

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09564

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における新規リンパ管新生抑制因子によるリンパ行性転移の抑制

研究課題名(英文) Inhibition of lymphatic metastasis in oral squamous cell carcinoma with the new anti-lymphangiogenic factor

研究代表者

山根木 康嗣 (YAMANAEGI, 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) 3,400,000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内因性血管新生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、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の中で、Semaphorin関連因子に絞った。epigenetic modulatorの作用によりこれら因子の発現が増加しリンパ管新生が有意に抑制されたことから、リンパ管形成の制御にも血管抑制因子が関わっている可能性が示唆された。また内因性血管抑制因子はepigeneticな要因によって拘束されており、これらを解除する事で腫瘍新生リンパ管形成を抑制できる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の発症率はわが国においても年々増加傾向にある。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、リンパ節転移および肺転移を抑制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。本研究では既知の薬剤(他の疾患の治療薬として承認済み)を用い、口腔扁平上皮癌が誘導する新生リンパ管形成を抑制する事を見出し、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移および肺転移を抑制できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the endogenous anti-angiogenic factors inhibited lymphangiogenesis on oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). Real time Microarray PCR revealed that some candidate of endogenous anti-angiogenic factors were found out OSCC treated with epigenetic modulators, such histone deacetylase inhibitor, DNA methylation inhibitor and mTOR inhibitor. To narrow down them further, we focus on the type 3 semaphorin and its related receptors in these candidate factors. Treatment of epigenetic modulators enhanced expression of these factors and inhibits growth of OSCC and lymphendothelial cells, and also tube formation. These results suggested that type 3 semaphorin and its related receptors could be inhibited cancer-induced lymphangiogenesis as a result of removed the epigenetic restriction.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：扁平上皮癌 新生リンパ管抑制 転移抑制 エピジェネティック阻害剤

## 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、angiopoietin/Tie2、FGF-2/FGFR-3等の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<sup>(1)</sup>。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を示唆していると考えられる。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<sup>(2)</sup>。実際、血管新生においても内因性の抑制因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。

### < 引用文献 >

- (1) Tammela T, Alitalo K, et al. *Cell*. 2010; 140: 466-476.
- (2) Jain RK. *Nat Med*. 2003; 9: 685-693.

## 3. 研究の方法

(ヒト口腔扁平上皮癌細胞における新規リンパ管新生抑制因子の検討)

- (1) 候補因子の選定
  - (A) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(OSCC)にヒストン脱アセチル化阻害剤であるバルプロ酸(VPA)と mTOR 阻害剤ラパマイシン(Rapa)を作用させ、TaqMan Human Angiogenesis real-time PCR array(ABI 社)にて血管新生およびリンパ管新生関連因子を測定・定量化した結果、数種の血管新生因子または受容体発現の著しい減少および内因性血管新生抑制因子とその受容体の増加を確認する。
  - (B) (A)のOSCC以外に、患者由来口腔扁平上皮癌細胞株(8株)(共同研究者樹立済み)、ヒトリンパ管内皮細胞株(LyMVEC)における上記候補因子とその受容体の発現を検討する。
    - a. 上記候補因子とその受容体の発現をRT-PCRにて確認する。
    - b. 上記候補因子とその受容体をreal-time PCRにて定量する。

(ヒトリンパ管内皮細胞における新規リンパ管新生抑制因子の検討)

- (1) 候補因子のヒトリンパ管内皮細胞における VPA、mTOR 阻害剤作用下での発現変動を real-time PCR で確認する。
- (2) ヒトリンパ管内皮細胞の蛋白発現および培養上清中の蛋白分泌の有無を western blotting にて確認する。
- (3) Transwell chamber にて VPA、mTOR 阻害剤作用群ヒト口腔扁平上皮癌細胞をヒトリンパ管内皮細胞と共培養し、その増殖能および管腔形成能を確認する。

(手術検体による検討)

兵庫医科大学歯科口腔外科にて切除された口腔扁平上皮癌の検体を用い、候補因子による免疫組織化学染色を施行・解析する。  
(腫瘍の組織型、転移の有無、予後等の臨床的・病理組織学的分類によって解析を行う。)

## 4. 研究成果

- (1) 候補因子の選定  
上記、より候補因子をSemaphorin 3F(SEMA3F)およびそのレセプターであるNeuropilin 2(NRP2)と共レセプターであるPlexinAに絞った。

- (2) OSCC における SEMA3F, NRP2, PlexinA の mRNA および蛋白発現の検討
- (A) VPA および Rapa 作用下での OSCC における SEMA3F, NRP2, PlexinA の mRNA および蛋白の発現の増加を確認した。
- a. Real time PCR にて定量化した結果、対照群と比較して  
SEMA3F : 2.5 倍、NRP2 : 2.3 倍、PlexinA1 : 2.2 倍の増加を示した。
- b. Western blot にてそれぞれの蛋白の発現の増加を確認した。  
(これらの効果はそれぞれの併用によってさらに増強されることも確認した。)
- (B) VPA および Rapa 作用下での OSCC における可溶性 SEMA3F 蛋白(sSEMA3F)と可溶性 NRP2 蛋白(sNRP2)の増加を確認した。  
sSEMA3F : 4.5 倍/10<sup>5</sup> cells、sNRP2 : 1.8 倍/10<sup>5</sup> cells の増加を示した。
- (C) VPA および Rapa 作用下での OSCC における可溶性 VEGF-C (sVEGF-C)の変化を測定した結果、VPA 作用群でのみ有意な減少を認めしたが、Rapa は sVEGF-C を増加させた。  
(この事により VPA と併用するエピジェネティック阻害剤の変更を検討した。)
- (D) VPA と併用するエピジェネティック阻害剤および試薬の検討
- a. 5-aza-2-deoxycytidine (Decitabine)と Genistein (イソフラボン)について OSCC の増殖能を検討した結果、Genistein は強力に OSCC の増殖能を抑制することから、Genistein との併用を模索する。
- b. Genistein 単独は OSCC における VEGF-C mRNA の発現の減少を認めた。また VPA との併用でもその効果は変わらなかった。
- c. Genistein 単独は OSCC における SEMA3F, NRP2, PlexinA の mRNA および蛋白の発現の増加を確認した。また VPA との併用はその効果を増強した。
- (3) ヒトリンパ管内皮細胞株(LyMVEC)に VPA と Rapa および Genistein を作用させ、VEGF-C, VEGFR3, SEMA3F, NRP2 および PlexinA の発現の増減を検討した。
- (A)VPA, Rapa および Genistein の単独および併用による LyMVEC の増殖能を検討。
- a. MTT 法にて測定した結果、濃度依存的に増殖抑制効果を示す事を確認した。
- (B) VPA と Genistein 単独またはその併用が SEMA3F, NRP2, PlexinA, VEGF-C および VEGFR3 mRNA および蛋白の発現の影響
- a. VPA, Rapa, Genistein 作用下での LyMVEC における SEMA3F, NRP2, PlexinA mRNA および蛋白の発現の影響増加を確認した。  
(これらの効果はそれぞれの併用によってさらに増強されることも確認した。)
- (C) VEGF-C および VEGFR3 mRNA の発現の減少と sVEGF-C 産生の減少を認めた。
- (D) Rapa 単独では sVEGF-C の産生量の増加を認めしたが Rapa と VPA および Rapa と Genistein の併用は、sVEGF-C を有意に減少させた。
- (E) VPA, Genistein を作用させた OSCC の培養上清を LyMVEC 培養上清に加え、LyMVEC の遊走能と管腔形成への影響を in vitro で検討した。
- a. ダブルチャンバーを用い対照群と比較して、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。
- (4) 当院歯科口腔外科で扁平上皮癌切除手術を施行された検体を収集し、Podoplanin (D2-40)、SEMA3F およびそのレセプター発現を免疫組織化学染色にて評価し、臨床データとの関係性を評価した。
- a. 切除検体 100 例、正常口腔粘膜 (対照群) 20 例を用い比較検討したところ、SEMA3F の発現と悪性度を示す Grade には有意な相関関係を認めなかった。
- b. 切除検体のうち 30 例でリンパ節転移を認め、これらの症例では SEMA3F の有意な減弱と原発巣での D2-40 陽性リンパ管数の増加を認めた。

以上より、リンパ管形成の制御には内因性血管抑制因子が関わっている可能性が示唆された。また内因性血管抑制因子はepigeneticな要因によって発現が制御されており、これらを解除する事で腫瘍新生リンパ管形成をコントロール出来る事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 SHUNSUKE KUMANISHI, KOJI YAMANEGI, HIROSHI NISHIURA, YUKI FUJIHARA, KENTA KOBAYASHI, KEIJI NAKASHO, HIROYUKI FUTANI and SHINICHI YOSHIYA	4. 巻 55
2. 論文標題 Epigenetic modulators hydralazine and sodium valproate act synergistically in VEGF-mediated anti-angiogenesis and VEGF interference in human osteosarcoma and vascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY	6. 最初と最後の頁 167-178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4811	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 Tamaoka J, Takaoka K, Hattori H, Ueta M, Maeda H, Yamamura M, Yamanegi K, Noguchi K and Kishimoto H	4. 巻 17
2. 論文標題 Osteonecrosis of the jaws caused by treatment with bisphosphonate and oxidative stress in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1440-1448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2018.7076	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shunsuke Kumanishi, Koji Yamanegi, Hiroshi Nishiura, Yuki Fujihara, Kenta Kobayashi, Hiroyuki Futani and Shinichi Yoshiya
2. 発表標題 Epigenetic modulator modulates the vascular endothelial growth inhibitor (VEGF)-mediated cell death in human osteosarcoma and vascular endothelial cells
3. 学会等名 2nd International Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies 2019 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kusafuka, K., Sugimura H., Yamada H., Kawasaki, T., Maeda, M., Yamanegi, K., Baba, S., Ishihara A., Ohuchi T., Inagaki H., Nakajima, T., Sugino T
2. 発表標題 CDH1 gene mutation in salivary duct carcinoma with rhabdoid features (SDCRF) is associated with no or aberrant expression of E-cadherin: Multi-institutional study.
3. 学会等名 United States and Canadian Academy of Pathology 2019 Annual Meeting (国際学会)
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
研究分担者	中正 恵二  (Nakasho Keiji)  (00217712)	兵庫医科大学・医学部・教授   (34519)	退職の為、分担者削除 平成31年1月17日付
研究分担者	山田 直子  (Yamada Naoko)  (10319858)	兵庫医科大学・医学部・講師   (34519)	
研究分担者	野口 一馬  (Noguchi Kazuma)  (50309473)	兵庫医科大学・医学部・准教授   (34519)	
研究分担者	西浦 弘志  (Nishiura Hiroshi)  (90284760)	兵庫医科大学・医学部・助教   (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------