGF-R2 抗体存在下で培養すると、30%以下に細胞増殖は抑制された。選択的 VEGF-R1 および VEGF-R2 キナーゼ阻害薬を添加して細胞増殖を観察すると、VEGF-R2 キナーゼ阻害薬のみで培養した方がより細胞増殖を抑制された(図 2)。HCM-SqCC010 における VEGF-A シグナルは、細胞増殖をより強く抑制された VEGFR-2 キナーゼ活性に依存すると考えられた。さらに HCM-SqCC010 からエクソソームを抽出可能であり、エクソソーム内に VEGF-A の mRNA の発現を確認できた(図 3)。

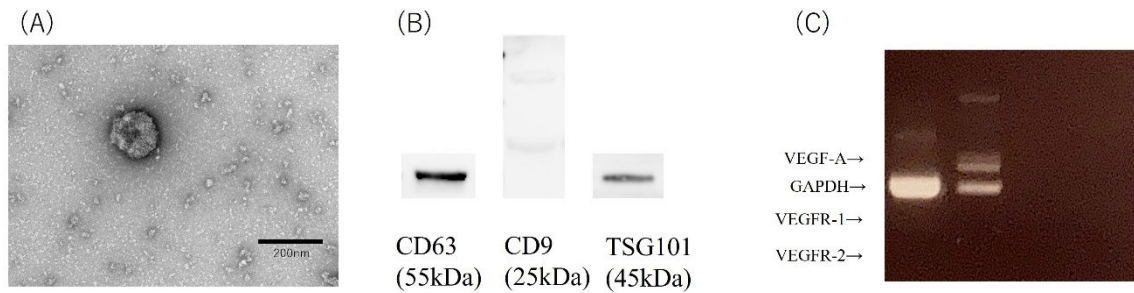


図 3 : (A) HCM-SqCC010 から抽出したエクソソーム。(B) Western blot 法でエクソソームの表面マーカーである CD9, CD63 および TSG101 のタンパク発現を確認した。(C) RT-PCR : HCM-SqCC010 から抽出したエクソソームは VEGF-A の mRNA を含んでいた。

HCM-SqCC010 は、VEGF-A に対する分子標的薬の効果は認められなかった。VEGF-R 阻害薬に対して強い細胞増殖阻害を認めた。したがって VEGF-R 阻害薬は、VEGF-R を発現している OSCC に対して有効である可能性が高いと考えられた。さらにエクソソーム内で VEGF-A の発現がみられたため、VEGF-A は、HCM-SqCC010 においてパラクラインとして細胞外に放出されるのではなく、細胞膜に存在する VEGF-R をオートクライン、あるいは細胞内結合で活性化する可能性が示唆された。腫瘍由来のエクソソームが転移に重要な役割を果たすことがわかってきており、今回エクソソームに VEGF-A が含まれていたことから、エクソソーム内に VEGF-A が取り込まれ、周囲に分散し、pre-metastatic niche を誘導している可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Araki-Maeda Hanako, Kawabe Mutsuki, Omori Yuji, Yamanegi Koji, Yoshida Kazunari, Yoshikawa Kyohei, Takaoka Kazuki, Noguchi Kazuma, Nakano Yoshiro, Kishimoto Hiromitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line expressing vascular endothelial growth factor a and its two receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Sciences	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） 10.1016/j.jds.2022.04.018	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------