

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05042

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮細胞癌の浸潤・転移機序の解明ならびに浸潤・転移阻止実験

研究課題名(英文) Explication of mechanisms on invasion and metastasis, and prevention of invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

川尻 秀一 (Kawashiri, Shuichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30291371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔扁平上皮癌の浸潤・転移機序の解明を目的として以下の解析を行った。

EGFRの発現はセツキシマブの効果と関連する可能性がある。症例の58.3%でEGFRが高陽性であった。高度浸潤癌で陽性率が低い傾向にあった。EGFRの発現減弱と上皮間葉移行(EMT)に関連を認めた。

口腔癌には強い免疫抑制状態でPD-L1を発現するタイプの腫瘍がある。口腔癌の微小環境におけるPD-L1の発現機序の検討が重要である。PD-L1の発現は高度浸潤癌で弱く、低浸潤癌で高かった。PD-L1の発現はEMTと関連を認めた。しかし高浸潤癌細胞とマクロファージや樹状細胞を共培養することでPD-L1の発現上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinomas (OSCC).

EGFR status may affect the patient response to cetuximab treatment. The analysis of the immunomarker for EGFR, it was revealed that 58.3% of the total cases, and furthermore, that invasiveness was inversely correlated with EGFR expression. Loss of EGFR expression in OSCC was associated with epithelial mesenchymal transition (EMT).

OSCC is highly immunosuppressive, and PD-L1 expression has been proposed as a potential mechanism responsible for this phenotype. Thus, it is important to understand the mechanisms underlying regulation of PD-L1 expression in the OSCC microenvironment. PD-L1 expression in high-grade invasive OSCC was lower than that in a low-grade invasive OSCC and found a close correlation between PD-L1 expression and the EMT. PD-L1 expression was upregulated in macrophages and dendritic cells in high grade invasive human OSCC tissues or co-cultured.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 浸潤 転移 間質 微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

われわれの講座では山本が浸潤様式分類を発表 (Yamamoto E. et al.: Cancer 51: 2175-2180, 1983.) して以来、口腔癌の浸潤像と転移や予後との関連性についての研究を行ってきた。その結果、臨床病理学的には浸潤像が転移や予後と最も相関する因子であることが明らかになり、浸潤機序の解明が治療成績の向上につながるものと確信し 1991 年以後は基礎的研究を併せて行っている。浸潤機序を解明するには再現性のある実験モデルを用いた研究が必須である。しかし、口腔領域ではそのモデルに乏しく、忠実に生体での現象を再現できるものはなかった。そこで、*in vitro* における線維芽細胞を組み込んだコラーゲンゲル内への癌細胞浸潤モデルを作製し、同時に新しいヌードマウスを用いた *in vivo* の正所性移植浸潤モデルの作製を試みた。その結果、われわれのモデルは用いたヒト口腔癌細胞の臨床での患者の浸潤・転移の病態を忠実に再現していた (Kawashiri S. et al.: Oral Oncology, Euro J Cancer 31B: 216-221, 1995.)。今回はこの *in vitro* および *in vivo* のモデルを用いてヒト口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移機序を解明するため以下の研究を行う。また、ヒト口腔扁平上皮癌の培養癌細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* の浸潤モデルの成果の一端はすでに報告したが、その結果、本モデルで臨床での浸潤像と類似の浸潤像が得られることが判明している。また、臨床材料を用いた免疫組織学的研究では、間質成分の型コラーゲン、その分解酵素であるマトリックスメタロプロテナーゼ、腫瘍細胞間接着のカドヘリンファミリーの一つであるデスモグレインが腫瘍の浸潤・転移や予後と密接に関係する因子であることが示唆され報告した。そこで、これらの点を明らかにするため、再現性のある本モデルを用い浸潤ならびに転移に関する研究を行なった。

## 2. 研究の目的

癌の浸潤は予後と最も関連する因子の一つである。われわれはこれまでの臨床的検討から、浸潤機序の解明が治療成績の向上につながるものと確信し研究を行ってきた。本研究では口腔扁平上皮癌の浸潤・転移機序の解明を目的として以下の解析を行った。

癌細胞が増殖する際に癌細胞自身が epidermal growth factor (EGF) を産生し、epidermal growth factor receptor (EGFR) を活性化して増殖を行なっている。また、EGFR をターゲットにした新しい分子標的薬 (セツキシマブ) の治療が口腔癌に使用されるようになった。EGFR の発現はセツキシマブの治療効果と関連がある可能性がある。そこで、本研究では、EGFR の発現と癌細胞の増殖のみならず浸潤や転移との関係について検討を行なった。

癌細胞が浸潤する際には周囲組織にも様々な変化が認められる。例えば、癌周囲の結合組織の線維化やリンパ球浸潤が観察される。この癌細胞周囲の微小環境は癌細胞の浸潤にとって「バリアーの役割をしている」という説が以前は一般的であった。ところが最近、癌周囲の微小環境が「癌細胞の浸潤や転移をサポートしている」という考え方が広まりつつある。その代表的なものは腫瘍血管や線維芽細胞である。しかし、腫瘍血管は腫瘍の増殖には重要であるが、浸潤や転移にはどのような影響があるのか分かっていない。また、間質の線維芽細胞の一部には cancer associated fibroblasts (CAF) が存在し、癌の浸潤を促進させているといわれている。そこで、本研究では腫瘍血管と CAF の浸潤や転移との関連について調査している。

その他にも、炎症性のサイトカインや免疫応答が癌細胞の周囲で作用し、癌細胞自身の浸潤や転移に影響を及ぼしている。特に高浸潤性口腔扁平上皮癌は浸潤先端部において免疫抑制性の微小環境を構築している可能

がある。本研究では PD-1/PD-L1 経路の活性化がこの一因となっているか否か検討を行っている。そこから口腔扁平上皮癌における癌細胞周囲の微小環境と浸潤・転移との関係を明らかにしたいと考えている。

### 3. 研究の方法

#### 細胞株

口腔扁平上皮癌由来細胞株で、浸潤の様相の異なる細胞株 3 種類(高浸潤性; HOC313、SCC4、中等度浸潤性; OSC-19 低浸潤性; OSC-20、H357) ならびに正常口腔線維芽細胞株 (NOF) を使用した。

#### 細胞培養

各細胞株は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した最小必要培地 MEM<sup>®</sup>(Sigma-Aldrich)にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養したものを、必要に応じて実験に供した。

#### 動物モデル

培養中の各細胞を培養液中で  $8.0 \times 10^6$  個/ml の濃度になるように調整し、ヌードマウスの舌もしくは口底部に 0.25ml を 27G 針付のマイクロシリンジにて移植する。移植後 3 ~ 6 週間でヌードマウスを屠殺し、局所腫瘍および頸部リンパ節を切除し、実験に使用した。

#### 臨床組織

金沢大学附属病院歯科口腔外科にて治療を行った口腔扁平上皮癌症例から生検時に切除し、病理検査に使用された腫瘍組織を使用した。またこれらの組織は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋したものを薄切して、HE 染色ならびに各種の免疫組織化学的染色を行った。

#### CAF

TGF- $\beta$ 1 を用いて NOF を刺激することにより CAF 化した線維芽細胞を作成した。CAF 化の確認は SMA の発現にて行った。

### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌における血管新生、リンパ管新生と浸潤との関連について免疫組織化学的に調査した。すなわち CD34 抗体による血管の免疫組織化学染色、D2-40 抗体によるリンパ管の免疫組織化学染色を行い、その密度と浸潤様式との関係について検討した。その結果、血管密度は浸潤様式が高度になるほど減少する傾向があり、浸潤様式 4D 型では最も低値を示した。また、リンパ管密度との相関については、リンパ節転移、浸潤様式ともにリンパ管密度との相関は認められなかった。しかしながら、浸潤様式が高度な癌では VEGF の発現や VEGF レセプターが上昇していることが、浸潤モデルを用いた実験で明らかとなった。また、血管新生阻害剤 (アバスチン) の腫瘍増殖や浸潤・転移に対する抑制効果について動物モデルを用いて検討した。その結果、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群とアバスチン投与群では差が認められなかった。リンパ節転移に関しても両群に差は認められなかった。病理組織像で移植腫瘍の浸潤様式 4C 型や 3 型にダウングレードする傾向は認められなかった。しかし、癌細胞の細胞増殖活性を観察するために増殖細胞核抗原 PCNA 抗体を、腫瘍組織の低酸素状態を観察するために低酸素誘導性因子 HIF-1 抗体を用い免疫染色を行ったところ陽性率が高かった。アバスチン投与群では血管とリンパ管を CD34 抗体と D2-40 抗体で 2 重免疫組織化学染色した。その結果、血管新生阻害効果を認めた。

癌細胞の浸潤に対する CAF の影響を調べた。その結果、NOF または CAF の培養上清 (NOF-CM、CAF-CM) で SCC4 および H357 細胞を培養したところ、間葉系の形態を呈した。さらに NOF-CM または CAF-CM での共培養により、低浸潤性の H357 細胞および高浸潤性の SCC4 細胞ともにさらなる

遊走性ならびに浸潤性を獲得した ( $p < 0.05$ )。しかも SCC4 細胞においては、CAF-CM との共培養により浸潤性の更新がより顕著となった ( $p < 0.05$ )。一方、NOF-CM または CAF-CM による培養はいずれの細胞株の増殖にも影響を与えなかった。

口腔癌の EGFR 発現についても検討を行った。臨床の口腔癌症例 24 例の切除組織を免疫組織化学的に染色し、58.3%の症例で EGFR が高陽性であった。EGFR 陽性率と T 分類、リンパ節転移、局所再発、分化度、浸潤様式との関連について検討したところ、浸潤様式のみが相関を認めた。すなわち、高度浸潤癌で陽性率が低い傾向にあった。また、EGFR の発現の高い癌細胞で、E-cadherin 発現が高く、N-cadherin, Vimentin, Snail 発現が低くことが判明し、EGFR の発現を抑制すると、E-cadherin 発現が減少し、N-cadherin, Vimentin, Snail 発現が上昇した。すなわち、EGFR の発現減弱と上皮間葉移行 (EMT) の関連を認めた。以上の結果から、EGFR をターゲットとする分子標的薬、例えばセツキシマブの効果が、浸潤傾向の強い癌で低くなるものと考えられた。

癌細胞は、細胞表面の programmed death ligand 1 (PD-L1) 発現を調節することにより免疫寛容を誘導し、周囲へ浸潤していることが予想される。そこで、口腔扁平上皮癌の PD-L1 の発現について検討した。その結果、臨床の口腔癌症例 24 例の切除組織を免疫組織化学的に PD-L1 を染色した。54.2%の症例で PD-L1 が高陽性であった。また PD-L1 陽性率と T 分類、リンパ節転移、局所再発、分化度、浸潤様式との関連について検討したところ、浸潤様式のみが有意差を認めた。すなわち、高度浸潤癌では PD-L1 陽性率が低い傾向にあった。口腔癌細胞を用いた結果でも、高浸潤性の HOC313 細胞、

TSU 細胞では mRNA の発現も蛋白の発現も低く、OSC-19 では中等度発現、OSC-20 細胞では高い PD-L1 発現を認めた。しかしながら、最も高浸潤性の浸潤様式 4D 型の症例の浸潤先端部の組織を検討したところ、癌細胞自身は発現が低いものの、周囲のマクロファージや樹状細胞で PD-L1 の発現を認めた。すなわち、高度浸潤癌では癌細胞周囲のマクロファージや樹状細胞を利用して免疫寛容の状態にしている可能性があり、癌細胞はこの微小環境を利用して浸潤しているものと推察された。

## 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 10 件)

Nagai H, Hasegawa S, Uchida F, Terabe T, Ishibashi Kanno N, Kato K, Yamagata K, Sakai S, Kawashiri S, Sato H, Yanagawa T, Bukawa H. MicroRNA-205-5p suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma by inhibiting TIMP-2 expression. *Int J Oncol.* 52(3):841-850, 2018.

Ishimiya M, Nakamura H, Kobayashi Y, Noguchi-Shinohara M, Abe C, Dohmoto C, Ikeda Y, Tokuno K, Ooi K, Yokokawa M, Iwasa K, Komai K, Kawashiri S, Yamada M. Tooth loss-related dietary patterns and cognitive impairment in an elderly Japanese population: The Nakajima study. *PLoS One.* 13(3): e0194504. 2018.

Ooi K, Inoue N, Matsushita K, Yamaguchi H, Mikoya T, Minowa K, Kawashiri S, Nishikata S, Tei K. Incidence of anterior disc displacement without reduction of the temporomandibular joint in patients with

dentofacial deformity. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 47(4): 505-510. 2018.

Hira-Miyazawa M, Nakamura H, Hirai M, Kobayashi Y, Kitahara H, Bou-Gharios G, Kawashiri S. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. *Int J Oncol.* 52(2): 379-388. 2018.

Kobayashi K, Jokaji R, Miyazawa-Hira M, Takatsuka S, Tanaka A, Ooi K, Nakamura H, Kawashiri S. Elastin derived peptides are involved in the processes of human temporomandibular disorder by inducing inflammatory responses in synovial cells. *Mol Med Rep.* 16(3): 3147-3154. 2017.

Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Int J Oncol.* 50(1):41-48, 2017.

Kitahara H, Hirai M, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. *Oncol Rep.* 36(6):3139-3144, 2016.

Kimura I, Kitahara H, Ooi K, Kato K, Noguchi N, Yoshizawa K, Nakamura H, Kawashiri S. Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett.* 11(1):201-207, 2016.

Chiba T, Soeno Y, Shirako Y, Sudo H, Yagishita H, Taya Y, Kawashiri S, Okada Y,

Imai K. MALT1 Inhibition of Oral Carcinoma Cell Invasion and ERK/MAPK Activation. *J Dent Res.* 95(4): 446-452. 2016.

Shibata M, Chiba T, Matsuoka T, Mihara N, Kawashiri S, Imai K. Krüppel-like factors 4 and 5 expression and their involvement in differentiation of oral carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 8(4): 3701-3709. 2015.

〔学会発表〕(計 16 件)

宮澤(平)真優子、中村博幸、川尻秀一. ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞の細胞膜上での MMP の分解による PD-L1 発現量調節機構. 第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会総会 2017 年 11 月 4 日(岩手)

Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, Kawashiri S, Nakamura H. The role of PD-L1 in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. European Society for Medical Oncology 2017 年 9 月 8 日~9 月 12 日(スペイン)

Kitahara H, Hirai M, Kobayashi Y, Nakamura H, Kawashiri S. Oral squamous cell carcinoma cells were sensitized to cetuximab by Eribulin via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. 2017 年 9 月 8 日~9 月 12 日(スペイン)

加藤広祿、北原寛子、野口夏代、中村博幸、川尻秀一. 口腔扁平上皮癌細胞の Invadopodia 形成と癌関連線維芽細胞(CAF)との関連, 第 41 回頭頸部癌学会 2017 年 6 月 8 日~6 月 9 日(京都)

吉本泰祐、小林泰、北原寛子、野口夏代、加藤広祿、川尻秀一. Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERK pathway. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 2017 年 1 月 26 日~1 月 27 日(福岡)  
加藤広祿、宮澤広樹、加藤阿希、平井真

理子、吉本泰祐、木村依世、北原寛子、野口夏代、中村博幸、川尻秀一. 口腔扁平上皮癌細胞の Invadopodia 形成と癌関連線維芽細胞 (CAF) との関連 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術集会 2016 年 11 月 25 日～11 月 27 日 (千葉)

Kitahara K, Hirai M, Nakamura H, Kawashiri S. Eribulin differentiates cetuximab resistant oral squamous cell carcinoma cells to sensitive by inducing mesenchymal-epithelial transition (MET). 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. 2016 年 7 月 9 日～7 月 12 日 (英国)

Hirai M, Kitahara K, Kimura I, Kato K, Bou-Gharios G, Nakamura H, Kawashiri S. The regulation of PD-L1 expression at microenvironment of high grade invasive human oral squamous cell carcinoma.

24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research. 2016 年 7 月 9 日～7 月 12 日 (英国)

北原寛子、中村博幸、平井真理子、加藤広祿、川尻秀一. エリブリンのセツキシマブ非感受性口腔癌細胞での作用検討 第 40 回頭頸部癌学会 2016 年 6 月 9 日～6 月 10 日 (埼玉)

北原寛子、中村博幸、平井真理子、加藤広祿、川尻秀一. セツキシマブ非感受性口腔癌細胞でのエリブリンの作用検討 第 70 回日本口腔科学会学術集会 2016 年 4 月 16 日～4 月 17 日 (福岡)

平井真理子、中村博幸、川尻秀一. 口腔扁平上皮癌における PD-L1 発現の検討 第 52 回日本口腔組織培養学会学術大会 2015 年 11 月 20 日～11 月 21 日 (徳島)

中村博幸、北原寛子、木村依世、川尻秀一. セツキシマブ非感受性口腔癌の解析と新しい治療法の検討 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2015 年 10

月 16 日～10 月 18 日 (徳島)

中村博幸、川尻秀一. 口腔扁平上皮癌における EGFR 発現と浸潤様式の相関と上皮間葉移行の関与. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日 (愛知)

吉本泰祐、滝野隆久、堂本貴寛、川尻秀一、佐藤博. Vinculin は MEK/ERK 経路を介した MT1-MMP の転写を負に制御する. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日 (愛知)

Nakamura H, Kimura I, Kitahara H, Kawashiri S. Loss of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial mesenchymal transition. European Cancer Congress 2015. 2015 年 9 月 25 日～9 月 29 日 (オーストリア)

Kimura I, Kitahara H, Nakamura H, Kawashiri S. Loss of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial mesenchymal transition. The Joint Meeting of 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology and 39th Annual Meeting of Japan Society for Head and Neck Cancer 2015 年 7 月 3 日～7 月 6 日 (兵庫)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川尻 秀一 (KAWASHIRI SHUICHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 30291371

### (2)研究分担者

中村 博幸 (NAKAMURA HIROYUKI)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号 : 30542253