

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06326・19K21410

研究課題名(和文) 口腔癌転移リンパ節外進展における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism in extra-capsular extension (ECE) of lymph nodes in oral cancer metastasis

研究代表者

森田 祥弘 (Morita, Yoshihiro)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30590517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移において、節外進展の有無はその予後に対する重要な因子であることが知られている。しかしながら、リンパ節転移において節外進展を制御している分子メカニズムは未だ明らかにされていない。本研究では、臨床検体を用いた解析と、蛍光たんぱく質でラベルした口腔癌細胞株をヒト口腔癌細胞だけでなく、マウス癌細胞でも樹立し、それらを用いた口腔癌のリンパ節転移モデルを用い、解析を行った。本研究により確立されたモデル動物と口腔癌の臨床検体での解析を併用することは、口腔癌転移リンパ節外進展の分子メカニズム解明と新しい分子標的治療の開発に貢献すると確信する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の頸部リンパ節転移における節外進展に関しては、臨床検体を用いた疫学的研究を中心に多くの研究がなされてきたが、その分子生物学的メカニズムに関する研究はほとんどなされておらず、国内外において報告がない。本研究により免疫不全マウスだけでなく正常な免疫を有したマウスでのモデルを用いることが可能となり、さまざまな状況下での転移リンパ節と原発巣の解析を臨床検体ならびに動物実験モデルを用いて分子生物学的なアプローチで解析することが可能となった。本研究により得られた成果は、リンパ節転移における節外進展のメカニズムを解明するとともに口腔癌転移の制御に向けた基礎的知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is known that the presence or absence of extranodal extension is an important factor for the prognosis of the patients with lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. However, the molecular mechanism controlling extranodal extension in lymph node metastatic lesions has not yet been clarified. In this study, analysis using clinical samples and lymph node metastasis models of oral cancer was performed. We established oral cancer cell lines labeled with a fluorescent protein not only in human oral cancer cells but also in mouse cancer cells. We believe that the combined use of the model animal established by this study and the analysis of clinical specimens of oral cancer will contribute to the elucidation of the molecular mechanism of the extranodal extension of oral cancer metastases and the development of new molecular targeted therapies.

研究分野：癌転移

キーワード：口腔癌 リンパ節転移 節外進展

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の頸部リンパ節転移は患者の予後及び生存率に影響を及ぼす重要な因子の一つである。その中でも節外進展の有無は再発や予後を悪化させるリスクになることが臨床検体を用いた研究ですでに報告されている。また、転移リンパ節の節外進展様式の種類についても 1963 年の Toker らの分類 (Toker C et al. Cancer 1963)をはじめとして、いくつか提唱されてきたが、その分子メカニズムに関しては検討されていない。

節外進展には、さまざまな状況が想定されるが、節外進展を評価する項目としては、大きく分けると、1) 個数 (節外進展している転移リンパ節が多いほど予後が悪い)、2) 節外進展距離 (転移リンパ節の節外進展している距離が長いほど予後が悪い)、3) リンパ節の大きさ (節外進展している転移リンパ節の短径が短いほど予後が悪い) の3点が挙げられる。

しかしながら、リンパ節転移巣において節外進展を制御している分子メカニズムは未だ明らかにされておらず、その詳細を明らかにすることが必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では臨床検体やリンパ節転移動物実験モデルを用いて、リンパ節転移巣における節外進展に関わる因子を同定すること、また、転移病巣内の血管やリンパ管、免疫細胞などを含めた微小環境との相互作用を解析し、節外進展の分子メカニズムの詳細を明らかにすることにより、リンパ節転移を制御する新たな治療法の開発を目指した。

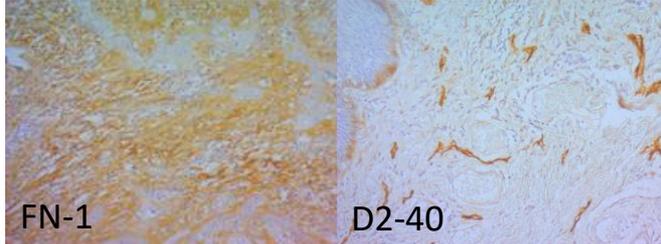
3. 研究の方法

本研究では、まずこれまでに我々が報告してきたリンパ節転移の成立への関与が示唆されている Fibronectin などの臨床検体における発現を免疫染色法にて解析し、節外進展との関連を精査した。また、癌微小環境や癌免疫との関連を解析する目的で ZsGreen1 遺伝子を安定発現するマウス口腔癌細胞株の樹立を行い、これらを用いて新たな頸部リンパ節転移動物実験モデルの確立とその解析を行い、これとともに以前我々が樹立したヒト口腔癌細胞株の頸部リンパ節高転移株である V-SAS-LM8 細胞を用いて頸部リンパ節の節外進展の再現を試みた。

4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた免疫染色

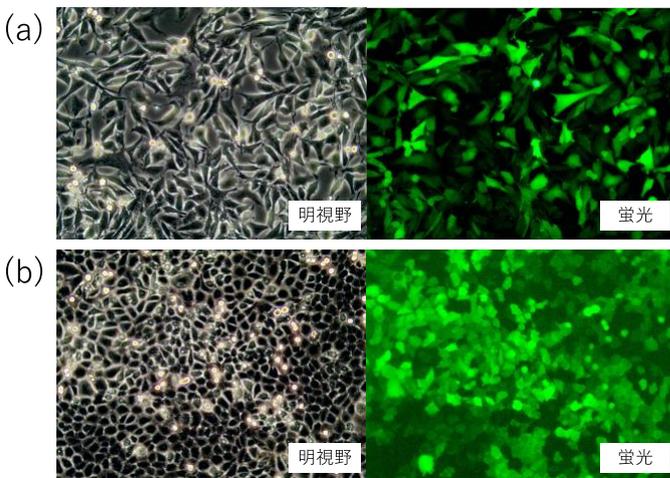
臨床検体の免疫染色には舌癌の原発巣のパラフィン包埋された術後病理検体を用いた。Fibronectin (FN-1) とリンパ管上皮細胞マーカーである D2-40 の免疫染色を行なったところ、両者の間に正の相関関係を認め、後発転移を含めたリンパ節転移とも統計学的に有意な関連性を認めたが、節外進展とは明らかな関連性を見出せなかった (図1)。



<図1: 臨床検体の免疫染色画像。>

(2) ZsGreen1 遺伝子を安定発現させてマウス口腔癌細胞株の樹立

pZsGreen1-C1 Plasmid Vector をマウス口腔癌細胞株 SCCVII 細胞と NR-S1 細胞にトランスフェクション試薬 (ProFection® Mammalian Transfection System: Promega) を用いて遺伝子導入し、G418 を用いて、ZsGreen1 遺伝子安定発現細胞株を複数樹立した。ZsGreen1 遺伝子の発現量の確認を、蛍光顕微鏡による目視により行い、ZsGreen1 遺伝子の発現が最も高かった細胞株を SCCVII-ZsGreen1 細胞および NR-S1-ZsGreen1 細胞としてクローニングした (図2)。



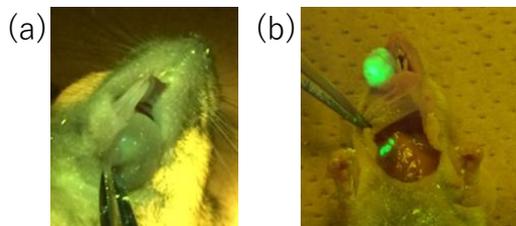
<図2: SCCVII-ZsGreen1 細胞 (a) および NR-S1-ZsGreen1 細胞 (b) の明視野画像および暗視野蛍光画像。>

(3) 頸部リンパ節転移動物実験モデルによる解析

樹立したマウス口腔癌細胞株である SCCVII-ZsGreen1 細胞および NR-S1-ZsGreen1 細胞を C3H/HeN マウスの舌に接種し、新たな頸部リンパ節転移動物実験モデルの確立とその解析を行った。細胞を 1,000, 0000 個/ml になるように調整し、そのうち 100 μ l を C3H/HeN マウス舌に接種した。腫瘍の増殖はポータブルの紫外線照射器によって緑色蛍光の口腔癌細胞の増大を観察でき、さらには頸部リンパ節への転移も確認できた。約2週間後に原発巣および頸部の転移リンパ

節を切除した。頸部リンパ節転移巣は紫外線照射化に摘出した。通法にしたがってパラフィン切片を作製し、組織学的検討を行い、リンパ節転移を確認した。以上の結果より、SCCVII-ZsGreen1細胞およびNR-S1-ZsGreen1細胞は口腔癌頸部リンパ節転移を再現し、癌微小環境や癌免疫も解析できる有益な動物実験モデルとして応用可能であることが明らかとなった（図3a）。

V-SAS-LM8細胞ならびにその親株であるV-SAS細胞を1,000,000個/mlになるように調整し、そのうち100 μ lをヌードマウス舌に接種した。以前の報告の通り、V-SAS-LM8では高頻度に頸部リンパ節への転移を確認でき、約2週間後に作製したパラフィン切片においてV-SAS-LM8では転移リンパ節での節外進展を疑う所見を得た。以上の結果より、頸部リンパ節高転移細胞株であるV-SAS-LM8細胞は、口腔癌細胞の転移リンパ節の節外進展メカニズムを探索するうえで、有用なツールとなり得ることが明らかとなった（図3b）。



<図3：口腔癌リンパ節転移動物実験モデル。(a) NR-S1-ZsGreen1細胞をC3H/HeNマウス舌に接種した像。(b)V-SAS-LM8細胞をヌードマウス舌に接種し、頸部リンパ節に節外進展をきたした像。>

今後は、これらのモデルマウスや臨床検体を用いて、頸部リンパ節転移節外進展を制御する因子を特定し、その分子メカニズム解明、ならびにメカニズムに基づいた新たな口腔癌治療戦略の開発に貢献していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshihiro Morita, Macall Leslie, Hiroyasu Kameyama, Narikazu Uzawa, Takemi Tanaka
2. 発表標題 Anti-E-selectin Aptamers (ESTA) Prevent Cancer Metastasis and Enhance the Effects of Anticancer Drugs.
3. 学会等名 The 17th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山俊 森田祥弘 今井智章 鵜澤成一
2. 発表標題 舌扁平上皮癌のリンパ節転移におけるFibronectin発現に関する免疫組織学的検討.
3. 学会等名 第64回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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
研究協力者	鵜澤 成一 (Uzawa Narikazu)		
研究協力者	今井 智章 (Imai Tomoaki)		