

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462623

研究課題名(和文) 頭頸部癌における低酸素誘導因子発現の転移への影響とその臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of HIF1- $\alpha$  expression for head and neck cancer metastasis

研究代表者

小澤 宏之(Ozawa, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：30327621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌症例のHIF1- $\alpha$ 発現について検討を行った。早期舌癌25症例の免疫染色ではHIF1- $\alpha$ の核内発現と遅発性頸部転移との関係が示された。また経口的腫瘍切除の適応となった早期下咽頭癌症例においてリンパ節転移の有無とHIF1- $\alpha$ 発現との間に相関を認めた。さらにHIF1- $\alpha$ 阻害薬を用いて下流シグナルの変化をReal Time PCRで測定した。頭頸部癌細胞株にHIF1- $\alpha$ 阻害薬を投与することにより、EMT関連遺伝子のなかではTWISTが、また癌幹細胞に関係するNANOGおよびOCT3/4遺伝子の発現が低下し、これらの遺伝子発現がHIF1- $\alpha$ により制御され転移病巣形成に関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the molecular targets of HIF1- $\alpha$  relevant to metastasis, and to find out an impact of HIF1- $\alpha$  to HNSCC metastasis by clinicopathological assays. In immunohistochemical study, the HIF-1 $\alpha$  expression was higher in cancer cells than in normal cells of the adjacent normal mucosa. Univariate analysis revealed that high expression of HIF-1 $\alpha$  was significantly correlated with T-classification ( $P=0.012$ ), lymph node metastasis ( $P=0.002$ ) and lymphatic invasion ( $P=0.03$ ). HIF-1 $\alpha$  inhibitor downregulated the expression of HIF-1 $\alpha$ , twist, Oct3/4 and Nanog of head and neck cancer cells. These results suggest that HIF-1 $\alpha$  plays a key role for the tumor progression of HNSCC through EMT and CSC property. From the present study, HIF-1 $\alpha$  inhibition may have the possibility to suppress tumor metastasis, thus HIF-1 $\alpha$  is attractive target for the treatment of HNSCC.

研究分野：頭頸部外科

キーワード：低酸素誘導因子

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌では原発巣が早期の状態でも約30%にすでに所属リンパ節への転移が生じるとされており、この所属リンパ節転移は局所再発や予後不良因子となっている。過去の我々の施設の報告で行った舌癌 86 例の報告でも複数の頸部リンパ節転移が優位な予後因子であった(坂本:頭頸部癌 2011)。現在でも頭頸部癌全体の生存率は 50%程度に過ぎず、予後を改善していくためには転移を抑制する治療手段を確立すること、一般的に治療抵抗性である転移巣の治療効果を改善する必要がある。そのためには頭頸部癌の転移に関わる分子生物学的なメカニズムを解明することが重要である。

癌の転移は多段階のプロセスを通して成立する。すなわち 1)原発巣を離れて血管やリンパ管へ移動、2)血管やリンパ管内で生存、3)遠隔臓器内部へ侵入、4)遠隔臓器内部での増殖・腫瘍形成といった複雑なプロセスを経るが、癌の転移が成立するためにはこの各ステップに応じた様々な遺伝子発現の調整を癌細胞が行っていると考えられている。

HIF1- は正常酸素濃度では常にユビキチン/プロテアソーム系で分解され発現量が少ない状態にあるが、低酸素分圧化では分解が抑制されることで発現量が上昇する。分解されなかった HIF1- は核内に移行し最終的に DNA 上の HRE (低酸素応答領域 Hypoxia responsive Element) と結合し、様々な遺伝子の転写を促進する。癌細胞は腫瘍増殖に伴う内部の血流減少や、血流に乏しい間葉組織への進展などで低酸素ストレスに晒される。そのため腫瘍細胞は HIF1- を介した種々の転写因子を活性化させることによりストレス環境下での生存を可能にしている。また癌転移にも HIF1- が関わっていることが知られている。HIF1- の転写因子の中には各種の血管新生因子やマトリックスメタロプロテアーゼなどがあり、血管およびリンパ管新生や腫瘍細胞の組織浸潤など腫瘍進展に重要な役割を果たしていると考えられる。

### 2. 研究の目的

研究代表者は 2011 年 4 月より 2 年間、米国の Johns Hopkins University に研究留学し、Department of Oncology, Head and Neck Cancer therapeutic program に所属し頭頸部癌の転移に関する研究を行ってきた。頭頸部癌細胞を口腔～中咽頭腔に注入移植し、所属リンパ節に転移を生じさせる同所移植モデル(orthotopic model)を確立した。

この同所移植モデルの原発巣とリンパ節転移を採取し、それぞれ組織での遺伝子発現を RNA-seq 法で解析し、転移リンパ節で発現の亢進している遺伝子および活性化しているシグナルを統計的に抽出した。その結果、転移リンパ節において HIF1 および HIF2 シグナルの亢進を認めた。また HIF1- の転写因子の一つとされる adrenomodulin がリン

パ節において発現上昇していることが解った。

以上の研究成果を踏まえ本研究では、はじめに頭頸部癌の臨床検体を用い、HIF1- 発現の臨床的な意義づけを行う。次に頭頸部癌細胞株を用い、HIF1- 発現と腫瘍増殖能および転移に関わる因子との関連について検討を行う

### 3. 研究の方法

(1)頭頸部癌における HIF1- およびその転写因子発現の免疫組織化学的評価

舌癌および下咽頭癌症例の病理標本について ABC-DAB 法を用いた HIF1- の免疫染色を行う。その結果を臨床データと比較し、治療効果や予後だけでなく所属リンパ転移、遠隔転移と HIF1- 発現との関連について解析する。

(2)頭頸部癌における HIF1- の作用についての検討

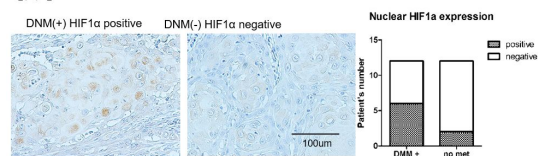
HIF1- シグナル阻害剤 (KC7F2) を頭頸部癌細胞株 FaDu および Detroit 512 に負荷し、HIF1- 発現量の変化を解析し、腫瘍増殖への与える影響について評価する。さらに各種転写因子の発現量の変化を mRNA レベルで解析する。

さらに頭頸部癌転移における HIF1- の関与を検討するため、この FaDu および Detroit 512 細胞を用い shRNA および siRNA を用いて HIF1- のノックダウン細胞株を作成する。それぞれの細胞の遺伝子発現変化を検討する(現在も継続中)。

### 4. 研究成果

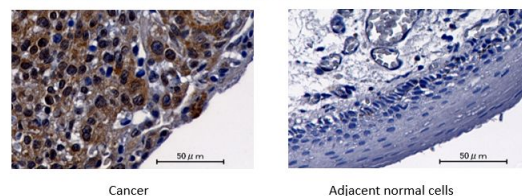
早期舌癌 25 症例の免疫染色では HIF1- の核内発現と遅発性頸部転移との関係が示された(図 1)。

【図1】 早期舌癌における遅発性頸部転移(DNM)とHIF1-α発現



【図2】

#### Immunohistochemical expressions of HIF-1α

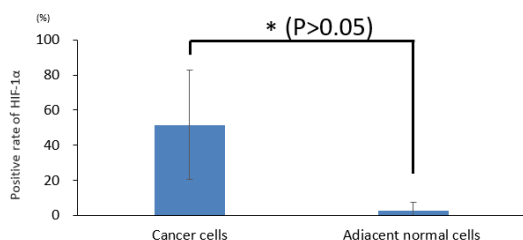


次に経口的腫瘍切除の適応となった早期下咽頭癌 33 症例において、周囲の正常粘膜と比較し、癌組織において HIF1- 発現の増加を認めた(図 2、3)。

下咽頭癌症例における臨床データと HIF1-

発現との関係についての解析を行ったところ、リンパ節転移の有無と HIF1- 発現との間に相関を認めた(図4)。

【図3】 Positive staining rate of HIF1α  
HPC cancer cells V.S Adjacent normal cells



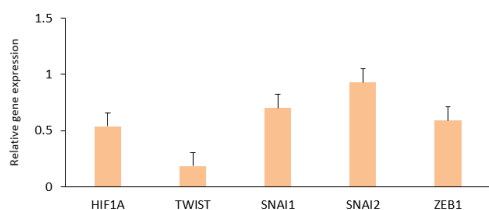
【図4】 Univariate analysis of risk factors for neck lymph node metastasis(NLNM)

Variable	NLNM positive (n=9)	NLNM negative (n=24)	Odds ratio	P value
Age	<70	3		0.392
	≥70	6		
T classification	Tis,1	2		0.101
	T2,3	7		
HIF-1α (≥60%)	Negative	2	13.300	0.002*
	Positive	7		
Lymphatic invasion	Negative	4	13.750	0.03*
	Positive	5		
Vascular invasion	Negative	6	0.167	
	Positive	3		

さらに HIF1- 阻害薬 (KC7F2) を用いて下流シグナルの変化を Real Time PCR で測定した。頭頸部癌細胞株 (FaDu, Detroit 512) に KC7F2 を投与することにより、EMT 関連遺伝子のなかでは TWIST が、また癌幹細胞に関係する NANOG および OCT3/4 遺伝子の発現が低下した(図5、6)。また、KC7F2 を用いた増殖抑制実験 (MTS アッセイ) では、FaDu、Detroit512 とともに濃度依存的に増殖が抑制された。

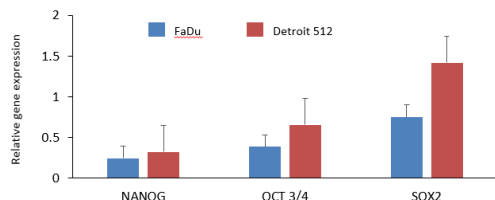
【図5】

mRNA expression of EMT markers after HIF-1α inhibitor exposure (FaDu)



【図6】

mRNA expression of CSC markers after HIF-1α inhibitor exposure



これらの結果から、頭頸部癌において HIF1- の発現は腫瘍発生や腫瘍増殖と関わっているだけでなく、頸部リンパ節転移と関わっていることが明らかとなった。そして HIF1- が転移抑制に関わるメカニズムとして TWIST 発現を介した EMT や、NANOG および OCT3/4 発現に見られる癌幹細胞形質が関与している事が示された。

今後は、薬剤耐性、浸潤能、遊走能などについて HIF1- 発現量との関係について研究を継続していく。

## 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2件)

1) Ikari Y, Ozawa H, Imanishi Y, Tomita T, Sekimizu M, Watanabe Y, Ito F, Saito S, Ogawa K. The functional and clinicopathological analysis of hypoxia inducible factor-1 (HIF1-) in head and neck squamous cell carcinoma. AACR annual meeting 2017, Washington DC, April 2014

2) 小澤宏之 伊藤文展 渡部佳弘 関水真理子 富田俊樹 小川郁. 頭頸部癌における同所移植転移モデルの確立と HIF1- の転移への関与について. 第39 頭頸部癌学会 会場名(兵庫県・神戸市) 2015年6月

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 宏之 (OZAWA, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 30327621

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡部 佳弘 (WATANABE, Yoshihiro)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30445374

佐藤 陽一郎 (SATO, Yoichiro)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：4062440

(4)研究協力者  
Christine Chung  
Johns Hopkins University, Dept of Oncology,  
Head and Neck therapeutic program