

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791797

研究課題名(和文) 同所性頭頸部癌モデルを用いた頭頸部癌頸部リンパ節転移に関する遺伝子の解明

研究課題名(英文) The comprehensive profile analysis for regional metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma in vivo

研究代表者

佐野 大佑 (SANO, DAISUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10620990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌治療における最大の問題点の一つである頭頸部癌頸部リンパ節転移の機序を解明するため、同転移を再現、検討できる同所性頭頸部癌モデルを用いて頭頸部癌頸部リンパ節転移能を検討した。頸部リンパ節転移高形成群と転移無形成群の2群の頭頸部癌細胞株を選出の上Whole gene microarray施行し、同解析結果をもとに施行された遺伝子カスケード解析により頸部リンパ節転移と強い関連をもつ可能性が高い遺伝子として、AP-1 遺伝子群を同定した。今後はAP-1遺伝子群が頭頸部癌における頸部リンパ節転移の進展に果たす役割を解明していく予定である。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanism of regional metastasis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), we characterized regional metastatic potential in vivo using an orthotopic mouse model of HNSCC first. For further study, 15 HNSCC cell lines, establishing more than 80 % of tongue tumor formation in the model, were selected and whole gene microarray was performed. According to the result of principal component analysis based on all the probe sets utilized in our microarray analysis, 4 cells were selected for further analysis. Genes with an absolute fold change value > 1.5 were selected for further analysis. The upstream and key nodes analysis with ExplainTM was then used to investigate upstream key molecules involved in the mechanisms of regional metastasis of HNSCC. The results showed molecules in AP-1 family with higher score suggesting that those molecules could be considered as key factors regulating the pathway related with regional metastasis of HNSCC.

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：頭頸部癌 頸部リンパ節 同所性頭頸部癌モデル

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は発生臓器の解剖学的部位によって症状が出現しにくいことが多いため進行癌で発見されることが多く、予後が不良である。嚥下や構音等の機能を温存し、かつ治療成績の向上を目指すため、現在根治治療としての手術、放射線療法に加え化学療法を組み合わせた集学的治療が行われている。

このように頭頸部癌に対する様々な治療法の開発や、また画像等を用いた診断技術が著しい進歩してきているにも関わらず頭頸部癌の予後は依然として不良である。大きな原因の一つは頭頸部癌が高頻度に頸部リンパ節転移をきたし、転移病変の制御が困難なためである。したがって頭頸部癌頸部リンパ節転移のメカニズムを解明することは頭頸部癌の治療成績を改善することに直結するといえる。

このような背景のもと、申請者は頸部リンパ節転移を再現、検討できる同所性頭頸部癌モデルを用いて多くの頭頸部癌研究に携わってきた。

同所性担癌モデルは癌研究で一般的に用いられている皮下担癌モデルと比べて、腫瘍細胞増殖・進展、すなわち浸潤・転移パターンを反映でき、腫瘍細胞と臓器特異的な微小環境条件における宿主側要因の影響も考慮できる非常に優れたモデルである。

同所性頭頸部癌モデルは頭頸部癌細胞をヌードマウスの口腔内組織に同所移植することにより作製し、同所移植された頭頸部腫瘍細胞の増殖の他、頭頸部癌の重要な予後因子である頸部リンパ節転移能も検討できるという利点がある。

申請者はこの同所性頭頸部癌モデルを用いて 48 種類の頭頸部癌細胞株を同所移植したマウスの生存率、腫瘍増殖能、並びに頸部リンパ節転移能について *in vivo* にて解析を行った。その結果、癌抑制遺伝子として知られる *TP53* の中でも *Disruptive TP53 mutation* と呼ばれるタイプの変異が特にマウスの生存率、頭頸部癌細胞株の増殖能に関与していることを報告した (Sano et al. Clin Cancer Res 2011)。しかしながら *Disruptive TP53 mutation* が頭頸部扁平上皮癌の頸部リンパ節に特異的な因子であるかは今後更なる検討が必要と思われた。

2. 研究の目的

本研究の目的は依然解明されていない頭頸部癌の頸部リンパ節転移の機序を解明するため、同所性頭頸部癌モデルから集積した頸部リンパ節転移能のデータを元に、頭頸部癌頸部リンパ節転移の制御に関与する遺伝子 (群) を同定することである。

3. 研究の方法

図 1A, 1B のように 59 種類の頭頸部扁平上皮癌細胞株 (5×10^4) をヌードマウスの舌組織へ移植することで同所性頭頸部癌モデルを作製した (Sano et al. Head Neck Oncol. 2009)。腫瘍径を測定の上、腫瘍容積を計算し、腫瘍による経口摂取障害が生じ、結果体重減少が著しくなった時点、もしくは移植 60 日後に舌腫瘍並びに頸部リンパ節を摘出した (図 1C)。その後ホルマリン固定、スライド標本の上、ヘマトキシリン・エオシン染色の後、頸部リンパ節転移はその存在を顕微鏡下で検討した (図 1D)。

同結果から 80% 以上舌に腫瘍形成し、細胞株移植後 32 日の平均腫瘍容積が 20mm^3 以上であった 15 細胞株 (図 2C) を選出した上、それぞれ Total RNA を抽出し、Whole gene microarray を施行した。

更に頸部リンパ節転移に関与する転写因子カスケードの上流因子を推測するため Whole gene microarray の結果を元に、TRANSFAC データベースを用いた転写因子サイト探索解析と、同結果を利用したキーノード解析による遺伝子カスケード解析を施行した。

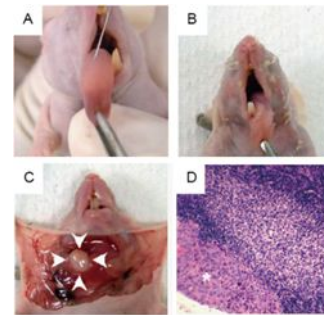


図 1. 同所性頭頸部癌モデルの作製方法

- 同所性頭頸部癌モデル作製方法
- 同モデルにおける舌の腫瘍形成
- 同モデルにおける頸部リンパ節転移
- 同モデル頸部リンパ節転移病理組織所見

4. 研究成果

合計 59 種類の同所性頭頸部癌モデルは様々な腫瘍増殖能、頸部リンパ節転移能を示した (図 2A, 2B)。

Whole gene microarray の結果を元に行った主成分分析 (図 3) において明確に 2 群に分類することが可能であった、転移を 70% 以上認めた 2 種の細胞株 (Detroit562 並びに FaDu) と転移 0% であった 2 種の細胞株 (YCU-MS861 並びに YCU-OR891) を更に選出し、同 2 群間で発現変動比について検討した結果、14661 遺伝子で 1.5 倍以上の発現量差を認めた (表 1)。

上記結果を元に遺伝子カスケード解析を

施行した結果、AP-1 Family である JunB、FOS、FOSL1 等が頸部リンパ節転移と強い関連をもつ可能性が高い結果となった(表 2)。

本研究で頭頸部癌頸部リンパ節転移のメカニズムに AP-1 Family である JunB、FOS、FOSL1 等が関与していることが示唆された。AP-1 のエピジェネティックな活性化が頭頸部扁平上皮癌の転移を促進するという報告もあり、頭頸部癌頸部リンパ節転移制御に AP-1 Family がどのように関与しているか、今後も検討を続けていく予定である。

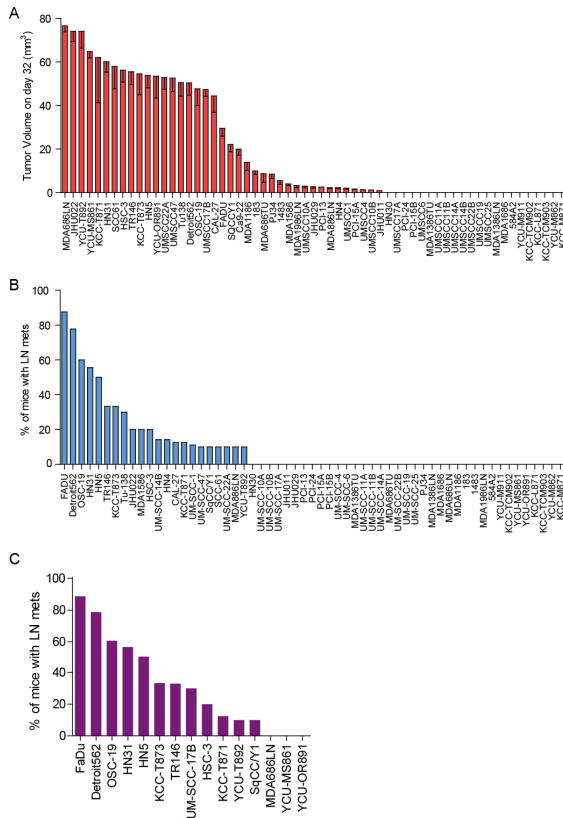


図 2. 同所性頭頸部癌モデルにおける腫瘍増殖能と頸部リンパ節転移能

- A. 59 種類の同所性頭頸部癌モデルの腫瘍増殖能
- B. 59 種類の同モデルにおける頸部リンパ節転移能
- C. 80%以上舌に腫瘍形成を認める 15 種類の同所性頭頸部癌モデルにおける頸部リンパ節転移能

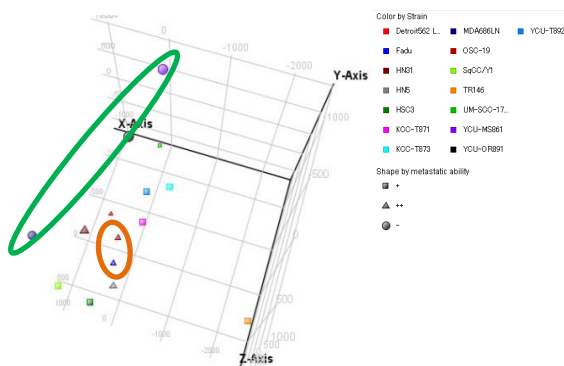


図 3. 主成分分析 (第 1~3 主成分分析) 転移を 70%以上認めた 2 種の細胞株 (右下オレンジ) 転移 0%であった 2 種の細胞株 (左上緑色) を示す。

ProbeName	GeneSymbol	Fold change ([+] vs [-])	Absolute Fold change ([+] vs [-])
A_23_P36658	MGST1	3959.6013	3959.6013
A_23_P374844	GAL	951.5455	951.5455
A_24_P166613	EPDR1	892.58136	892.58136
A_23_P21092	CALB2	-409.87357	409.87357
A_33_P3221203	MMP13	377.3312	377.3312
A_23_P86599	DMBT1	-375.89697	375.89697
A_33_P3315385	MPPED2	290.27573	290.27573
A_23_P53126	LMO2	246.63565	246.63565
A_23_P62351	ARMCX6	233.03413	233.03413
A_23_P68487	BMP7	224.91309	224.91309
A_23_P48561	EFS	200.82884	200.82884
A_33_P3234697	LXN	194.21046	194.21046
A_33_P3252141	TMX3	-170.25647	170.25647
A_23_P127584	NNMT	-168.78313	168.78313
A_23_P131676	CXCR7	162.52005	162.52005
A_23_P28466	WDR69	-137.53099	137.53099
A_21_P0003289	XLOC_003181	125.265915	125.265915
A_23_P17593	CDH4	-114.3612	114.3612
A_23_P48585	SALL2	114.30093	114.30093
A_32_P142440	PCSK9	108.64897	108.64897

表 1. 転移高形成群と転移無形成群間での発現変動比

Key molecules	Score
JUNB	24
p38alpha	23
MAPKAPK3	22
IPF1	20
MYOG	20
MSK1	19
MYOD1	19
mdm2-isofom1	18
ATM	17
FOS	17
Caspase-3	14
FOSL1	14
PPARalpha	11
RELB	11
CKII-alpha	10
NFKB1	10
NIK	10
STAT3-isofom1	9
CEBPB	8
EBF1	8

表 2. 遺伝子カスケード解析結果

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 1 件)

佐野大佑: 同所性頭頸部癌モデルを用いた頭頸部癌頸部リンパ節転移の機序の解明. 横浜医学, 64 (1) : 21-26, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Oridate N: The profile of regional and distant metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma in vivo. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, October 3-5, 2013

百束紘、高橋秀聡、堀井千裕、高橋優宏、西村剛志、田口享秀、佐野大佑: 頭頸部がん研究における経尾静脈移植による頭頸部癌肺転移モデルの有用性について. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会、札幌、2013 年 5 月

15-18 日

Sano D, Takahashi H: The regional metastatic potential of an orthotopic mouse model of head and neck squamous cell carcinoma. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Sapporo, Japan, September 19-21, 2012

Sano D, Hyakusoku H, Takahashi H, Nishimura G, Takahashi M, Taguchi T, Matusda H, Myers JN: The applicability of murine orthotopic and experimental metastasis models for identifying the mechanisms of regional and distant metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. 8th international conference on head and neck cancer, Toronto, ON, Canada, July 21-25, 2012

佐野大佑、高橋秀聡、百束紘、堀井千裕、高橋優宏、西村剛志、田口享秀、Jeffrey N. Myers: 頭頸部がん研究における同所性頭頸部癌モデルの有用性について. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会、新潟、2012 年 5 月 10-12 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐野 大佑 (Daisuke Sano)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：10620990