

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20510

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の組織内血小板による浸潤、転移能獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of permeation, metastaticity acquisition mechanism due to the platelet in the tissue in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

北原 寛子 (KITAHARA, HIROKO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：70507053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が転移・浸潤していくには、癌細胞自身が上皮間葉転換(EMT)を来し、また腫瘍周囲に免疫抑制性の微小環境を構築することが不可欠である。近年、血管内の血小板が癌細胞を被覆し、EMT誘導し、浸潤・転移促進に作用することが注目されている。本研究では、口腔扁平上皮癌由来細胞株と血小板を共培養し、上皮間葉転換誘導について検討した。結果、上皮間葉移行がおきている可能性が示唆された。また、口腔扁平上皮癌患者より得られた組織標本を免疫染色したところ、浸潤性が高い症例では腫瘍は間葉系の性質を持つ傾向にあり、周囲に血小板凝集を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order for cancer cells to metastasize and invade, it is important for cancer cells to develop epithelial mesenchymal transition (EMT) and to construct an immunosuppressive microenvironment around the tumor. In recent years, attention has been drawn that platelets in blood vessels coat cancer cells, induce EMT, and act to promote invasion, metastasis. In this study, we investigated the induction of epithelial mesenchymal transition by coculturing oral squamous cell carcinoma cell line and platelets. As a result, it is suggested that epithelial mesenchymal transition may occur. In addition, immunostaining of tissue specimens obtained from oral squamous cell carcinoma patients showed that tumors tended to have mesenchymal characteristics in cases with high invasiveness. And it is suggested that platelet aggregation may be caused around.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 血小板 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は浸潤・転移の各段階で免疫担当細胞の攻撃により大部分は死滅すると考えられているが、実際には癌細胞は免疫担当細胞の攻撃から逃避している(免疫寛容)。癌細胞が転移・浸潤していくには、癌細胞自身が上皮間葉転換(EMT)を来し、また腫瘍周囲に免疫抑制性の微小環境を構築することが不可欠である。これまで我々は、口腔扁平上皮癌を山本・小浜分類により浸潤様式を1、2、3、4C、4D型の5つに分類し、検討してきた。その結果、とくに4D型の高浸潤癌は高転移性で、化学療法や放射線療法への耐性を獲得しており、5年生存率も最も低いことが認められ、報告してきた。4D型の高浸潤癌は浸潤先端部において、数個の癌細胞のクラスターを形成しながら浸潤しているが、このような少ない数の癌細胞の集団でありながら免疫担当細胞の攻撃から逃避し、しかも抗がん剤や放射線に対し耐性を獲得している。癌細胞自身が腫瘍周囲になんらかの手段で免疫抑制性の微小環境を構築し、また上皮間葉転換(EMT)を誘導していることが推定されるが、これらに関する詳細なメカニズムは全く明らかになっていない。

近年、血小板の転移形成における役割が注目されている。血管内に侵入した癌細胞は24時間以内にその99.9%が死滅するが、残った0.1%の癌細胞が生存し転移を形成する。血小板は、循環血液中の癌細胞を取り囲むことで免疫細胞の攻撃を阻害するとともに転移巣への生着を高め、上皮間葉移行(EMT)を誘導することで組織内進入を促進することが明らかになってきた。血小板凝集因子ポドプラニン/アグラスは、血小板上のCLEC-2と結合することで癌の血行性転移を引き起こす。ポドプラニン/アグラスは、肺癌、食道癌、頭頸部癌、脳腫瘍、悪性中皮腫などに高発現し、患者の予後と相関する。ポドプラニン/アグラスを標的とした中和抗体も開発され、この抗体がポドプラニン/アグラス依存的な血小板凝集および実験的肺転移を抑制されることが報告されている。さらに、膵臓癌において組織中にも血小板は移行し、癌細胞を取り囲み、この微小環境においてTGF-beta等のEMT誘導因子を放出して癌細胞を刺激し、浸潤転移を促進することが明らかになってきている。

口腔扁平上皮癌においても、組織中に移行した血小板は4D型口腔扁平上皮癌の浸潤先端部において癌細胞を被覆し免疫寛容が誘導されるとともに、EMT様および癌幹細胞化の変化を誘導し、浸潤・転移に有利な環境を形成している可能性が考えられる。さらに、癌幹細胞として選別される細胞はEMTが誘導されている状態にあることが示されていることから、血小板凝集は幹細胞維持のための微小環境(ニッチ)として機

能している可能性も考えられた。

2. 研究の目的

これまでの予備実験のうち、浸潤様式の異なる口腔扁平上皮癌細胞株を用いてEMT誘導状態を検討した結果では、浸潤性が高い4D型細胞では3型、4C型細胞と比較し、EMT関連遺伝子のうち間葉系マーカー(Vimentin、N-cadherin、Snail)の発現が高く、一方上皮マーカー(E-cadherin)の発現は低下していた。これらの結果より4D型口腔扁平上皮癌細胞はEMTを獲得していると考えられるが、どのような微小環境でEMTを獲得したかは不明で、これまで詳細な検討も行われていない。そこで血小板が4D型口腔扁平上皮癌の浸潤先端部において癌細胞を被覆し免疫寛容が誘導されるとともに、EMT様および癌幹細胞化の変化を誘導しているのではないかと考えた。微小環境の形成と血小板凝集との関係を明らかにするため、血管外に漏出した組織内血小板の凝集と4D型口腔扁平上皮癌の浸潤先端部の癌細胞のクラスター形成との関係や、血小板凝集がつくる微小環境での癌細胞のEMT誘導状態を検討することとした。

3. 研究の方法

(1)血小板との共培養下での、口腔扁平上皮癌細胞株のEMT誘導

口腔扁平上皮癌由来細胞株は、口腔扁平上皮癌罹患患者の転移リンパ節より樹立した細胞株OSC-20細胞(癌浸潤様式:山本・小浜分類3型細胞)を使用する。ヒト血小板は、成人より同意を得て採取した血液から遠心分離して調整する。血小板はトロンピン0.5U/mlを37℃で15分処理し活性化。それぞれの癌細胞と血小板は、10%FCSを添加したDMEM培地で培養する。培養開始後、24時間ごとに72時間まで細胞の形態の変化の観察を行い、上皮細胞の形態からやや紡錘状の形態に変化するEMT様の形態変化が誘導されているかを観察する。さらに、同様に、培養開始後、24時間ごとに72時間までmRNA抽出を行う。抽出したmRNAよりcDNAを合成する。蛍光プローブを用いたTaqManプローブ法によるreal-time RT-PCR法を用い比較Ct法にて定量化する。EMT関連遺伝子のうち間葉系マーカー(Vimentin、N-cadherin、Snail)と上皮マーカー(E-cadherin)の発現の変化を検討する。

(2)口腔扁平上皮癌組織中の血小板の局在と癌細胞でのポドプラニン/アグラスの発現

金沢大学附属病院歯科口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌一次症例患者より得られた組織標本を対象とする。組織標本をホルマリン固定後、パラフィン包埋したものを使用し、HE染色後各症例の癌浸潤様式(山

本・小浜分類)を判定する。さらに、抗血小板抗体(Anti-GPIba、Anti-CD42b)、抗ポドプラニン/アグラス抗体および EMT 関連タンパク (Vimentin、N-cadherin、Snail、E-cadherin) に対する抗体を用いた免疫組織化学染色にて検討する。得られた結果よりそれぞれのタンパクの局在を検討し、特に 4D 型高浸潤癌の浸潤先端部の数個の癌細胞クラスター周囲を中心に観察する。

4. 研究成果

(1) 血小板との共培養下での、口腔扁平上皮癌細胞株の EMT 誘導

OSC-20 細胞は予備実験から口腔扁平上皮癌細胞の中でも上皮系マーカーの発現が強く EMT 獲得がされていないものと思われた。そのため血小板との共培養により EMT 関連マーカーの発現に変化が認められるかを検討した。その結果、血小板と共培養しなかった細胞と比較したところ、上皮系マーカーには発現変化はあまり認められなかった。しかし、間葉系マーカーである、N-cadherin では上昇が認められ、Snail でもわずかに上昇傾向が認められた。これらの結果から血小板との共培養により OSC-20 細胞は間葉系へ移行する傾向が認められ、血小板は EMT 獲得になんらかの影響を与えているのではないかと考えられた。

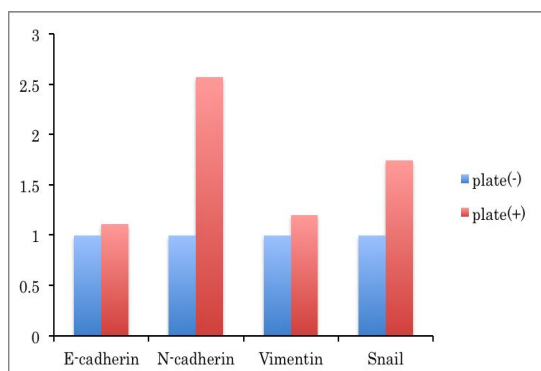


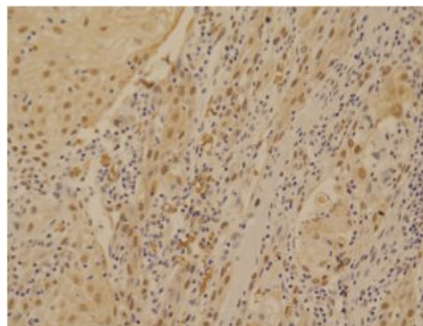
図 1 OSC-20 細胞における血小板共培養下での EMT 関連マーカーの RNA 発現変化 (real-time RT-PCR) plate(-)の発現量を 1 として比較

(2) 口腔扁平上皮癌組織中の血小板の局在と癌細胞でのポドプラニン/アグラスの発現

浸潤様式 4D 型患者より得た組織標本より切片を作成し、免疫組織化学染色を行い、癌組織における血小板や EMT 関連マーカーのタンパクの発現部位について検討した。その結果、Snail、Vimentin、Podoplanin は腫瘍細胞に発現が認められた。また、CD42b の発現は腫瘍の周囲組織に認められた。つまり、浸潤性が高い症例では、腫瘍

は間葉系の性質を持つ傾向にあり、周囲に血小板凝集を引き起こしている可能性が示唆された。

Snail



CD42b

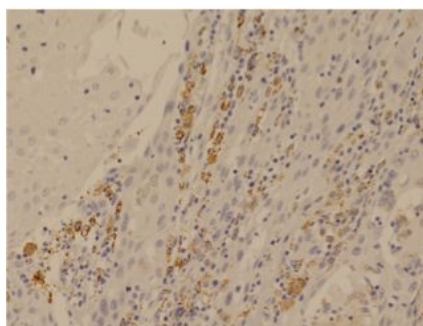


図 2 免疫組織化学染色

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 3 件)

M Hirai, H Kitahara, Y Kobayashi, K Kato, G Bou-gharios, H nakamura, S Kawashiri Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment. International Journal of Oncology 査読有 50 2017 41-48 DOI:10.3892/ijo.2016.3785

H kitahara, M Hirai, K Kato, G Bou-gharios, H Nakamura, S kawashiri Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. Oncology Reports 査読有 36 2016 3139-3144 DOI:10.3892/or.2016.5189

I Kimura, H Kitahara, K Ooi, K Kato, N Noguchi, K Yoshizawa, H Nakamura, S Kawashiri Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and

epithelial-mesenchymal-transition.
Oncology Letters 査読有 11(1) 2016
201-207 DOI:10.3892/ol.2015.3833

〔学会発表〕(計9件)

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大会 2016年11月26日 幕張メッセ(千葉)

野口夏代、平井真理子、加藤阿希、吉本泰祐、木村依世、北原寛子、大井一浩、加藤広祿、中村博幸、川尻秀一 薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)の早期発見における bone scan index の有用性 第61回日本口腔外科学会総会学術大会 2016年11月25日 幕張メッセ(千葉)

H kitahara, M Hirai, H Nakamura, S Kawashiri Eribulin differentiaes cetuximab resistant oral squamous cell carcinoma cells to sensitive by inducing mesenchymeal-epithelial transition(MET) 24thBiennial congerss of the European associateon for cancer research 2016年7月10日 Manchester(UK)

M hirai, H kitahara, I Kimura, K kato, G Bou-gharios, H nakamura, S Kawashiri The regulateon of PD-L1 exprression at microenvironment of high grade invasive human oral squamous cell carcinoma 24thbiennial congerss of the European associateon for cancer research 2016年7月10日 Manchester(UK)

北原寛子、中村博幸、加藤広祿、野口夏代、大井一浩、川尻秀一 エリプリンのセツキシマブ非感受性口腔癌細胞での作用機序 第40回日本頭頸部癌学会 2016年6月10日ソニックシティ(埼玉)

北原寛子、平井真理子、中村博幸、川尻秀一 セツキシマブ非感受性口腔癌細胞でのエリプリンの作用検討 第70回日本口腔科学会 2016年4月17日福岡国際会議場(福岡)

平井真理子、北原寛子、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70回日本口腔科学会 2016年4月16日福岡国際会議場(福岡)

H Nakamura, I Kimura, H Kitahara, A Kawashiri Loss of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition The Joint Meeting of 4th Congress go Asian Society of Head and Neck Oncology(ASHNO) and 39th Annual Meeting of Japan Society for Head and Neck Cancer(JSHNC) 2015年6月3-6日 神戸国際会議場(兵庫)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北原 寛子 (KITAHARA, Hiroko)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：70507053