

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10039

研究課題名(和文) 線維芽増殖阻害薬による口腔癌の浸潤・転移抑制効果

研究課題名(英文) Effects of fibroblast inhibitor on invasion and metastasis of oral cancer

研究代表者

野口 夏代(Noguchi, Natsuyo)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：90547176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の間質には線維芽細胞が多く観察される。本研究では線維芽細胞増殖抑制剤の口腔扁平上皮癌に対する増殖や転移抑制の効果を検討した。口腔扁平上皮癌の臨床での浸潤および転移を忠実に再現できるマウス正所性移植モデルを用いて、線維芽細胞増殖抑制剤の効果を検討した。癌細胞は高浸潤高転移性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるOSC-19細胞を使用し、ヌードマウスの舌に移植した。線維芽細胞増殖抑制剤はピルフェニドンとニンテダニブを用いて、増殖とリンパ節転移の阻止効果を調べた。その結果、腫瘍の大きさ、リンパ節転移にそれぞれ効果を認め、臨床的にも有意義であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の生物学的な大きな特徴は局所の増殖浸潤と転移である。特に転移の有無は口腔癌患者の予後を左右する最も重要な因子であり、治療が成功するか否かは転移を制御できるかどうかにかかわっている。口腔扁平上皮癌は間質に浸潤する際に間質反応として線維化を伴うことが知られているが癌にとってこの反応が宿主防御反応か癌細胞の浸潤増殖の足場として機能しているのかは不明である。本研究の結果、口腔癌において増殖や転移に線維芽細胞が深く関わっており、線維芽細胞の増殖を抑制することで癌細胞の増殖や転移を抑制できる可能性が示唆された。新しい口腔癌の治療法の開発につながるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Fibroblasts are abundantly observed in the stroma of oral squamous cell carcinoma. In this study, we investigated the effect of a fibroblast proliferation inhibitor agents on proliferation and metastasis of oral cancer. Using an orthotopic implantation mice model in which the invasion and metastasis of oral cancer can be reproduced, we investigated the inhibitory effects of fibroblast growth inhibitor agent on proliferation and metastasis. A highly invasive and metastatic human oral SCC cell line, OSC-19, was implanted into the tongue, and Pirfenidone or Nintedanib were administered to the mice. The effects of each drug on cancer proliferation and metastasis were investigated. Tumor sizes were significantly reduced in Pirfenidone and/or Nintedanib administered groups. The rate of metastasis was significantly decreased in Pirfenidone and/or Nintedanib administered groups. The use of fibroblast proliferation inhibitor considering these effects may be clinically very useful.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 増殖 転移 線維芽細胞



細胞を移植した舌と頸部リンパ節を摘出し、舌腫瘍部のサイズを測定した。その後、ホルマリン固定してから、パラフィン包埋した。舌と頸部リンパ節のパラフィン切片(4 $\mu$ m)を作成した。その切片を用い、舌移植腫瘍はヘマトキシリン - エオジン染色 ( HE 染色 )、アザン染色、免疫組織化学的染色を行い、間質を比較検討した。頸部リンパ節は HE 染色し転移の有無について検討した。

#### 4. 研究成果

増殖抑制効果は対照群の移植腫瘍の体積の平均値に比較して、ピルフェニドン投与群ではその 68.3%、ニンテダニブ投与群では 8.9%、併用投与群では 19.6%になっており、明らかな腫瘍縮小効果が認められた。

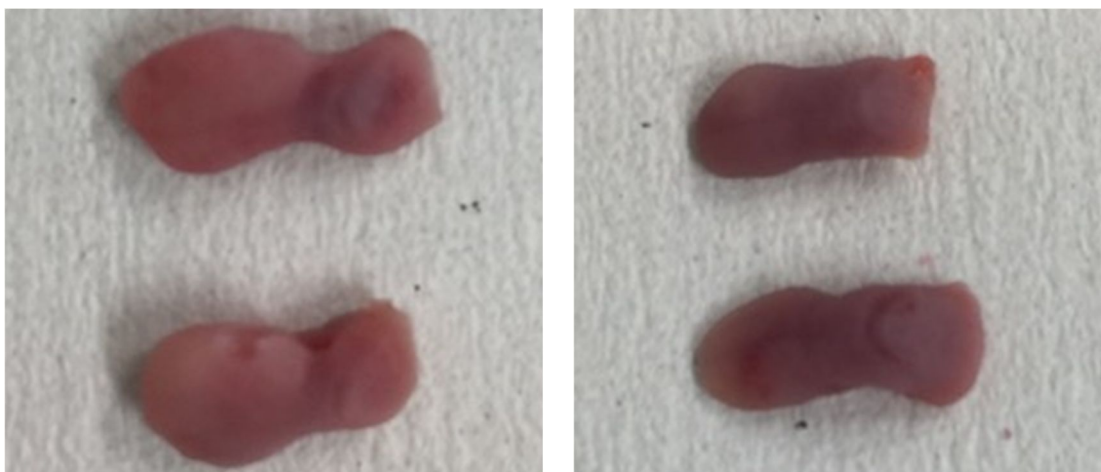


図 1 : 舌移植腫瘍の写真。左が対照群 ( 非薬剤投与群 )、右がピルフェニドン・ニンタデニブ併用投与群。併用群において腫瘍体積の縮小効果が観察された。

$$\text{腫瘍体積}(V)\text{の計算式} : V = lw^2 / 2 \quad (l: \text{長径} \quad w: \text{短径})$$

腫瘍体積の平均値は、コントロール群 ( N=5 ) が 47.97mm<sup>3</sup>、ピルフェニドン投与群 ( N=5 ) が 32.79mm<sup>3</sup>、ニンテダニブ投与群 ( N=5 ) が 4.28mm<sup>3</sup>、併用投与群 ( N=4 ) が 9.45mm<sup>3</sup>であった。ピルフェニドン投与群、ニンテダニブ投与群、併用投与群では有意に腫瘍の縮小効果を認め、特にニンテダニブ投与群と併用投与群では腫瘍体積が 8 割以上縮小されており、高い効果を示していた。

移植腫瘍の組織切片を作成し HE 染色で病理組織像を比較した結果、各群の移植腫瘍の病理組織像は低～中分化の扁平上皮癌で病理組織像に顕著な差は見られなかった。増殖抑制効果が認められた腫瘍でも壊死像などはみられなかった。また、アザン染色でも各群間での膠原線維の量や分布を検討したが、差は見られなかった。

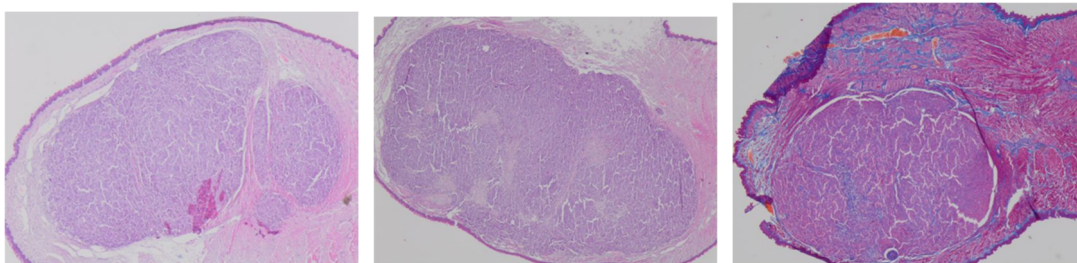


図 3 : 舌移植腫瘍の組織像。左が対照群 ( HE 染色 )、中央がピルフェニドン投与群 ( HE 染色 )、右がニンタデニブ投与群 ( アザン染色 )。HE 染色とアザン染色では組織像に差がみられない。

間質の線維芽細胞については免疫組織化学的に検索した。がん浸潤を促進させる cancer associated fibroblasts (CAF) のマーカーである  $\alpha$ -SMA 抗体を用いて免疫組織化学染色を行なったところ、対照群で腫瘍間質に強く発現していたが、各投与群ではやや減弱が見られた。したがって、癌間質の CAF の量が薬剤を投与した群で減少していることが明らかになった。

頸部リンパ節転移については、対照群の転移率 90%、ピルフェニドン投与群の転移率 80%、ニンテダニブ投与群の転移率 40%、併用投与群の転移率 25% で、併用投与群でリンパ節転移が抑制されていた。

以上結果から、移植腫瘍の体積はニンテダニブ投与群で顕著に減少がみられたが、移植腫瘍の病理組織像では各群間で差は見られなかった。また移植腫瘍のアザン染色でも各群間に差はみられなかった。転移リンパ節の病理像には差はなかったが、リンパ節転移率は併用投与群で顕著に低くなっていた。したがって、本研究から間質の線維芽細胞の阻害薬を投与することで、癌細胞の増殖抑制効果とリンパ節転移抑制効果が認められることが明らかになった。

本研究では上記のように、ピルフェニドンおよびニンテダニブ投与による腫瘍の増殖抑制と転移抑制効果が、口腔扁平上皮癌のマウス浸潤・転移モデルを用いて示された。

また、本研究では HE 染色、アザン染色、 $\alpha$ -SMA 抗体と FGF-2 抗体の免疫組織化学染色を行い、それぞれ間質阻害薬の効果を検討した、その結果  $\alpha$ -SMA と FGF-2 の発現の差を認められたが、その他の染色像には差がなかった。今回、腫瘍増殖抑制の効果が顕著に認められたことから癌細胞の増殖抑制に何が関与したか、詳細に検討したいと考えている。すなわち、癌細胞自身の増殖活性は抑制されているのか？血管新生やリンパ管新生が抑制されているのか？癌細胞や周囲の炎症性サイトカインやケモカインは抑制されているのか？癌細胞浸潤に重要である、周囲組織を破壊する酵素活性は抑制されているのか？癌細胞周囲の微小環境や免疫寛容状態は変化したのか？など、癌の増殖抑制に関与した機序を詳細に検討していく必要があると思われる。これらの機序を明らかにすることで、間質をターゲットとした薬剤の癌治療に対する有用性を示すことができると思われる。

さらに、間質を阻害する薬剤の効果が確かめられた後には、これまで使用している癌細胞に直接作用する抗癌剤との併用効果について検討したい。現在は化学療法での口腔癌の根治的治療は困難である。本研究のように癌細胞周囲の間質を抑制することにより、これまでの抗癌剤では不十分であった点を補い、強力な抗癌作用を得ることが期待できるならば、併用効果は高いと思われる。高悪性の癌において抗癌剤は殆ど効果がないが、逆に高悪性の癌において周囲の間質や炎症などの変化は大きいことが判明している。このようにターゲットの異なる薬剤の併用は、高悪性の癌にも効果を発揮できる治療法を発見できる可能性が高いとともに、癌の実質と間質や環境を同時に攻撃する新しい治療法が開発できる可能性が期待できるものと考えている。

## 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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato K, Miyazawa H, Kawashiri S, Lambert DW.	4. 巻 26
2. 論文標題 Tumour Fibroblast Interactions Promote Invadopodia-Mediated Migration and Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 5277440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/5277440.	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 該当する
1. 著者名 Yamashita-Futani Y, Jokaji R, Ooi K, Kobayashi K, Kanakis I, Liu K, Kawashiri S, Bou-Gharios G, Nakamura H	4. 巻 14
2. 論文標題 Metalloelastase-12 is involved in the temporomandibular joint inflammatory response as well as cartilage degradation by aggrecanases in STR/Ort mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical reports	6. 最初と最後の頁 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2021.1427.	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 該当する
1. 著者名 Yoshizawa K, Ando H, Kimura Y, Kawashiri S, Yokomichi H, Moroi A, Ueki K	4. 巻 133
2. 論文標題 Automatic discrimination of Yamamoto-Kohama classification by machine learning approach for invasive pattern of oral squamous cell carcinoma using digital microscopic images: a retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology	6. 最初と最後の頁 441-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oooo.2021.10.004.	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 Kato K, Miyazawa H, Kobayashi H, Kishikawa Y, Funaki H, Noguchi N, Ooi K, Kawashiri S.	4. 巻 18
2. 論文標題 The pattern and spread of invasion can predict late cervical lymph node metastasis in early tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic pathology	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13000-023-01371-3.	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸川祥彰、加藤広祿、船木勇人、宮澤広樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるDynamin-2発現と臨床病理学的因子との関連性についての検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船木勇人、岸川祥彰、加藤広祿、宮澤広樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるProx-1発現と臨床病理学的因子との関連性についての検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤広祿、宮澤広樹、小林泰、小林久乃、船木勇人、岸川祥彰、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌に対する術前S-1単独化学療法の有効性に関する検討
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤広祿、宮澤宏樹、小林泰、小林久乃、岸川祥彰、船木勇人、大井一浩、野口夏代、川尻秀一
2. 発表標題 当科における口腔扁平上皮癌の臨床病理学的特徴と予後との関連
3. 学会等名 第47回日本頭頸部癌学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸川祥彰、加藤広禄、箱田京介、船木勇人、小林久乃、小林泰、宮澤宏樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるカベオラ構成タンパク質発現の臨床病理学的意義について
3. 学会等名 第68回日本口腔外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船木勇人、加藤広禄、箱田京介、岸川祥彰、小林久乃、小林泰、宮澤宏樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるカProx-1およびVEGF3発現とその臨床病理学的意義
3. 学会等名 第68回日本口腔外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023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	川尻 秀一  (Kawashiri Shuichi)  (30291371)	金沢大学・医学系・教授   (13301)	病理組織学的解析

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
---------	---------