

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792206

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移におけるケモカインおよび増殖因子の関与

研究課題名(英文) Contribution of chemokines and growth factors for the cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

田中 徳昭 (TANAKA, NORIAKI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：70412012

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)：本研究では口腔扁平上皮癌の予後因子である頸部リンパ節転移を引き起こす因子について解析を行った。手術切除組織を用いた解析から癌細胞におけるVEGF-CおよびCCR7の発現と頸部リンパ節転移との間に関連を認めた。また、培養細胞を用いた解析からVEGF-Cにより癌細胞は遊走能・浸潤能の亢進を認めた。以上から、口腔扁平上皮癌においてVEGF-Cは癌周囲にリンパ管新生を引き起こすとともに癌細胞自身の遊走能や浸潤能を亢進させ、またCCR7-CCL19による走化性によりリンパ管への侵入を亢進させることにより頸部リンパ節転移を亢進させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：One of prognostic factors of oral squamous cell carcinoma patients is cervical lymph node metastasis. In this study, we analyzed the factors of lymph node metastasis to use with resected tissues and cultured cells of oral cancer. From the results of analysis for resected tissues, we found the correlation between cervical lymph node metastasis and highly expression of VEGF-C or CCR7 in cancer cells. Moreover, from the results of analysis for cultured cells, VEGF-C promotes cancer cells migration and invasion abilities. Thus, VEGF-C induces lymphangiogenesis in peritumoral tissue and promotes migration and invasion abilities in oral cancer. Moreover, it is suggested that oral cancer cells are promoted cervical lymph node metastasis to enhance invasion into lymphatic vessels by chemotaxis of CCR7-CCL19 lineage.

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：口腔扁平上皮癌 リンパ節転移 ケモカイン 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

国立がんセンターがん対策情報センターの資料によると、口腔・咽頭癌の粗罹患率および粗死亡率は男女とも年々増加傾向を示し、特に男性においては、ここ10年で急激な増加を認めており、早急な対策が望まれる状況となっている。口腔・咽頭癌はその90%が扁平上皮癌であり、頸部リンパ節転移が口腔・咽頭扁平上皮癌の予後因子であることが以前より報告されている。したがって、口腔・咽頭扁平上皮癌における頸部リンパ節転移の制御が本患者の予後改善に非常に重要と思われる。しかしながら、近年まで口腔・咽頭扁平上皮癌のみならず、全身的に見ても癌のリンパ節転移機構についての十分な解析は行われていなかった。これはリンパ管を同定することが不可能であったことに起因するが、近年になりリンパ管特異的なマーカーであるD2-40 (ポドプラニン) やLYVE-1が発見され、リンパ管の同定が可能となったことから、リンパ節転移機構の解析が徐々にではあるが行われるようになってきている。しかし、口腔・咽頭扁平上皮癌についてほとんど解析はされておらず、癌周囲のリンパ管増生や癌細胞のVEGF-CおよびFlt-4の発現が予後不良因子であることが明らかになってはいるが、不明な点が多い。また、近年の研究により癌が増殖・浸潤する際に周囲の微小環境(ニッチ)に適するように変化したり、ニッチそのものを改変したりすることで、ニッチを利用していることが明らかとなってきた。また、リンパ節転移を特徴とする口腔・咽頭扁平上皮癌のような癌周囲にはリンパ管新生をしばしば認めることから、癌そのものがニッチを利用してリンパ節転移を促進させていることが強く考えられる。したがって、口腔・咽頭癌の予後改善にはリンパ管新生を引き起こすニッチの改変が重要であると考えられ、リンパ管新生を引き起こすニッチそのものの解析と癌細胞がそのニッチ

形成にどのように関与しているかを解析する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は口腔扁平上皮癌組織で確認されたVEGF-CおよびCCR7を中心とした増殖因子やケモカインについて、口腔扁平上皮癌細胞の3次元培養モデルを用いて、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移機構におけるリンパ管新生とケモカインの役割について解析を行うことである。また、腫瘍が実際に生体内を浸潤し、リンパ管内へ侵入していく際には周囲の間充織を分解していくことが必要であり、間充織の最大の構成成分であるタイプIコラーゲンをを用いた3次元培養モデルは生体内の状況を非常に良く反映したモデルと考えられる。さらに、コラーゲンゲル内に増殖因子やケモカイン、線維芽細胞やリンパ管内皮細胞を添加し、それらのコラーゲンゲルを層状に組み合わせることにより3次的に癌細胞の浸潤形態やリンパ管内皮細胞との相互作用を検討することが可能であると考えられる。したがって、本実験モデルから得られた結果は2次元環境下で得られた結果よりも、より生体内の状況を反映していると考えられ、分子標的治療薬などの形で、早期に臨床にフィードバックが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

- (1) 口腔扁平上皮癌組織におけるリンパ管新生因子およびケモカインの発現レベルの検討 - 患者の同意の得られた口腔扁平上皮癌手術切除材料を用いて、リンパ管形成に関連の強い増殖因子やリンパ管への遊走に関する深いケモカインレセプターについて口腔扁平上皮癌組織における発現を検討する。また、患者予後との関連についても解析を行う。
- (2) 癌細胞の増殖・遊走におけるリンパ管新生因子の関与についての検討 - 培養液中に

リンパ管新生因子を添加し、癌細胞の増殖への関与について検討を行う。また、遊走能については Wound healing assay を用いて検討を行う。

(3) 3次元培養実験モデルにおける癌細胞のコロニー形成能にリンパ管新生因子が及ぼす影響についての検討 - コラーゲンゲル内にリンパ管新生因子を添加することにより、口腔扁平上皮癌培養細胞のコロニー形態や大きさに影響を及ぼすか否か検討を行う。

4. 研究成果

(1) 研究に用いた手術材料について、患者予後とリンパ節転移との関連について検討を行ったところ、これまでの報告と同様にリンパ節転移群で有意に予後が不良であった。これらの集団がこれまでに報告と同様であることを確認できたことから、これらの集団を用いて免疫組織染色による検討を行った。免疫組織染色結果を染色濃度および染色率からスコア化し、平均値を算出した。平均値より高スコアのを High 群、低スコアのを Low 群とした。また、毛細血管密度およびリンパ管密度も計測し、これらについても同様に平均値を基準として High 群と Low 群に分類し、これら 2 群間での比較検討を行った。検討を行った因子の中で、明らかに予後との相関を認めたものは無かったが、リンパ節転移は VEGF-C ($p=0.0093$)、CCR7 ($p=0.0311$)、リンパ管密度 ($p=0.0182$) において High 群で有意に多く認められた。Neuropilin-2 は有意差は無いものの、High 群でリンパ節転移が多く認められる傾向にあった。それ以外の因子についてはリンパ節転移とも特に相関を認めなかった。

(2) 種々の口腔扁平上皮癌培養細胞を用い、VEGF-C、FLT-4 および CCR7 の発現レベルについて解析を行った。SAS、OSC19 および HOC313 では VEGF-C の高発現を認め、SAS および

HOC313 では FLT-4 も高発現を示した。残念ながら CCR7 については培養細胞での発現を確認できなかった。これらの口腔扁平上皮癌培養細胞株に recombinant VEGF-C および VEGF-D を添加し培養を行った。VEGF-D 添加では特に変化は認めなかった。VEGF-C 添加では FLT-4 発現細胞では Wound healing assay にて遊走能の亢進を認めたが、増殖能については変化を認めなかった。FLT-4 非発現細胞では特に変化は認めなかった。

(3) 2次元培養で recombinant VEGF-C 添加により遊走能の亢進を認めた細胞株を使用し、3次元培養による変化を確認した。これらの細胞を VEGF-C 含有コラーゲンゲル内で培養を行ったところ、非添加群と比較して形態には変化がないものの大きなコロニーを形成し、Invasion assay でも浸潤能の亢進傾向を認めた。また、コラーゲンゲルを重層させ、リンパ管新生因子方向への走化性を検討したが、リンパ管因子方向への走化性は示せなかった。

以上の結果から、VEGF-C および CCR7 は口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関与しており、また、口腔扁平上皮癌細胞は VEGF-C を分泌することによりリンパ管新生を行うとともに、癌細胞自身の遊走能や浸潤能を亢進させることが示唆された。さらに、CCR7-CCL19 および VEGF-C - FLT-4 による走化性を利用し、リンパ管への侵入を亢進させていると考えられた。

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)

[雑誌論文](計2件)

(1) Ishimoto S, Wada K, Usami Y, Tanaka N, Aikawa T, Okura M, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y. Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous

cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. Int J Oncol 41:67-75, 2012 (査読あり)

(2) Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, Yamanishi T, Ishihama K, Aikawa T, Okura M, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y. Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. Int J Oncol 40:1011-9, 2012 (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

(1) 平岡慎一郎、田中徳昭、大倉正也、古郷幹彦：当科における口腔癌周術期栄養療法 EPA と Probiotics の併用効果について
第 37 回頭頸部癌学会(2013年6月13日～14日、東京)

(2) Yamamoto N, Otani M, Yamada K, Tanaka N, Aikawa T, Okura M and Kogo M : Evaluation Atrophy of Sternocleidomastoid Muscle After Neck Dissection.
4th World Congress of the international Academy of Oral Oncology (May 15-18 2014, Rhodes island, Greece)

(3) 山本奈穂、相川友直、田中徳昭、沢井奈津子、山田謙一、應谷昌隆、古郷幹彦、大倉正也：頸部隔清術における副神経胸鎖乳突筋枝保存の有無における術後評価の検討。
第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2012年10月19日～21日、横浜)

(4) 田中徳昭、大倉正也、相川友直、山田謙一、應谷昌隆、松賀ひとみ、古郷幹彦：口腔癌の遠隔転移に関するリスク因子の統計学的検討。

第 36 回日本頭頸部癌学会 (2012年6月7日～8日、松江)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 徳昭 (TANAKA, Noriaki)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員
研究者番号：70412012