

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792225

研究課題名(和文)mGluR5を標的とした口腔癌に対する転移抑制療法の開発

研究課題名(英文)The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the metastases in oral cancer

研究代表者

栗林 伸行(KURIBAYASHI, Nobuyuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80617332

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)：mGluR5阻害剤がSDF-1/CXCR4システム依存的な脈管新生因子に及ぼす影響を検討したところ、VEGF-CのタンパクおよびmRNA産生は有意に抑制された。また、リンパ管新生能はmGluR5阻害剤にて有意に抑制された。さらに、口腔癌患者を用いた免疫組織学的検索の結果、mGluR5とCXCR4の発現比較では、両者に相関性を認め、mGluR5の発現はリンパ節転移の有無および浸潤様式と有意に相関していた。以上より、口腔癌の転移には、mGluR5を介した癌細胞の遊走促進とVEGF-Cによるリンパ管新生が重要であり、mGluR5が口腔癌に対する転移抑制療法の標的分子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：mGluR5-specific antagonists, MPEP and MTEP inhibit the SDF-1/CXCR4 dependent-migration of the cells. Immunohistochemical analysis revealed that there was a significant association between CXCR4 and mGluR5 protein expression. Furthermore, the mGluR5 protein expression in clinical specimen was significantly associated with the lymph node metastases and the modes of invasion. Moreover conditioned media derived from the oral cancer cells acquiring SDF-1/CXCR4 system enhanced the migration of lymphatic endothelial cells, which was significantly suppressed by the treatment with MPEP or MTEP. Furthermore, induction of a lymphangiogenic factor, VEGF-C was specifically impaired by the treatment with these mGluR5 antagonists. These results suggested that mGluR5 promotes the lymph node metastases of oral cancer cells by the SDF-1/CXCR4 system via enhancement of cancer cell migration and induction of lymphangiogenesis by VEGF-C.

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：mGluR5

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の予後不良因子は転移である。そこで、われわれは転移抑制療法の開発を目指し、口腔癌の転移機構について研究を行ってきた。その中で、ケモカインレセプターCXCR4を発現している口腔癌細胞が転移先リンパ節の産生するリガンドSDF-1に引き寄せられながらリンパ節転移を起こすこと(Exp Cell Res 290:289、2003; Lab Invest 84:1538、2004; Int J Oncol 25:65、2004; Int J Oncol 29:1133、2006)、CXCR4を高発現している口腔癌細胞の転移が、CXCR4の発現抑制作用を有するキノリノン誘導体ベスナリノンや、CXCR4特異的阻害剤AMD3100により抑制できることを明らかにしてきた(Mol Cancer Res 5:1、2007; Mol Cancer 8:62、2009; Eur J Cancer 47:452 2011)。これら一連の結果は、AMD3100を含めたCXCR4特異的阻害剤による口腔癌の転移抑制療法の可能性を示唆するものである。しかしながら、AMD3100は近年、造血幹細胞の動員薬として米国で臨床応用されており、AMD3100を癌の転移抑制剤として長期間投与した場合、造血幹細胞への影響が危惧される。そこで、われわれの研究室では、血球系細胞に発現のない癌細胞特異的なCXCR4の標的分子を探索すべく、SDF-1/CXCR4 autocrine loopを有するB88-SDF-1細胞(図1)を用い、ヒト全遺伝子型cDNAマイクロアレイによる解析を行った。その結果、発現変化を認めた418個の遺伝子の中から(四国歯誌 20:135、2007、図2) 遺伝子ネットワーク解析により、metabotropic glutamate receptor(mGluR)5を同定した。mGluR5は、グルタミン酸を唯一のリガンドとする代謝型グルタミン酸受容体の一つであり、神経系の細胞で高発現しているが、血球系細胞では発現していない(Histochem Cell Biol 132:435、2009)とされている。また、mGluR5は大腸癌細胞、乳癌細胞、前立腺癌細胞などの固形癌における発現も確認されており、最近、口腔癌において、mGluR5の強発現が患者生存率と相関すること、mGluR5特異的阻害剤が*in vitro*において口腔癌細胞の遊走を抑制することが報告された(Oncol Rep 17:81、2007)。そこで、われわれは、SDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌の転移におけるmGluR5の関連をmGluR5特異的阻害剤を用いて検討したところ、mGluR5特異的阻害剤は、SDF-1/CXCR4システム依存的な細胞遊走と*in vivo*におけるリンパ節および肺転移を有意に抑制した(四国歯誌 24:1 2011、図2)。この結果は、mGluR5がSDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌細胞の転移を制御していることを示唆するものである。しかしながら、血管新生、脈管内侵入、標的臓器への移動、脈管外遊出、着床、colonizationなどの複雑な過程を経て成立する癌細胞の転移において、mGluR5がど

の過程に作用しているかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、SDF-1/CXCR4システムを介した口腔癌の転移過程におけるmGluR5の役割を詳細に検討した上で、mGluR5が口腔癌に対する転移抑制療法の標的分子となるか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)すでにわれわれは、CXCR4とmGluR5を高発現している高転移性口腔癌細胞B88-SDF-1において、脈管新生因子であるVEGFファミリーの産生が増強していることを報告している(Eur J Cancer 47:452 2011)。そこで、VEGFファミリー(VEGF-A/B/C/D; R&D社)の産生におよぼすmGluR5阻害剤(MTEP; 3-((2-Methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl)pyridine、Calbiochem社より購入、以後の実験でも同様に20µMで使用)の影響をELISA法にて検討した。

(2)B88-SDF-1細胞とコントロール細胞の培養上清を、1/5、1/10倍添加した状態でリンパ管内皮細胞(TRALE)を培養し、SDF-1/CXCR4システム依存的な脈管新生を検討した。このとき、mGluR5阻害剤を20µMの濃度で添加し、これらの細胞に対するリンパ管新生抑制効果および遊走抑制効果をtube formation assay、migration chamber assayにて検討した。

(3)一次治療前の口腔癌患者原発巣より採取した生検材料48例を用い、mGluR5に対する免疫組織化学染色を行う。mGluR5の染色性と転移についてTNM分類に基づき評価し、相関性を検討する。また、mGluR5の染色性と生存率との相関性も評価した。

4. 研究成果

(1)まず、われわれはmolecular mechanismを探索すべく、mGluR5作動薬と阻害剤がSDF-1/CXCR4システム依存的な脈管新生因子の産生に及ぼす影響を検討した。その結果、SDF-1/CXCR4依存的に脈管新生因子であるIL-6、IL-8、VEGF-Aの産生はELISA法にて亢進されたが、それらの産生にmGluR5は影響を与えなかった(図1)。

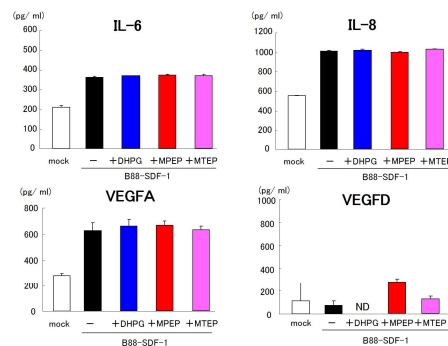


図1. mGluR5作動薬(DHPG)と阻害剤(MPEP, MTEP)がSDF-1/CXCR4システム依存的な脈管新生因子の産生に及ぼす影響(ELISA)

しかしながら、VEGF-C において、タンパク質産生が mGluR5 作用薬である DHPG にて上昇し、阻害剤である MPEP, MTEP で有意に抑制された。また、mRNA レベルでも同様の結果を得た。(図 2)

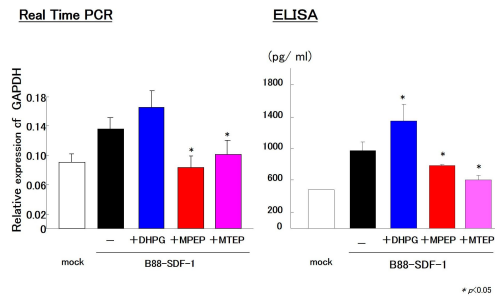


図2. mGluR5作用薬(DHPG)と阻害剤(MPEP, MTEP)がSDF-1/CXCR4システム依存的なリンパ管新生因子VEGF-Cの産生に及ぼす影響

(2)さらに、mGluR5 antagonist (MPEP, MTEP) がリンパ管新生におよぼす影響として、リンパ管内皮細胞 (TRALE) を用いて検討したところ、tube formation assay および migration assay よりリンパ管新生能およびリンパ管内皮細胞の遊走は mGluR5 特異的阻害剤である MPEP および MTEP 処理にて有意に抑制された(図 3)。

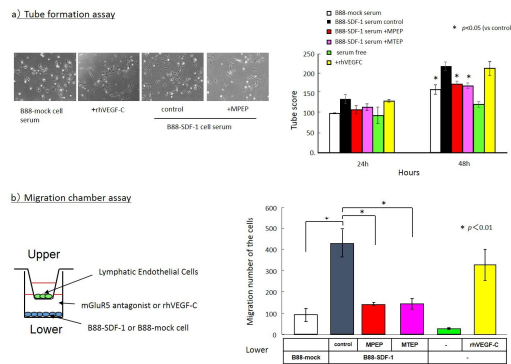


図3. SDF-1/CXCR4システムに誘導されるリンパ管新生因子VEGF-Cの産生に対するmGluR5阻害剤(MPEP, MTEP)の影響

(3)口腔扁平上皮癌患者を用いて免疫組織学的に検索を行った。一次治療前の口腔癌患者原発巣より採取した生検材料 48 例を用いたところ、原発巣における mGluR5 と CXCR4 の発現比較では、癌患者の原発巣において CXCR4 陽性の患者は mGluR5 の発現も陽性である患者が多く、両者に相関性を認めた(表 1)。

CXCR4 \ mGluR5	mGluR5		計
	陽性	陰性	
陽性	25 (52.1%)	9 (18.7%)	34 (70.8%)
陰性	6 (12.5%)	8 (16.7%)	14 (29.2%)
計	31 (64.6%)	17(35.4%)	48

$p < 0.05$   
(Fisher's exact test)

表1. 原発巣におけるCXCR4とmGluR5の発現比較

さらに、mGluR5 の発現と種々の臨床病理組織学的因子の関連について検討したとこ

る、mGluR5 の発現はリンパ節転移の有無および浸潤様式 (Y-K 分類) と有意に相関していた(表 2)。

臨床病理組織学因子	mGluR5 陽性	mGluR5 陰性	P値
年齢	<65	10	NS
	≥65	19	
原発巣の大きさ	T1,T2(<4)	23	NS
	T3,T4(≥4)	6	
リンパ節転移の有無	あり	1	$p < 0.01$
	なし	17	
浸潤様式	YK1~2	7	$p < 0.05$
	YK3~4	10	
分化度	高	14	NS
	中~低	15	

表2. mGluR5 の発現と種々の臨床病理組織学的因子の関連

以上より、SDF-1/CXCR4 システムを介した口腔癌の転移過程における mGluR5 の役割として、口腔癌のリンパ節転移には、mGluR5 を介した癌細胞の遊走促進のみならず、VEGF-C によるリンパ管新生が重要である可能性が示唆された。従って、mGluR5 が口腔癌に対する転移抑制療法の標的分子となりうる可能性が示唆された。

## 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 1 件)

Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M, Takamaru N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y, The Role of Metabotropic Glutamate Receptor 5 on the Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4 System in Oral Cancer. PLoS One, 査読有, 2013 Nov 13;8(11): e80773

DOI : 10.1371/journal.pone.0080773.

〔学会発表〕(計 3 件)

Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Makoto Kinouchi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto, The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the lymph node metastases in oral cancer. AACR Annual Meeting 2014 2014年4月5-9日(発表日4月7日) Abstract Number 1993 San Diego Convention Center USA

栗林伸行, 内田大亮, 木内 誠, 玉谷 哲也, 永井宏和, 宮本洋二, CXCR4 システムを介した口腔癌のリンパ節転移における mGluR5 のリンパ管新生への関与, 第 58 回 (公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 福岡県, 福岡市(福岡国際会議場, マリンメッセ福岡), 2013年10月11~13日(発表日10月11日, 演題番号 1-P1.1-4)

栗林伸行、内田大亮、木内誠、玉谷哲也、永井宏和、宮本洋二、CXCR4 伝達経路による mGluR5 の転写調節機構、第 72 回日本癌学会学術大会総会、神奈川県、横浜市(パシフィコ横浜), 2013年10月3~5日(発表日 10月4日、演題番号 P-2114)

〔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 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

栗林 伸行 (KURIBAYASHI, Nobuyuki)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号：80617332

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：