

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26462616

研究課題名（和文）耳下腺癌の低酸素環境における転移浸潤メカニズムの研究

研究課題名（英文）Metastasis and invasion mechanism in the hypoxia environment of parotid gland cancer

研究代表者

伊地知 圭（IJICHI, Kei）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50510278

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）：低酸素環境が唾液腺がん組織の悪性を促進させるメカニズムを解明することを目的とした研究を行った。

唾液腺がん細胞株A253とNSDC-5F、対照として甲状腺癌細胞株8305c、TTを低酸素培養し、immunoblottingにてHIF-1の発現を確認した。A253とNSDC-5F、TTではHIF1、 が発現していたが、8305cでは発現が確認できなかった。低酸素条件にてHIF-1の発現があったTTとA253に対し、同様に低酸素条件において転移、上皮間葉転換関連蛋白の変化をimmunoblottingにて観察したが、発現量の変化を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We conducted the study for the purpose of hypoxia environment elucidating a mechanism to promote the malignant transformation of the salivary gland cancer tissue.

Thyroid cancer cell line 8305c, TT and salivary gland cancer cell line A253 and NSDC-5F as a control were cultured in a hypoxia condition, then confirmed expression of HIF-1 in immunoblotting. HIF1 and were expressed in A253 and NSDC-5F, TT, but was not able to confirm expression in 8305c. We observed a status of the epithelium mesenchyma transition and metastasis related protein in a hyponoxia condition similarly in immunoblotting, but there were no changes of the expression level in a hypoxia condition for TT and A253 where there was expression of HIF-1 .

研究分野：頭頸部外科

キーワード：唾液腺がん 低酸素 悪性化 HIF-1

### 1. 研究開始当初の背景

固形癌の低酸素領域では周辺組織への浸潤と転移、そして放射線や薬剤への耐性などの悪性化因子が増加する。唾液腺がんでは浸潤や転移によって患者の予後を悪化させるばかりでなく、手術範囲が拡大することによって顔面麻痺、咀嚼嚥下機能障害など多くの機能障害を引き起こす。したがって唾液腺がん組織の低酸素領域での悪性化を促進させるメカニズムを解明することは至急の課題である。

癌の低酸素領域では低酸素誘導転写因子 (hypoxia inducible factor 1 : HIF-1 ) が多くの癌細胞内で活性化される。低酸素環境下では HIF-1 が安定化し、様々な転写因子を活性化することで、血管新生、放射線や薬剤への耐性、浸潤・転移能の増加など癌の悪性化に関与している。一方で転写因子である STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription3) は多くの癌で恒常的に活性化されており、また STAT3 活性化の抑制が癌細胞株の増殖を抑制することから癌治療の分子標的の 1 つとして注目されている。

癌の低酸素領域では HIF-1 が誘導され、様々な転写因子が活性化されて EMT を引き起こすことで細胞の運動性が高まり、転移や浸潤を促進すると考えられる。また、EMT を引き起こした細胞は上皮細胞由来の癌に多く発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とした分子標的治療薬の耐性化を引き起こすことが予測される。STAT3 は癌細胞の運動性を上昇させることから HIF-1 の誘導する EMT に深く関与しているのではないかと推測し、本研究では唾液腺がん細胞を用いて低酸素環境下での EMT 誘導における HIF-1 および STAT3 の役割、とくにシグナル伝達系を明らかにするとともに、EMT に伴う EGFR や VEGFR を介したシグナル伝達系や癌の微小環境の変化に伴う血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 2. 研究の目的

近年癌細胞が間質系の細胞形質を獲得する上皮間葉移行 (EMT) を引き起こし、浸潤・転移に貢献することが明らかとなり、その中でも低酸素領域では EMT が盛んに行われ、癌の悪性度につながっている。一方で低酸素領域では癌幹細胞のニッチの存在も示唆されている。本研究ではがんの低酸素で中心的役割を果たす HIF-1 と発癌に関与する STAT3 の EMT にかかわる分子メカニズムの解明を行う。また癌幹細胞周囲の微小環境がどのような分子メカニズムで EMTなどを介して浸潤・転移を引き起こしているかを明らかにする。さらに EMT を起こした癌細胞の薬剤耐性化メカニズムについても解析を行い、最終的な治療ターゲットの開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、唾液腺がん細胞を用いて低酸素および通常酸素分圧で培養した際の、細胞形態および EMT 関連蛋白の発現度を解析し、癌の微小環境に存在する細胞群の EMT における役割を解明する。さらにこれらの細胞を 3 次元培養し、癌細胞の浸潤能の変化を調べる。また唾液腺がん患者から得られた癌組織から癌幹細胞を単離し、原発巣および転移巣の癌細胞について HIF-1 や STAT3 活性、EMT 発生の変化などを調べることで、癌幹細胞周囲の微小環境がどのような分子メカニズムで EMTなどを介して浸潤・転移を引き起こしているかを明らかにする。HIF-1 や STAT3 活性をイムノプロットにて、EMT 発生の有無を上皮細胞は E-cadherin を、間葉系細胞は vimentin をマーカーとして、タンパクの発現量や細胞内局在について評価する。EMT を引き起こす因子は TGF- $\beta$  や HGF 等が報告されておりこれらの因子が低酸素刺激や HIF-1 の過剰発現によってどのように変化するかも検討する。つぎに EMT をきたした癌細胞では EGFR の発現が減少すると考えられることが

ら、同様に転移をきたした癌組織におけるEGFRの発現量やリン酸化の状態、そして下流のシグナル伝達経路を解析し耐性化メカニズムを探る。

#### 4. 研究成果

唾液腺がん細胞株の低酸素および通常酸素分圧で培養した際の細胞形質を確認する解析を進めた。具体的には唾液腺がん細胞を用いて低酸素環境下でのEMT誘導におけるHIF-1およびSTAT3の役割、とくにシグナル伝達系を明らかにするとともに、EMTに伴うEGFRやVGFRを介したシグナル伝達系や癌の微小環境の変化に伴う血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的とし、解析を行った。また、国際的には唾液腺がん細胞株の入手が困難であり、名古屋市立大学での樹立の準備を進めた。唾液腺がん細胞株A253と、controlとして甲状腺癌細胞株8305c、TTを酸素濃度1%の条件で24時間低酸素培養器で培養した。蛋白を回収し、immunoblottingにてHIF-1の発現を確認した。A253とTTではHIF1が発現していたが、8305cでは発現が確認できなかった。低酸素条件にてHIF-1の発現があったTTとA253に対し、同様に低酸素条件において転移、EMT関連蛋白の変化をimmunoblottingにて観察した。p-STAT, STAT, -actin, NDRG1などでは発現量の変化を認めなかった。平行して、名古屋市立大学にて倫理審査委員会にて審査を受け、切除組織から唾液腺がん細胞株を樹立した(NSDC-5F)。本細胞株でも同様に低酸素条件下でのHIF-1のstatusを解析しHIF-1の発現がみられた。本研究において、低酸素条件下でのHIF-1誘導によりSTATの発現、リン酸化の変化がみられなかった。結論として、唾液腺がん、甲状腺がん細胞株では低酸素条件下でのHIF-1誘導を認めた。しかし、この条件下でのSTATの発現上昇やリン酸化が見られなかった。唾液腺がん細胞株

においての低酸素条件下でのHIF-1誘導が、他の因子からEMT関連蛋白に作用するかを検討していく。また、CD44およびALDHをマーカーに癌幹細胞を単離し、in vivoでは悪性化、転移について、in vitroでは浸潤能、抗がん剤に対する耐性化における解析を行っていく。

#### 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 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

無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊地知 圭 (IJICHI, Kei)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50510278

### (2)研究分担者

足立 誠 (ADACHI, Makoto)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：10468192