

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890092

研究課題名（和文） 低酸素環境によるヒト口腔がんのEMT誘導

研究課題名（英文） The research on the effect of hypoxia on EMT of human oral cancer

研究代表者

宮崎 康雄 (Miyazaki Yasuo)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60509818

研究成果の概要（和文）：

本研究は腫瘍内低酸素環境が上皮-間葉転換（epithelial-mesenchymal transition; EMT）の誘因となることを証明することを目的とした。

本研究では、低酸素環境はヒト口腔扁平上皮がんに対する大きな刺激となり、がん細胞における EMT の誘因となる可能性が示唆された。実験結果を裏付けるため、現在さらに EMT 関連遺伝子の変化を観察中である。

研究成果の概要（英文）：

We researched whether the hypoxia in tumor tissue causes epithelial-mesenchymal transition (EMT) on tumor cells.

The results imply that the hypoxic condition may be one of the trigger of EMT. To support these results, we are researching the hypoxia-induced changes of the DNA expression associated with EMT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

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：口腔がん

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の浸潤・転移は、臨床的にがん患者における生命予後に大きく影響する因子の1つである。このため、がん細胞の浸潤・転移のメカニズムを解明することは、がん治療において非常に重要である。実際、がん細胞の浸潤・転移のメカニズム解明のためにこれまで非常に多くの研究が為され、次第にそのメカニズムが明らかとなってきた。

近年、がん細胞の浸潤・転移のメカニズムにおいて、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行)の関連が注目されるようになってきた。EMTとは上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入、神経提細胞の運動や器官形成過程における重要性が明らかとなっている。このEMTの獲得により運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらされることから、がん細胞の浸潤・転移メカニズムへの関連が示唆されている。

ヒト口腔扁平上皮がんにおいても、上皮細胞もしくは間葉系細胞に特異的な細胞表面抗原を指標に、EMTの存在が次第に明らかにされてきた。また、がん細胞へTWISTやSnailなどの遺伝子を導入することによりEMTと考えられる現象が生じることも明らかとなっており、ヒト口腔扁平上皮がん細胞がEMTを生じる過程も少しずつ明らかになってきている。

しかしながら、生体内においてヒト口腔扁平上皮がんがEMTがん細胞を取り巻く“環境因子”とEMTとの関連性については明確にされていない。

## 2. 研究の目的

腫瘍内における低酸素環境がヒト口腔扁平上皮がん細胞のEMT獲得の因子となることを検証し、ヒト口腔扁平上皮がん細胞におけるEMT発現の過程を明らかにする。これによりヒト口腔扁平上皮がん細胞の浸潤メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

1) ヒト口腔がん細胞SASの低酸素培養を行い、低酸素環境ががん細胞のEMTの誘因となることを確認する。EMTの確認は上皮細胞・間葉系細胞のそれぞれに特異的な細胞表面抗原の発現変化を経時的に評価することにより行う。また、低酸素環境から通常酸素環

境に戻し、EMTのreversibilityを検討する。

2) ノードマウス皮下にSASを注射し腫瘍モデルを作成し、生体内における腫瘍内低酸素領域でのEMT発現と通常酸素領域でのEMT発現を比較する。EMT発現の評価については上皮細胞・間葉系細胞それぞれに特異的な細胞表面抗原の発現変化を用いる。また、腫瘍内低酸素領域の特定にはpimonidazoleを用いる。

## 4. 研究成果

ヒト口腔がん細胞SASの低酸素培養では細胞培養の至適酸素濃度を決定し、低酸素培養においてもその増殖能に変化がみられないことを確認した。他のヒト口腔がん細胞で同様の実験を行ったところ、細胞種によっては低酸素培養において増殖能の低下が認められるものを認められた。このことから細胞種により低酸素環境に対する反応性の違いが存在することが示唆された。

次に低酸素環境下で培養したヒト口腔がん細胞SASにおける上皮細胞・間葉系細胞に特異的な細胞表面抗原の発現が、通常酸素状態で培養と比較し変化するかを観察した。この結果、低酸素培養を行ったヒト口腔がん細胞SASでは通常酸素状態で培養したものと比較し、上皮細胞に特異的な細胞表面抗原の発現が低下し、逆に間葉系細胞に特異的な細胞表面抗原の発現が増すことを確認した。

上記結果から低酸素環境はヒト口腔扁平上皮がんに対する刺激となり、がん細胞におけるEMTの誘因となる可能性が示唆された。

さらに低酸素状態で培養していた細胞を再度通常酸素状態で培養することにより、上皮細胞に特異的な細胞表面抗原の発現が回復し、間葉系細胞に特異的な細胞表面抗原の発現が減少することが観察された。このことから、低酸素環境により生じる細胞表面抗原の変化は可逆的であると考えられた。

また、この実験でも細胞種により細胞表面抗原発現の変化に違いが認められ、低酸素という環境に対する反応性の違いが細胞種間に存在することが確認できた。

次いでノードマウスにヒト口腔がん細胞SASを皮下注射することにより、ヒトがん細胞の生体内腫瘍モデルを作成し、生体内における通常酸素状態と低酸素状態の細胞における違いを調査した。

生体内腫瘍モデルにおける低酸素領域はpimonidazoleを用い可視化することにより検出した。pimonidazoleは10mmHg以下の細

胞に取り込まれるため、これを免疫組織化学的手法にて染色を行うことで低酸素領域を可視化した。

ヌードマウスを用いて作成した腫瘍モデルをホルマリン固定の後連続切片を作成し、1枚を pimonidazole 染色、残りの標本を上皮細胞・間葉系細胞それぞれに特異的な細胞表面抗体で免疫組織化学染色することにより、低酸素領域と非低酸素領域における細胞表面抗体発現の違いを比較した。

この結果、低酸素領域では通常酸素領域と比較し上皮細胞に特異的な細胞表面抗体の発現が低下し、逆に間葉系細胞に特異的な細胞表面抗体の発現が増加することが観察できた。

以上の結果より、低酸素環境はヒト口腔扁平上皮がんに対する大きな刺激となり、がん細胞における EMT の誘因となる可能性が示唆された。さらにこの変化は可逆的変化である可能性が示唆された。

このことは、がん細胞の増殖により低酸素環境が生じ、がん細胞が EMT を獲得する。これによりがん細胞の運動性が亢進し、その結果転移を生じる。転移したがん細胞は転移先にて再度上皮細胞の性質を回復し増殖を開始する、という腫瘍転移の仮説に矛盾しない。

実験結果を裏付けるため、現在さらに EMT 関連遺伝子の変化を観察中である。

## 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 2 件)

①Yamashita T, Toida M, Kato K, Long NK, Miyazaki Y, Asaka Y, Hatakeyama D, Yonemoto K, Makita H, Kato Y, Shibata T. The effect of neoadjuvant therapy on the 5-fluorouracil metabolic and relative enzymes of oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2009 Sep;22(3):501-7. 査読有

②Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, Hara A. Global DNA hypomethylation suppresses squamous carcinogenesis in the tongue and esophagus. Cancer Sci.2009 Jul;100(7):1186-91. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①山下知己, 土井田誠, 加藤恵三, Nguyen Khanh LONG, 宮崎康雄, 浅香雄一郎, 米本和弘, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 柴田敏之  
喫煙と飲酒が口腔扁平上皮癌患者の 5-FU 代謝酵素に与える影響  
第 33 回日本頭頸部学会, 2009 年, 6 月 10-12 日, ロイトン札幌

②加藤恵三, 宮崎康雄, 馬場政司, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 山下知己, 土井田誠, 柴田敏之  
Reck 遺伝子のメチル化と予後との相関および脱メチル化による浸潤制御の可能性  
第 63 回日本口腔科学会総会, 2009 年, 4 月 16 日, アクトシティ浜松

③Nguyen Khanh LONG, 加藤恵三, 宮崎康雄, 馬場政司, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 山下知己, 土井田誠, 柴田敏之  
Reck 遺伝子のメチル化と予後との相関  
第 20 回岐阜頭頸部腫瘍懇話会, 2009 年 2 月 6 日, 岐阜都ホテル

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 康雄 (Miyazaki Yasuo)  
岐阜大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：60509818

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：