

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591917

研究課題名（和文） EMT（上皮間葉転換）を誘導する分子機構を標的とした頭頸部癌転移治療の研究

研究課題名（英文） Study to control metastasis of HNSCC by targeting molecular mechanisms leading to epithelial-mesenchymal transition (EMT)

研究代表者

今西 順久 (IMANISHI YORIHISA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80255538

研究成果の概要（和文）：癌細胞の転移プロセスに関与する上皮間葉転換(EMT)について次のような成果を得た：1) 細胞接着因子 E-カドヘリンの発現低下，転写抑制因子 SIP1 の発現亢進は舌扁平上皮癌の頸部リンパ節転移の予測因子と考えられた。2) 血管新生調節因子 Ang2 は乳癌細胞において EMT 誘導のみならず，アポトーシス抑制を介して生存能を増強させることで，転移能を亢進させることを解明した。3) 選択的 Cox2 阻害の抗腫瘍作用は EMT 抑制も介していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Our study of EMT (epithelial to mesenchymal transition), which is closely involved in a process of cancer metastasis, led to the following results: 1) Downregulation of E-cadherin and overexpression of SIP1 were considered to be predictive of cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinoma. 2) Ang2 was shown to enhance metastatic ability of breast cancer cells by promoting cell survival ability via suppression of apoptosis, in addition to induction of EMT. 3) Selective Cox2-inhibition was revealed to include suppression of EMT in its anti-tumor effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌，転移，EMT（上皮間葉転換），細胞遊走能，E-cadherin，転写抑制因子，Cox2，多変量解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌の治療成績向上の限界

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は世界統計におけるがん罹患率で第 6 位，毎年 500,000 人以上の新患者を認めるが，従来集学的治療として手術・放射線・化学療法を最大限に駆

使してきたにも関わらず，この 20 年に亘りその治療成績に向上が認められない。その最大の障壁が強い浸潤能・転移能にあることから，癌の浸潤・転移の分子機構のさらなる解明は，一次治療後の後発性転移のリスク評価と予測や，転移出現後の効果的治療の開発な

ど、臨床現場の視点からも極めて重要な課題である。

(2) 転移メカニズムにおける EMT と Ang2

癌の転移は様々な細胞レベルの現象：すなわち細胞間接着の低下と離脱、遊走能の亢進、細胞外マトリックスの分解、リンパ管・血管への侵入、循環系におけるサバイバル、リンパ管・血管外への侵入、標的組織における血管新生を伴う再増殖、などの積み重ねの結果として成立する。近年のがん生物学の進歩において、これらのイベントの多くが EMT (epithelial to mesenchymal transition: 上皮間葉転換) に類似していることが指摘されるようになった。EMT とは、上皮細胞が細胞間接着を失い細胞骨格の再構築を行って間葉細胞の性質を獲得する現象で、元来は初期胚発生過程や創傷治癒過程に特有とされる。上皮由来癌細胞が紡錘型の形態変化に伴って遊走能・浸潤能を獲得することで浸潤・転移に寄与していると考えられている。HNSCC での意義はまだ十分解明されていない一方、我々はマウス同所移植モデルを用いて、血管新生調節因子 Ang2 が $\alpha 5\beta 1$ -integrin/ILK/Akt/GSK3 β /snail pathway を介して乳癌細胞の EMT を誘導することで遠隔転移を亢進させるメカニズムを解明し、以前に報告した。

(3) Cox2 選択的阻害と EMT 抑制

脂肪酸酸化酵素 cyclooxygenase (Cox) はアラキドン酸を基質とした生理活性物質 Prostaglandin の合成を介して様々な細胞機能を制御しており、誘導性の Cox2 は癌細胞における発現亢進が広く認められる。Cox2 が癌の発生と進行に寄与する作用は細胞増殖能亢進・浸潤能亢進・血管新生誘導・アポトーシス抑制など多彩であり、その選択的阻害による chemoprevention 効果が消化器癌を中心に報告されているが、EMT を含めた細胞遊走能への関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HNSCC の浸潤・転移の分子機構における EMT の関与を解明し、そのシグナル (E-cadherin の転写抑制因子の誘導シグナル、Ang2- $\alpha 5\beta 1$ integrin pathway, その他) に関わる分子標的の制御により EMT を抑制し得る新たな抗転移治療戦略を開発し、さらに転移予測における新規バイオマーカーを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HNSCC における EMT 関連因子の発現評価と臨床的意義の検討

①種々の HNSCC 細胞 (HSC2, HSC3, HSC4, SAS, SCC25, HO1U1, Hep2, SCC4, FaDu, KB, Detroit562 など) における細胞接着因子

E-cadherin (E-cad) およびその転写抑制因子

(SIP1, snail, twist) の発現を TaqMan Gene Expression Assays を用いた

quantitative real-time PCR により定量した。

②慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科で初回治療として舌部分切除のみを行った stage I-II (T1-2N0) 舌扁平上皮癌症例 37 例の臨床検体における病理組織学的所見、および免疫組織化学的に EMT 関連因子の発現を評価し、後発性リンパ節転移 (delayed neck metastasis: DNM) の規定因子を統計学的に検討した。

(2) 乳癌転移モデルにおける血管新生調節因子 Ang2 の (EMT 以外の) 役割の検討

①Ang2 導入乳癌細胞 MCF-7 とその親株の転移能を、ヌードマウス経尾静脈注入転移モデルを用いた xenograft assay により評価した。さらに *in vivo* (上記モデルの肺に trap された細胞を対象とする) および *in vitro* (serum-starvation モデルおよび CoCl₂ による擬似的低酸素モデル) の cell survival assay, *in vivo* TUNEL assay, Cell Death detection ELISA により、*in vivo* および *in vitro* 各々の生存能 (cell survival) および apoptosis を評価した。

②ILK, Akt (isoform 1,2,3) の Ser473 リン酸化、apoptosis 関連シグナル分子の発現の変化を Western Blot にて評価した。ILK, Ang2, Akt1, Akt2, および Bcl-2 に対する gene knockdown として各々の siRNA を用いて上述のリン酸化および発現の変化を評価した。

③他の Ang2 高発現細胞: MDA-MB-468, SK-BR-3 および MDA-MB-231 (#1834) においても *in vitro* における Ang2-knockdown の影響を上述の手法で評価した。

(3) HNSCC における選択的 Cox2 阻害と EMT 抑制の検討

①種々の HNSCC 細胞 (同上 11 種) における Cox2 と E-cad の発現を quantitative real-time PCR で定量した。選択的 Cox2 阻害剤 (Celecoxib, NS-398, SC-791) 処理による E-cad 発現の変化を quantitative real-time PCR および flow cytometry で定量し、さらに遊走運動能を *in vitro* migration assay で評価した。

②全 stage の舌扁平上皮癌 40 例の新鮮凍結組織 (うち 20 例は非癌部舌口腔粘膜組織とのペア) を用いて Cox-2, E-cad, SIP1, Snail, Twist の mRNA 発現レベルを quantitative real-time PCR にて定量的に評価し、臨床病理組織学的因子との相関を検討した。

4. 研究成果

(1) HNSCC における EMT 関連因子の発現評価と臨床的意義

①HNSCC 細胞における発現が E-cad と有意な逆相関を示す転写抑制因子は SIP1 であった。多彩な EMT 誘導因子がある中で、HNSCC においては SIP が特に重要な役割を有している可能性が示唆された (図 1)。

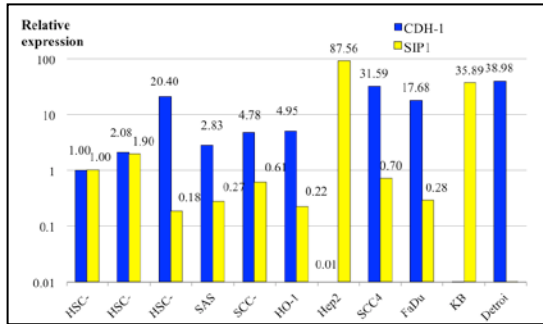


図 1: HNSCC 細胞における E-cad と SIP1 の発現

②Stage I-II 舌癌部分切除症例における DNM は 13/37 例に認められ、多変量解析の結果、その独立予測因子は SIP1 発現亢進、E-cad 発現減弱、血管侵襲であった (図 2)。すなわち原発単癌細胞における EMT 誘導が DNM の出現に深く関与していることが示唆された。

Variable	Odds ratio	95% confidence interval	P value
Step 1			
E-cadherin-	43.04	0.58-3,224	0.088
SIP1+	56.63	2.67-1,200	0.010
Mode of invasion, grade 3, 4	1.19	0.026-53.1	0.618
Vascular invasion+	22.73	0.956-541	0.053
Muscular invasion+	2.47	0.071-86.5	0.930
Step 2 (the last step)			
E-cadherin-	56.03	1.07-2,946	0.046
SIP1+	68.17	3.49-1,330	0.005
Vascular invasion+	31.68	1.56-643	0.024

図 2: DNM 危険因子の logistic regression model

(2) 乳癌転移モデルにおける血管新生調節因子 Ang2 の (EMT 以外の) 役割

①経尾静脈注入転移モデルにおいて Ang2 導入 MCF-7 の遠隔転移能は有意に亢進していた。注入後早期に着目すると、肺に trap された Ang2 導入 MCF-7 は親株に比べて apoptosis が有意に抑制されていた (図 3)。無血清培地および低酸素のストレス条件下における *in vitro* assay においても、Ang2 導入 MCF-7 は有意に apoptosis が抑制され、cell survival (生存能) が亢進していた。

②MCF 7 において Ang2 は ILK を介して Akt1, Akt2 の ser473 リン酸化、および Bcl-2 の発現を亢進させ、apoptosis を抑制し、生存能を亢進させていた。Akt1, Akt2 もしくは Bcl-2 を knockdown すると、apoptosis 抑制が阻害され、生存能は *in vitro*, *in vivo* (転移モデルの肺における増殖) とともに抑制された (図 4)。

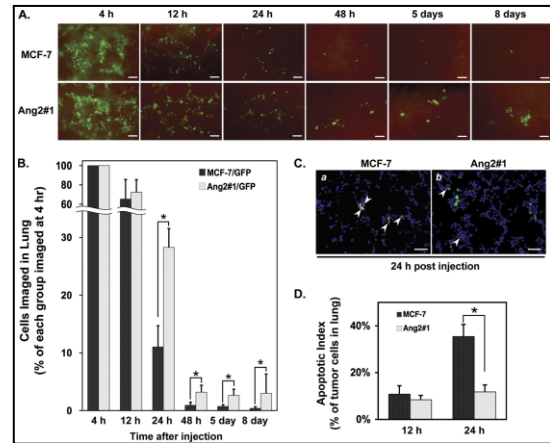


図 3: Ang2 enhances cancer cell survival, suppresses apoptosis, and promotes the initial growth in the lung.

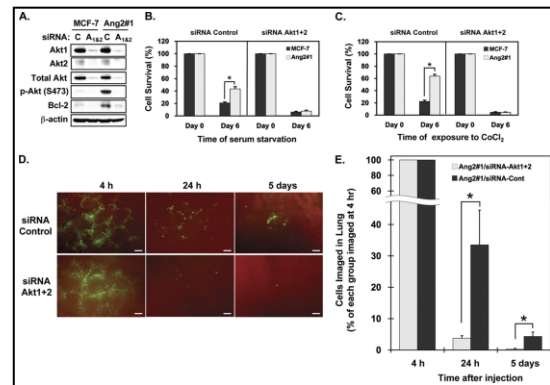


図 4: Knockdown of Akt1 and Akt2 diminishes Ang2-stimulated cell survival and metastasis.

③他の Ang2 高発現細胞: MDA-MB-468, SK-BR-3 および MDA-MB-231(#1834)においても、Ang2 を knockdown すると Akt ser473 のリン酸化と Bcl-2 発現の抑制を介して、apoptosis が亢進し生存能が抑制された。

以上より、乳癌細胞 MCF-7 において、Ang2 は ILK-AKT-Bcl-2 pathway の活性化による apoptosis 抑制を介し、転移巣での初期増殖能と生存能を増強させることで、転移能を亢進させることが初めて解明された。

(3) HNSCC における選択的 Cox2 阻害と EMT 抑制

①HNSCC 細胞において Cox2 と E-cad の間に mRNA 発現の逆相関は認められなかった。選択的 Cox2 阻害による E-cad 発現変化は、E-cad 低発現細胞では発現増強を示したのに対し、E-cad 高発現細胞ではその変化は微弱であった (図 5)。Cox2 阻害による E-cad 発現増強は転写抑制因子 SIP1, snail, twist の発現抑制を介していた。遊走運動能も、E-cad 低発現細胞ではその発現増強に伴い抑制されたのに対し、E-cad 高発現細胞ではその抑制は微弱であった。

以上より、Cox2 選択的阻害は HNSCC 細胞の E-cad 発現亢進を介してその遊走能も抑

制することで、すなわち EMT 抑制を介して抗腫瘍効果を導く可能性が示唆された。

結果! "#\$%&'()*+,-./0123456789:;<=>@A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z [\] ^ _ ` a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z { | } ~ ¡ ¢ £ ¤ ¥ ¦ § ¨ © ª « ¬ ® ¯ ° ± ² ³ ´ µ ¶ · ¸ ¹ º » ¼ ½ ¾ ¿

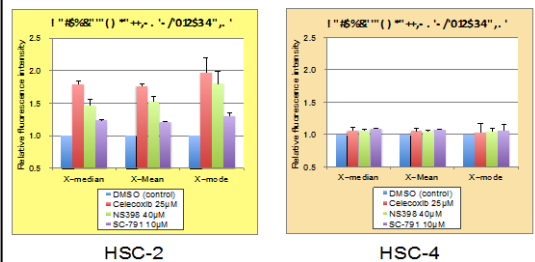


図 5: E-cadherin expression after Cox2-inhibition

②舌扁平上皮癌の凍結組織標本 40 例における mRNA 発現を検討した結果、癌部では非癌部に比べて Cox2 発現が有意に亢進し、E-cad 発現は有意に低下していた。臨床病理組織学的因子との関係では、Cox2 は頸部リンパ節(LN)転移と、SIP1・twist は分化度・神経周囲浸潤と、snail は分化度と、E-cad は T 分類・頸部 LN 転移との間に、各々有意な相関が認められた。多変量解析の結果、頸部 LN 転移の独立規定因子は E-cad 発現低下であった。

以上より Cox2 と E-cad 転写抑制因子の発現亢進および E-cad 発現低下はいずれも舌扁平上皮癌の悪性度と進行への関与が、特に頸部 LN 転移には癌細胞の EMT の関与が強く示唆された。

今後の展望：HNSCC において EMT 誘導因子の key molecule と考えられる転写抑制因子 SIP の、転移予測バイオマーカーとしての有用性を prospective に、および治療標的としての有効性を in vivo モデルにおいて評価することが望まれる。また、腫瘍の進行に関わる Ang2 の (EMT 誘導を含めた) 多彩な役割と臨床病理学的意義を HNSCC において明らかにし、転移予測バイオマーカーとしての有用性、その下流シグナル分子の治療標的としての有効性を検討する必要がある。さらに Cox2 選択的阻害による EMT 抑制を含めた抗腫瘍効果の、in vivo モデルおよび臨床レベルでの評価が必要である。

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 3 件)

- ① Sakamoto K, Imanishi Y, Tomita T, Shimoda M, Kameyama K, Shibata K, Sakai N, Ozawa H, Shigetomi S, Fujii R, Fujii M, Ogawa K: Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin

predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. Ann Surg Oncol. 査読有り, 2012; 19: 612-9.

doi: 10.1245/s10434-011-2052-1

- ② Imanishi Y, Hu B, Xiao G, Yao X, Cheng SY: Angiopoietin-2, an angiogenic regulator, promotes initial growth and survival of breast cancer metastases to the lung through the integrin-linked kinase (ILK)-AKT-B cell lymphoma 2 (Bcl-2) pathway. J Biol Chem. 査読有り, 2011; 286: 29249-60. doi: 10.1074/jbc.M111.235689

- ③ 坂本耕二, 今西順久, 富田俊樹, 小澤宏之, 田川崇正, 藤井良一, 重富征爾, 羽生 昇, 大塚邦憲, 山下拓, 菅家稔, 藤井正人, 小川郁: 舌扁平上皮癌症例の臨床統計学的検討 頭頸部癌, 査読有り, 2011; 37: 529-535.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjhnc/37/4/37_4_529/_pdf

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjhnc/37/4/37_4_529/_article/-char/ja/

[学会発表] (計 7 件)

- ① 藤井良一, 今西順久, 柴田克志, 酒井伸也, 坂本耕二, 重富征爾, 羽生 昇, 大塚邦憲, 小川 郁 頭頸部扁平上皮癌における Cox2 inhibition と E-cadherin および転写抑制因子の発現に関する検討 第 50 回日本癌治療学会 横浜 2012.10.26
- ② 藤井良一, 今西順久, 柴田克志, 酒井伸也, 坂本耕二, 重富征爾, 羽生 昇, 大塚邦憲, 富田俊樹, 小川 郁 頭頸部扁平上皮癌における Cox2 と E-cadherin およびその転写抑制因子の発現に関する臨床病理学的検討 第 36 回頭頸部癌学会 島根 2012.6.7
- ③ 坂本耕二, 今西順久, 富田俊樹, 下田将之, 亀山香織, 柴田克志, 酒井伸也, 小澤宏之, 藤井良一, 重富征爾, 藤井正人, 小川 郁 Stage I/II 舌癌部分切除後の後発頸部リンパ節転移予測における SIP 1 発現亢進と E-cadherin 発現減弱の役割 慶應東大ジョイントカンファレンス 東京 2012/2/2

- ④ 坂本耕二, 今西順久, 富田俊樹, 下田将之, 亀山香織, 柴田克志, 酒井伸也, 小澤宏之, 藤井良一, 重富征爾, 藤井正人, 小川 郁 Stage I/II 舌癌部分切除後の後発頸部リンパ節転移予測における EMT 関連因子の

役割 第8回頭頸部腫瘍セミナー 東京
2011/11/25

- ⑤ Sakamoto K, Imanishi Y, Shimoda M, Kameyama K, Tomita T, Ozawa H, Tagawa, T, Shibata K, Sakai N, and Ogawa K. Overexpression of SIP1 and down-regulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. AACR 102nd Annual Meeting (Orlando/FA, USA) 2011/4/2-6
- ⑥ Sakamoto K, Imanishi Y, Shimoda M, Kameyama K, Tomita T, Ozawa H, Tagawa, T, Shibata K, Sakai N, and Ogawa K. Overexpression of SIP1 and down-regulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II OSCC. AHNS 2010 Research Workshop (Arlington/VA, USA) 2010/10/28-30
- ⑦ 藤井良一, 今西順久, 柴田克志, 酒井伸也, 坂本耕二, 重富征爾, 大塚邦憲, 富田俊樹, 小川 郁 Cox2-inhibition が頭頸部扁平上皮癌細胞の E-cadherin 発現に及ぼす影響の検討 第34回日本頭頸部癌学会(新宿) 2010/6/11

[その他]

ホームページ

http://www.keio-ent.jp/kenkyu_04.html

(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室 HP
の中で腫瘍診療班の研究内容を整理掲載。)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 順久 (IMANISHI YORIHISA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80255538

(2) 研究分担者

(無し)

(3) 連携研究者

藤井 良一 (FUJII RYOICHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30348742

重富 征爾 (SHIGETOMI SEIJI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30365366

羽生 昇 (HABU NOBORU)

慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：60365369

大塚 邦憲 (OOTSUKA KUNINORI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40465026

佐藤 陽一郎 (SATO YOICHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40624440

渡部 佳弘 (WATANABE YOSHIHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30445374

(4) 研究協力者

坂本 耕二 (SAKAMOTO KOJI)
(元) 慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80338136