

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791561

研究課題名 (和文) 腺様嚢胞癌の浸潤機構における MMPs および増殖因子の関与

研究課題名 (英文) The relationship of MMPs and growth factors in the invasion mechanism of adenoid cystic carcinoma

研究代表者

田中 徳昭 (TANAKA NORIAKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70412012

研究成果の概要 (和文)：腺様嚢胞癌は悪性唾液腺腫瘍で、神経・脈管浸潤を特徴とする疾患である。本研究において、腺様嚢胞癌の浸潤機構にはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 9 および MMP14 を中心としたシステムが深く関与していることが示唆された。また、腺様嚢胞癌細胞は血管内皮細胞増殖因子の発現を認め、腫瘍周囲への血管新生を誘導していることが示唆された。さらに、神経ガイダンス因子であるセマフォリンが浸潤機構に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Adenoid cystic carcinoma is a malignant salivary gland tumor characterized by perineural and perivascular invasion. In this study, we found that MMP9 and MMP14 were associated with the invasion mechanism of adenoid cystic carcinoma. In addition, the expression of VEGF was found in the adenoid cystic carcinoma cells, and it was suggested that VEGF induced angiogenesis at peritumoral stroma. Furthermore, it might be thought that semaphorins, which were known as the neuron guidance factor, were associated with the invasion mechanism of adenoid cystic carcinoma.

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	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：腺様嚢胞癌、3次元培養、浸潤機構、MMPs、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 腺様嚢胞癌は悪性唾液腺腫瘍で、口腔領域の悪性腫瘍としては扁平上皮癌に次いで発生頻度の高い疾患である。口腔領域では比較的遭遇することが多く、特徴的な病態を

示す疾患であるが、いまだに不明な点も多く、その理由としては実験モデルが確立されていないことが挙げられる。

(2) これまでの研究でより生体に近い環境

であるタイプ I コラーゲンゲルを用いた 3 次元下での培養が可能な新規腺様嚢胞癌培養細胞株を樹立した。本細胞株を 3 次元培養すると、腺様嚢胞癌病理組織型における cribriform type および solid type と類似したコロニー形成を認め、その組織像もこれらと類似していた。また細胞株を樹立したもとの腫瘍とほぼ同じタンパク発現を示した。生体内の環境は 2 次元ではなく 3 次元であり、その周囲の基質の大半がタイプ I コラーゲンである。したがって、生体内での事象を解析するにはその環境に類似した培養環境が必要であり、本方法での培養は生体内の環境を反映し、腺様嚢胞癌実験モデルとして有用と考えられた。さらに、これまでに樹立されていた他の腺様嚢胞癌培養細胞株のいくつかもタイプ I コラーゲンゲル内での 3 次元培養が可能であることも確認した。

(3) これまで腺様嚢胞癌の浸潤には uPA に代表されるセリンプロテアーゼの深い関与が報告されてきた。本実験モデルを用い、セリンプロテアーゼの阻害剤であるアミロライドおよびマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の阻害剤である 1-10 フェダントロリンを培養液中に添加し培養すると、コントロールと比較してアミロライド添加では変化が起こらなかったが、1-10 フェダントロリンを添加すると腺様嚢胞癌培養細胞は増殖を認めず、コロニー形成を認めなかった。コロニーを形成するには周囲に浸潤する、すなわち周囲のタイプ I コラーゲンを融解する必要があると考えられる。したがって、本実験から腺様嚢胞癌の浸潤は MMPs 阻害剤で抑制され、セリンプロテアーゼ阻害剤で変化を認めなかったことから、腺様嚢胞癌の浸潤には MMPs が深く関与していることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 3 次元培養実験モデルを用い、腺様嚢胞癌の浸潤機構の解析を行い、浸潤の中心的役割を担っていると考えられる、MMPs の同定を行う。また、腺様嚢胞癌は神経・脈管周囲への浸潤が著明であることから、神経および脈管形成やリモデリングに関与する増殖因子が関与していることが考えられ、これら神経・脈管浸潤関連因子の同定を行う。

(2) 腺様嚢胞癌の予後を左右する因子として局所再発および遠隔転移 (特に肺) が挙げられるが、局所再発の原因としては神経周囲浸潤が、遠隔転移の原因としては脈管周囲浸潤が挙げられる。したがって、神経・脈管周囲浸潤を引き起こす因子の同定は腺様嚢胞癌患者の予後改善につながると考えられる。神経・脈管へ特異的に浸潤を来すには腺様嚢胞癌細胞が神経もしくは脈管に引っ張られ

るように浸潤していく必要がある。そのような細胞浸潤に方向性を持たせるものとしては、増殖因子やケモカインなどが考えられるが、そのなかでも神経や脈管に特異的に関与する因子との関連が推察されるため、これらの因子について本実験モデルを用いて検証を行う。

(3) 3 次元培養実験モデルは間充織最大の構成成分であるタイプ I コラーゲンを用いているため、生体の状況をより反映したモデルと考えられる。そのため、本実験モデルより得られた結果は早期に臨床応用できる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 2 次元培養および 3 次元培養を行った腺様嚢胞癌細胞から RNA の回収を行う。2 次元培養の細胞からは通法通りの RNA 回収が可能であるが、3 次元培養の細胞からの RNA 回収は、培養細胞をタイプ I コラーゲンゲルごと回収し、タイプ I コラーゲンゲルをコラゲナーゼ処理し融解した後に細胞を回収し、以降は 2 次元培養の細胞と同様に通法通りで RNA 回収を行う。回収した培養条件の異なる培養細胞の RNA について、MMP2、MMP7、MMP9、MMP14、MMP15 について発現を確認し、培養方法による発現の違いを確認する。

(2) 2 次元培養および 3 次元培養下における腺様嚢胞癌培養細胞の神経・脈管関連因子の発現を確認する。神経・脈管関連因子としては神経・脈管系の構築に関わる因子や、恒常性を維持するために必要な因子、ケモカインなどについて確認する。

(3) 腺様嚢胞癌培養細胞をヌードマウスへ移植し、形成された腫瘍塊から再度培養細胞株を作成し、それを繰り返しヌードマウスへ移植することにより遠隔転移をきたす細胞株 (遠隔転移株) の樹立を行う。遠隔転移には脈管浸潤が必要となるため、遠隔転移株は高浸潤能も有していると考えられる。そのため、通常の細胞株との相違を検索することで浸潤機構の中心的役割を担っている因子の確認を行うことが可能と考える。また、遠隔転移株を樹立することにより、遠隔転移のメカニズムの解析も可能になると考えられ、遠隔転移株が樹立されれば、遠隔転移についての解析も今後行うこととする。

(4) 基底膜様物質とされているマトリゲルを用いて発現の確認された神経・脈管関連因子による化学走性のある無について確認する。腫瘍は周囲組織に浸潤するには必ず基底膜の破壊を必要とする。さらに、脈管内に進入するためにも再度基底膜を破壊する必要

性がある。マトリゲルは基底膜とほぼ同等の構成成分からなり、基底膜の破壊を伴う実験には不可欠と考える。本実験では腺様嚢胞癌培養細胞と関連性が疑われる神経・脈管関連因子へ向かい、腺様嚢胞癌培養細胞が基底膜を破壊しながら遊走できるか否かを検討する。この結果から、腺様嚢胞癌が実際にその増殖因子やケモカインに向かい遊走する、すなわち方向性をもった浸潤をするか否かの検討ができると考える。

4. 研究成果

(1) タイプ I コラーゲンを破壊する MMPs として、MMP1、MMP2、MMP7、MMP9、MMP14 などがあり、腺様嚢胞癌と関連が深い MMPs としてはこれまでに MMP15 が報告されている。これらについて 2 次元培養の細胞および 3 次元培養の細胞で RNA 発現を検討したところ、MMP7、MMP9、MMP14、MMP15 は 2 次元培養下および 3 次元培養下にかかわらず発現を認めただのに対して、MMP2 は 3 次元培養では発現を認めなかった。このことは ACCNS だけではなく、他の腺様嚢胞癌培養細胞株でも見られた。MMP2 が 3 次元培養で発現しないことから、3 次元培養下でのコロニー形成において、MMP2 が関与していないことが考えられた。このことから、腺様嚢胞癌の浸潤機構に MMP2 は関与していない可能性が示唆された。したがって、腺様嚢胞癌の基底膜破壊には MMP9 が中心的な役割を果たしていると考えられ、基底膜以外の部位への浸潤にも同様に MMP9 が関与している可能性が考えられた。

(2) 神経・脈管関連因子の発現は RT-PCR、免疫細胞染色、Western Blotting 法で確認を行った。腭臓癌で神経周囲浸潤との関連が報告されている、GDNF (Glial cell-derived neurophilic factor ; グリア細胞由来神経栄養因子) のレセプターである GFR α 1 および c-Ret のタンパク発現を認めたが、GDNF の発現は認めなかった。GDNF のレセプターを発現していることから GDNF は腺様嚢胞癌の浸潤機構に関与している可能性が考えられた。また、強力な血管新生因子である VEGF のタンパク発現を認めたが、そのレセプターである KDR および FLT-1 の発現は認めなかった。しかし、KDR の co-レセプターである NRP1 の発現を認めた。NRP1 は KDR と VEGF の結合を増強するとされているが、NRP1 単独では VEGF のレセプターとはなりえない。腺様嚢胞癌培養細胞において KDR の発現を認めないことから、腺様嚢胞癌において VEGF はオートクラインではなくパラクラインとして働いている可能性が考えられた。すなわち、腺様嚢胞癌周囲への血管新生を引き起こしている可能性が考えられ、腫瘍周囲に血管が新生されることは、腺様嚢胞癌細胞の脈管浸潤および

その後発すると考えられる遠隔転移の可能性を増加させている可能性が考えられた。また、NRP1 の他のリガンドとしては SEMA3family があるが、SEMA3family は神経のガイダンス因子であることから、SEMA3family-NRP1 が腺様嚢胞癌の浸潤機構に関与している可能性が考えられたが、SEMA3family の発現については細胞レベルで十分な検討が行えていない。

(3) 腺様嚢胞癌培養細胞をヌードマウスへ同所性に移植し、形成された腫瘍塊から再度培養細胞株を樹立した。この新たに樹立した培養細胞株を繰り返しヌードマウスに移植を行ったところ、腫瘍や培養細胞の増殖速度は速くなったものの、リンパ節転移や肺転移は認められず結果的に高浸潤株(遠隔転移株)の樹立はできなかった。

(4) 化学走行性については明らかにレセプターの発現を認めた GDNF についてのみ検討を行った。実験にはマトリゲルでコーティングをしたポイデンチャンバーを使用し、上層に腺様嚢胞癌培養細胞を播種し、下層に GDNF を付与し、上層から下層へと移動する腺様嚢胞癌培養細胞の数を計測した。付与する GDNF の濃度は製品添付のプロトコールに従い、最適な濃度になるように付与した。結果はコントロールと GDNF 投与群での移動した細胞数に有意差は認められず、腺様嚢胞癌培養細胞において GDNF における化学走行性は認められなかった。またあわせて細胞増殖能についても検討を行ったが、同様にコントロールと GDNF の間に有意差を認めず、腺様嚢胞癌の浸潤機構において GDNF は関与していないと考えられた。今後は VEGF や SEMA3family などについても検討を加えていく予定である。

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 1 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 head and neck、査読有、vol.33、2008、1133-1139

[学会発表] (計 1 件)

(1) Tanaka N, Establishment of a novel adenoid cystic carcinoma cell line in the salivary gland. At Mt. Zion in University of California San Francisco. : San

Francisco, May 27, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 徳昭 (TANAKA NORIAKI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70412012