

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 20101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010 年度～2012 年度
 課題番号：22390388
 研究課題名（和文） 口腔がんにおける β カテニン遺伝子異常の解析とがん治療への応用

研究課題名（英文） Analysis of the β catenin gene abnormality and therapeutic application for oral cancer.

研究代表者

平塚 博義 (HIRATSUKA HIROYOSHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50165180

研究成果の概要（和文）：固形癌においては、腫瘍内に低酸素領域が存在し、細胞増殖、抗がん剤耐性、細胞浸潤・転移能の亢進など癌の悪性化に関与している。本研究では口腔扁平上皮癌細胞が低酸素環境におかれることにより、wnt/ β カテニン経路が活性化し、がんの浸潤・転移能の獲得に関与していること、さらに低酸素環境がグルコース輸送体タンパク質-1の発現を亢進し、抗がん剤耐性を増強すること、また NF- κ B を活性化し細胞増殖能を亢進させる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Hypoxic regions in solid tumors mediate malignant transformation, cancer cell proliferation, resistance to anti-cancer agents, and enhanced cellular invasion and metastasis. In this study, we found that the wnt/ β -catenin pathway activation mediates the acquisition of invasion and metastatic potential in oral squamous cell carcinoma cells. Hypoxia enhances the expression of glucose transporter 1 (GLUT1) and anticancer drug resistance, and activates NF- κ B/p65 to trigger cell proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔がん、 β カテニン、低酸素、上皮-間葉転換、GLUT-1、NF- κ B/p65

1. 研究開始当初の背景

1) 口腔扁平上皮癌では、接着因子であり腫瘍特異抗原でもある β カテニンの細胞膜発現減弱が予後因子であり、Wnt/ β カテニン伝達経路を阻害する分泌型 frizzled 関連蛋白

(SFRP) 遺伝子の DNA メチル化異常が認められることが報告されている。また、 β カテニンの細胞膜における発現減弱と口腔がんの予後が有為に相関することを報告しているが、分子生物学的な機序に関しては報告がない。

2) 口腔がんを含む固形がんにおいては、腫瘍内に低酸素領域が存在し、がんの悪性化に強く関与していることが多くの領域のがんで報告されているが、口腔がんでは詳細な分子生物学的な報告がほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞が低酸素環境におかれることにより、wnt/ β カテニン経路が活性化し、がんの浸潤・転移能の獲得に関与していること、さらに低酸素環境におけるがんの悪性化、すなわち抗癌剤耐性や細胞増殖能の増強の分子生物学的機序を明らかにする事を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

1) 口腔扁平上皮癌細胞を低酸素環境におき、wnt/ β カテニンシグナルの活性化、細胞接着因子であるEカドヘリン、 β カテニン、間葉系マーカーであるビメンチンなどの細胞内動態を蛍光免疫染色法やリアルタイムPCR法で検討した。

2) 口腔癌細胞を低酸素環境下で培養し、低酸素誘導因子関連遺伝子に対するcDNAプレートアレイでHIF1関連遺伝子遺伝子の発現変化を解析した。

3) cDNAプレートアレイの解析結果にもとづき、抗癌剤感受性や細胞増殖能に関連した遺伝子をsiRNAでノックダウンし、口腔癌細胞の抗癌剤耐性や細胞増殖の変化に関して検討を行った。

4. 研究成果

1) 口腔癌細胞を低酸素環境におくと、細胞膜でのEカドヘリン、 β カテニンの発現が減少し、 β カテニンは細胞質や核へ移行した。これに伴い間葉系マーカーであるVimentinやSnailの細胞内での発現が増加した。これは、口腔扁平上皮癌細胞が低酸素環境で上皮-間葉移行をおこなっていると考えられ、浸潤、転移能を獲得する重要な機序の1つである

ことが示唆された。これは、腫瘍組織において β カテニンの細胞膜発現が減弱した群が有為に予後不良になることの分子生物学的機序の1つと考えられた。

2) 化学療法に対する感受性についてについての検討では、口腔扁平上皮癌細胞は、通常酸素環境下と低酸素環境下で、それぞれCDDPの量に対して異なる応答を示すことが解った。口腔扁平上皮癌細胞では低酸素環境下でグルコース輸送体タンパク質-1 (GLUT-1)の発現上昇を認めた。さらに、グルコース輸送体タンパク質-1 (GLUT-1)の発現とCDDP感受性に負の相関関係があった。口腔扁平上皮癌細胞において、通常酸素環境下と比較して低酸素環境下ではGLUT-1ノックダウンしてCDDP処理をすると、アポトーシスの増加をもたらす結果となった。これらのことから、低酸素環境におけるGLUT-1の発現が、抗癌剤耐性に関与していることが示唆された。

3) 細胞増殖活性に関する検討では、口腔癌細胞を低酸素環境におくと、NF- κ Bの活性が上昇し、これにともないVEGF-Cの発現が有為に上昇した。NF- κ B/p65 siRNAを導入し、NF- κ B/p65発現をノックダウンした結果、細胞増殖能が抑制された。以上の結果から、口腔癌細胞では低酸素環境においてNF- κ B経路の活性化によって、細胞増殖能が増加している事が示唆され、口腔癌細胞においては低酸素領域でNF- κ B/p65が細胞増殖のコントロールに重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

5) 本研究成果の国内外における位置づけとインパクト

癌細胞が低酸素において受ける影響についての研究は、膵臓癌など転移が問題となる領域で多く報告されているが、口腔癌においては詳細な分子生物学的機序を報告したものは少ない。本研究はwnt/ β カテニン経路を中心と

して口腔癌細胞が低酸素で受ける影響を分子生物学的に明らかにした点で、単に基礎的研究ではなく、臨床の口腔癌治療で問題となる抗癌剤耐性や放射線治療抵抗性の解決につながる可能性がある。

(6) 今後の展望

現在の課題は、放射線化学療法の術前予測と効果不良の難治性口腔癌の治療法の開発である。

本研究は、固形癌に特徴的な低酸素領域における浸潤、転移能の獲得、抗癌剤に対する感受性の低下、細胞増殖活性の増加など口腔癌の悪性化に関しての分子生物学的機序を明らかにした。

これらの結果は難治性の口腔癌治療において治療抵抗性を解除し、放射線や抗癌剤に対する感受性を改善し、治療効果を高める治療法の開発に寄与すると思われる。

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7件)

- 1: Naoki Anbo, Kazuhiro Ogi, Yohei Sogabe, Makoto Shimanishi, Takeshi Kaneko, Hironari Dehari, Akihiro Miyazaki, Hiroyoshi Hiratsuka. Suppression of NF- κ B/p53 inhibits the proliferation in oral squamous cancer cells. *Journal of Cancer Therapy*, 2013 June; 4: 891-897 doi:10.4236/jct.2013.44100. 査読あり
- 2: Shimanishi M, Ogi K, Sogabe Y, Kaneko T, Dehari H, Miyazaki A, Hiratsuka H. Silencing of GLUT-1 inhibits sensitization of oral cancer cells to cisplatin during hypoxia. *J Oral Pathol Med*. 2013 May;42(5):382-8. doi: 10.1111/jop.12028. 査読あり
- 3: Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T,

- Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, Fujino J, Asanuma H, Tamura Y, Nakamori K, Hasegawa T, Hiratsuka H, Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int*. 2012 Oct;62(10):684-9. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02851.x. 査読あり
- 4: Kobayashi J, Miyazaki A, Yamamoto T, Nakamori K, Suzuki R, Kaneko T, Suzuki N, Hiratsuka H. Granulocyte colony-stimulating factor-producing squamous cell carcinoma of the lower gingiva: a case report. *Head Neck Oncol*. 2012 Jun 19;4:35. doi:10.1186/1758-3284-4-35. 査読あり
- 5: Izumo T, Kirita T, Arijii E, Ozeki S, Okada N, Okabe S, Okazaki Y, Omura K, Kusama M, Sato T, Shinohara M, Shimozato K, Shintani S, Tanaka Y, Nakayama E, Hayashi T, Miyazaki A, Yagishita H, Yamane M; Working Group 1 on the 'Guidelines for Clinical and Pathological Studies of Oral Cancer', Scientific Committee, Japan Society for Oral Tumors. General rules for clinical and pathological studies on oral cancer: a synopsis. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 42:1099-109. 査読あり
- 6: 宮崎晃亘, 平塚博義. 口腔悪性腫瘍. *医学と薬学* 2012 67:799-805. 査読なし
- 7: Miyazaki A, Kobayashi J, Torigoe T, Hirohashi Y, Yamamoto T, Yamaguchi A, Asanuma H, Takahashi A, Michifuri Y, Nakamori K, Nagai I, Sato N, Hiratsuka H. Phase I clinical trial of survivin-derived peptide vaccine therapy for patients

with advanced or recurrent oral cancer. Cancer Sci. 2011 Feb;102(2):324-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01789.x. 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

1. Takanori Sasaki, Takayuki Kanaseki, Sachiyo Kawami, Yasuaki Tamura, Toshihiko Torigoe, Hiroyoshi Hiratsuka, Noriyuki Sato. The stressed cells are potential targets for CD8+T cell recognition in vivo 日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月京都
2. Kazuhiro Ogi, Makoto Shimanishi, Takeshi Kaneko, Hironari Dehari, Akihiro Miyazaki, Hiroyoshi Hiratsuka. Silencing of GLUT1 inhibits sensitizes oral cancer cells to CDDP during hypoxia. 日本癌学会総会、2012 年 9 月札幌
3. Akihiro Miyazaki, Junichi Kobayashi, Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Yoshitaka Michifuri, Takanori Sasaki, Junki Fujino, Hiroko Asanuma, Akari Takahashi, Noriyuki Sato, Hiroyoshi Hiratsuka. Survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent oral cancer - Phase I clinical trial - 日本癌学会総会、2012 年 9 月札幌
4. 佐々木敬則、金関貴幸、山本絵利、植田恵実理、田村保明、鳥越俊彦、平塚博義、佐藤昇志 : 小胞体ストレスにより MHC クラス I 抗原プロセッシングの分子機構と病態 日本病理学会総会、横浜、2011 年 4 月
5. 道振義貴、廣橋良彦、鳥越俊彦、宮崎晃亘、小林淳一、田村保明、平塚博義、佐藤昇志 : 口腔がんにおけるがん幹細胞特異的分子の同定 日本病理学会総会、横浜、2011 年 4 月
6. Takanori Sasaki, Takayuki Kanaseki, Emiri Nakazawa, Eri Saka, Yasuaki Tamura, Toshihiko Torigoe, Hiroyoshi Hiratsuka,

Noriyuki Sato: The cells under the ER stress present novel pMHC1 and elicit CD8+ T cell responses. The 2011 CSSI Congress, 2011 年 8 月 カナダ、ケベック

7. Naoki Anbo, Makoto Shimanishi, Kazuhiro Ogi, Hiroyoshi Hiratsuka: Analysis of cDNA plate array between CDDP sensitive and CDDP resistant. Oral squamous cancer cell line ; HIF-1 can regulate NF- κ B under hypoxia. 日本癌学会総会、2011 年 10 月 名古屋
8. Kazuhiro Ogi, Makoto Shimanishi, Naoki Anbo, Tsuyoshi Kaneko, Yohei sogabe, Hironari Dahari, Hiroyoshi Hiratsuka: Identification of epigenetic change of genes that mediates hypoxic adaptation using HIF regulated cDNA plate array. 日本癌学会総会、2011 年 10 月 名古屋
9. Akihiro Miyazaki, Junichi Kobayashi, Toshihiko Torigoe, Yoshihiko Hirohashi, Yoshitaka Michifuri, Takanori Sasaki, Hiroko Asanuma, Noriyuki Sato, Hiroyoshi Hiratsuka: A phase I study of survivin-2B peptide vaccine therapy in combination with interferon- α for patients with oral cancer. 日本癌学会総会、2011 年 10 月 名古屋
10. Takanori Sasaki, Takayuki Kanaseki, Hiroyoshi Hiratsuka, Noriyuki Sato: The cells under the ER stress present novel pMHC1 and elicit CD8+T cell responses. 日本癌学会総会、2011 年 10 月 名古屋
11. Yoshitaka Michifuri, Yoshihiko Hirohashi, Toshihiko Torigoe, Akihiro Miyazaki, Junichi Kobayashi, Takashi Yamamoto, Yasuaki Tamura, Akari Takahashi, Kenji Nakamori, Akira Yamaguchi, Hiroyoshi Hiratsuka, Noriyuki Sato: Small

proline-rich protein-1B (SPRP1B) is overexpressed in ALDEFLUOR bright human cancer stem-like oral squamous cell carcinoma and related to its maintenance.

日本癌学会総会、2011年10月 名古屋

12. 宮崎晃亘、小林淳一、鳥越俊彦、廣橋良彦、山本 崇、道振義貴、浅沼広子、荻 和弘、山口 晃、佐藤昇志、平塚博義：口腔癌に対するサバイビン 2B ペプチドワクチン療法第 I 臨床試験。日本癌学会総会、2010年9月 大阪

13. 荻 和弘、仲盛健治、宮崎晃亘、島西真琴、安保直樹、平塚博義：口腔癌における癌低酸素領域での血管新生因子に関する臨床的意義。日本癌学会総会、2010年9月 大阪

14. 安保直樹、島西真琴、荻 和弘、平塚博義：hMHL1, hMSH2 の口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得への関与に関する研究。日本癌学会総会、2010年9月 大阪

15. Kenji Nakamori, Hironari Dehari, Takashi Imai, Akihiro Miyazaki, Kazuhiro Ogi, Naoki Anbo, Makoto Shimanishi, Hiroyoshi Hiratsuka: Clinical Significance of Cortactin and Cyclin D1 Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Tongue. 20th European Association for Cranio-Maxillo-facial Surgery, 2010年9月 ベルギー

〔図書〕(計1件)

Nakamori K, Dehari H, Miyazaki A, Ogi K, Anbo N, Shimanishi M, Kaneko T, Hiratsuka H: Clinical and pathological features of squamous cell carcinoma of the tongue with special reference to cortactin and cyclin D1 expression. *Tongue: Anatomy, Kinematics and Diseases*, Editors: Hiroto Kato and Taiga Shimizu, Nova Science Publishers, Inc, NY, United States of America, 2012, pp.155-164

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/oral/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 博義(HIRATSUKA HIROYOSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号:50165180

(2) 研究分担者

出張 裕也(DEHARI HIRONARI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号:00381260

宮崎 晃亘(MIYAZAKI AKIHIRO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号:10305237

荻 和弘(OGI KAZUHIRO)
札幌医科大学・医学部・訪問研究員
研究者番号:40433114

佐々木 敬則(SASAKI TAKANORI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号:50548732

仲盛 健治(NAKAMORI KENJI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号:60295334

小林 淳一(KOBAYASHI JYUNICHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号:80404739

曾我部 陽平(SOGABE YOUHEI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号:50468104

山本 崇(YAMAMOTO TAKASHI)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号:50448594

島西 真琴(SHIMANISHI MAKOTO)
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号:10516561

(3) 連携研究者

()

研究者番号: