

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870601

研究課題名(和文) 口腔癌低酸素微小環境と癌浸潤メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of oral cancer microenvironment and invasion

研究代表者

足立 誠 (Adachi, Makoto)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：10468192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌におけるEMTに関わる癌微小環境の解析として、まずin vitroにおいて口腔癌細胞を用いて微小環境に存在する細胞群のEMTへの関与とその役割を明らかにすることを目的とする。口腔癌細胞株OSC-19をGFPでラベルした後で、CD11b骨髄細胞および血管内皮細胞共存下に培養し、低酸素および通常酸素分圧で培養した際の細胞形態およびEMT関連蛋白(TWIST, Snail, Slug)の発現度を解析した。その結果、通常酸素分圧に比較し、低酸素環境化で培養した癌細胞でより運動能の上昇が認められた。さらに癌の微小環境に存在する細胞群においても低酸素下における細胞の運動能上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the role of tumor microenvironment in epithelial transformation of oral cancer cells under the hypoxic condition. Cell mortality and expression pattern of EMT-related proteins such as TWIST, Snail, and Slug in oral cancer cells were analyzed when these cells were cultured with or without CD11b+ myeloid cells and endothelial cells that are composed of tumor microenvironment. We found that oral cancer cells showed higher mortality in hypoxic condition than normoxia.

研究分野：癌の基礎研究

キーワード：低酸素 EMT

1. 研究開始当初の背景

固形癌の低酸素領域では周辺組織への浸潤と転移、そして放射線や薬剤への耐性などの悪性化因子が増加する。口腔癌では浸潤や転移によって患者の予後を悪化させるばかりでなく、手術範囲が拡大することで摂食、嚥下、構音など多くの機能障害を引き起こす。したがって口腔癌組織の低酸素領域での悪性化を促進させるメカニズムを解明することは至急の課題である。

癌の低酸素領域では低酸素誘導転写因子 (hypoxia inducible factor 1 α : HIF-1 α) が多くの癌細胞内で活性化される。低酸素環境下では HIF-1 α が安定化し、様々な転写因子を活性化することで、血管新生、放射線や薬剤への耐性、浸潤・転移能の増加など癌の悪性化に関与している(Semenza GL et al, *Cancer Cell*, 2004)。したがって低酸素領域で HIF-1 α およびその調節因子を標的とした薬剤の開発が世界中で進められている。組織の酸素濃度は健常時では一定に保たれているが、固形癌では幼弱な腫瘍血管が豊富で十分な循環を供給していないことから低酸素が生じている。さらに癌の周囲にはしばしば炎症が存在しており、炎症組織もまた低酸素を呈しており、CD11bを高発現するマクロファージが腫瘍内および周囲に誘導される。CD11b骨髓由来細胞は TGF- β や IL-6 を高発現することが知られている。TGF- β や IL-6 は、癌細胞が上皮性細胞形態から線維芽細胞様形態へと変化する上皮-間葉移行 (EMT) を引き起こすから我々はこれらの炎症性細胞により低酸素における癌の EMT が行われているのではないかと推測する。

一方で転写因子である STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription3) は多くの癌で恒常的に活性化されており、また STAT3 活性化の抑制が癌細胞株の増殖を抑制することからも癌治療の分子標的の1つとして注目されている。STAT3 は IL-6 ファミリーのサイトカイン、G-CSF、EGF などの増殖因子などによる Janus キナーゼ(JAK)の活性化とそれに引き続く、JAK と STAT3 のリン酸化カスケードにより活性化される (JAK-STAT 経路)。(Lai SY, et al. *Drug Resist Updat.*, 2010) また最近では、低酸素刺激によっても STAT3 が活性化され、HIF-1 α の発現を誘導したり、結合して特異的な遺伝子発現を誘発することで癌をより悪性化に導くことがわかりつつある。

2. 研究の目的

癌の低酸素領域では HIF-1 α が誘導され、様々な転写因子が活性化されて EMT を引き起こすことで細胞の運動性が高まり、転移や浸潤を促進すると考えられる。また、EMT を引き起こした細胞は上皮細胞由来の癌に多く発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とした分子標的治療薬の耐性化を引き起こすことが予測される。STAT3 は癌細胞の運動性を上昇させることから HIF-1 の誘導する EMT に深く関与しているのではないかと推測し、本研究では口腔癌細胞を用いて低酸素環境下での EMT 誘導における HIF-1 α および STAT3 の役割、とくにシグナル伝達系を明らかにするとともに、EMT に伴う EGFR や VEGFR を

介したシグナル伝達系や癌の微小環境の変化に伴う血管新生のメカニズムを明らかにすることを目的とする。さらに、これらにより悪性化した口腔癌に対する治療薬の新たな分子標的候補の同定を目指す。

3. 研究の方法

口腔癌におけるEMTに関わる癌微小環境の解析 (In vitro解析)

まず、口腔癌細胞株をGFPでラベルした後で、CD11b 骨髄細胞および血管内皮細胞共存下に培養し、低酸素および通常酸素分圧で培養した際の、細胞形態およびEMT関連蛋白 (TWIST, Snail, Slug) の発現度を解析し、癌の微小環境に存在する細胞群のEMTにおける役割を解明する。さらにこれらの細胞を3次元培養し、癌細胞の浸潤能の変化を調べる。

口腔癌EMTにおける分子メカニズムの解明 (In vitro解析)

上記1の実験系でEMTが証明された際は、それぞれの細胞においてSTAT3およびHIF-1のノックダウン細胞を作製し、その関与を調べる。もし計画通りにいかなかった場合は、EMT促進作用があるTGF- β を作作用させ、細胞群間で差が出る条件を検討する。また培養上清からEMTに関わる蛋白質を同定し、そのノックダウン効果についても検討する。

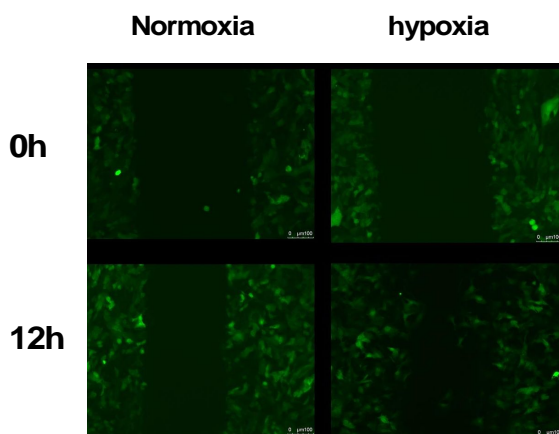
口腔癌幹細胞とEMTとの関連とその分子メカニズムの解明 (In vivo解析)

口腔癌患者から得られた癌組織から CD44 および ALDH をマーカーに癌幹細胞を単離し、レンチウイルスを用いて Luciferase を発現させ、NOD-SCID マウス口底に移植し、リンパ節転移が得られたマウスにおける原発巣および転移巣について解析する。

転移の有無は IVIS System をもちいて In vivo イメージングを行う。HIF-1 や STAT3 活性をイムノプロットにて、EMT 発生の有無を上皮細胞は E-カドヘリンを、間葉系細胞はビメンチンをマーカーとして、タンパクの発現量や細胞内局在について細胞染色を用いて評価する。EMT を引き起こす因子は TGF- β や HGF 等が報告されておりこれらの因子が低酸素刺激や HIF-1 の過剰発現によってどのように変化するかも検討する。さらに癌幹細胞 (-) の細胞株で同様の実験を行い、癌幹細胞との EMT におけるメカニズムの違いを調べる。

4. 研究成果

口腔癌細胞株 OSC-19 を GFP でラベルした後で、CD11b 骨髄細胞および血管内皮細胞共存下に培養し、低酸素および通常酸素分圧で培養した際の細胞形態および EMT 関連蛋白 (TWIST, Snail, Slug) の発現度を解析した。その結果、通常酸素分圧に比較し、低酸素環境化で培養した癌細胞でより運動能の上昇が認められた(図1)。さらに癌の微小環境に存在する細胞群においても低酸素下における細胞の運動能上昇を認めた。



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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

足立 誠 (ADACHI, Makoto)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：10468192

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：