

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592995

研究課題名(和文) 低酸素環境における口腔癌細胞の悪性化に関する研究

研究課題名(英文) Study of malignant transformation of oral squamous cell carcinoma under hypoxia environment

研究代表者

宮脇 昭彦 (MIYAWAKI, Akihiko)

産業医科大学・大学病院・講師

研究者番号：40200216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞をHSC-2,HSC-4を用いて通常の培養と、低酸素環境で培養しメタボローム解析を行った。両方の細胞株は解糖系、アミノ糖、ペントースリン酸経路が特に亢進していたが、低酸素環境で培養した場合にはペントースリン酸経路の代謝が亢進した。我々は低酸素環境では細胞増殖、浸潤能が増大し、悪性形質が獲得されることを見出したが、低酸素環境における代謝変化は悪性形質の獲得に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed metabolomics of oral squamous cell carcinoma using HSC-2,HSC-4 cell lines cultivated under normoxia and hypoxia condition. In particular, glycolysis, amino sugars and pentose phosphate pathway were accelerated for both cell lines, but, under hypoxia condition, pentose phosphate pathway was accelerated. We found that hypoxia condition increased the motility and invasiveness of HSC-2, HSC-4 cells and that induced malignant transformation. These findings suggest that metabolic changes under hypoxia environment influence acquisition of malignancy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：低酸素環境 口腔癌 代謝 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、解糖系代謝亢進は、多くの癌細胞で観察される生物学的特性である点に着目し、口腔癌患者の生検時の組織での HIF-1 α 、Glut-1、VEGF の免疫組織学的手法により、FDG-PET における FDG の集積が解糖系代謝マーカーである HIF-1 α や Glut-1 の発現が高いほど亢進し、治療抵抗性を獲得すること、癌細胞の解糖系代謝は低酸素環境などの癌の微小環境に影響を受けることを報告した。さらに低酸素環境が Notch シグナルを介して口腔癌細胞の EMT に関連することを見出し、平成 21 年度基盤研究(C)「口腔癌前癌病変における解糖系代謝活性とその意義」においては口腔前癌病変が比較的早期に解糖系代謝亢進と関連する所見を得た。pyruvate kinase の免疫組織学的染色結果では、口腔前癌病変における中等度上皮性異形成から重度上皮性異形成、さらに上皮内癌、扁平上皮癌へ進行するにつれて解糖系ピルビン酸リン酸化酵素は上皮性異形成が強くなるほど発現増強がみられた。このことは上皮性異形成の早期の段階より代謝の変化があることを示唆しているものと考えられる。このように口腔癌細胞の低酸素環境における代謝の変化と悪性形質の獲得との関連が明らかになりつつある。また最近では LDH-A の発現低下は解糖系やミトコンドリアの生理学的機能および腫瘍の維持との関連を減弱させるという報告があり、癌に特徴的な代謝経路が新たな治療戦略としても注目されている。このような我々のこれまでの研究背景、文献的な背景から研究をさらに発展させ、癌微小環境である低酸素環境における口腔癌細胞の代謝経路、特に解糖系代謝の活性の解明と浸潤、転移に関わる悪性形質獲得との関連を明らかにすることを考えた。

2. 研究の目的

癌細胞はエネルギー獲得と同時に、増殖に必要な細胞内構成成分を合成するのに有利な代謝を行い、グルコースやグルタミンを大量に取り込み、解糖系およびグルタミン分解が活性化されている。最近では乳酸脱水素酵素やパイルベートキナーゼ M2 は癌の増殖に必須の酵素であることが報告され、腫瘍の代謝経路を標的とした治療戦略となっている。

我々は、口腔癌細胞、正常粘膜細胞における低酸素環境下と通常の培養をした場合の代謝の違いをメタボローム解析で解明する。さらに代謝に関連する乳酸脱水素酵素などの発現や糖代謝が亢進した結果細胞内に蓄積した乳酸を細胞外に排出する Monocarboxylate transporters (MCT) などを生体から採取した口腔癌組織を用いて免疫組織学的に検索し予後との関連を分析するとともに、口腔癌細胞を用いて浸潤・転移との関わりを明らかにする。

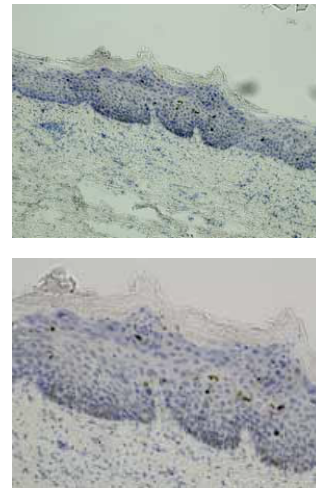
3. 研究の方法

口腔癌細胞株 (HSC-2、HSC-4) および口腔粘膜細胞から樹立した正常粘膜細胞を用いて normoxia, hypoxiam の条件下で培養した 2 群間で、解糖系代謝のメタボローム解析を行い、その代謝経路の違いを分析する。

また、マイクロアレー技術により normoxia, hypoxia における口腔癌細胞株での解糖系代謝に関する酵素を検出する。臨床検体においても正常細胞との代謝の違いを明らかにする。最後に EMT などの悪性形質獲得との関連を分析するために、解糖系代謝の機能解析および臨床材料を用いて免疫組織学的染色の手法を用いて予後との関連を調査する。

4. 研究成果

(1) 乳酸のトランスポーター MCT の免疫組織学染色結果

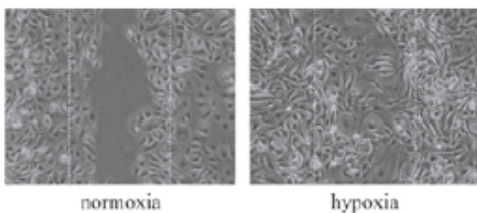


解糖系代謝亢進によって蓄積される乳酸は一種の老廃物という考えが一般的であったが、最近のトレーサー実験の結果から各組織へのエネルギー基質輸送の媒体として、乳酸が寄与していることが明らかになっている。各組織の細胞膜表面に乳酸のトランスポーターである MCT が同定され、5 種類のアイソフォームが知られている。その中で MCT4 は骨格筋の細胞内から外へ乳酸輸送を促進することがわかっているが、ある種の癌細胞においても MCT4 の発現と予後との関連が示唆されている。上記写真は口腔前癌病変における MCT4 の免疫染色の結果である。上記写真に見るように細胞異型の強い部分の基底細胞を中心に強く染色され、正常上皮には染色されていない。上皮細胞異型の強拡大像では基底細胞部分の細胞膜が染色されている。このことは乳酸の排出促進や基質輸送の増強がうかがわれ、エネルギー代謝が亢進していることが示唆される。免疫染色の結果からは悪性形質獲得早期においてすでに解糖系代謝亢進していることが示唆された。

さらに我々は、臨床的な研究にも着手し手術後の局所再発について検討した。手術時に

おける外科切除範囲の設定について明らかなエビデンスは現在ないが、腫瘍からおよそ1cmが切除範囲とされている。このことを基準にして腫瘍近接したものと切除範囲が十分なものでは再発率や生存率が有意差をもって差が現れた。腫瘍が近接しているものは再発との関係は容易に想像できるが、切除範囲が十分であるが、上皮異型がみられるものについては再発が少なからずみられた。このことはMCT4の免疫染色の結果について触れたが、腫瘍周囲には明らかな細胞の形の変化がなくても解糖系代謝亢進などの変化がすでに生じている可能性がある。

(2) 低酸素環境における浸潤能および遊走能について



我々は、共同研究者らとともに、HSC-2, HSC-4の cell line において normoxia および hypoxia の環境下でスクラッチアッセイの結果、上記写真に示すように hypoxia では細胞の形が紡錘形に変化し遊走能が増加することを見出した。低酸素環境下での口腔癌細胞の悪性形質獲得を示すものである。上記写真は共同研究者らと2013年に発表した論文の抜粋である。

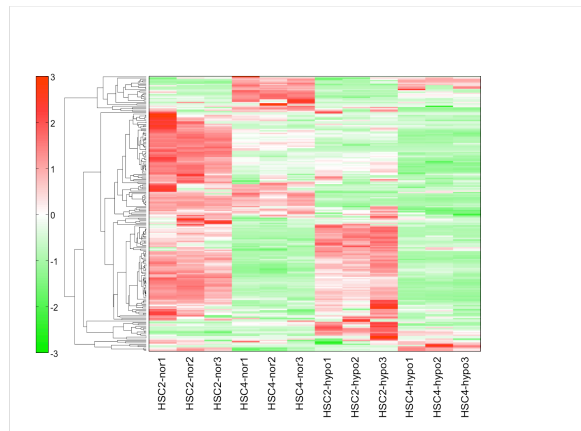
(3) CE-TOF によるヒト口腔癌細胞株のメタボローム解析結果について

HSC-2 の3検体と HSC-4 の3検体を normoxia の環境下で培養した6検体と hypoxia の環境で24時間培養した6検体あわせて12検体についてカチオンモード、アニオンモードの測定を行った。得られたピーク強度、および形状から判断して、カチオンモードでの測定には5倍、アニオンモードでの測定には2倍に希釈した試料でメタボローム解析を行った。HMT(ヒューマン・メタボローム・テクノロジー)代謝物質ライブラリー及び known-unknown ピークライブラリーに登録された物質を対象とした。

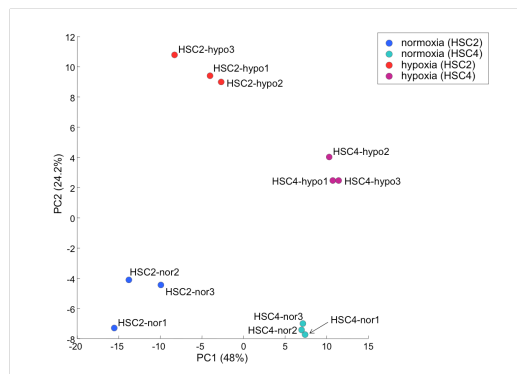
① heatmap 図

横軸はサンプル名(ここでは、cell line 名)で縦軸はピーク値を示す。ピークに対してHCAを実施し、ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。緑が濃いほど平均値よりも小さいことを示し、赤が濃いほど平均値より大きいことを示している。HSC-2 と HSC-4 では normoxia, hypoxia 環境下の培養でピーク値に差がみられる。HSC-2 株の方が HSC-4 より概してピーク値が高い。しかしながら、aminiosugar や解糖系においてはピーク値が

共通し、解糖系代謝の亢進が示唆される。低酸素環境下においては、両方の細胞株においてもピーク値は低下する方向に傾くが、normoxia でのピーク値は基本的に維持している。共通して低下のあるピーク値は normoxia でも共通した部分であった。

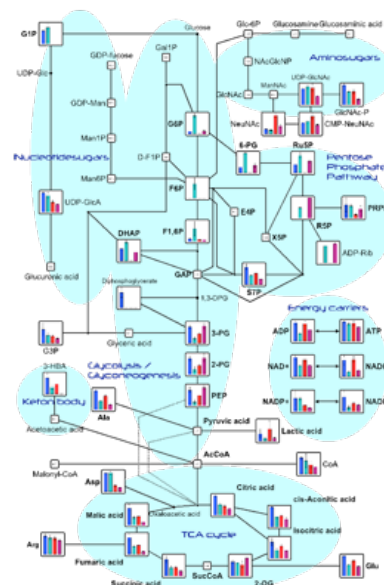


②主成分分析 (PCA 結果)



2種類の細胞株を normoxia と hypoxia の環境下で培養した結果、cell line の違いによる分離がみられるが、細胞培養の環境条件の違いにより明確に分離されている。細胞培養の違いが代謝変化に重要であった。

③代謝物質の中心炭素代謝の経路図の評価



解糖系代謝、TCA サイクル アミノ糖、ペントースリン酸経路、核酸などの主な代謝経路の低酸素環境における変化を上図で示す。通常培養下のHSC-2ではアミノ糖代謝の亢進とブドウ糖はペントースリン酸経路を経てグリセルアルデヒド3リン酸からピルビン酸を経て乳酸へ至る経路とTCAサイクルへ至る経路が観察される。一方、通常培養下のHSC-4ではペントースリン酸経路の亢進はみられず、アミノ糖代謝の亢進がみられた。低酸素環境下では両方の細胞株ともアミノ糖の代謝はやや減弱し、それに比べてペントースリン酸経路からの解糖系代謝の亢進がみられた。このような癌細胞のストレスによるペントースリン酸経路への迂回は癌細胞の環境変化へのストレス耐性に貢献していることが推察された。

上記(1)、(2)、(3)の結果より口腔癌細胞の低酸素環境は悪性形質獲得とエネルギー代謝の変化により環境変化へのストレス耐性を得る可能性が示唆されたが、代謝変化は個々の口腔癌細胞の違いによるところも大きく、そのような口腔癌細胞の不均一性は口腔癌治療の障壁となるため口腔癌細胞の形質の不均一性の解明が必要と思われた。

<引用文献>

- ① Akihiko Miyawaki, Ryuji Ikeda, Hiroshi Hijioka, Takayuki Ishida, Mina Ushiyama, Etsuro Nozoe, Nakamura Norifumi: SUV max of FDG-PET correlates with the effects of neoadjuvant chemoradiotherapy for oral squamous cell carcinoma. *Oncology report*. 23:1205-1212 2010
- ② Ishida Takayuki, Hijioka Hiroshi, Kume Kenichi, Miyawaki Akihiko, Nakamura Norifumi: Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment. *Oncol Lett*. 6 1201-1206 2013
- ③ Valeria R. Fantin, Julie St-Pierre, and Philip Leder: Attenuation of LDH-a expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *cancer cell* 9 425-434 2006
- ④ Heather R. Christofk, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumor growth. *Nature* 452 230-234 2008
- ⑤ Gao HJ, Zhao MC, et al. Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *J Cancer Res Clin Oncol* 141 1151-1162 2015

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)

1) Akihiko Miyawaki, Hiroshi Hijioka, Takayuki Ishida, Etsuro Nozoe, Norifumi Nakamura and Ryoichi Oya: Intraoperative frozen section histological analysis of resection samples is useful for the control of primary lesions in patients with oral squamous cell carcinoma. *査読あり*. *Molecular and clinical oncology* 3: 55-62 2015.

DOI:10.3892/mco.2014.409

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 平島 惣一、宮脇 昭彦 他3名
口腔癌の動注化学放射線療法患者における modified Glasgow Prognostic Score の有用性 第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術総会 2013年1月25日 秋葉原コンベンションホール(東京都・千代田区)
- 2) 志渡澤 和佳、宮脇 昭彦 他3名
当科における口腔癌一次症例の臨床統計的観察 第32回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2014年1月24日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 昭彦 (MIYAWAKI Akihiko)
産業医科大学・大学病院・講師
研究者番号: 40200216

(2) 研究分担者

池田 龍二 (IKEDA Ryuji)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授
研究者番号: 50398278

(3) 研究分担者

中村 典史 (NAKAMURA Norifumi)
鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号: 60217875

(4) 研究分担者

比地岡 浩志 (HIJIOKA Hiroshi)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 70305150