

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792353

研究課題名(和文) EphrinB2を標的とした脈管新生抑制による口腔癌の制御

研究課題名(英文) Reverse signaling from EphrinB2 enhances lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

笹部 衣里 (SASABE, ERI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40363288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌発現のEphrin-B2がリンパ節転移に寄与するかどうかを検討した。SAS-L1細胞にEphrin-B2-siRNAを導入したところ、ヒトリンパ管内皮細胞への接着能、細胞間遊走能が有意に低下するとともに、SCIDマウス舌の移植モデルでは転移頸部リンパ節数が有意に減少した。また、口腔扁平上皮癌1次症例50例の原発巣生検組織を用いてEphrin-B2の発現程度と臨床病理組織学的特徴との関連について検討した結果、N分類、異型度、YK分類による浸潤様式との関連が認められた。これらの結果より、口腔扁平上皮癌においてEphrin-B2はリンパ節転移を正に制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Lymphangiogenesis is controlled primarily by VEGF receptor signaling and its signaling is enhanced by reverse signaling from Ephrin-B2. We determined whether Ephrin-B2 expressed in oral squamous cell carcinoma contributes to lymph node metastasis. Introduction of Ephrin-B2-siRNA into SAS-L1 cells significantly suppressed adhesion and cell-to-cell migration activities to hLEC cells. In a model constructed by implanting SAS-L1 cells in the tongue of SCID mice, injection of Ephrin-B2-siRNA significantly reduced the number of cervical lymph nodes with metastasis. Ephrin-B2 expression level correlated with N classification, tumor grading, and invasion mode of primary lesions from 50 patients with oral squamous cell carcinoma. In summary, Ephrin-B2 signaling was shown to facilitate lymph node metastasis via effects on adhesion to the surrounding lymphatic vessels and migration activities.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Ephrin-B2 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の予後を左右する重要な因子であるリンパ節および遠隔転移は、腫瘍の血管新生、リンパ管新生によって生じる。

これらは VEGF (Vascular endothelial growth factor, 血管内皮増殖因子) とその受容体シグナルによって制御されるが、最近新たに受容体型チロシンキナーゼ Eph のリガンドである Ephrin-B2 が VEGF により誘導される血管およびリンパ管新生を制御していることが明らかとなってきた。このことは、Ephrin-B2 が口腔扁平上皮癌の転移を制御する重要な分子である可能性を示唆している。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌に発現している Ephrin-B2 がリンパ節転移に関連する因子であるかどうかを明らかにするとともに、Ephrin-B2 を標的とした脈管新生の抑制が口腔扁平上皮癌の制御に繋がるか検証する。

3. 研究の方法

(1) リンパ節転移能を有する口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS-L1 細胞) のリンパ管内皮細胞 (hLEC 細胞) への接着、細胞間遊走能における Ephrin-B2 シグナルの関与について検討する。

(2) SAS-L1 細胞を SCID マウス舌に移植したリンパ節転移モデルマウスを用いて、Ephrin-B2-siRNA を導入し、腫瘍の成長、頸部リンパ節転移への影響を検討する。

(3) 臨床材料を用いて Ephrin-B2 の発現を免疫組織化学的に調べ、Ephrin-B2 の発現程度と腫瘍血管およびリンパ管の数、分布、密度、VEGF-VEGFR の発現、頸部リンパ節転移および遠隔転移等との関連について臨床病理組織学的観点より検討する。

4. 研究成果

(1) 株化口腔扁平上皮癌細胞およびヒトリンパ管内皮細胞を用いた接着能・細胞間遊走能に及ぼす Ephrin-B2 の影響

口腔扁平上皮癌細胞のリンパ管内皮細胞への接着・遊走における Ephrin-B2 の関わりを *in vitro* の系で検討した。GFP で標識された高リンパ節転移性株化舌扁平上皮癌細胞である SAS-L1 細胞を、単層培養したヒトリンパ管内皮細胞である hLEC 細胞上に播種し、1 時間後に hLEC 細胞に付着した GFP 陽性細胞数を蛍光顕微鏡にてカウントした。その結果、コントロール細胞に比べ Ephrin-B2-siRNA を導入することにより Ephrin-B2 をノックダウンした細胞の接着能は有意に減弱した (図 1 A)。

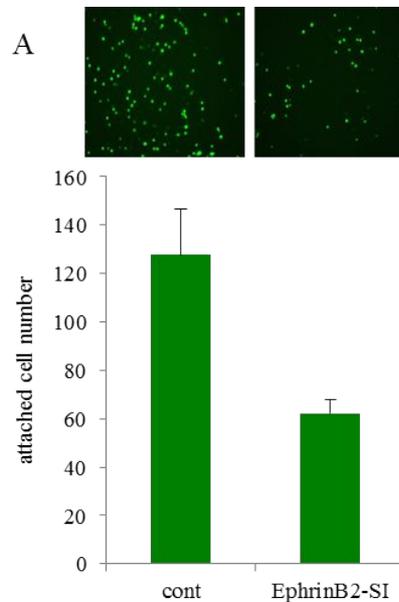


図 1A : SAS-L1 の hLEC 細胞への接着における Ephrin-B2 の関与

さらに、口腔扁平上皮癌細胞の hLEC 細胞間の遊走能における Ephrin-B2 の関わりについて CytoSelect Tumor Transendothelial Migration Assay キットを用いて、単層培養した hLEC 細胞層を transmigrate した細胞を検出した。その結果、Ephrin-B2-siRNA を導入することにより、hLEC 細胞層を transmigrate した SAS-L1 細胞数は有意に減少した (図 1B)。

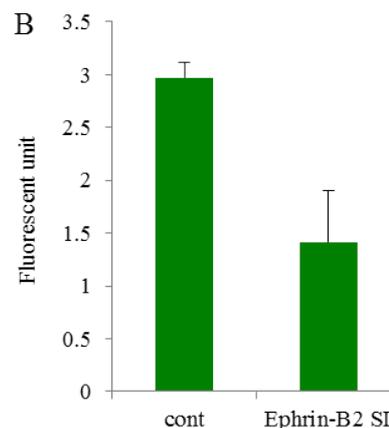


図 1B : SAS-L1 の hLEC 細胞間遊走における Ephrin-B2 の関与

(2) リンパ節転移モデルマウスを用いたリンパ節転移における Ephrin-B2 の関わりに関する検討

5 週齢雄 SCID マウスの舌に SAS-L1 細胞を移植し、移植後舌に Ephrin-B2-siRNA と Ate logene の混合液を局所注射し、移植後 19 日目に実体蛍光顕微鏡を用いて、舌への腫瘍の

生着と頸部リンパ節への転移を評価した。Ephrin-B2-siRNA 非投与群のほとんどのマウスで舌および両側顎下リンパ節に GFP の発現が認められた (図 2A)。そこで、マウスの舌を回収し、Ephrin-B2 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、Ephrin-B2-siRNA 投与群では Ephrin-B2 の発現は減弱しており (図 2B) 転移頸部リンパ節数も Ephrin-B2-siRNA 投与群では有意に減少していた (図 2C)。

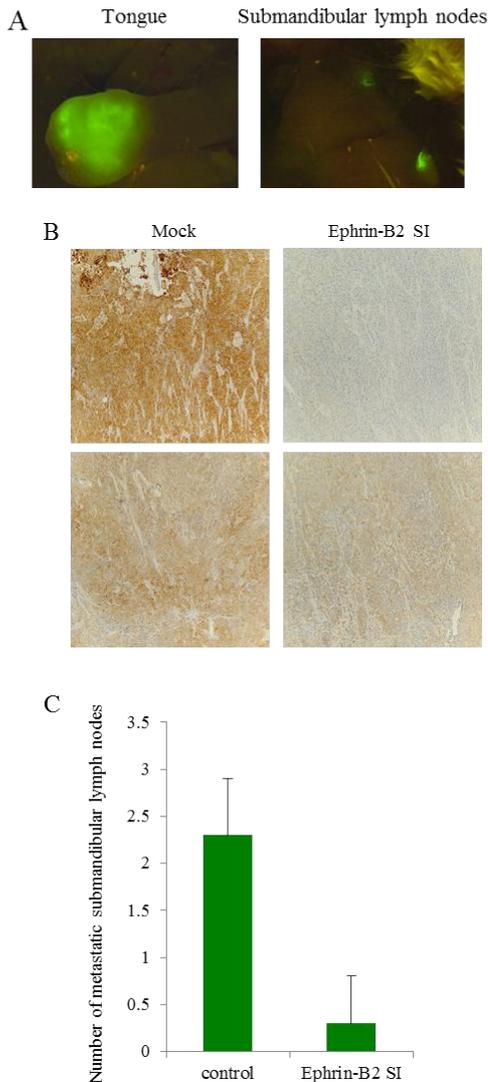


図 2 : SAS-L1 の頸部リンパ節転移における Ephrin-B2 の関わり

(3) 口腔扁平上皮癌 50 症例の臨床材料を用いた免疫組織学的検討

臨床材料を用いた検討の対象は表 1 に示している口腔扁平上皮癌 50 症例で、比較的リンパの流れが類似していると考えられる軟組織に限局した舌・口底癌を取り上げた。リンパ節転移陽性例は 52%であった。

		例数	(%)
性別	男性	32	64.0
	女性	18	36.0
部位	舌	41	82.0
	口底	6	12.0
	頬粘膜	3	6.0
T分類	T1	11	22.0
	T2	21	42.0
	T3	10	20.0
	T4	8	16.0
N分類	N0	24	48.0
	≥N1	26	52.0
M分類	M0	50	100.0
	M1	0	0.0

年齢: 66.2 ± 14.0 (35-91) 歳

表 1 : 対象症例の内訳

Ephrin-B2 の染色結果は、染色強度と腫瘍細胞における陽性率から 0 から 3 の 4 段階の染色スコアに分けて評価した (図 3A)。Ephrin-B2 の発現強度と臨床病理組織学的因子との関連について、スピアマンの順位相関検定を用いて検討したところ、N 分類、異型度および浸潤様式と Ephrin-B2 の染色スコアとの間に有意な相関が認められ、染色スコアが高くなるほど、N が陽性で、異型度が強くなり、YK 分類による浸潤様式も 4 が多くなっていた (図 3B)。しかし、Ephrin-B2 の染色スコアと T 分類、臨床型、分化度、分裂度との間に有意な関連は認められなかった (表 2)。また、Ephrin-B2 の発現と腫瘍内リンパ管および血管密度との関連について検討した結果、Ephrin-B2 の発現とリンパ管および血管密度との間に関連は認められなかった (データ示さず)。

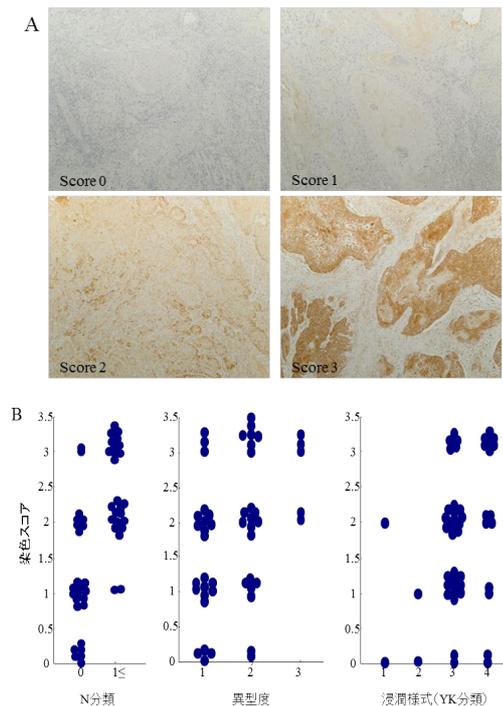


図 3 : Ephrin-B2 と臨床病理組織学的因子

	<i>r</i>	<i>p</i>
T 分類	0.228	0.12
N 分類	0.637	0.00
臨床型	0.070	0.63
分化度	-0.054	0.71
異型度	0.363	0.01
分裂度	0.156	0.28
浸潤様式	0.346	0.01

(スピアマンの順位相関検定)

表 2 : Ephrin-B2 と臨床病理組織学的因子

以上の結果より、口腔扁平上皮癌において Ephrin-B2 からのリバースシグナルは口腔扁平上皮癌細胞のリンパ管への接着および遊走能の促進作用を介してリンパ節転移を正に制御することが明らかとなった。

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)

[学会発表](計2件)

笹部衣里、大野清二、山田朋弘、山本哲也
Ephrin-B2 からのリバースシグナルは口腔扁平上皮癌のリンパ節転移を増強する
第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2013 年 5 月 24 日、栃木県総合文化センター、
栃木

笹部衣里、吉村友秀、仙頭信哉、山田朋弘、
山本哲也

口腔扁平上皮癌細胞の増殖および浸潤能
に及ぼす Ephrin-B2 の影響
第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2012 年 5 月 17-18 日、広島国際会議場、広島

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笹部 衣里 (SASABE ERI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：40363288