

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659941

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移における腫瘍間質の役割

研究課題名(英文) Role of tumor microenvironment on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

川尻 秀一 (Kawashiri, Shuichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：30291371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：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、腫瘍間質の線維芽細胞と腫瘍血管の役割を解明するため、抗癌剤と血管新生阻害剤を投与し検討した。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、ヌードマウスの口腔底もしくは舌に移植した。線維芽細胞増殖抑制剤はトラニラストを血管新生阻害薬はベバシズマブを用いて、癌の増殖と浸潤、転移の阻止効果を調べた。その結果、腫瘍の大きさ、浸潤様式のダウングレード、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。

研究成果の概要(英文)：Using an orthotopic implantation mice model in which the invasion and metastasis of oral cancer can be reproduced, we investigated the inhibitory effects of anti-fibroblastic agent and angiogenesis inhibitor on invasion and metastasis. A highly invasive and metastatic human oral squamous cell carcinoma cell line, OSC-19, was implanted into the tongue or oral floor of nude mice, and tranilast or bevacizumab were administered to the mice after the implantation. The effects of each drug on cancer invasion and metastasis were investigated. Tumor size and the ratio of proliferating cell nuclear antigen positive cells were significantly reduced. The rate of metastasis in the cervical lymph node was significantly decreased. The tumor stage progression in the metastatic lymph nodes was also inhibited. The use of anticancer agent and angiogenesis inhibitor considering these effects may be clinically very useful.

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌 腫瘍間質 浸潤 転移 線維芽細胞 血管 リンパ管

### 1. 研究開始当初の背景

当教室では先代の教授である山本が、1983年に新しい浸潤様式分類を発表 (Yamamoto E. et al.: Cancer 51: 2175-2180, 1983.) して以来、口腔癌の浸潤像と転移や予後との関連性についての研究を行ってきた。その結果、臨床病理学的には浸潤像が転移や予後と最も相関する因子であることが明らかになり、浸潤機序の解明が治療成績の向上につながるものと確信し以後は基礎的研究を併せて行っている。浸潤機序を解明するには再現性のある実験モデルを用いた研究が必須である。しかし、口腔領域ではそのモデルに乏しく、忠実に生体での現象を再現できるものはなかった。そこで、研究代表者の川尻は、ヌードマウスの口腔内に口腔癌を移植する正所性移植法を用いた *in vivo* の浸潤・転移モデルを作製したところ、このモデルにおいては臨床における浸潤や転移の病態を忠実に再現できることが判明した (Eur J Cancer, Oral Oncology 31B(4): 216-221, 1996)。本研究計画においては、通常の臨床で用いている抗癌剤および最近臨床応用が期待される血管新生阻害剤および線維芽細胞増殖抑制剤が口腔癌の増殖、浸潤や転移を抑制する効果を有するか否か、この自然転移モデルを用いて検討する。

### 2. 研究の目的

癌細胞が浸潤する際には、周囲組織にも様々な変化が認められる。この癌間質は癌細胞の浸潤にとって「バリアーの役割をしている」という説が以前は一般的であった。ところが最近、癌間質は「癌細胞の浸潤や転移をサポートしている」という考え方が広まりつつある。その代表的なものは腫瘍血管である。しかしながら、腫瘍血管は腫瘍の増殖には重要であるが、浸潤や転移にはどのような影響があるのか分かっていない。また、間質の線維芽細胞の一部に Cancer associated fibroblasts (CAF) が存在し、癌の浸潤を促進させているといわれている。そこでわれわれはこの間質成分の何が浸潤・転移に関与しているのか、具体的に検索するとともに、その影響を検討し、口腔扁平上皮癌における腫瘍間質と浸潤・転移との関係を明らかにする。これまでわれわれは *in vivo* の浸潤・転移モデルを開発し、臨床での浸潤像と類似の浸潤像を再現するとともに、頸部リンパ節への転移を再現することに成功している。本研究ではこのモデルを用いて、線維芽細胞増殖抑制剤や血管新生阻害剤を使用し、腫瘍の間質を抑制した際に、癌の浸潤や転移が抑制されるのか否か検討し、癌の浸潤や転移に腫瘍間質や血管・リンパ管の果たす役割を明らかにする。血管新生阻害剤はアバスタチン、線維芽細胞増殖抑制剤トラニラスト (現在術後の癒痕形成抑制やケロイド治療薬として市販され臨床ですでに用いられている) を用いる。なお、トラニラストは腫瘍間質の線維芽細胞の

増殖を抑制すると共に血管新生も阻害することが明らかとなっている。また同様に、腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果、抗癌剤の組織学的抗腫瘍効果との関係やその機序についても検討する。

### 3. 研究の方法

口腔癌の浸潤過程における腫瘍間質および血管・リンパ管新生について検討する。用いる浸潤・転移モデルに関する基礎的な研究は既に行われており、本年度は以前の報告において最も高浸潤・高転移性を示した OSC-19 細胞を用いてヌードマウスの口腔内に移植し、移植後経時的にマウスを採取して、その間質および血管・リンパ管像を観察する。

通常の病理組織切片での腫瘍間質および血管・リンパ管像の観察以外に、墨汁還流法および血管・リンパ管の観察のため血管とリンパ管をそれぞれ染め分けることが可能な ALP-5' nase 2 重染色法を用いる予定である。すなわち、墨汁還流法では生体墨汁をマウスの心尖より還流後に屠殺、組織を採取し、通常に従いパラフィン包埋してブロックを作製、そこから 100 $\mu$ m の組織切片を作製し、キシレンにて透明標本とする。この方法の利点としては、確実に血管のみが染色されること、厚みのある切片を用いることにより、血管の立体的構築像が観察できる点にある。

また、血管内皮細胞に特異的な CD31、CD34 抗体、リンパ管に特異的な LIVE-1 抗体や D2-40 抗体を用いた免疫染色法による観察も行う。同部位の薄切切片を同時に作製し、腫瘍の性状と血管・リンパ管の構築を交互連続切片で比較検討し、経時的な腫瘍と血管・リンパ管の変化を詳細に調査する。腫瘍間質の変化についてはアザン染色を行い間質コラーゲン量の変化を検討するとともに、間質中の線維芽細胞の性質の変化についても検討する。また、MMP-2 の発現、FGF-2 の発現、 $\alpha$ -SMA の発現を免疫組織化学染色し、それぞれ検討する。

線維芽細胞増殖抑制剤、血管新生阻害薬による浸潤や転移の阻止実験をヌードマウスの浸潤・転移モデルを用いて口腔扁平上皮癌細胞を移植して行い、浸潤や転移における腫瘍間質および血管新生の意義について明らかにしていきたい。すなわち、血管新生阻害剤にはアバスタチンを、線維芽細胞増殖抑制剤にはトラニラストを用いる。なお、トラニラストは腫瘍間質の線維芽細胞の増殖を抑制すると共に血管新生も阻害することが明らかとなっている。腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果の他に血管構築像、血管数、血管の大きさや形態の観察、リンパ管の変化を詳細に調査する。また、増殖細胞核抗原 (PCNA) 抗体、上皮成長因子 (EGF) および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 抗体、血管内皮細胞に特異的な CD31、CD34 抗体、リンパ管に特異的な LIVE-1 抗体

や D2-40 抗体を用いた免疫染色するとともに、腫瘍間質の変化についてはアザン染色を行い間質コラーゲン量の変化を検討するとともに、間質中の線維芽細胞の性質の変化についても検討し、浸潤や転移に腫瘍間質や血管・リンパ管の果たす役割を明らかにする。

#### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌の浸潤と転移を臨床に近い状態で再現できる正所性移植モデルを用いて、特に日常の臨床で使用している抗癌剤に増殖のみならず、浸潤や転移に対する抑制効果があるのか否かを検討した。高浸潤高転移性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株の OSC-19 細胞をヌードマウスの口底もしくは舌に移植した後に、シスプラチンまたはペプロマイシンを移植後 7 日目または 14 日目に投与し、各抗癌剤ならびに各投与時期の違いによる腫瘍増殖に対する効果、浸潤に対する効果、転移に対する効果について検討した。増殖抑制効果では抗癌剤投与により平均 38% の腫瘍縮小効果が認められ、PCNA 陽性細胞率も有意に低下した。対照群の口底腫瘍は 4C 型の浸潤様式を呈していたが、抗癌剤投与群の浸潤様式は 3 型が 72.7~81.8% と多く、いわゆる浸潤様式の抗癌剤投与によるダウングレードが認められ、抗癌剤投与によって腫瘍の浸潤抑制効果が観察された。対照群の頸部リンパ節転移形成率は 90.9% であったのに対して、抗癌剤の 7 日目投与群ではリンパ節転移形成率は 45.5% と有意に低下し、また転移リンパ節内での腫瘍進展度も抑制されていた。すなわち抗癌剤投与により腫瘍の増殖のみならず浸潤や転移を抑制していた。

線維芽細胞増殖抑制剤(トラニラスト)を用いて OSC-19 細胞(浸潤様式 4C 型)を移植したモデルでの同様の検討をした結果でも、増殖、浸潤、転移にそれぞれ抑制効果が認められた。また、血管新生阻害剤(アバステチン)を本モデルに同様に使用し、増殖、浸潤ならびに転移抑制効果の有無についても検討を行った。その結果では、増殖、浸潤、転移にそれぞれ一定以上の抑制効果が認められた。しかしながら、本剤においては特に局所腫瘍の増殖に対しての効果が大きく、それにつれて浸潤や転移の時期が遅くなっている印象であった。

しかしながら、同様に線維芽細胞増殖抑制剤(トラニラスト)と血管新生阻害剤(アバステチン)を高浸潤性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株の OLC-01 細胞(浸潤様式 4D 型)をヌードマウスの口底もしくは舌に移植したモデルを用いた結果では、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群とトラニラスト投与群、アバステチン投与群では差が認められなかった。リンパ節転移に関しても両群に差は認められなかった。病理組織像で移植腫瘍がトラニラストを投与することで浸潤様式 4C 型や 3 型にダウングレードする傾向は認められなかった。しかし、癌細胞の細胞増殖活性を観

察するために増殖細胞核抗原 PCNA 抗体を、腫瘍組織の低酸素状態を観察するために低酸素誘導性因子 HIF-1 抗体を用いた免疫染色を行ったところトラニラスト投与群で陽性率が高かった。さらに、間質および血管・リンパ管を検討した。また、通常の病理切片での腫瘍間質および血管・リンパ管の観察以外に、血管とリンパ管をそれぞれ、血管内皮細胞マーカーである CD34 抗体、リンパ管内皮細胞マーカーに D2-40 抗体を用いた、免疫組織化学染色を行った。その結果では浸潤像と血管の密度やリンパ管の密度との間には関連性が認められなかったが、腫瘍の増殖脳との関連を認めた。また、間質の線維芽細胞の性質の変化についても検討した。その結果、浸潤が高度になるにつれて、腫瘍細胞のみならず間質線維が細胞にも、MMP-2 発現の上昇、FGF-2 発現の上昇、 $\alpha$ -SMA の発現が上昇した。したがって、口腔扁平上皮癌の浸潤時には癌細胞のみならず、間質線維芽細胞も浸潤のサポートをしていると考えられた。また、これらの間質反応を線維芽細胞増殖抑制剤であるトラニラストや血管新生阻害剤であるアバステチンにより抑制することで、癌細胞の浸潤や転移を抑制する可能性が示唆された。

今回の結果から、浸潤様式 4C 型の癌細胞で浸潤・転移にも効果が見られた抗癌剤(シスプラチン)、線維芽細胞増殖抑制剤(トラニラスト)と血管新生阻害剤(アバステチン)が、しかしより高悪性度の 4D 型の癌細胞では、増殖には若干効果を認めるものの、それぞれ単剤では浸潤や転移には効果が見られなかった。現在はトラニラストやアバステチンと抗癌剤(シスプラチン)との併用の実験を行いそれぞれの効果を検討している。

#### 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)

Sasaya K, Sudo H, Maeda G, Kawashiri S, Imai K. Concomitant loss of p120-catenin and  $\beta$ -catenin membrane expression and oral carcinoma progression with E-cadherin reduction. PLoS One. 8(8):e69777. 2013. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0069777.

Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O. xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 73(6):1855-66.

2013. 査読あり doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T.

Yoshizawa K., Nozaki S., Kato A., Hirai M., Yanase M., Yoshimoto T., Kimura I., Sugiura S., Okamune A., Kitahara H., Noguchi N., Kato K., Ueki K., Kawashiri S. Loss of claudin-7 is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Report* 29: 445-450, 2013. 査読あり doi: 10.3892/or.2012.2161.

川尻秀一 . 口腔扁平上皮癌の浸潤像と予後予測因子 . 愛知学院大学歯学部同窓会誌 57 . 27-31, 2012. 査読なし

Hashimoto T., Soeno Y., Maeda H., Taya Y., Aoba T., Nasu M., Kawashiri S., Imai K. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced E-cadherin expression but not cadherin switch. *PLOS ONE* 7: e47899, 2012. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0047899.

Yoshizawa K., Nozaki S., Kitahara H., Kato K., Noguchi N., Kawashiri S., Yamamoto E. Expression of urokinase-type plasminogen activator / urokinase-type plasminogen activator receptor and maspin in oral squamous cell carcinoma: Association with mode of invasion and clinicopathological factors. *Oncology Reports* 26: 1555-1560. 2011. 査読あり doi: 10.3892/or.2011.1419.

Kato K., Kawashiri S., Yoshizawa K., Kitahara H., Okamune A., Sugiura S., Noguchi N., Yamamoto E. Expression of p53 and PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis. *Journal of Oral pathology and medicine* 40: 693-698, 2011. 査読あり doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01032.x.

〔学会発表〕(計 10 件)

柳瀬瑞希、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、川尻秀一 . 口腔扁平上皮癌における VEGF-A および VEGF-C 発現の免疫組織化学的検討 . 第 67 回日本口腔科学会総会・学術集会, 2013 年 5 月 24 日, 栃木県総合文化センター (栃木県)

Kato K, Noguchi N, Kitahara H, Yoshizawa K, Kawashiri S. The AMPK activator AICAR inhibits proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint*

Conference. 2013 年 2 月 24 日. Hyatt Regency Maui (USA)

木村依世、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、柳瀬瑞希、川尻秀一 . 口腔扁平上皮癌における EGFR 発現の免疫組織化学的検討 . 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2013 年 1 月 25 日 . 秋葉原コンベンションホール (東京都)

加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、杉浦史郎、木村依世、柳瀬瑞希、加藤阿希、平井真理子、川尻秀一. AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌の抗腫瘍効果の検討 . 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 . 2012 年 10 月 20 日 . パシフィコ横浜 (神奈川県)

八木瑞希、川尻秀一、野口夏代、加藤広禄、吉澤邦夫、岡宗絢子 . 口腔扁平上皮癌における VEGF-A および VEGF-C 発現の免疫組織化学的検討 . 第 36 回日本頭頸部癌学会総会・学術集会, 2012 年 6 月 8 日, 島根県民会館 (島根県)

吉澤邦夫、八木瑞希、加藤広禄、上木耕一郎、川尻秀一 . 口腔扁平上皮癌における Claudin7 発現と浸潤様式および臨床病理学的因子との関連について . 第 66 回日本口腔科学会学術集会, 2012 年 5 月 18 日, 広島国際会議場 (広島県)

杉浦史郎、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、八木瑞希、木村依世、吉本 泰祐、川尻秀一, 口腔扁平上皮癌における接着分子としての CD44v3 の発現と臨床病理組織学的因子との関係, 第 30 回日本口腔腫瘍学会学術集会, 2012 年 1 月 26 日, 大宮ソニックシティ (埼玉)

Kawashiri S., Noguchi, N., Kato, K., Yoshizawa, K., Kitahara, H., Okamune, A., Sugiura, S., Yamamoto, E., Evaluation of clinical and histopathological factors for survival in squamous cell carcinoma of oral cavity. 20th International Conference of Oral and Maxillofacial Surgery, 2011.11.3, Casa Piedra Centro de Eventos Congressos, Santiago (Chile)

北原寛子、川尻秀一、野口夏代、加藤広禄、吉澤邦夫、岡宗絢子、山本悦秀、E-Cadherin の口腔扁平上皮癌の浸潤への影響, 第 35 回日本頭頸部癌学会, 2011 年 6 月 10 日, ウィンクあいち (愛知県)

杉浦史郎、川尻秀一、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、八木瑞希、木村依世、山本悦秀、口腔扁平上皮癌における接着分子としての CD44 の発現, 第 65 回

日本口腔科学会学術集会, 2011年4月22日,  
タワーホール船堀(東京都)

〔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

川尻 秀一 (KAWASHIRI SHUICHI)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号: 30291371

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: