

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20575

研究課題名(和文) 癌幹細胞周囲微小環境に着目した転移抑制効果の検討

研究課題名(英文) Examination of metastasis suppression effect focusing on tumor microenvironment around cancer stem cells

研究代表者

武田 大介 (Takeda, Daisuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80755637

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)：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を継代し通常培養と低酸素培養を行った。また、臨床検体として原発巣と正常組織を採取した。酸素条件と分化度の違いによる幹細胞性因子の発現を検討した。その結果、低酸素培養細胞と中・低分化型臨床検体で、Oct3/4, Sox2, Nanogの有意な発現上昇が認められた。さらに、後ろ向きに術後経過が調査可能であった患者の病理組織検体を収集し検討した。その結果、Oct3/4, Sox2, Klf4の高発現が3年疾患特異的生存率の有意な低下と関係した。また、リンパ管新生能因子の発現も検討した。その結果、PodoplaninとLYVE-1の高発現が頸部リンパ節転移と有意に関係した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、癌幹細胞理論が提唱され、癌幹細胞が治療抵抗性や再発に重要な役割を果たしていると考えられている。また、癌幹細胞がその幹細胞の性質を維持するためには、癌細胞周囲微小環境が必要とされ、上皮系腫瘍である扁平上皮癌が、間葉組織で新たに転移巣を形成できるのは、自己複製能をもつ癌幹細胞様の細胞が存在するからだと考えられている。口腔扁平上皮癌においても、幹細胞性因子の発現が低酸素、分化度・転移能などの腫瘍の悪性度や予後と関連する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of induced pluripotent stem cell related genes in vitro and in clinical samples to identify their relationships with hypoxia and tumorigenesis. Oral squamous cell carcinoma cells were used to show that expression levels of Oct3/4, Sox2, and Nanog were significantly increased in hypoxic condition in vitro and in moderately- and poorly-differentiated samples. The 3-year disease-specific survival rates of patients with high Oct3/4, Sox2 and Klf4 expression levels were significantly decreased. The expression levels of Podoplanin and LYVE-1 were significantly associated with cervical lymph node metastasis.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 癌幹細胞 幹細胞性因子 低酸素 分化度 疾患特異的生存率 リンパ管新生能因子 頸部リンパ節転移

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞研究の進歩により、固形癌や造血器腫瘍において癌幹細胞の存在が示唆されるようになった。正常組織は組織幹細胞を頂点とする階層性構造を呈することが知られているが、癌組織も幹細胞様の自己複製能と分化能を有する細胞、いわゆる癌幹細胞(cancer stem cell: CSC)と呼ばれる細胞を起点として階層性構造を構築していることが分かってきている。癌幹細胞はストレス回避能力が高いことから化学療法や放射線治療に抵抗性を示し、再発の原因となると考えられている。癌幹細胞がその幹細胞の性質を維持するためには、癌細胞周囲微小環境が必要と考えられており、転移先組織においても転移巣形成に癌細胞周囲微小環境が必要とされている。上皮系腫瘍である口腔扁平上皮癌が、血管新生やリンパ管新生を介して、転移先である間葉組織で新たに転移巣を形成するには自己複製能をもつ癌幹細胞様の細胞である必要があるが、原発巣や転移巣での癌幹細胞の機能については未だ解明されていない点も多い。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌において癌幹細胞の存在の確認とその性質について検討し、主な転移先であるリンパ節での転移巣形成に関わる因子を解明することにより、より未分化で悪性度の高い癌幹細胞のリンパ節転移機構についての新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vitro における幹細胞性因子の評価

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)を 37 °C、5% CO₂ で培養し、 1.0×10^7 個細胞を 6-well plate(通常培養)と 15ml tube(pellet culture:低酸素培養)へ各々継代培養し、1週間後に各々の細胞より RNA を抽出して、酸素条件の違いによる幹細胞性因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog)の発現量を Real-time PCR で検討した。

(2) 臨床検体を用いた幹細胞性因子の評価

当科で外科的手術を行った口腔扁平上皮癌患者 25 名の臨床検体(正常組織と腫瘍組織)より RNA を抽出して、分化度の違いによる幹細胞性因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog)の発現量を Real-time PCR で検討した。

後ろ向きに術後経過が調査可能であった 89 名の患者の病理組織検体を収集し、Nanog を除く幹細胞性因子の発現を免疫染色で検討した。なお、腫瘍組織における正常組織との発現量の比率を求め、疾患特異的生存率を primary outcome とし、高値群と低値群に分類し、予後との関連性を検討した。

より臨床検体収集を継続し口腔扁平上皮癌患者 33 名の臨床検体(正常組織と腫瘍組織)より RNA を抽出して、リンパ管新生能因子(Podoplanin, LYVE-1)の発現を Real-time PCR で検討し、免疫染色でも検討した。

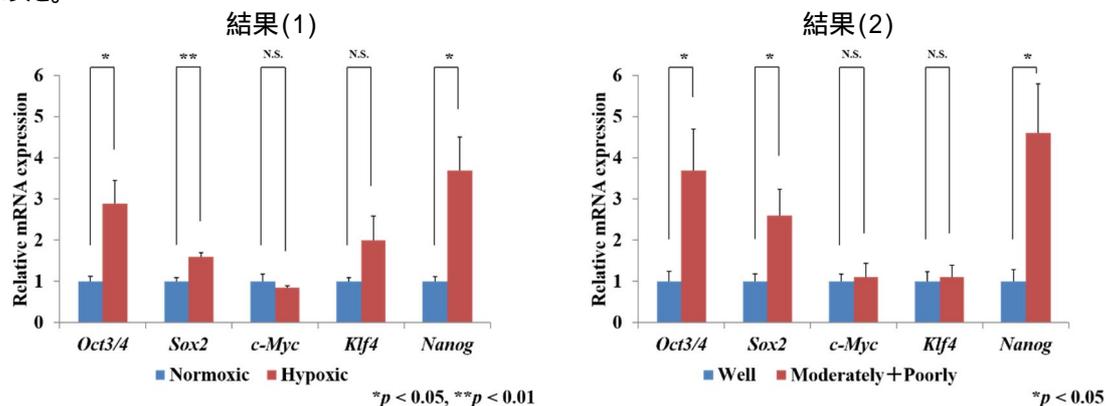
4. 研究成果

(1) In vitro における幹細胞性因子の評価

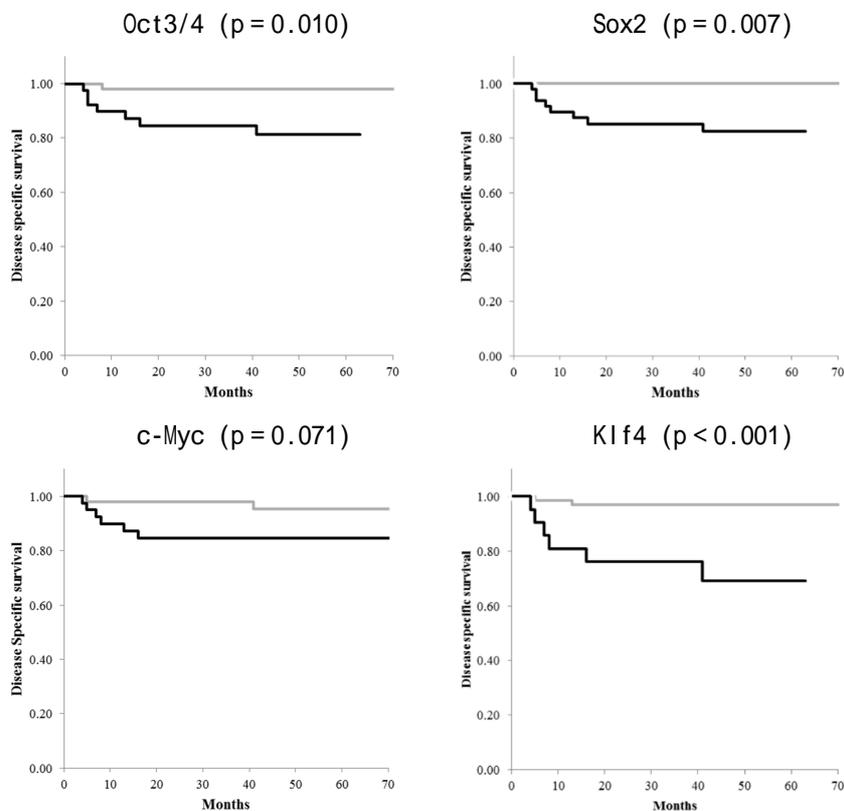
通常培養と比較して低酸素培養で、Oct3/4, Sox2, Nanog の有意な発現上昇を認めた。

(2) 臨床検体を用いた幹細胞性因子の評価

高分化型組織と比較して中・低分化型組織で、Oct3/4, Sox2, Nanog の有意な発現上昇を認めた。



Oct3/4, Sox2, Klf4 高値群は低値群と比較して、3年疾患特異的生存率の有意な低下を認めた。また、各因子の発現量と患者背景因子について単変量解析を行い、Oct3/4 高値群と頸部多発転移、分化度(中・低分化型)に統計学的に有意な関連性を認めた。さらに、各因子(高値群)・患者背景因子・病理組織学的因子と予後との関連性について多変量解析を行い、3年疾患特異的生存率に統計学的に有意に関連する因子は Klf4 高値群、分化度(中・低分化型)であった。



単変量解析結果

	n	Oct3/4 expression			Sox2 expression			c-Myc expression			Klf4 expression		
		- (n)	+ (n)	p値	- (n)	+ (n)	p値	- (n)	+ (n)	p値	- (n)	+ (n)	p値
分化度				0.044			0.271			0.125			0.801
中・低分化	32	13	19		12	20		14	18		24	8	
高分化	57	37	20		29	28		35	22		44	13	
頸部多発転移				0.020			0.774			0.391			0.115
あり	18	5	13		7	11		7	11		10	8	
なし	37	24	13		17	20		20	17		29	8	

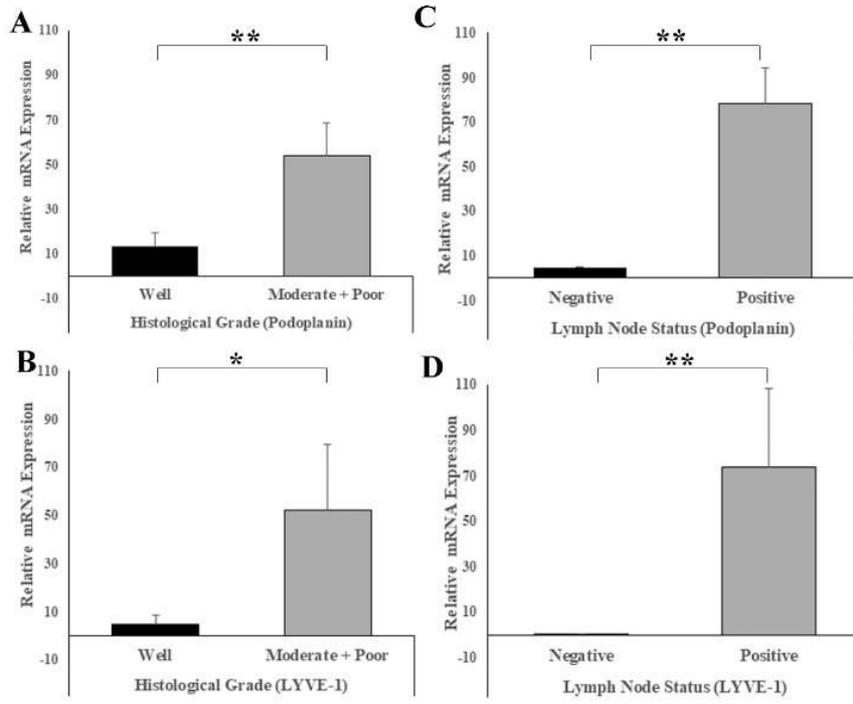
多変量解析結果

3年DSS	p 値	OR	95% CI	
			Lower	Upper
Klf4高値群(+)	0.004	10.28	2.069	51.098
分化度(中・低分化)	0.012	14.85	1.822	120.943

OR: Odds ratio, CI: Confidence interval

Oct3/4 と Sox2 は幹細胞の分化万能性や自己複製能を制御し、c-Myc は腫瘍形成作用を持ち、それぞれ予後不良との関連性が報告されている。一方、Klf4 は腫瘍形成作用と腫瘍抑制作用の相反する作用を持つが、予後不良との関連性もいくつか報告されている。本研究では、Klf4 の高発現が予後予測因子となる可能性が考えられた。口腔扁平上皮癌においても、幹細胞性因子の発現が低酸素、分化度・転移能などの腫瘍の悪性度や予後と関連する可能性が考えられた。

頸部リンパ節転移陰性群と比較して転移陽性群で、また、高分化型組織と比較して中・低分化型組織で、Podoplanin と LYVE-1 の有意な発現上昇を認めた。さらに、免疫染色では、頸部リンパ節転移陰性群と比較して陽性群で、Podoplanin と LYVE-1 の有意な発現上昇を認め、病理学的 T 分類において T1-2 群と比較して T3-4 群で、Podoplanin の有意な発現上昇を認めた。



免疫染色での発現結果

	Subjects	Podoplanin		P	LYVE-1		P
		Low	High		Low	High	
Pathological T stage							
T1-T2	17	10	7	0.005**	8	9	0.848
T3-T4	16	2	14		7	9	
Lymph node status							
Positive	15	1	14	0.001**	4	11	0.047*
Negative	18	11	7		11	7	
Histologic grade							
Well	13	7	6	0.09	7	6	0.435
Moderate + Poor	20	5	15		8	12	

**P<0.01, *P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda D, Hasegawa T, Iwata E, Harada R, Sakakibara A, Kawamoto T, Minamikawa T, Sakai Y, Komori T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Induced Pluripotent-stem-cell Related Genes Contribute to De-differentiation in Oral Squamous Cell Carcioma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1075-1082
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.21873/anticanres.11419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arimoto S, Hasegawa T, Takeda D, Saito I, Amano R, Akashi M, Komori T.	4. 巻 38
2. 論文標題 Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 6157-6162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.21873/anticanres.12968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muraki Y, Hasegawa T, Takeda D, Ueha T, Iwata E, Saito I, Amano R, Sakakibara A, Akashi M, Komori T.	4. 巻 39
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cell-related Genes Correlate With Poor Prognoses of Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1205-1216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.21873/anticanres.13231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江崎友美・長谷川巧実・武田大介・寛康正・明石昌也・南川勉・古森孝英
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるiPS細胞関連因子の発現率と予後の関連性
3. 学会等名 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田大介・長谷川巧実・江崎友美・榊原晶子・明石昌也・南川勉・古森孝英
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における人工多能性幹細胞関連因子の発現について
3. 学会等名 第37回(一社)日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有本智美・長谷川巧実・八谷奈苗・天野利香・齊藤泉・武田大介・明石昌也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるリンパ管新生とリンパ節転移
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----