

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 8 月 18 日現在

機関番号：32428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462915

研究課題名(和文) 頭頸部癌転移をリンパ系の発生・再生の視点から解析する

研究課題名(英文) Analysis of the metastatic activity of head and neck cancer from the aspect of lymphangiogenesis

研究代表者

勝部 憲一 (Katsube, Ken-ichi)

東都医療大学・ヒューマンケア学部・教授

研究者番号：20233760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌細胞株と線維芽細胞NHDFの共培養で、Notchファミリーで有意な発現上昇を示すのはNotch3だった。分離解析をするとNotch3発現はNHDFに依り、癌はJAG1を発現していた。扁平上皮癌細胞株にはNotch3誘導陽性株と陰性株があり、陽性株はvivo増殖能の高い活動性がある。Notch3誘導性癌細胞とNHDF、HUVEC共培養をおこなうと、脈管形成が促進された。臨床例では悪性度が高く血管新生の多い症例ほどCAFにNotch3発現が高い傾向だった。口腔扁平上皮癌は周囲間質にCAFを誘導して有利な環境を作り出すだけでなく、脈管新生を促し転移に有利な環境を形成する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Coculture of the oral Squamous cell carcinoma (SCC) and fibroblasts showed the significant upregulation of Notch3 among Notch receptor family. Separation analysis revealed that the fibroblasts are responsible for Notch3 upregulation and carcinoma cells express JAG1. Triple coculture of oral SCC, fibroblasts and HUVEC showed an accelerated vasculogenesis. Oral SCC cell lines are classified into Notch3-inducing type and Notch3-non-inducing type, in which the Notch3-inducing cell lines have highly active growth in vivo. Analysis of the clinical cases of oral SCC revealed that Notch3-inducing type has higher malignant activity. Oral SCC may induce not only CAF to produce an favorable environment, but also vasculogenesis to promote metastasis.

研究分野：病理学

キーワード：Notch 脈管新生 癌転移

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌では頸部へのリンパ行性転移が多いことが知られているが、そのセンチネルリンパ節の存在に関していろいろな議論がある。リンパ管網形成期に網羅的遺伝子解析をおこない、発生・リモデリング関連遺伝子を明らかにすることを試みた。腫瘍転移には周囲間質の脈管に浸潤し、そこから管腔内を移動するルートが一般的である。周囲間質にはリンパ球を中心とした各種の免疫細胞が浸潤し癌の増殖を抑制しているが、最近寧ろ癌の伸展を支える細胞の存在が明らかになってきた。特に癌間質線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts (CAF) と呼ばれる細胞は、様々な因子の分泌や組織構築を通じて癌の増殖を助けていることが知られるようになった。CAF の作用のひとつとして血管新生を促進する特徴が、癌転移との関連で注目されている。

2. 研究の目的

Notch シグナルについて研究をおこなってきたが、Notch シグナルは血管やリンパ管の脈管形成や脈管新生で重要なシグナル経路であることが知られている。ヒト口腔扁平上皮癌を中心に頭頸部がん症例で、Notch 受容体ファミリーの発現を解析して、癌の悪性度や周囲 CAF の誘導能、脈管誘導能との関連を解析する。得られた結果を元に培養細胞の共培養で、症例解析結果の細胞生物学的な側面のメカニズム解明をおこなう。

3. 研究の方法

1 ヒト症例での Notch 発現と予後関連解析
東京医科歯科大学歯学部付属病院において、扁平上皮癌の診断のもと、外科的切除された検体を用いて、癌浸潤巣における NOTCH3 と -SMA (CAF のマーカー) の発現を免疫組織化学的に検討し、予後評価と合わせて統計処理をおこなった。またその後 Notch シグナル因子や脈管形成に関わる因子の発現を同じように解析して、相関性の有無について解析をおこなった。蛍光二重染色法 (NOTCH3 陰性 CAF 症例は -SMA と CD34、NOTCH3 陽性 CAF 症例は NOTCH3 と CD34 で比較解析) により得られた画像を NIH image J ソフトウェアを用いる事で形態学的に定量・解析した。ヒト症例の解析に関しては東京医科歯科大学の研究倫理規定に則り、倫理審査委員会に研究計画書を提出の上に審査を受けて、許可をとっておこなった。

2 共培養を用いた細胞生物学的解析

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を中心とした癌細胞株とヒト皮膚線維芽細胞 (以下 NHDF) の共培養をおこない、Notch シグナル因子を中心とした各種遺伝子の発現誘導変化を解析した。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を中心とした癌細胞株と NHDF とヒト臍帯静脈内皮細胞 (Huvec) の 3 重共培養をおこない、脈管構造の誘導能

と Notch シグナルを中心とした各種因子の発現状況の関連性について解析をおこなった。遺伝子の発現に関しては転写レベルでは realtime-RTPCR をおこない、蛋白発現レベルでは SDS-PAGE をおこないウェスタンブロット法を用いて解析をおこなった。また Notch3 が本当にこれらの誘導に関係するかどうかを明確にするため、siRNA を用いて発現抑制をおこないレスキュー実験をおこなった。

4. 研究成果

1 免疫組織化学的検討の結果、浸潤部では癌細胞周囲に NOTCH3 陽性を示す線維芽細胞が 93 症例中 31 症例 (33.3%) で認められた。更に、これら NOTCH3 陽性を示す線維芽細胞は全例、-SMA にも陽性を示す、すなわち CAF である事が示された。Notch3 陽性を示す症例で周囲に形成される脈管は組織学的にみて血管腔と評価され、ポドプラニン陽性の脈管の増生や VEGFR-3 陽性部位については確認できなかった。

2 ヒト口腔由来の培養扁平上皮癌細胞株の複数種とヒト皮膚由来線維芽細胞 NHDF の共培養を調べた結果、Notch ファミリーで有意な発現上昇を示しているのは Notch3 であった。Notch 受容体ファミリーで各種の幹細胞の増殖・分化で主要な役割を演じているのは Notch1 だが、今回の実験ではいずれの癌細胞株の共培養でも誘導が観られなかった。また免疫細胞分離、免疫細胞化学染色をおこない癌細胞と NHDF の分離識別をおこなうと、この Notch3 発現誘導は NHDF に依ることがわかった。

2 培養扁平上皮癌細胞株には Notch3 誘導陽性株と Notch3 誘導陰性株が存在し、陽性株は増殖能や vivo 転移能で、より活発な活動性を示している。

3 2 で示した Notch3 誘導陽性株でも特に強い発現を示す H01-N-1 を選び、NHDF の変化を調べると SMA の誘導がかかることが明らかになった。

4 ヒト口腔扁平上皮癌の症例を解析すると、転移能が高い症例ほど周囲の CAF に Notch3 発現が高い傾向が有意に存在した。NOTCH3 陰性 CAF 症例と NOTCH3 陽性 CAF 症例とで、腫瘍間質中の血管密度に差があるかどうかを、蛍光二重染色法 (NOTCH3 陰性 CAF 症例は -SMA と CD34、NOTCH3 陽性 CAF 症例は NOTCH3 と CD34 で比較解析) により得られた画像を形態学的に定量・解析した。

これらの結果を考察すると、ヒト口腔扁平上皮癌は周囲の間質に影響して、CAF の誘導をおこなうことが想定できる。この誘導される CAF にどういう意義があるか解析した結果が以下となる。

H01-N-1 と NHDF、さらにヒト内皮細胞 HUVEC の 3 重共培養をおこなうと、HUVEC 由来の脈管形成が有意に促進された。この結果は Notch3 siRNA を用いる実験で有意に抑制され、Notch3 に依存するシグナルで誘導される

結果と考えられた。

これらの結果をまとめると Notch3 を誘導する癌細胞は CAF 誘導から血管新生を通じて増殖と浸潤を促進している可能性がある。otch 受容体ファミリーの中で Notch3 はあまり注目を集めてこなかったが、例外として CADASIL 原因遺伝子としての報告が多数ある。CADASIL とは Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarct and Leukoencephalopathy の略称、皮質下梗塞と白質脳症をともなう常染色体優性の遺伝病である。この原因遺伝子が Notch3 と特定されたが、Notch3 の機能と CADASIL 発生機序に関しては様々な議論がある。現在もっとも有力視されている説では、Notch3 が血管内皮細胞と周皮細胞の情報伝達を制御して血管安定性を担っていると仮定されている。そのため Notch3 の機能が低下している CADASIL 患者では血管が不安定になり、血管周囲への血漿漏出や組織変性が促されているのではないかと考えられている。Notch3 とヒト病態の関連で確実に証明されているのは、CADASIL における脳細動脈の変性・破綻である。我々の研究では Notch3 の新たな機能として、癌における血管新生の可能性が示された。

ただし血管新生は新たな血管の形成なので、既存血管の変性とは状況が異なる。血管新生では内皮細胞の一部が分化して、tip cell と呼ばれる探索細胞が細かい突起を出して VEGF などの濃度勾配から新生の方向を探る。そして伸長方向が決まると tip cell は互いの位置を調整しながら徐々に管腔形成をおこなう。

またこの仮説が事実とすると、脈管新生で内皮細胞と周皮細胞の挙動に Notch3 のシグナルが重要な影響を与えていることが考えられる

今回の研究では培養癌細胞株として、子宮頸部扁平癌:HeLa、肺腺癌:A549、乳腺癌:MCF-7、胃腺癌:MKN-74、大腸腺癌:HCT-15、膵癌:Panc-1 も解析・検討をおこなった。このうち肺腺癌由来の A549 細胞株で、NHDF における NOTCH3 発現誘導が確認された。この結果は口腔扁平上皮癌に限らず、Notch3 が癌一般で血管新生を通じて転移能を促進している可能性を示している。

H01-N-1 は自身が Notch リガンドのひとつの JAG1 (Jagged ファミリーのひとつ) を強く発現しているが、Jagged は Notch 受容体修飾因子の Fringe の存在有無によって受容体活性化が異なることが知られている。Fringe は糖鎖修飾酵素のひとつで、Notch 受容体膜外ドメインに糖鎖を与えて、Notch リガンド 2 系統のうち Jagged との結合性を高め、シグナル識別をおこなっている。そのため Fringe ファミリーが、扁平上皮癌増あるいは転移の実験系あるいは症例において、どのような発現変化をおこなうかを解析中である。

癌の脈管性転移で、脈管新生の誘導は重要

なイベントである。脈管特に血管新生がなければ、癌組織は十分な酸素や栄養を受けられず、かつ転移の機会もない。しかし後半の転移に関しては、よく考察すると 2 つの相互矛盾する過程が、血管新生にはある。血管新生の最初の過程では未熟な内皮細胞の緩やかな集合しかなく、十分な循環は期待できない。しかし次の過程で内皮細胞に周皮細胞が付着して基底膜形成など強固な構造が完成すると、今度は癌細胞が管腔内に入ることが難しくなる。癌細胞によってはヘパラーゼなど基底膜分解酵素を持つものもあるが、脈管性転移は非常に限られた条件でしか起こりえない。今回解析した Notch シグナルの JAG1 を通じた調節では、この過程を制御できる可能性がある。癌細胞の上皮間葉移行などともに脈管新生誘導は注目すべき課題である。

リンパ行性転移が多い口腔扁平上皮癌でリンパ管との関連が示せなかったのは意外な結果だが、一般に口腔扁平上皮癌症例では癌周囲の組織中のリンパ管はポドプラニン陰性になり、免疫組織化学的に検出できないことが多い。そのため共培養系では VEGF 系の遺伝子発現解析を試行している。VEGF に関しては VEGF-C の明らかな誘導は見られなかったが、VEGF-A, VEGF-B に関しては、発現上昇が見られることもあった(有意差については試行回数を増やして検討中である)。今回の研究ではリンパ管新生など誘導の直接の示唆は得られなかったが、リンパ管との関連は引き続き検討すべき課題と考えている。口腔がんのリンパ節転移に関して行われた研究結果によると、他の器官の癌と異なりセンチネルリンパ節の存在が依然として明確に確認できていない。リンパ節には必ず輸出入の血管(動脈・静脈)の出入りがある。これらの血管を通じて、一旦血流に入った癌細胞がリンパ系に移行する可能性も考えて調査をおこなう必要があるのではないかと考えている。

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 5 件)

1

Kou Kayamori, Ken-ichi Katsube, Kei Sakamoto, Yoshio Ohyama, Hideaki Hirai, Akane Yukimori, Yae Ohata, Takumi Akashi, Masao Saitoh, Kiyoshi Harada, Hiroyuki Harada, Akira Yamaguchi, 'NOTCH3 Is Induced in Cancer-Associated Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma', PLoS ONE, 2016 Apr 28;11(4):e0154112,doi:10.1371/journal.pone.0154112. eCollection 2016. 査読あり

2

Notch シグナルとがんの増殖・浸潤 勝部憲二 東都医療大学紀要 査読有 6(1):1-7. 2016 査読あり

3

Recent advances in renal cell carcinoma from a pathological point of view. Mikami S, Oya M, Mizuno R, Kosaka T, Ishida M, Kuroda N, Nagashima Y, Katsube K, Okada Y. Pathol Int. 査読あり

4

A facile one-step strategy for the generation of conditional knockout mice to explore the role of Notch1 in oroesophageal tumorigenesis. Mandasari M, Sawangarun W, Katsube K, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり

5

CCN3 protein participates in bone regeneration as an inhibitory factor. Matsushita Y, Sakamoto K, Tamamura Y, Shibata Y, Minamizato T, Kihara T, Ito M, Katsube K, Hiraoka S, Koseki H, Harada K, Yamaguchi A. J Biol Chem. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝部憲一 (KATSUBE, Ken-ichi)
東都医療大学・ヒューマンケア学部 教授
研究者番号：20233760

(2)研究分担者

栢森 高 (KAYAMORI, Kou)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：10569841

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()