

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11097

研究課題名(和文) 口腔癌における新規リンパ管新生抑制因子の機構解明

研究課題名(英文) Inhibition of lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山根木 康嗣 (YAMANEGI, KOJI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00434944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株およびリンパ管内皮細胞株における血管新生因子、内因性血管抑制因子とその受容体の発現をヒストン脱アセチル化阻害剤、DNAメチル化阻害剤またはmTOR阻害剤を作用させ網羅的に解析し、発現が増加する因子を絞り込んだ。更に、候補因子の中からVEGF-CもしくはVEGFR-3と複合体を形成する因子を同定し最終候補因子とした。これらの因子はリンパ管増殖抑制効果を示した。このことから、リンパ管形成の制御には血管新生抑制因子が関わっており、これらの因子はepigeneticな要因により制御され、これを解除する事でリンパ管形成をコントロール出来る事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the anti-angiogenic and/or endogenous anti-angiogenic factors inhibited lymphangiogenesis on oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). Real time Microarray PCR revealed that some candidate of anti-angiogenic and/or endogenous anti-angiogenic factors were found out OSCC treated epigenetic modulators, such histone deacetylase inhibitor, DNA methylation inhibitor and mTOR inhibitor. To narrow down them further, these candidate factors were performed immunoprecipitation with VEGF-C or VEGFR-3. The candidate factor inhibits growth of lymphendothelial cells and tube formation. This result suggest that cancer-induced lymphangiogenesis could be controlled by epigenetic modulator.

研究分野：口腔病理学

キーワード：新生リンパ管抑制 扁平上皮癌 血管新生抑制因子

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は全世界で毎年約 60 万人が発症していると推測されており、その中でも口腔扁平上皮癌は 60%を占めるといわれている。その発症率はわが国においても年々増加傾向にある。現在の治療法は腫瘍の広範切除に加え、術前・術後の化学・放射線療法が一般的に用いられている。しかし、口腔扁平上皮癌は比較的早期に頸部リンパ節や肺転移を来す事が指摘されており、頸部リンパ節転移を認めた症例ではその生存率は半減するといわれている。従って、口腔扁平上皮癌の治療成績の向上のためには、リンパ節および肺転移の抑制又は転移巣を消滅させる新たな治療法を開発し、外科・化学療法と併用して行う必要がある。

### 2. 研究の目的

リンパ管の形成は静脈からのリンパ管内皮細胞の出芽によって始まると考えられており、血管新生促進に関わるシグナル伝達経路がリンパ管新生を誘導することが報告されている。これらのことは血管新生抑制因子がリンパ管新生の抑制にも関与している可能性が示唆される。通常、血管新生は促進因子と抑制因子のバランスによってコントロールされているため、限られた部分でしかみられない。しかし腫瘍内では促進因子と抑制因子の量的バランスが不平衡で、血管新生促進因子が優勢な状態であると考えられている。実際、血管新生においても内因性の抑制因子(ネガティブフィードバック分子)がいくつか同定されており、angiostatin等が血管新生阻害薬として使用されている。しかし血管新生形成メカニズムの解明に比べ、リンパ管新生については未知な領域が多い。本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞が発現する内因性血管抑制因子の中でリンパ管抑制に関わる因子に着目し、ヒト口腔扁平上皮癌におけるリンパ行性転移の抑制を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株に epigenetic modulator(ヒストン脱アセチル化阻害剤(HDACI)、DNAメチル化阻害剤(DNMTI)または mTOR 阻害剤)を作用させ、血管新生因子、内因性血管抑制因子およびそれらの受容体の発現の変化をリアルタイム PCR アレーにて検索する。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、患者由来口腔扁平上皮癌細胞株(8株)、リンパ管内皮細胞株における内因性血管新生抑制因子とその受容体の発現の有無を検索する。  
(患者由来口腔扁平上皮癌細胞株は共同研

### 研究者樹立済み)

- 内因性血管新生抑制因子およびその受容体の発現を RT-PCR にて確認する。
- 蛋白発現は Western blot 法にて、可溶性蛋白は培養上清を ELISA 法にて確認する。
- 患者由来口腔扁平上皮癌細胞株の結果は、臨床データ(転移や予後)との対比によってリンパ行性転移との密接な関係を総合的に判断する。

(3) 上記 (1) で得られた内因性血管新生抑制因子と VEGF-C もしくは VEGFR-3 との結合性を検索する。

- 免疫沈降にて確認する。

(4) 上記(1)、(2)の結果より候補蛋白がリンパ管内皮細胞に対して増殖抑制効果が認められるかを検討する。

- 増殖抑制効果は MTT 法にて測定する。
- ファイブロネクチンコーティング dish を用い、tube formation にて評価する。

(5) epigenetic modulator 作用させたヒト扁平上皮癌細胞株の培養上清をリンパ管内皮細胞株培養上清に加え、リンパ管細胞の遊走能と管腔形成(tube formation)への影響を *in vitro* で検討する。

(6) 当院歯科口腔外科で扁平上皮癌の切除手術を施行された検体を収集し、候補因子の発現を免疫組織化学染色もしくは *in situ* にて染色し、臨床データ(リンパ節転移や予後)との関係を評価する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株に HDACI, DNMTI, mTOR 阻害剤を作用させ、リアルタイム PCR アレーにて、血管新生因子、内因性血管抑制因子およびそれらの受容体の発現が 4 倍以上の増減を示した因子を 18 種類同定した。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、患者由来口腔扁平上皮癌細胞株(8株)、リンパ管内皮細胞株における上記候補因子とその受容体の発現を検討した。

- 上記候補因子とその受容体の発現を RT-PCR にて発現を確認した。
- ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、患者由来口腔扁平上皮癌細胞株(8株)において Western blot 法にて、HDACI, DNMTI, mTOR 阻害剤作用群と対照群の蛋白発現を Bio-Rad 社の imaging

システムを用い、dotの濃度を比較、数値化した。

(3) 上記 (1)(2)で得られた内因性血管新生抑制因子とVEGF-CもしくはVEGFR-3との結合性を検索した。

a. Protein A magnetic beadsを用いて免疫沈降をした結果、3種類の最終候補因子を決定した。

(4) 上記(3)の結果より最終候補蛋白がリンパ管内皮細胞に対して増殖抑制効果が認められるかを検討した。

a. MTT 法にてリンパ管内皮細胞の増殖能を測定した結果、濃度依存的に増殖抑制効果を示す事を確認した。

b.上記の結果を反映して、リンパ管管腔形成能も抑制されていた。

(5) epigenetic modulator 作用させたヒト扁平上皮癌細胞株の培養上清をリンパ管内皮細胞株培養上清に加え、リンパ管細胞の遊走能と管腔形成(tube formation)への影響を *in vitro* で検討した。

a. ダブルチャンバーを用いたところ、対照群と比較して、遊走能は有意に抑制された。

b. リンパ管管腔形成能も抑制されていた。

(6)当院歯科口腔外科で扁平上皮癌の切除手術を施行された検体を収集し、最終候補因子の発現を免疫組織化学染色もしくは *in situ* にて染色し、臨床データ(リンパ節転移や予後)との関係を評価した。

a. 切除検体 40 例、正常口腔粘膜(対照群)10 例を用いて、最終候補因子について免疫組織化学染色を施行、比較検討したところ、有意な所見が得られた。

b. a.の結果を踏まえ、有意な結果を得た28 例について手術時リンパ節転移の有無を検索した結果、28 例中3 例と今現在明らかな有意差は見られていない。

**以上より、*in vitro* において epigenetic modulator は血管新生抑制因子の発現を促進する事により、腫瘍血管新生のみならずリンパ管新生もコントロールできる事が示唆された。**

## 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 13 件)

1. Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Nishiura H. Erythroblast differentiation at spleen in Q137E mutant ribosomal protein S19 gene knock-in C57BL/6J mice, *Immunobiology.*, 223(1), 118-124, 2018 (doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.003.) 査読(有)

2. Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Nishiura H. Participation of delta annexin A3 in the ribosomal protein S19 C-terminus-dependent inhibitory mechanism of the neutrophil C5a receptor through delta lactoferrin, *Pathol int.*, 68(2), 109-116, 2018 (doi: 10.1111/pin.12626.) 査読(有)

3. Yamada N, Kato-Kogoe N, Yamanegi K, Nishiura H, Fujihara Y, Fukunishi S, Okamura H, Terada N, Nakasho K., Inhibition of asparagine-linked glycosylation participates in hypoxia-induced down-regulation of cell-surface MICA expression, *Anticancer Res.*, 38(3), 1353-1359, 2018 (doi: 10.21873/anticancer.12358) 査読(有)

4. Yamanegi K, Kawakami T, Yamada N, Kumanishi S, Futani H, Nakasho K, Nishiura H. The roles of a ribosomal protein S19 polymer in a mouse model of carrageenan-induced acute pleurisy. *Immunobiology* 2017; 222: 738-750. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2017.02.001>) 査読(有)

5. Kusafuka K, Kawasaki T, Maeda M, Yamanegi K, Baba S, Ito Y, Inagaki H, Nakajima T. Salivary duct carcinoma with rhabdoid features: a salivary counterpart against pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 2017; 70(2): 164-173. (doi: 10.1111/his.12987.) 査読(有)

6. Nishiura H, Kawakami T, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, Nakasho K, Yamanegi K. RP S19 C-terminal peptide trimer acts as a C5a receptor antagonist. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2016; 7: 70-76. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.05.006>) 査読(有)

7. Kato-Kogoe N, Ohyama H, Okano S, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Nishiura H, Abiko Y, Terada N, Nakasho K. Functional analysis of differences in

transcriptional activity conferred by genetic variants in the 5' flanking region of the IL12RB2 gene. *Immunogenetics* 2015; 68: 55-65.

(doi: 10.1007/s00251-015-0882-x.) 査読(有)

**8.** Kuroda Y, Kato-Kogoe N, Tasaki E, Yuasa-Sunagawa M, Yamanegi K, Nakasho K, Nakase I, Futaki S, Tohyama Y, Hirose M. Suppressive effect of membrane-permeable peptides derived from autophosphorylation sites of the IGF-1 receptor on breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2015; 765: 24-33. (doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.004.) 査読(有)

**9.** Nishiura H, Yamanegi K, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, Nakasho K. The roles of ribosomal protein S19C-terminus in a shortened neutrophil lifespan through delta lactoferrin. *Immunobiology* 2015; 220: 1085-1092. (doi.org/10.1016/j.imbio.2015.05.006.) 査読(有)

**10.** Kawabe M, Ohyama H, Kato-Kogoe N, Yamada N, Yamanegi K, Nishiura H, Hirano H, Kishimoto H, Nakasho K. Expression of interleukin-34 and colony stimulating factor-1 in the stimulated periodontal ligament cells with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Med Mol Morphol* 2015; 48, 169-176. (doi: 10.1007/s00795-014-0094-8.) 査読(有)

**11.** Yamanegi K, Kawabe M, Futani H, Nishiura H, Yamada N, Kato-Kogoe N, Kishimoto H, Yoshiya S, Nakasho K. Sodium valproate, a histone deacetylase inhibitor, modulates the vascular endothelial growth inhibitor mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells. *Int J Oncol* 2015; 46: 1994-2002. (doi: 10.3892/ijo.2015.2924.) 査読(有)

**12.** Hirano H, Kizaki T, Ito T, Okimura A, Yamanegi K, Nakasho K. Expression of adhesion molecules and the proliferative activity of carcinosarcoma of the ovary. *Anticancer Res* 2014; 34: 7351-7356. 査読(有)

**13.** Nishiura H, Yamanegi K, Kawabe M, Kato-Kogoe N, Yamada N, Nakasho K. Annexin A3 plays a role in cytoplasmic calcium oscillation by extracellular

calcium in the human promyelocytic leukemia HL-60 cells differentiated by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Exp Mol Pathol* 2014; 97: 241-246.

(doi: 10.1016/j.yexmp.2014.07.010.) 査読(有)

[学会発表](計 15 件)

### (特別講演)

**1.** 西浦弘志, 山田直子, 中正恵二, 藤渕 航, 山根木康嗣. 137 番グルタミンをグルタミン酸に変異した S19 リボソーム蛋白質遺伝子をノックインした C57BL/6J 系マウスの全身性エリテマトーデス様病態、**2017 年度生命科学系学会合同年次大会**、2017.12.06 神戸市。

### (国内学会)

**1.** 西浦弘志, 山田直子, 山根木康嗣, 中正恵二. 137 番グルタミンをグルタミン酸に変異した S19 リボソーム蛋白質遺伝子をノックインした C57BL/6J 雌マウスの全身性エリテマトーデス様病態の解明、第 54 回日本補体学会学術集会、2017.9.01 福島市。

**2.** 西浦弘志, 山根木康嗣, 中正恵二. 全身性シェーグレン症候群様の病態を呈する Gln137Glu 変異 RP S19 遺伝子ノックイン C57BL/6J マウス。第 **106 回日本病理学会総会** 2017.4.28 東京。

**3.** 山根木康嗣, 西浦弘志, 小越菜穂子, 和唐雅博, 岡村友玄, 富永和也, 田中昭男. 先天性エプーリスを疑われた症例。第 **27 回日本臨床口腔病理学会総会** 2016.8.11 広島市。

**4.** 西浦弘志, 山根木康嗣, 小越菜穂子, 中正恵二. Gln137Glu 変異 RP S19 遺伝子ノックインマウスの病態。第 **105 回日本病理学会総会** 2016.5.14 仙台市。

**5.** 山田直子, 山根木康嗣, 小越菜穂子, 西浦弘志, 中正恵二. 骨肉腫細胞における低酸素による細胞表面 MICA の発現低下。第 **38 回日本分子生物学会年会** 2015.12.2 神戸市。

**6.** 西浦弘志, 山根木康嗣. 部分的細胞恒常性維持機構欠損の C57BL/6J マウス病態への影響。第 **26 回日本臨床口腔病理学会総会** 2015.7.31 札幌市。

**7.** 山根木康嗣, 西浦弘志, 小越菜穂子, 和唐雅博, 岡村友玄, 富永和也, 西川哲成, 田中昭男. 下顎歯肉に発生した隆起性病変。

## 第26回日本臨床口腔病理学会総会

2015.7.30 札幌市 .

8. 山根木康嗣, 西浦弘志, 小越菜保子, 川邊睦記, 首藤敦史, 野口一馬, 岸本裕充, 中正恵二 . 上顎に発生した骨肉腫の1例 . **第104回日本病理学会総会** 2015.5.2 名古屋市 .

9. 西浦弘志, 山根木康嗣, 小越菜保子, 中正恵二 . 転移性エナメル上皮腫の鑑別法 . **第104回日本病理学会総会** 2015.5.2 名古屋市 .

10. 草深公秀, 前多松喜, 山根木康嗣, 大山秀樹, 村松浩二, 中島孝 . Salivary duct carcinoma with rhabdoid features (SDCRF)の臨床病理学的検討 . **第103回日本病理学会総会** 2014.4.26 広島市 .

(国際学会)

1. Kumanishi S, Yamanegi K, Futani H, Nakasho K, Yoshiya S. Sodium Valproate, a histone deacetylase inhibitor, induces the Expression of cell-surface NKG2D Ligand, MICA and B, with decreasing their soluble forms to enhance susceptibility of human osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Orthopaedic Research Society 2017 Annual meeting** 2017.03.20 (San Diego, California, USA)

2. Nishiura H, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K. The roles of ribosomal protein S19 polymer in acute pleurisy model C57BL/6J mice. **26th International Complement workshop** 2016.9.05 (Kanazawa, JAPAN)

3. Nishiura H, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K. A Sjögren's syndrome-like condition in Gln137Gly mutant RP S19 gene knocked-in C57BL/6J female mice. **International Congress of Immunology 2016** 2016.8.23 (Melbourne, Australia)

4. Kusafuka K, Kawasaki T, Maeda M, Yamanegi K, Baba S, Sugimura H, Ito Y, Inagaki H, Nakajima T. Salivary duct carcinoma with rhabdoid features is a salivary counterpart against pleomorphic lobular carcinoma of the breast: No or aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin. **United States and Canadian Academy of Pathology 2016 Annual Meeting** 2016.3.12 (Seattle, Washington, USA)

(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  
山根木 康嗣 (YAMANEGI, Koji)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00434944

(2)研究分担者  
中正 恵二 (NAKASHO, Keiji)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00217712

山田 直子 (YAMADA, Naoko)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10319858

西浦 弘志 (NISHIURA, Hiroshi)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90284760

野口 一馬 (NISHIURA, Hiroshi)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50309473

小越 菜保子 (KOGOE, Nahoko)  
兵庫医科大学・医学部・研究生  
研究者番号: 50309473