

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390549
 研究課題名（和文）ケモカインシグナルを介した口腔癌転移機構の解析と転移抑制の分子標的治療
 研究課題名（英文）Analysis of mechanisms of oral cancer metastasis via chemokine signals and molecular target therapy for inhibition of metastasis
 研究代表者
 浦出 雅裕（URADE MASAHIRO）
 兵庫医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70104883

研究成果の概要：本研究は、口腔癌の転移機構をケモカインシグナルの観点から解析することを目的とし、口腔癌臨床材料、口腔癌培養細胞およびヌードマウスに移植した口腔癌細胞のリンパ節転移および血行転移モデルを用いて、ケモカインおよびケモカインレセプター発現を免疫組織学的、細胞・遺伝子工学的に検索した結果、代表的なケモカインレセプターである CXCR4 は、口腔扁平上皮癌、腺様嚢胞癌の転移や予後に、さらに悪性線維性組織球腫の転移にも深く関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、腺様嚢胞癌、浸潤、転移、ケモカインレセプター、CXCR4、予後

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後を左右する主たる要因は、頸部リンパ節転移あるいは血行性遠隔転移の不制御であることから、口腔癌の転移に関与する因子を明らかにし、それを分子標的として転移を抑制することは口腔癌治療における最重要課題である。これまで、癌の浸潤・転移は、主としてマトリックス・メタプロテアーゼに着目して研究が進められてきたが、近年、乳癌や胃癌などにおいては転移の臓器特異性という観点から、癌細胞の発現するケモカインレセプター（CXCR4, CCR7 など）と転移臓器が産生するケモカイン（CXCL12, CCL21 など）の結合が注目されるようになってきた。

2. 研究の目的

本研究は、口腔癌における転移機構をケモカインシグナルの観点から、口腔癌臨床材料、口腔癌培養細胞およびヌードマウスに移植した口腔癌のリンパ節転移および血行性転移モデルを用いて解析し、さらにケモカインレセプターに対する抗体やアンタゴニスト処理による転移抑制効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌および腺様嚢胞癌における CXCR4 発現の免疫組織化学的検討：口腔扁平上皮癌 39 例（リンパ節転移あり 10 例、なし 29 例）、腺様嚢胞癌 16 例について、

代表的ケモカインレセプターである CXCR4 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

(2) CXCR4 発現と血管新生、リンパ管新生に対する免疫組織化学的検討：上記の臨床材料を用いて、癌間質における血管新生を VEGF-A 抗体、リンパ管新生を D2 40 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

(3) 口腔扁平上皮癌培養細胞における CXCR4 発現と浸潤・転移能の検索：COX-2 を遺伝子導入した浸潤・転移能の高い KB/COX-2 と対照の KB/neo を用いて、細胞増殖、細胞運動能、浸潤能と CXCR4 発現の関連を調べた。

(4) ノードマウスにおける扁平上皮癌および腺様嚢胞癌転移モデルを用いた CXCR4 発現の検索：両腫瘍系を同所性移植、皮下移植あるいは心腔内注入し、原発巣と転移巣における CXCR4 発現を免疫組織化学染色およびウエスタンブロット法で検討した。

(5) 中和抗体、CXCR4 アンタゴニストによるノードマウス移植腫瘍の転移抑制実験：CXCR4 中和抗体あるいはアンタゴニストである AMD3100 を用いて、ノードマウス移植腫瘍のリンパ節転移および血行性転移が抑制されるか否か検討する。

(6) 悪性線維性組織球腫のノードマウス可移植腫瘍の樹立と血行性転移モデルの確立の試み：研究期間の途中で、本腫瘍の臨床材料が入手可能となったため、ノードマウス移植腫瘍の樹立を試みた。また、本腫瘍が血行性転移を来しやすいことから CXCR4 発現について検索した。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌の原発巣および転移巣に対して、ケモカインレセプター CXCR4、悪性度の指標として COX-2、血管新生因子 VEGF-A、リンパ管新生を D2 40 抗体により発現を調べたところ、転移を来した症例の原発巣は、転移のない症例の原発巣に比べて、いずれの因子も発現が増強する傾向を示した。

(2) 口腔扁平上皮癌における CXCR4 と COX-2 発現は相関する傾向を示し、とくに COX-2 発現はリンパ節転移との相関が強く、5 年生存率に強く影響した。すなわち、転移を来した症例の原発巣は転移のない原発巣より、また転移巣は原発巣より COX-2 発現および細胞増殖活性を示す DNA topoisomerase II α 発現が有意に高く、両活性の高い症例の 5 年生存率は有意に減少し

た。

(3) 口底癌由来の KB 癌細胞に COX-2 遺伝子を導入した高発現クローン(KB/COX-2) は、対照の KB/neo に比べて、高い PGE₂ 産生と細胞運動能および浸潤能の有意な増強、CXCR4 発現増加、E-カドヘリン発現の減少を認めた。

(4) KB/COX-2 は、KB/neo に比べ、ノードマウス皮下移植における造腫瘍性が高く、腫瘍増殖も速かった。また、口底部への同所性移植では、KB/COX-2 は KB/neo に比べ、強い局所浸潤性を示し、頸部リンパ節転移や肺転移率が高かった。さらに、左心室注入では KB/COX-2 は、高率に全身多発転移を来した。

(5) 肺やリンパ節に高率に転移を来す腺様嚢胞癌 16 例について、CXCR4 発現と組織型、転移能、予後との関連を調べた結果、CXCR4 高発現症例で肺やリンパ節転移を認め、予後不良であった。また、組織型においては、充実型や転移を認めた篩状型で CXCR4 発現が強陽性であり、転移巣は原発巣に比べ CXCR4 の発現が高かった。

(6) 腺様嚢胞癌移植ノードマウスモデルにおいても、腫瘍増殖や転移能の亢進に伴い CXCR4 発現が増大し、組織型は篩状型から充実型あるいは未分化癌に変化した。

(7) 全身に血行性多発転移を来す下顎悪性線維性組織球腫 (MFH) のノードマウス移植モデルおよび培養細胞の樹立に成功した。細胞を移植したノードマウスでは、腫瘍の形成とともに多発性肺転移を認め、移植した培養細胞には転移関連分子である MMP7, MMP9, MT1-MMP, CXCR4, COX-2, integrin $\alpha 4$ の発現亢進と MMP2, TIMP1 の発現低下が認められた。

(8) 腺様嚢胞癌および悪性線維性組織球腫のノードマウス移植・転移モデルを用いて、CXCR4 アンタゴニストである AMD3100 投与による転移抑制実験を施行中である。

以上の結果から、口腔扁平上皮癌、腺様嚢胞癌、悪性線維性組織球腫という組織型の異なる 3 種の代表的な腫瘍の培養細胞、ノードマウス移植腫瘍による in vitro および in vivo モデルを樹立することができたことにより、それらの転移に深く関与しているケモカインレセプター CXCR4 を分子標的とした解析、さらには治療シミュレーションが可能となった。

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 8 件)

- ① Zushi Y, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K, Segawa E, Takaoka K, Toyohara Y, Tanaka N, Kishimoto H, Urade M. Relations among expression of CXCR4, histological patterns, and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol* 33:1133-1139, 2008. (査読あり)
 - ② Takaoka K, Kishimoto H, Segawa E, Otsu N, Zushi Y, Hashitani S, Noguchi K, Urade M. *In vitro* susceptibility to anticancer agents of the human KB carcinoma cell line transfected with COX-2 cDNA. *Oncol Rep* 20:645-649, 2008. (査読あり)
 - ③ Maeda T, Hashitani S, Zushi Y, Segawa E, Tanaka N, Sakurai K, Urade M. Establishment of a nude mouse transplantable model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:1005-1011, 2008. (査読あり)
 - ④ Segawa E, Sakurai K, Kishimoto H, Takaoka K, Noguchi K, Hashitani S, Hirota S, Urade M. Expression of cyclooxygenase-2 and DNA topoisomerase II α in precancerous and cancerous lesions of the oral mucosa. *Oral Oncol* 44:664-671, 2008. (査読あり)
 - ⑤ Sakurai K, Urade M, Noguchi K, Hashitani S, Takaoka K, Segawa E, Kishimoto H. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 and DNA topoisomerase II α expression in oral carcinoma. *Head Neck* 29:1002-1009, 2007. (査読あり)
 - ⑥ Tanaka N, Urabe K, Hashitani S, Sakurai K, Urade M. Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma cell line forming colonies cultured in collagen gel and transplantable in nude mice. *Oncol Rep* 17:335-340, 2007. (査読あり)
 - ⑦ Hashitani S, Urade M, Zushi Y, Sagawa E, Okui S, Sakurai K. Establishment of nude mouse transplantable model of a human adenoid cystic carcinoma of the oral floor showing metastases to lymph node and lung. *Oncol Rep* 17:67-72, 2007. (査読あり)
 - ⑧ Takaoka K, Kishimoto H, Segawa E, Hashitani S, Zushi Y, Noguchi K, Sakurai K, Urade M. Elevated cell migration, invasion and tumorigenicity in human KB carcinoma cells transfected with COX-2 cDNA. *Int J Oncol* 29:1095-1101, 2006. (査読あり)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Urade M, Kishimoto H, Takaoka K, Segawa E, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in oral cancer. XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (2008.9.9-12, Bologna, Italy)
 - ② 瀬川英美、岸本裕充、高岡一樹、橋谷 進、野口一馬、浦出雅裕：スードマウス心腔内移植におけるCOX-2高発現ヒトKB癌細胞の転移能および siRNA による転移抑制効果。
第 32 回日本口腔科学会学術集会 (2008.4.17-18, 福岡)
 - ③ Takaoka K, Urade M, Kishimoto H, Hashitani S, Toyohara Y, Noguchi K. *In vitro* susceptibility to anticancer agents of human KB carcinoma cell line transfected with COX-2 cDNA.
第 66 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5, 横浜)
 - ④ Hashitani S, Toyohara Y, Takaoka K, Noguchi K, Kishimoto H, Sakurai K, Urade M. Establishment and characterization of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible transplantable in nude mice.
第 66 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5, 横浜)
 - ⑤ Zushi Y, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K, Takaoka K, Tanaka N, Kishimoto H, Urade M. Relationship between expression of CXCR4 and histological type in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. The European Cancer Conference 14th (ECCO14) (2007.9.23-24, Barcelona, Spain)
 - ⑥ 田中徳昭、橋谷 進、櫻井一成、浦出雅裕：3次元培養可能な上顎腺様嚢胞癌由来培養細胞株の細胞特性。
第 43 回日本口腔組織培養学会 (2006.11.11, 大阪)
 - ⑦ Hashitani S, Noguchi K, Zushi Y, Okui S, Tanaka N, Sakurai K, Urade M. Establishment of nude mouse transplantable model of a human

adenoid cystic carcinoma showing metastases to the lymph node and lung.

7th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery (2006.11.5-9, Hong Kong)

- ⑧ 高岡一樹、浦出雅裕、岸本裕充、橋谷 進、豊原幸代、野口一馬、櫻井一成：COX-2 遺伝子導入によるヒト KB 癌細胞の増殖能と浸潤能の亢進。
第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.28-30, 横浜)
- ⑨ 橋谷 進、野口一馬、豊原幸代、高岡一樹、岸本裕充、櫻井一成、浦出雅裕：ヒト口底腺様嚢胞癌のヌードマウスにおける転移モデルの樹立とその細胞生物学的特性。第 65 回日本癌学会学術総会 (2006.9.28-30, 横浜)
- ⑩ 橋谷 進、野口一馬、奥井 森、瀬川英美、頭司雄介、櫻井一成、浦出雅裕：ヌードマウス可移植性ヒト腺様嚢胞癌の移植継代による転移モデルの樹立。
第 60 回日本口腔科学会総会 (2006.5.11-12, 名古屋)
- ⑪ 田中徳昭、占部一彦、橋谷 進、櫻井一成、浦出雅裕：3次元培養可能な腺様嚢胞癌細胞株の樹立とその細胞特性について。第 60 回日本口腔科学会総会 (2006.5.11-12, 名古屋)
- ⑫ 高岡一樹、岸本裕充、瀬川英美、頭司雄介、萬野幸代、橋谷 進、野口一馬、櫻井一成、浦出雅裕：COX-2 高発現ヒト KB 癌細胞の増殖および浸潤能における一酸化窒素の影響。
第 60 回日本口腔科学会総会 (2006.5.11-12, 名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70104883

(2) 研究分担者

櫻井 一成 (SAKURAI KAZUNARI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：30129118
岸本 裕充 (KISHIMOTO HIROMITSU)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：30291818
野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50309473
橋谷 進 (HASHITANI SUSUMU)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：00330449

(3) 研究協力者

高岡 一樹 (TAKAOKA KAZUKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：60373122
田中 徳昭 (TANAKA NORIAKI)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：70412012
瀬川 英美 (SEGAWA EMI)
兵庫医科大学・医学部・病院助手
頭司 雄介 (ZUSHI YUUSUKE)
兵庫医科大学・大学院