

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861540

研究課題名(和文)ケモカインレセプターの頭頸部癌における役割の検討

研究課題名(英文)The function of the chemokine receptor in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

岡本 昌之 (Okamoto, Masayuki)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90464057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔中咽頭癌におけるケモカインレセプター3(CCR3)の発現を検討した。30症例の病理組織をCCR3抗体にて免疫染色を行った。CCR3発現陽性となったのは14症例(46.7%)であり、CCR3陽性となった症例では、リンパ節転移の有無、癌のステージ分類、5年生存率においてCCR3陰性例と比べて有意な差を見ることができた。細胞実験からも、CCR3のリガンドであるCCL11を作用させると、咽頭癌細胞はその移動能が有意に上昇した。また、siRNAにてCCR3をノックダウンさせた細胞では浸潤能が低下していることを確認した。これらのことから、CCR3は口腔中咽頭癌の予後推定因子と成り得ると思われた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of CC chemokine receptor 3(CCR3) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Thirty formalin-fixed paraffin-embedded oral and oropharyngeal SCC specimens were stained by ABC methods using CCR3 antibody. Positive expression of CCR3, of which the staining score was 10% over, was found in 14(46.7%) patients. CCR3 expression was significantly associated with lymph node metastasis, progress in clinical stage, as compared with CCR3 negative SCCs. And the overall survival rate of 14 CCR3 positive SCCs were lower than those of 16 CCR3-negative SCCs. Next We examined in vitro examination. Chemokine ligand 11 (CCL11) increases migration in human pharyngeal cancer cells in wound healing assay. And pretreatment of cells with CCR3 siRNA significantly reduced CCL11-increased cell migration in cell invasion assay. These results show that the investigation of CCR3 expression in oral and oropharyngeal SCCs may be useful to predict patients prognosis.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 ケモカインレセプター

1. 研究開始当初の背景

転移は癌の典型的な特徴であり、癌根治を困難にしている最大の要因である。癌の転移は、癌細胞の原発巣からの離脱、周辺組織への浸潤、リンパ管および血管内への進入、体液中での移動、末梢組織での着床、浸潤、転移巣の形成、などを経て成立する。これまでの症例の積み重ねによって、手術療法、放射線治療、化学療法の併用により制御可能となる癌が増加してきている一方、局所再発、リンパ節転移、遠隔転移などにより制御困難な症例も数多く存在している。頭頸部癌においても同様なことが言える。これからの癌治療において、癌の浸潤、転移をコントロールしながら原発巣の治療を完遂することができれば癌の制御に多大なる功績をもたらすことになる。

2. 研究の目的

手術療法、化学療法、放射線療法の進歩により制御可能となる癌が増加してきている一方、リンパ節転移、遠隔転移により制御困難な症例も数多く存在している。転移は癌の典型的な特徴であり、癌根治を困難にしている最大の要因である。近年ケモカインレセプターが多くの悪性腫瘍細胞に発現しており、その発現量と癌の遠隔転移、リンパ節転移、腫瘍径、予後との関係に関する報告がなされており、注目を集めている。我々はこれまでも CCR7、CXCR4 と頭頸部癌との関係を報告しているが、今回は Chemokine receptor 3 (CCR3)に着目した。CCR3 はもともと好酸球の遊走に関与し、アレルギー制御に関わるケモカインレセプターであるが、甲状腺乳頭癌での発現が亢進していることや、腎細胞癌や悪性黒色腫、悪性皮膚腫瘍などにおいても、癌の発育、増殖、悪性度との関連が報告されている。我々の施設における口腔咽頭癌組織

の免疫染色により CCR3 の発現とリンパ節転移、遠隔転移、TNM 分類(ステージ分類)、予後の検討を行うと共に、培養細胞を用いて、浸潤、転移に関する検討を行うこととした。CCR3 の siRNA ベクターを作成し、その機能をノックダウンさせることや CCR3 発現ベクターにて過剰発現させることによってその機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 4 種類の頭頸部癌細胞株 (咽頭癌由来細胞 : T3M-1, 上顎癌由来細胞 : IMC-3, 舌癌由来細胞 : HSC-3, 口腔癌由来細胞 : HSQ-89) における CCR3、の発現をリアルタイム PCR にて定量し、ウェスタンブロット法を用いて定性的かつ半定量的に検討する。
- (2) CCR3 の発現ベクター-RNAi ベクターの作成し、導入することにより、細胞の移動能、浸潤能を検討する。
- (3) 頭頸部癌手術摘出標本における免疫組織化学的染色、リアルタイム PCR による癌組織部分の CCR3 の発現を測定し、臨床的関連を検討する。

4. 研究成果

- (1) 頭頸部癌細胞株を用いてリアルタイム PCR 法にてケモカインレセプターの発現量を測定した。種々の培養頭頸部癌細胞において、CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR4, CCR6 とともに CCR3 の mRNA 発現も確認することができた。その中で、口腔中咽頭癌細胞株である T3M-1 細胞を用いて、以後の in vitro 実験を行っていた。

(2)

T3M-1 細胞に CCR3 の Ligand である CCL11 を作用させて、cell invasion assay を行うと、濃度依存的に細胞の移動能が上昇した。

(図 1)

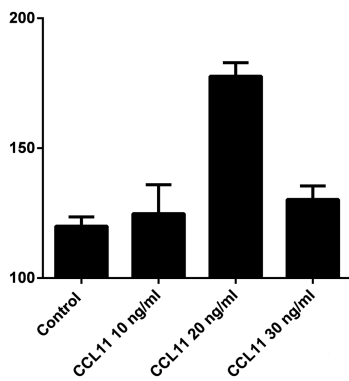


図 1 CCL11 刺激による invasion assay

また、CCR3 をノックダウンした細胞はその移動、浸潤能が低下した。(図 2)

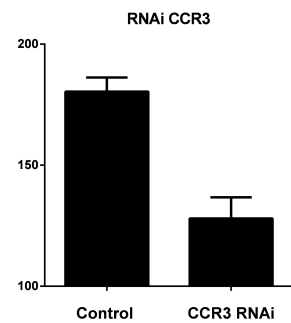
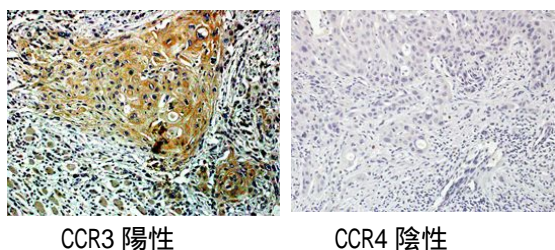


図 2 CCR3 ノックダウンによる invasion assay

(3)

2009 年 1 月 ~ 2012 年 12 月までに当科にて治療された口腔中咽頭癌 30 例について CCR3 の免疫染色を行った。



CCR3 陽性

CCR3 陰性

年齢、性別、腫瘍サイズには有意差は見られなかったが、CCR3 陽性症例においては、有意にリンパ節転移を認める症例が多く、またステージ分類でも陽性例は前例がステージの進行癌であった。再発率、原病死の比較では有意差はなかったが、やはり CCR 陽性例において再発率、原病死をきたしやすいという傾向が認められた。(表 1)

| | CCR3 positive (N=14) | CCR3 negative (N=16) | |
|----------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Age (mean ± SD) | 61.2 ± 13.1 | 62.4 ± 11.8 | n.s |
| Gender | | | |
| Male | 11 (78%) | 12 (75%) | n.s |
| Female | 3 (22%) | 4 (25%) | |
| Tumor size | | | |
| T1 or T2 | 5 (35%) | 7 (43%) | n.s |
| T3 or T4 | 9 (65%) | 9 (57%) | |
| Lymphnode metastasis | | | |
| positive | 14 (100%) | 8 (50%) | P<0.01 |
| Negative | 0 (0%) | 8 (50%) | |
| Clinical stage | | | |
| I | 0 | 1 (6%) | P<0.01 |
| II | 0 | 4 (25%) | |
| III | 0 | 5 (31%) | |
| IV | 14 (100%) | 6 (38%) | |
| Recurrence | | | |
| Yes | 7 (50%) | 6 (37%) | n.s |
| No | 7 (50%) | 10 (63%) | |
| Dead from disease | | | |
| Yes | 7 (50%) | 3 (18%) | n.s |
| No | 7 (50%) | 13 (82%) | |

表 1 CCR3 発現と臨床学的因子

5 年生存率も CCR3 陽性例では陰性例に比べて有意に低いという結果が得られた。(図 3)

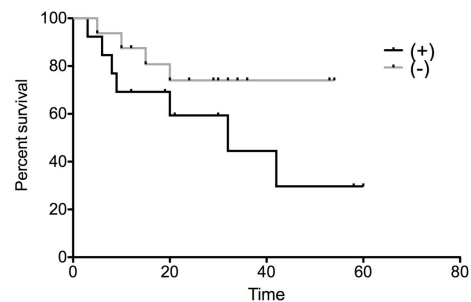


図 3 生存曲線(overall survival)

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

口腔中咽頭癌における CCR3 発現の検討
岡本昌之 成田憲彦 伊藤有未 呉 明美
藤枝重治
 第 38 回 日本頭頸部癌学会

2014.6.12-13 東京ファッションタウンビル
(東京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 昌之 (Okamoto, Masayuki)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90464057

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

藤枝 重治 (Fujieda, Shigeharu)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：30238539