

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10116

研究課題名（和文）口腔癌リンパ節転移節外進展における脂肪細胞の役割

研究課題名（英文）The Role of Adipocytes in Extracapsular Spread of Lymph Node Metastasis in Oral Cancer

研究代表者

栗林 恭子（Kuribayashi, Kyoko）

愛媛大学・医学部附属病院・助教（病院教員）

研究者番号：60579952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移巣微小環境における脂肪細胞の役割を明らかにした。口腔扁平上皮癌組織の転移リンパ節標本を用いた。Visiumにて空間的遺伝子発現解析を行った。その結果、脂肪分化マーカーであるADIPOQは口腔扁平上皮癌組織に近接している脂肪組織が認められるClusterでの発現低下を認めた。さらに、脂肪組織に進展している口腔扁平上皮癌組織では転移への関与が示唆されているANGPTL4の発現亢進を認めた。以上から、口腔扁平上皮癌組織と脂肪組織は接することにより、脂肪細胞に対しては脱分化を誘導し、癌細胞に対しては転移能を高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果として、口腔扁平上皮癌組織と脂肪組織は接することにより相互の遺伝子発現に影響を及ぼし、脂肪細胞に対しては脱分化を誘導し、癌細胞に対しては転移能を高める可能性が示唆され、学術的意義が見いだされた。さらに、口腔癌におけるリンパ節転移における新たな治療の可能性が示唆され、社会的に意義のある成果が見いだされた。

研究成果の概要（英文）：This study elucidated the role of adipocytes in the microenvironment of metastatic cervical lymph nodes in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Metastatic lymph node specimens from OSCC tissues were used, and spatial gene expression analysis was performed using Visium. The results showed a decrease in the expression of ADIPOQ, a marker of adipocyte differentiation, in clusters of adipose tissue adjacent to OSCC tissues. Additionally, there was an increased expression of Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4), which is implicated in metastasis, in OSCC tissues infiltrating adipose tissue. These findings suggest that the interaction between OSCC tissues and adjacent adipose tissue affects their respective gene expressions. This interaction may induce dedifferentiation in adipocytes and enhance the metastatic potential of cancer cells.

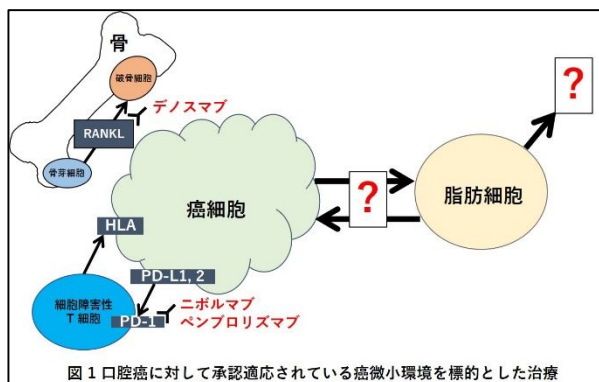
研究分野：脂肪細胞

キーワード：脂肪細胞 口腔癌 リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

わが国では超高齢社会の到来とともに口腔扁平上皮癌の罹患数は増加しており、2015年の時点で年間約 8,000 人とされ、約 30 年前の 3 倍に達している。2016 年の国立がん研究センターの調べでは口腔・咽頭がんの死亡率は 35.5% で、米国の 19.8% に比較すると約 1.7 倍も高くなっている。従来、集学的治療が行われてきたが治療成績の飛躍的な向上には未だ至っておらず、病態の理解を分子レベルでさらに深める必要がある。予後に影響を及ぼす最大の臨床病理組織学的因子は頸部リンパ節転移であるが、特に転移巣がリンパ節被膜を超えて隣接組織に浸潤する、いわゆる節外浸潤をきたした症例では予後が著しく不良となることがよく知られている。この節外進展症例に対しては術後放射線化学同時併用療法が標準治療とされているが完全制御には至っていないのが現状である。

癌組織は、癌細胞のみならず種々の間質細胞や細胞外マトリックスなどから構築されており、いわゆる微小環境を形成している。21 世紀に入り、この癌微小環境の解明がさかんに行われており、癌細胞の増殖、浸潤、転移が免疫細胞、線維芽細胞、新生血管を構成する血管内皮細胞、神経細胞、骨芽細胞、破骨細胞などにより制御されていることが明らかにされている。さらに、これら細胞の発現する分子を標的とした薬剤がすでに承認され日常の癌診療に用いられている。口腔癌を含む頭頸部癌も例外でなく、免疫細胞に発現する PD-1 (programmed death



receptor-1) や骨芽細胞が発現し破骨細胞への分化を促す RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) を標的としたニボルマブ、ペンブロリズマブやデノスマブが再発・転移や骨転移症例の治療に使用されている (図 1)。しかしながら、癌微小環境の中でも癌細胞と脂肪細胞の相互作用に関する知見は乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌リンパ節転移節外浸潤における脂肪細胞の役割を明らかにすることを目的とする。すなわち、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移節外浸潤を脂肪細胞が助長するのか抑制するのかを明らかにした上で、空間的遺伝子発現解析技術を用いて癌細胞と脂肪細胞の相互作用を分子レベルで完全に解明することを目指した。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌症例の頸部郭清手術標本より転移リンパ節を周囲組織と共に摘出した。臨床的に明らかな節外浸潤を認める症例とリンパ節は顕著に腫大しているにもかかわらず節外浸潤を認めない症例を解析対象とした。転移リンパ節と周囲組織との境界を含めるように約 5 mm 角の組織片を複数切り出し、液体窒素上でイソペンタンに浸け急速凍結した後に Tissue-Tek[®] O.C.T.compound を用いて包埋し、凍結組織ブロックを作製した。同ブロックから薄切切片を複数枚切り出し、1 枚は H&E 染色を行い組織構造が保たれていること、すなわち癌細胞がリンパ節被膜を超えて脂肪細胞と接して

いるか、いないかを確認し、もう 1 枚からは total RNA を抽出し、分解を受けていないことを確認した。上記 2 点を確認した上で、同ブロックから厚さ 10 μm の切片を切り出し、Visium Spatial Gene Expression Slide (10x Genomics) に載せる (図 2)。本スライドは、6.5 x 6.5 mm の区画内に数億の mRNA キャプチャーオリゴを含む 5,000 のスポットを有し、スポットあたり平均 1-10 細胞をキャプチャーした。1 スポットに 1 種類のバーコードを付与しているため各細胞の空間的位置情報を保持したまま遺伝子発現プロファイルを得ることができた。さらに、組織の H&E 染色画像データを取得した後に細胞透過酵素で処理し、ライブラリーを調製した。次いで、次世代シーケンサーを用いて RNA Sequencing (RNA-Seq) を行い、リンパ節転移巣における癌細胞と脂肪細胞それぞれの遺伝子発現プロファイルを得た。

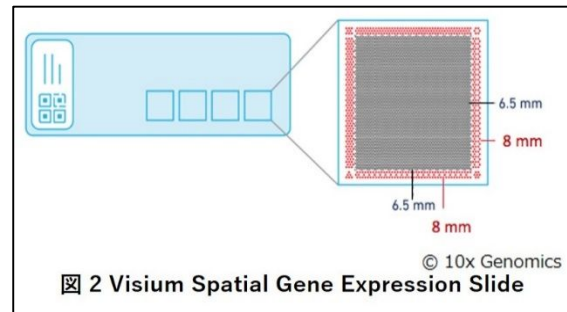


図 2 Visium Spatial Gene Expression Slide

4. 研究成果

臨床的に明らかな節外浸潤を認める症例とリンパ節は顕著に腫大しているにもかかわらず節外浸潤を認めない症例における Visium 空間的遺伝子発現解析では、それぞれ 8 種類のクラスターに分類された。その際、節外浸潤を認めている症例において、節外浸潤周辺組織 (脂肪組織も混在) は異なった遺伝子発現クラスターを認めた (図 3)。脂肪分化マーカーである Adiponectin (ADIPOQ)、Lipoprotein lipase (LPL) および peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) は HE 染色にて脂肪組織が認められる Cluster での発現亢進を認めていた。しかしながら、節外浸潤周辺組織に混在した脂肪組織における Adiponectin の発現亢進は認めなかった。また、脂肪組織に進展している口腔扁平上皮癌組織では転移への関与が示唆されている Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) の発現亢進を認めた。ANGPTL4 は脂質代謝や血管新生因子としての働きが指摘されている。最近、癌の遠隔転移における癌細胞の血管内皮細胞通過の過程に ANGPTL4 が関与している可能性が報告されている。さらに、ANGPTL4 が口腔の扁平上皮癌の進展にも影響しているとの報告があり、ANGPTL4 の癌運動性や浸潤亢進、増殖亢進等を調べ、癌促進相乗作用を明らかにされていた。従って、本研究結果から口腔扁平上皮癌組織と脂肪組織は接することにより相互の遺伝子発現に影響を及ぼし、脂肪細胞に対しては脱分化を誘導し、癌細胞に対しては転移能を高める可能性が示唆された。

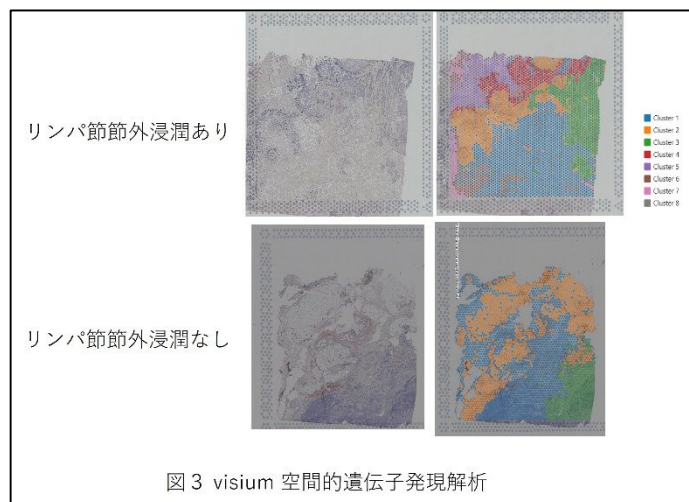


図 3 visium 空間的遺伝子発現解析

謝や血管新生因子としての働きが指摘されている。最近、癌の遠隔転移における癌細胞の血管内皮細胞通過の過程に ANGPTL4 が関与している可能性が報告されている。さらに、ANGPTL4 が口腔の扁平上皮癌の進展にも影響しているとの報告があり、ANGPTL4 の癌運動性や浸潤亢進、増殖亢進等を調べ、癌促進相乗作用を明らかにされていた。従って、本研究結果から口腔扁平上皮癌組織と脂肪組織は接することにより相互の遺伝子発現に影響を及ぼし、脂肪細胞に対しては脱分化を誘導し、癌細胞に対しては転移能を高める可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗林伸行、中城公一、栗林恭子、日野聡史、合田啓之、徳善紀彦、内田大亮
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌と脂肪組織の相互作用
3. 学会等名 第68回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
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	中城 公一 (Nakashiro Koh-ichi) (90314880)	愛媛大学・医学系研究科・准教授 (16301)	

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