

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592135

研究課題名（和文） 上皮間葉移行の口腔腫瘍での役割

研究課題名（英文） Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Cancer

研究代表者

勝部 憲一（KATSUBE KENICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20233760

研究成果の概要（和文）：

本研究は研究が進んでいる腎細胞癌でシグナル因子を探索し、その分子シグナルと病態について解析をおこなった。また口腔腫瘍については扁平上皮癌・角化嚢胞性歯原性腫瘍について解析をおこなった。腎細胞癌で注目したのは RANKL である。我々の調査では明細胞癌のように高い浸潤能をもつタイプで発現が多く見られた。また Kaki のような腎癌培養細胞で RANKL 遺伝子を強制発現させると vivo, vitro とも癌細胞の移動性・浸潤性を高める結果となった。可能性のある下流因子として MMP や snail に焦点をあてて解析を進めている。角化嚢胞性歯原性腫瘍についてはケラチン発現の変化に注目した。多種のケラチンや関連因子を探索した結果、ケラチン 17、19 がこの腫瘍で特異的に上昇し、腫瘍性のない正角化型嚢胞との相違が明らかになった。扁平上皮癌においてはケラチン 4、13 が上皮異形成とともに特異的な上昇を示す。これらは Notch シグナルとの負の相関の可能性もあることが組織学的解析からわかり、現在培養細胞を用いた実験検討をおこなっている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on the two different tumors. One is renal cell carcinoma (RCC), which has been well studied from the aspect of molecular signal of epithelial mesenchymal transition. The other is the common oral tumors; keratocystic odontogenic tumor and oral squamous cell carcinoma. In RCC, we focused on the role of RANKL, which was recently reported to be directly involved in tumor invasion, other than the induction of osteoclastogenesis in bone metastasis. From our Clinicopathological study, high invasive RACC such as the clear cell type has high level expression of RANKL. In vitro study using RCC cell line such as Kaki showed that the introduction of RANKL gene increased the high mobility in vitro and high invasiveness in transplant study. We are investigating the role of other factors such as MMP and snail transcriptional factor. In keratocystic odontogenic tumor (KCOT), we screened the cytokeratin expression change. Among the keratin proteins, Cytokeratin 17 and 19 has been dramatically upregulated in KCOT, not in orthokeratinized odontogenic cyst (non-tumor type cyst). In squamous cell carcinoma, Cytokeratin 4 and 13 showed the distinct expression pattern and this change is also observed in the epithelial dysplasia. These changes is indicated to reciprocally relate to the Notch gene expression and in vitro transfection study of these keratin genes is ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：腫瘍 上皮-間葉転換 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

腫瘍における上皮間葉移行とは（発生生物学からの流れ）

上皮間葉移行をつかさどる因子として最初に発見され、かつもっとも著名なのは HGF である。肝細胞増殖因子として同定されたこのペプチドの配列を調べると、以前から **scattering factor** と呼ばれていたものと同一だと判明した。実際 HGF はその受容体 MET を通じて細胞遊走を促進する作用を示すことがわかり、この動きを「間葉化した」と捉えるようになった。しかしその後 HGF の作用は間葉移行の部分的なプロセスしか担わないことがわかり、**scattering** に影響する他の因子探究が進められた。それは意外にも発生過程に関係する遺伝子の KO マウスから解明され、TGF beta, BMP, Wnt などが見いだされた。これらの因子はいずれも正常な発生の器官・組織形成時に分化・増殖調節因子として働いて、それ以外に細胞移動調節にも関与していることが KO の形質で明らかになった。代表的な例は口蓋癒合時の癒合部からの上皮細胞遊走離脱や神経堤細胞の体内遊走で、TGF beta, Wnt などの機能喪失でその遊走が阻害される。その結果として口蓋癒合不全や色素細胞の異常分布が起こる。それ以外にも Notch シグナルの喪失で起こる血管内皮細胞の間葉移行や血管網再編成などの阻害も広い意味でこの上皮（内皮）間葉移行の一環を担っていると現在考えられている。

最近そのメカニズムが腫瘍転移に与える影響が注目されている（文献 1）。癌研究は現在 vivo での挙動解明に向かっていて、その研究の流れの 1 つは周囲の正常細胞・組織との相互作用による浸潤様式の展開の解明である。最近腫瘍細胞でも転移で上皮間葉移行シグナルに異常が起こっていることが報告されるようになり、癌化の過程でこれらの遺伝子に何らかの変異が起こると上皮間葉移行の制御逸脱が起こると推測されようになった。たとえば HGF の受容体 MET 自体が癌遺伝子そのもので、その変異が細胞癌化を引き起こしている。この接着性変化による移動能変化および癌化に注目したのが本研究課題である。

本課題になぜ着目したか（応募者の今までの研究方向から）

応募者は今まで主として色素性母斑細胞の移動能と皮膚上皮との関連を調べてきた。

その結果上皮に近い母斑細胞はカドヘリンを発現するものの、接着装置は形成されず積極的に移動する能力を有していることがわかった。その際カドヘリンは接着ではなく、移動探査シグナルとして機能する特異な作用を有することがわかった（文献 2）。また Notch、SHH シグナルは歯原性上皮の分化に影響を与えることを解析してきたが（文献 3）、歯原性腫瘍の一部（歯原性線維腫）でもその影響と思われる上皮間葉移行があることがわかった（論文投稿中）。また腎癌細胞に NFkB を刺激するように RANKL 遺伝子導入すると意外にも骨浸潤ではなく、上皮間葉移行を移動度亢進を起こしていることがわかった（論文準備中）。これらの結果から口腔腫瘍に与える上皮間葉移行に注目するようになった。また別な方向からリンパ管内皮細胞の上皮間葉移行に Notch シグナルが働くことを解明したことも挙げられる（文献 4）。

口腔腫瘍に関連する研究の現況

現在までに腫瘍と上皮間葉移行は多数報告がある。その中で口腔腫瘍では特に扁平上皮癌から紡錘形細胞癌の生成に注目した研究が日本から報告されている（文献 5）。応募者も舌扁平上皮癌細胞株の移動度と基底膜形成は検索して報告し（文献 6）、また種類は異なるが腎癌症例で明細胞癌から紡錘形細胞に生成する症例ではその移行部で特異的に NFkB シグナルが上昇していることを確認しており、紡錘形癌と上皮間葉移行には普遍的な関係があると考えている。ただし上記の報告では主としてケモカインの SDF1 の重要性を強調しているが、腎癌ではそれは見られない。これは他にも未知の上皮間葉移行因子が紡錘形の形態に限っても存在する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

口腔紡錘形細胞癌における上皮間葉移行に関する未知の因子の免疫組織化学的解析

悪性腫瘍では特に紡錘形細胞癌形成のメカニズムに注目する。下記の腎癌細胞株で同定が予想される上皮間葉移行シグナル因子を含め、関連する因子を組織化学的に解析する。特に扁平上皮癌からの移行像がある症例や放射線照射で移行した症例に注目する。

2 歯原性腫瘍についての上皮間葉移行の解析（免疫組織化学および遺伝子発現）

歯原性線維腫での上皮間葉移行は今まではっきりしなかったが、歯原性線維腫でその

存在を確かめた。そこでエナメル上皮腫やエナメル線維腫など関連する歯原性腫瘍についても解析を進め、普遍的な現象かどうか調べる。

3 腎癌細胞株に上皮間葉移行を与える因子モデル解析

RANKL 導入で発現が変わる因子を調べ、上記 1、2 への適用をおこなう。

4 周辺リンパ脈管環境との上皮間葉移行シグナルの関連解析

リンパ管構造は主に扁平上皮癌転移で重要な役割を演じている。Notch シグナルは発生段階での動静脈分化では特に決定的な役割を担っている。しかし腫瘍との関連では VEGFR の方がより大きな役割をしていると考えられ、Notch シグナルは補足的な役割と考えられていた。リンパ管は多くの腫瘍でその転移経路として重要で、血行性転移よりその頻度が高いと考えられている。リンパ管内皮細胞の上皮間葉移行を通して腫瘍細胞転移が促進されている可能性もあり、その関与度を明らかにする。

③ 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義
口腔腫瘍の上皮間葉移行から見た特異性

紡錘形細胞癌が口腔を含む上部消化管からの発生が知られている。扁平上皮癌からの何らかの移行と考えられていて、一部では扁平上皮癌に対する放射線照射による変化と考えられる症例も報告されている。通常の扁平上皮癌と比べ接着性に乏しく胞巣形成が不明瞭で、その浸潤の強さも著明である。放射線照射など遺伝子変異を与える可能性がある療法がその原因の 1 つとも言われるが現在のところはっきりしていない。上皮間葉移行の解明でそのメカニズムが解明できれば有用な治療法を開発できる可能性がある。

歯原性線維腫は口腔内特異的だが扁平上皮癌と比べ頻度が低い腫瘍で、多くは良性である。しかしエナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍のように高い浸潤性を示す種類もある。歯原性腫瘍は歯原性腫瘍の中でも稀な腫瘍で、線維性組織と不活発な上皮細胞からなる島から形成されている。この腫瘍の進展に関して上皮成分の関与は今まで否定的だったが、線維性組織の中に Notch 陽性の上皮性腫瘍細胞が多数散在していることがわかった(文献 4, 5)。これらの細胞は基本的にサイトケラチン陰性だが、Epithelial membrane antigen (EMA)陽性を示すようになる。この細胞は調査した歯原性線維腫ではすべて見られるのでこの腫瘍には共通した現象だと考えられる。1 例では試験切除を全摘出前におこなっていたが、その再生する粘膜上皮やその下の肉芽組織中にアメリロジェニン陽性

腫瘍細胞が多数入り込んでいた。これはこの腫瘍細胞に高い移動能が潜在的にあることを示しており、またその紡錘形の形状を勘察すると上皮間葉移行を起こした結果と考えるのが妥当である(投稿中)。なおこのような間充織に散在するアメリロジェニン陽性細胞はエナメル上皮腫の症例でもある割合で見られ、歯原性腫瘍に普遍的な現象である可能性がある。このように歯原性腫瘍のような大半が良性腫瘍と考えられる種類でも上皮間葉移行シグナルがその進展に関与している可能性がある。しかし上記の歯原性線維腫では今までに知られている上皮間葉移行に関係する因子のはっきりした変化を確認できなかった。このことは上皮間葉移行シグナルにはまだ知られていない経路があることを暗示している。

このように良性・悪性いずれの腫瘍の進展にも関連すると考えられる上皮間葉移行だが、口腔腫瘍では歯原性腫瘍、扁平上皮癌で重要な働きをしている可能性がある。また紡錘形細胞癌が口腔と中心とする上部消化管扁平上皮癌で多く見られる癌で、その発生には放射線照射との関連も示唆されているが詳細は不明である。歯原性腫瘍でも悪性化すると骨転移能が急速に亢進することが知られており、これらの変化に上皮間葉移行が関係する可能性がある。

3. 研究の方法

口腔紡錘形細胞癌における上皮間葉移行に関する未知の因子の免疫組織化学的解析

悪性腫瘍では特に紡錘形細胞癌形成のメカニズムに注目する。下記の腎癌細胞株で同定が予想される上皮間葉移行シグナル因子を含め、関連する因子を組織化学的に解析する。特に扁平上皮癌からの移行像がある症例や放射線照射で移行した症例に注目する。

2 歯原性腫瘍についての上皮間葉移行の解析(免疫組織化学および遺伝子発現)

歯原性線維腫での上皮間葉移行は今まではっきりしなかったが、歯原性線維腫でその存在を確かめた。そこでエナメル上皮腫やエナメル線維腫など関連する歯原性腫瘍についても解析を進め、普遍的な現象かどうか調べる。

3 腎癌細胞株に上皮間葉移行を与える因子モデル解析

RANKL 導入で発現が変わる因子を調べ、上記 1、2 への適用をおこなう。

4 周辺リンパ脈管環境との上皮間葉移行シグナルの関連解析

リンパ管構造は主に扁平上皮癌転移で重要な役割を演じている。Notch シグナルは発生段階での動静脈分化では特に決定的な役割を担っている。しかし腫瘍との関連では VEGFR の方がより大きな役割をしていると考

えられ、Notch シグナルは補足的な役割と考えられていた。リンパ管は多くの腫瘍でその転移経路として重要で、血行性転移よりその頻度が高いと考えられている。リンパ管内皮細胞の上皮間葉移行を通して腫瘍細胞転移が促進されている可能性もあり、その関与度を明らかにする。

4. 研究成果

1 腎癌について

我々は腎癌の型別で特に明細胞癌型に関して転移能が高いことに注目して、昨年度は RANKL の関与について解析・発表をおこなってきた(文献)。本年度は細胞内特に転写調節に関わる因子に焦点をあてて、解析をおこなった。その結果 snail と呼ばれる小型 Zn finger 型転写因子の発現が統計的に明細胞癌で高いことがわかり、培養細胞でその分子機能について探索をおこなった。明細胞型腎癌細胞株で snail の発現が有意に高いものを選び、その細胞株に対して snail siRNA を遺伝子導入で試みた。その結果発現が低下した細胞で移動能を調べたところ、vivo, vitro 両方とも移動能が低下していた。細胞因子について調べてみると MMP9 の発現が有意に低下していた。一般に snail の機能として細胞間接着因子のカドヘリン低下を促すことが知られている。MMP の機能は多様であるが、上皮細胞に関しては基底膜構造の破壊と細胞外基質に捕捉されていた各種増殖因子の放出が知られている。今回の結果は snail が上皮-間葉転換で広範な影響を及ぼすことを示している。この結果は現在投稿準備中である。

2 口腔扁平上皮癌について

扁平上皮癌についてはさまざまな因子が上皮-間葉転換に関係していると推測されるが、我々は Notch シグナルに注目している。我々は現在口腔扁平上皮癌の症例について Notch 発現を調べているが、癌化した上皮では Notch1 発現が全層性に低下することがわかってきた。またこの Notch 発現低下と呼応してセラチン発現に大規模な変化が起こることがわかった。特に keratin 14, 17 などの発現が上昇することがわかってきた。セラチンは細胞分化マーカーとしての取り扱いが多いが、デスモソームとの構造関連で細胞接着性にも重要な関連があることが知られている。サイトセラチンに関してはデスモソーム中の接着因子デスモグレインとの結合を妨げることで dominant negative の効果を狙い、この部分を欠失した keratin 14 遺伝子を口腔癌細胞に遺伝子導入している。予備的な結果ではこれらの遺伝子導入細胞株は形態に変化を起しているため、その変化についても検討している。

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 件)

1. Aragaki T, Sakamoto K, Michi Y, Katsube K, Uzawa N, Okada N, Akashi T, Amagasa T, Yamaguchi A

Comprehensive keratin profiling reveals different histopathogenesis of keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst

Human Pathology 2010 Dec;41(12):1718-25.

2. Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, Kawachi H, Kayamori K, Nakanishi S, Omura K, Miki Y, Okada N, Katsube K, Takizawa T, Yamaguchi A

Downregulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for the histopathogenesis

Histopathology 2011 in press

3. Tanabe H, Takayama I, Nishiyama T, Shimazaki M, Kii I, Li M, Amizuka N, Katsube K, Kudo A

Periostin associates with Notch1 precursor to maintain Notch1 expression under a stress condition in mouse cells.

Plos One 10 Aug 18;5(8):e12234

4. Wang S, Kawashima N, Sakamoto K, Katsube K, Umezawa A, Suda H

Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Sep 10;400(1):39-45. Epub 2010 Aug 4

5. Fu L, Katsube K and Tohda S*

Transition of Cleaved Notch1 and Gene Expression Changes in Myeloblastic Leukemia Cells Stimulated with Notch Ligands

Anticancer Research 917623. Epub 2009 Jun 24

6. Katsube K, Ichikawa S, Katsuki Y, Kihara T, Terai M, Tamura Y, Lau LF, Takeda S, Umezawa A, Sakamoto K, Yamaguchi A.

CCN3 and bone marrow cells

Journal of Cell Communication and Signalling. 2009 Jun;3(2):135-45.

7. Mikami S, Katsube K, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, Mochizuki S, Ikeda T, Mukai M, Okada Y.

Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas.

Journal of Pathology. 218(4):530-9. 2009

8. Kishi K, Okabe K, Ninomiya R, Konno E, Hattori N, Katsube K, Imanish N, Nakajima H, Nakajima T.

Early serial Q-switched ruby laser therapy for medium-sized to giant congenital melanocytic naevi.

British Journal of Dermatology. 2009 Aug;161(2):345-52.

9. Kishi K*, Ninomiya R, Okabe K, Konno E, Katsube K, Imanishi N, Nakajima H, Nakajima T.

Treatment of giant congenital melanocytic nevi with enzymatically separated epidermal sheet grafting.

Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2009 Apr 25.

10. Matsuda N, Katsube K, Mikami S, Katsuki Y, Iseki H, Mukai M, Yamaguchi A, Takano Y, Nakajima T, Nakajima H, Kishi K:

E-cadherin expression in the subepithelial nevus cells of the giant congenital nevocellular nevi (GCNN) correlates with their migration ability in vitro.

Journal of Dermatological Science 52(1):21-30. 2008

11. Sakamoto K, Tamamura Y, Katsube K, Yamaguchi A:

Zfp64 participates in Notch signaling and regulates differentiation in mesenchymal cells.

Journal of Cell Science 121(10):1613-23. 2008

12. Kabasawa Y, Nagumo K, Takeda Y, Kawashima N, Okada N, Omura Ken, Yamaguchi A, Katsube K:

Amelogenin positive cells scattered in the interstitial component of odontogenic fibromas.

Journal of Clinical Pathology 61(7):851-5. 2008

13. Katsuki Y, Sakamoto K, Minamizato T,

Makino H, Umezawa A, Ikeda MA, Perbal B, Amagasa T, Yamaguchi A, Katsube K:

Inhibitory effect of CT domain of CCN3/NOV on proliferation and differentiation of osteogenic mesenchymal stem cells, Kusa-A1.

Biochemical and Biophysical Research Communications 368(3):808-14. 2008

〔学会発表〕(計 4件)

1 勝部憲一 「CCN3・Notch シグナルの骨形成に措ける役割」日本発生生物学会・環太平洋発生生物学会合同年会 京都 (2010年6月23日~25日)

2 勝部 憲一 「骨形成・骨再生における CCN3 の役割」第3回日本CCN研究会・特別講演 岡山 (2009年8月28、29日)

3 「歯原性線維腫におけるアメロジェニン陽性細胞の役割」

第62回日本口腔科学会学術集会 ミニシンポジウム 歯原性腫瘍の治療科学 福岡 (2008年4月17、18日)

海外

Ken-ichi Katsube

CCC3 and Notch/BMP Signals (口演)

第5回CCN遺伝子ファミリー国際会議 Toronto、カナダ 2008年10月19日~22日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝部 憲一 (KATSUBE KEN-ICHI)

研究者番号 : 20592135

(2) 研究分担者 なし

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号 :