

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20791537

研究課題名（和文）：口腔扁平上皮癌リンパ節転移と VEGF 発現との関連の基礎的研究

研究課題名（英文）：The fundamental study of correlation between expression of VEGF and lymphmetastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

石田 喬之 (ISHIDA TAKAYUKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20404501

研究成果の概要（和文）：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2,HSC-4 を通常培養条件 (20%O₂, 5%CO₂, 37℃、低酸素培養条件(5%O₂, 5%CO₂, 37℃)で培養し VEGF の発現を免疫染色、RT-PCR にて比較した。免疫染色において低酸素状態で VEGF-C の発現の増大を認めた。RT-PCR にて低酸素条件で VEGF-C と MMP-9 の発現の増大を認めた。以上より低酸素状態により誘導される VEGF-C が口腔癌扁平上皮癌の転移能を増大させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The human oral squamous cell carcinoma cell lines, HSC-2 and HSC-4 cultured under normoxia (20%O₂,5%CO₂) and hypoxia (5%O₂, 5%CO₂, 37%). The expression of VEGF was assessed by immunohistochemical staining and RT-PCR. In immunohistochemical staining, the expression of VEGF-C was stronger under hypoxia rather than normoxia of each cell line. In RT-PCR, the expression of VEGF-C and MMP-9 were increase under hypoxia. Therefore this result suggests VEGF-C induced by hypoxia may increase ability of metastasis in oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、リンパ節転移、VEGF、低酸素

1. 研究開始当初の背景

口腔癌における、多くの臨床統計報告で所属リンパ節に転移を認めた症例の5年生存率は50%前後と報告されており、口腔癌治療において遠隔転移の制御がもっとも治療成績の向上が図れる因子であるといえる。そのためには転移のメカニズムを明らかにし、治療ターゲットとなる因子の検索が必要である。

そのために現在ヒト由来の癌細胞を用いて癌細胞の接着・浸潤能、細胞外基質タンパク分解酵素活性、細胞運動能などの多くの研究が行われている。

また多くの癌組織では癌細胞の旺盛な増殖能のため、癌細胞を栄養する血管網の構築が間に合わず低酸素状態に陥っている。癌細胞は低酸素状態に陥るとその環境を脱却するために様々な因子を誘導し、周囲環境を自己に有利な状態に改善しようとするのが知られている。その因子の一つに血管内皮細胞誘導因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)がある。

VEGFはA,B,C,D,EのファミリーがありVEGF-Aが血管新生、VEGF-C/Dがリンパ管新生を誘導することが知られている。様々な臨床研究においてVEGF-C発現とリンパ節転移との関連が示唆されており、転移のプロセスのモデルとして癌細胞がリンパ管新生を誘導することによりリンパ管の分布や面積が増え、結果的に癌細胞がリンパ管に浸潤する機会が増え、転移につながっているのではないかという概念が生まれた。

今回私は、口腔癌の所属リンパ節転移において低酸素状態におけるVEGF-C発現の増大が所属リンパ節転移に重要な役割を果たし

ているのではないかと考え、今回の研究を計画した。

2. 研究の目的

①低酸素状態がヒト由来口腔癌細胞株においてVEGF発現を誘導するかどうかを確かめる。

②VEGF発現と癌の転移能との関連をMatrix metalloproteinase(MMP)発現を調べることにより検討する。

3. 研究の方法

材料：ヒト口腔癌細胞株

HSC-2, HSC-4, OSC-19, KON

培養条件

通常培養条件 20%O₂, 5%CO₂, 37°C

低酸素条件 5%O₂, 5%CO₂, 37°C

培地は抗生剤含有 10%ウシ胎児血清培地を用いた。

①上記条件でそれぞれ細胞株を培養し70%の細胞密度に到達した時点で免疫染色にてHIF-1 α , VEGF-A/Cの発現を比較した。発現の定量は、Shibusaraらの免疫組織学化学的染色スコア法を用いて評価した。

②上記条件で14日間培養し、細胞数をカウント。細胞増殖曲線を調べ、低酸素状態が増殖能に関連するかを調べた。

③HSC-2, HSC-4を1.0 $\times 10^5$ ずつdishにまいて上記条件で48時間培養、total RNAを抽出しRT-PCR法にてVEGF-A/C/D発現とMMP-2,9のmRNA発現を調べた。

4. 研究成果

①通常培養条件ではすべての細胞株で VEGF-A/C の発現を認めたが、HSC-2、OSC-19、KON で VEGF-A が強発現した。また低酸素条件では HSC-2、HSC-4 で VEGF-C の発現の増大を認めた。HIF-1 α は通常培養では殆ど発現を認めず、低酸素状態で OSC-19 に強発現した。

②細胞増殖曲線を HSC-2、HSC-4、OSC-19、KON で通常条件、低酸素条件で比較したが有意差を認めず、低酸素状態は腫瘍細胞の増殖能には影響しないことが示唆された。

③HSC-2 では VEGF-A/D、MMP-2 発現に殆ど差を認めなかった。しかし低酸素条件で VEGF-C 発現がわずかに増大、MMP-9 の発現は増大した。HSC-4 も同様に低酸素条件で VEGF-C、MMP-9 の発現が増大した。

以上の結果より低酸素状態は今回調べた口腔癌細胞株増殖能には影響せず、HSC-2、HSC-4 において低酸素状態で VEGF-C と MMP-9 の発現が増大することがあきらかになった。

リンパ管新生のためにはリンパ上皮細胞が癌組織にむかって浸潤、さらに癌細胞がために細胞外マトリックスを分解する MMP を産生する必要があるが、癌細胞そのものも増殖、浸潤するために MMP の産生を増大させている。最近の研究で癌細胞の MMP 産生と VEGF 産生が相関しているとの報告がある。今回の結果では低酸素状態によって口腔癌細胞株の VEGF-C と MMP-9 発現が増大したことにより低酸素環境が癌細胞のリンパ管新生誘導能と浸潤能が増大させる可能性が示唆された。しかし MMP-9 の発現増大が VEGF-C によって誘導されたものか低酸素環境によって誘導される別の誘導因子によるものかは明らかにできなかったため、今後さ

らなる実験として RNAi による VEGF-C の Knock down で MMP-9 の発現が変化するかどうかを確かめる必要があると考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

①Upregulation of Notch pathway molecules in oral squamous cell carcinoma. Hiroshi Hijioka, Takao Setoguchi, Akihiko Miyawaki, HUI GAO, Takayuki Ishida, Seturo Komiya and Norifumi Nakamura.

International journal of oncology 36: 817-22, 2010.(査読有り)

②SUVmax of FDG-PET correlates with the effects of neoadjuvant chemotherapy for oral squamous cell carcinoma. Akihiko Miyawaki, Ryuji Ikeda, Hiroshi Hijioka, Takayuki Ishida, Mina Ushiyama, Eturo Nozoe and Norifumi Nakamura. Oncology reports 23: 1205-12 2010.(査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

①肥厚性カンジダ症に対するイトラコナゾール内用液(ITCZ-S)の使用経験。石田喬之、宮脇昭彦、五味暁憲、上川善昭、中村典史。第 19 回日本口腔粘膜学会総会 2009 年 6 月 6 日、神奈川

②舌下腺悪性腫瘍の画像所見～耳下腺・顎下腺悪性腫瘍との比較～。石田喬之、河津俊幸、吉浦一紀。第 28 回日本歯科放射線学会関西・九州合同地方会：2009 年 1 月 24, 25 鹿児島

③当科における口腔扁平上皮癌患者の頸部リンパ節転移の診断精度に関する検討。比地

岡浩志、石田喬之、宮脇昭彦、野添悦郎、馬嶋秀行、中村典史。第 12 回九州地区口腔癌研究会学術講演 2008 年 9 月 5 日、宮崎

④口腔扁平上皮癌における Notch シグナルの発現とその意義。比地岡浩志、宮脇昭彦、石田喬之、中村典史。第 62 回日本口腔科学会総会 2008 年 4 月 17、18 日、福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 喬之 (ISHIDA TAKAYUKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20404501