

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890175

研究課題名(和文) 口腔癌における転移の早期診断マーカーの同定および解析

研究課題名(英文) Analysis and identification of early diagnostic markers of metastasis in oral cancer

研究代表者

田中 拓也 (TANAKA, TAKUYA)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30631767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(OSCC)は、患者のQOLと生命を脅かす重大な疾患である。口腔扁平上皮癌(OSCC)の治療では、手術療法・化学療法・放射線療法であり、癌患者の生存率の向上や再発抑制に大きく貢献している。しかし、遠隔転移の抑制は現在でも困難であり、新たな治療法の開発が望まれている。申請者は、口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株をヌードマウスに移植し、高転移性の株から、肺に転移するモデルを作成しその株の樹立に成功した。そして、マイクロアレイ解析を行い探索・同定した結果、候補遺伝子としてAngptl4 (angiopoietin-like protein 4)の著しい上昇をみとめた。

研究成果の概要(英文)：Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is a serious disease patient quality of life and life-threatening. In the treatment of oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), operative therapy and chemotherapy-radiation x-ray, and greatly contributed to improve the survival rate of patients with cancer and recurrences. But distant metastasis suppressor is difficult in the current development of a new treatment is desired. Applicant transplant, oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) cell line in nude mice and the successful establishment of the and create a model from a high metastatic spread to the lung. And micro-array analysis, discovery and identification as a candidate gene admitted Angptl4 (angiopoietin-like protein 4) upswing.

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：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の約 60% を占める疾患であり、その 90% 以上を OSCC が占めている。近年、頭頸部癌の診断・治療法の選択肢は広がっているものの、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない。それに加え、寛快した患者でも、部位的特性から日常生活の根本に関わる口腔機能障害を後遺するのが現状である。以上より、OSCC をはじめとした頭頸部癌の、病態に基づいた非外科的治療法の開発が極めて重要である。一方、転移のメカニズムを詳細に理解するためには、癌のタイプごとにヒトの転移プロセスと類似した動態を示すモデルの存在が不可欠である。そこで、申請者は、GFP を導入した OSCC を用いて申請者の作成した高転移株をヌードマウスに移植することにより肺転移株を樹立することに成功した。また、これまで複数の癌で転写因子 nuclear factor- B (NF- B) は、恒常的に活性化されており、癌の悪性化に関わることが知られている。これまで申請者は、OSCC の頸部リンパ節転移に関わる因子について、樹立した高転移株を用いて、NF- B の発現が高くなっていることを明らかにし、NF- B の阻害剤である NBD peptide を用いて vivo の実験で口腔癌では、初めてリンパ節転移を抑制することに成功した。申請者が肺転移株を使用してマイクロアレイ解析を行ったところ、肺転移株では、Angpt14 (angiopoietin-like protein 4) の発現が著しく上昇していることが明らかとなった。興味深い事に、Angpt14 の発現上昇は生命予後の悪化に強く関連していることが報告されている。しかし口腔癌では、いまだ報告はない。現在、OSCC に対する治療法は、手術、放射線治療、化学療法が挙げられている。一方、これら 3 つの治療法を組み合わせても制御できない遠隔転移において、新たな OSCC の転移治療薬としての分子標的治療薬の開発が望まれている。しかしながら、先に述べたような OSCC の転移メカニズムに関わる分子が治療標的になるとは限らない。すなわち、目的とする腫瘍においてどの程度重要な機能を有しているかを明確にする必要がある。以上より、本研究の最大の目的は、OSCC の遠隔転移機構を遺伝子発現異常探索によって解明し、OSCC 患者での新規の遠隔転移の予後測マーカーを発見するとともに、分子標的とする革新的な癌治療法開発につなげることである。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、患者の QOL と生命を脅かす重大な疾患である。口腔扁平上皮癌 (OSCC) の治療では、手術療法・、化学療法・放射線療法であり、癌患者の生存率の向上や再発抑制に大きく貢献している。しかし、遠隔転移の抑制は現在でも困難であり、新たな治療法の開発が望まれている申請者は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞。株をヌードマウスに移植し、高転移性の株から、肺に転移す

るモデルを作成しその株の樹立に成功した。そして、マイクロアレイ解析を行い探索・同定した結果、候補遺伝子の一つに Angpt14 (angiopoietin-like protein 4) の著しい上昇をみとめた。この分子の転移能増強における役割に関してはほとんど分かっていない。そこで本研究では、OSCC に焦点を当て、を解明するとともに、新たな診断・治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) OSCC における Angpt14 の発現とその臨床的意義の解析

OSCC における Angpt14 発現量の解析
OSCC の臨床検体を肺転移のあるグループと肺転移のないグループに分けて Angpt14 を免疫組織学的に検討する。またウエスタンブロッティング法、PCR 法にて解析する。さらに、その結果と各種臨床情報との関連を統計学的に検討する。

(2) Angpt14 の発現上昇が OSCC の転移に及ぼす影響とその分子機構の解析

Angpt14 のタンパク質量の発現上昇が OSCC の進展に寄与していることが確認されたら、Angpt14 の発現抑制によって起こる現象を *in vivo*、*in vitro* で解析する。

Angpt14 の発現抑制による解析 (*in vitro*)

siRNA による Angpt14 の一過性発現抑制を行う。マトリゲルインベーションチャンパーによる浸潤能の評価、wound healing assay による遊走能の評価、MTS assay による増殖能の評価、抗癌剤などの各種ストレス環境下でのアポトーシスの評価などを中心に行う。また、表現系の変化から重要と考えられる細胞内外関連因子の発現変化をタンパク質 (ウエスタンブロッティング法、免疫染色、ELISA 法など)・遺伝子 (リアルタイム PCR 法など) レベル両面で解析する。

Angpt14 の発現抑制による解析 (*in vivo*)

ヌードマウスに、樹立した Angpt14 発現抑制株およびコントロール株を移植し、まず増殖能や転移能の差異を評価する。GFP 発現株であるため、蛍光検出システムにより簡単に転移の部位や程度を評価することが可能である。続いて、組織学的解析を免疫組織化学染色などにより行う。

これらに並行して、*in vitro* で数種類の OSCC 細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22) および非悪性上皮細胞 (HaCaT 細胞) を用いて、Angpt14 の一過性発現抑制で同様の現象が得られるかどうかを確認する。

(3) Angpt14 の発現低下誘導メカニズムに関する検討

各種癌浸潤・転移に関わる因子による Angpt14 発現変化を検討する。

Angpt14 は、NF- κ B の下流の分子であると報告されている。申請者の樹立した高転移株は、NF- κ B の活性が高く癌間質細胞自身から分泌する TGF- β によりさらに NF- κ B の恒常的な活性がおこり、NF- κ B の下流の分子である Angpt14 の分泌がより高くなっている可能性が考えられる。そこで申請者は、NF- κ B 活性シグナルである TGF- β で高転移株を刺激をし Angpt14 の発現変化を RT-PCR 法・ウエスタンブロット法にて解析する。また予後を大きく左右する癌の遠隔転移の過程は上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) に基づくと考えられている。申請者は既に、樹立した高転移株で EMT 様の現象が誘導されることを見出した。そこで EMT マーカーである E-カドヘリン・ビメンチン Snail・N-カドヘリン等も同時に解析していく。

肺転移株における NF- κ B の発現を検討する

肺転移株における NF- κ B の高発現は、申請者は過去に見出しているため、今度は、肺転移株における Angpt14 を制御していると考えられる NF- κ B の活性を調べて行く。まず、NF-

B の核内移行を確認するために細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。次に、転写因子 NF- κ B の DNA との結合能を確認するため Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行います。さらに NF-

B の転写活性を確認するためルシフェラーゼアッセイを、デュアルルシフェラーゼレポーター法により、ルミノメーター (Promega) を用いて測定する。悪性度の評価のために親株と肺転移株をマウスに移植して解析する。生存解析は、Kaplan-Meier 法を用いて行い、各細胞移植後のマウスの生存率の有意差検定は、Log-rank test にて行う。

NF- κ B 阻害剤である NBD peptide で Angpt14 は、抑制されるのか in vitro、in vivo で検討する。in vitro では、肺転移株を NBD peptide で処理をしてマトリゲルインベーションチャンバーによる浸潤能の評価、wound healing assay による遊走能の評価、MTS assay による増殖能の評価をおこなう。また in vivo においては、ヌードマウスに親株と肺転移株を移植して NBD

peptide を投与し転移能の抑制の評価を行ったのち、摘出した舌・肺の検体を用いて Angpt14 の発現および血管新生能に関して VEGF-A・CD34 が抑制されているか免疫化学的染色を行うことで評価する。また発現変化を RT-PCR 法・ウエスタンブロット法にて解析する。

(4) 患者臨床サンプルでの Angpt14 発現解析と臨床応用

OSCC 患者における Angpt14 の発現解析のため、当院倫理委員会の承認をすでに得ており、OSCC 患者の臨床サンプルを用いて、Angpt14 の発現程度と予後との関連性を確認し、Angpt14 が肺転移の診断マーカーとして有用であることを示す。

4. 研究成果

(1) 癌の浸潤転移に対するがん微小環境の役割が注目されている。特に癌実質細胞と間質細胞との相互作用が重要であると考えられているがその分子メカニズムは十分解明されていない。Angpt14 は癌原発巣内に存在する間質細胞から分泌される TGF- β によって誘導され、癌の肺転移を促進する。Angpt14 は、癌の進展・転移因子として注目されている。(図1) PCR、ウエスタンブロットで肺転移株で発現をみとめており現在再現実験を行っているところである。

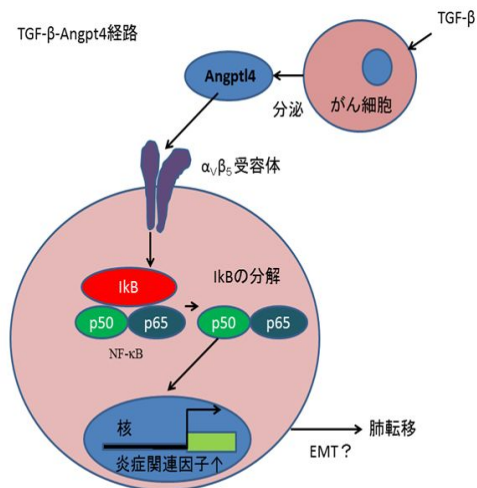


図 1

(2)

マトリゲルインベーションチャンバーによる浸潤能の評価、wound healing assay による遊走能の評価は、共に肺転移株が親株より有意に高い結果がでていた。また、siRNA による Angpt14 の一過性発現抑制をおこなった実験は、行っていない。

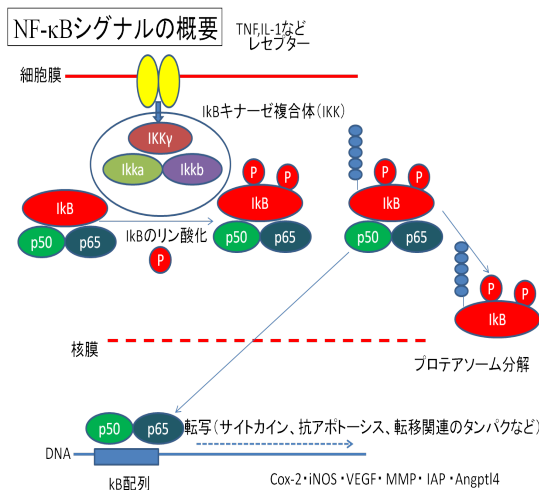
ヌードマウスに、樹立した Angpt14 発現抑制株およびコントロール株を移植し、増殖能や転移能の差異の検討まではまだいた

っていない。組織学的解析を免疫組織化学染色では、転移関連因子の発現が抑制されている予定である。

これらに並行して、in vitro で数種類の OSCC 細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22) および非悪性上皮細胞 (HaCaT 細胞) に GFP 導入株を作成した。

(3)

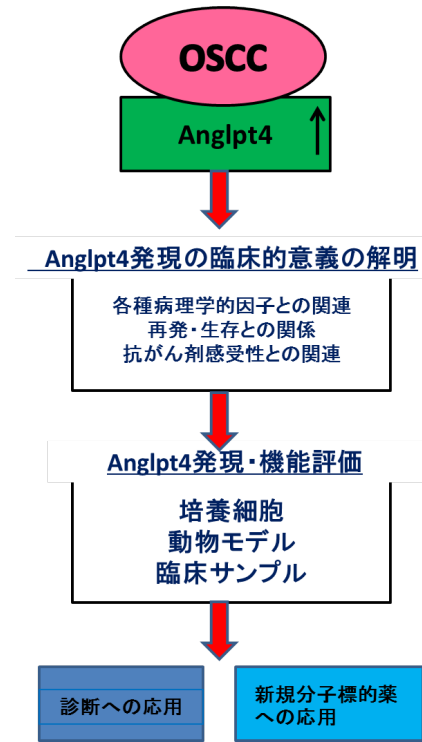
転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、複数の癌で恒常的に活性化されており、癌の悪性化に関わることが知られている。(図2) 今回、NF- κ B の下流にある分子であり、癌の進展に関わる Angpt14 の発現に与える影響を解析する。また、Angpt14 の発現抑制条件の解明は、その後の現実的な診断・治療法の開発に貢献すると考えられる。申請者は、NF- κ B の抑制を NBD peptide を用いて成功した。NBD peptide を用いて Angpt14 の発現の抑制を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)、NF- κ B の転写活性を確認するためルシフェラーゼアッセイを、デュアルルシフェラーゼレポーター法により、ルミノメーター (Promega) を用いて測定しているところである。また、悪性度の評価のために親株と肺転移株をマウスに移植を行い現在実験中である。結果が出次第、生存解析を、Kaplan-Meier 法を用いて行い、各細胞移植後のマウスの生存率の有意差検定は、Log-rank test にて行う予定である。



(図2)

(4)

OSCC 患者における Angpt14 の発現解析のため、OSCC 患者の臨床サンプル(血液・唾液)を用いて、Angpt14 の発現程度と予後との関連性を確認し、Angpt14 が肺転移の診断マーカーとしての有用性を示す予定である。(図3)



(図3)

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 2 件)

田中拓也：高転移性口腔扁平上皮癌における NF- κ B の役割とその抑制効果に関する研究。第 50 回日本癌治療学会総会 神奈川 2012 年 10 月 25 - 27 日パシフィコ横浜

田中拓也：NBD peptide による NF- κ B の選択的抑制は高転移扁平上皮癌の転移を阻害する。第 57 回日本口腔外科学会総会 神奈川 2012 年 10 月 19 - 21 日パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 拓也 (TANAKA TAKUYA)

熊本大学・医学部付属病院・非常勤診療医師

研究者番号：30631767

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：