

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670855

研究課題名(和文) PTHrP産生口腔腫瘍の微小環境における間質細胞の変化は何に基づいているか？

研究課題名(英文) What causes changes in microenvironments associated with PTHrP-produced oral cancer tumors?

研究代表者

佐藤 千晴 (sato, chiharu)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：50222013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌はPTHrPを産生し、PTHrP陽性症例では間質の線維芽細胞に SMA陽性のcancer associated fibroblast (CAF)が有意に多かった。PTHrP処理により線維芽細胞は増殖活性の亢進、SMAの発現などCAFの形質を獲得することがわかった。線維芽細胞はPTHrPの受容体であるPTH1Rを発現し、PTHrP処理によりERKのリン酸化が生じることがわかった。以上の結果は、口腔癌細胞が産生したPTHrPがPTH/PTHrPレセプターを介したERK活性化を介して周囲微小環境の線維芽細胞をCAFに誘導することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma produce PTHrP, and PTHrP-positive cases showed a statistically significant presence of SMA positive cancer-associated fibroblasts in the stroma. PTHrP processing was found to exacerbate proliferative activity of fibroblasts, and CAF was obtained, as seen in the expression of SMA. The fibroblasts expressed PTH1R, a receptor of PTHrP, and PTHrP processing was found to stimulate ERK phosphorylation. These results suggest that PTHrP produced by oral cancer tumors utilizes ERK activation with PTH/PTHrP as a receptor to induce the fibroblasts in the surrounding microenvironment to develop into CAF.

研究分野：口腔外科学

キーワード：PTHrP 腫瘍微小環境 CAF

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍は遺伝子の疾患であり、がんの発症にはいわゆるがん遺伝子(原がん遺伝子)の活性化・がん抑制遺伝子の不活化などの複数の遺伝子異常が蓄積された結果生じることが明らかになり、多くの研究成果が報告されている。このようながん細胞自体の異常に加えて、近年、腫瘍をとりまく微小環境が注目を浴びている。なかでも腫瘍間質に存在する線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts(CAF)は、正常細胞とは異なった形質を発現することが明らかになりつつあり、がん細胞との相互作用の重要性が注目されている。CAFはTGF- $\beta$ やVEGFなど、通常の線維芽細胞では発現がほとんどみられないタンパクを発現していることが示され、VEGFにより血管新生が誘導されることや、TGF- $\beta$ によりがん細胞にEMT(Epithelial mesenchymal transition: 上皮間葉移行)を生じさせることが報告されている。しかし、がん細胞がCAFを誘導するメカニズムの詳細については未だ不明な点が多く残っている。

### 2. 研究の目的

口腔癌細胞と間質細胞の相互作用について検索を行うこと。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮がん細胞株におけるPTHrPの発現 口腔扁平上皮がん細胞株HSC2, HSC3, HSC4と前立腺癌細胞株PC3(陽性コントロール)からタンパクを抽出し、Western blotでPTHrP発現を検討した。

(2) 口腔がん患者標本におけるPTHrPの発現検索 口腔扁平上皮癌患者からの病理組織検体を用いてPTHrPの発現と腫瘍周囲微小環境の変化について免疫組織学的に検討した。

(3) PTHrP高発現口腔癌細胞培養上清による正常線維芽細胞増殖活性の亢進 ヒト正常線維芽細胞株MRC5にPTHrPを高発現しているHSC2培養上清(HSC2c.m.)を加えて培養を行った。

(4) PTHrP高発現口腔癌細胞培養上清による正常線維芽細胞のCAF誘導効果 ヒト歯髄由来線維芽細胞株DP31にHSC2c.m.を加えて培養した。

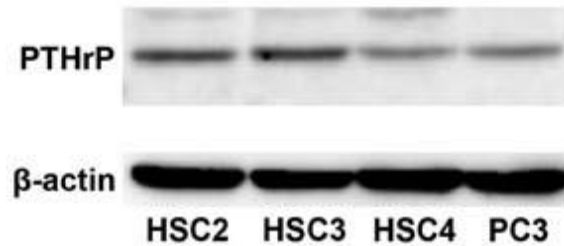
(5) PTHrP高発現腫瘍細胞と線維芽細胞株の共培養 HSC2とDP31および同じくヒト歯髄由来線維芽細胞DP36を共培養した。

(6) 線維芽細胞におけるPTHrP受容体の発現と下流のシグナル伝達系 線維芽細胞株MRC5, DP31, DP36はPTHrP受容体であるPTH1Rを発現していた。レセプターチロシンキナーゼの下流にMAPキナーゼのリン酸化シグナルがある。ERKのリン酸化についてウェスタンブロッティングで検索した。

### 4. 研究成果

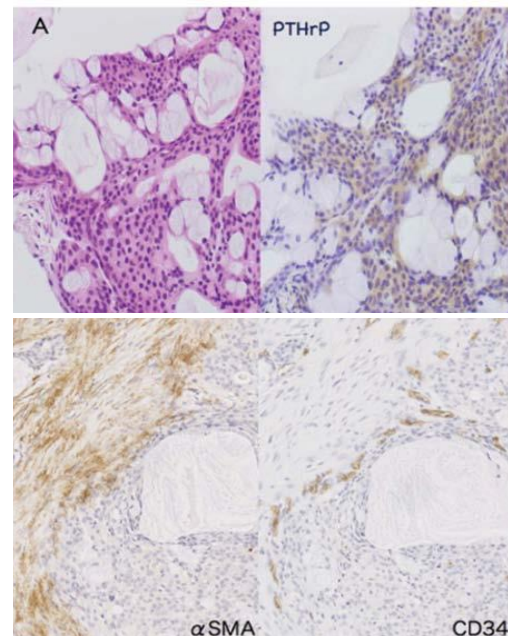
(1) 口腔扁平上皮がん細胞株における

PTHrPの発現 HSC2, HSC3, HSC4はいずれも陽性コントロールであるPC3よりも高いレベルでPTHrPを発現していた。

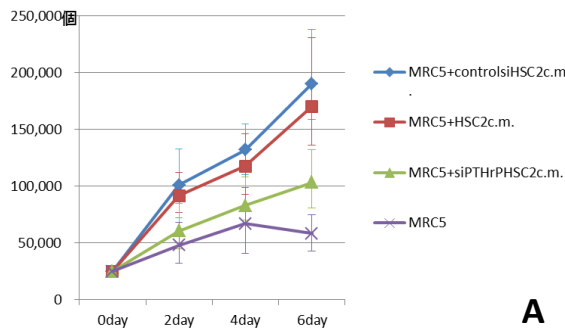


### (2) 口腔がん患者標本におけるPTHrPの発現検索

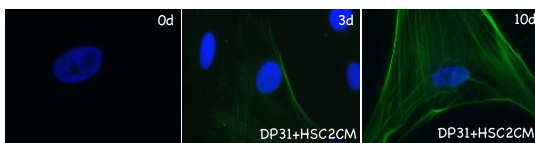
In vivoでも腫瘍細胞はPTHrPを産生し、HuRの発現との相関がうかがえた。PTHrP陽性症例では間質の線維芽細胞に $\alpha$ SMA陽性のcancer associated fibroblast(CAF)が有意に多いことが示された。さらにCD34陽性の血管内皮細胞は径が小型で幼若なものが多いことが明らかになった。



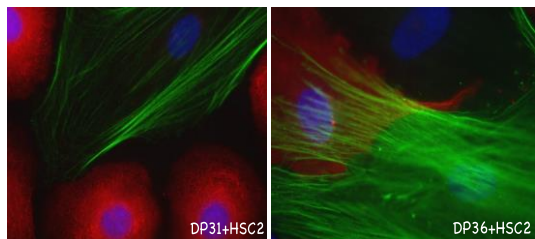
(3) PTHrP高発現口腔癌細胞培養上清による正常線維芽細胞増殖活性の亢進 HSC2c.m.によるMRC5の著しい増殖活性化が認められた。この増殖活性の亢進はHSC2にsiPTHrPを導入しPTHrPをノックダウンした細胞上清(siPTHrPHSC2c.m.)では抑制されることから腫瘍細胞が産生するPTHrPが腫瘍微小環境に存在する線維芽細胞の増殖を誘導することが示された。



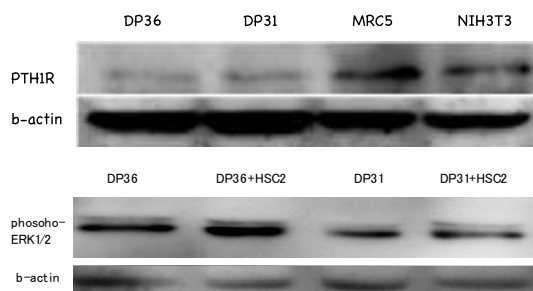
(4) PTHrP 高発現口腔癌細胞培養上清による正常線維芽細胞の CAF 誘導効果 通常培養した際にはほとんど発現のみられない  $\alpha$  SMA が経日的に DP31 線維芽細胞で発現亢進することが明らかになった。



(5) PTHrP 高発現腫瘍細胞と線維芽細胞株の共培養 HSC2 と DP31 および同じくヒト歯髄由来線維芽細胞 DP36 を共培養したところ、 $\alpha$  SMA の発現亢進が認められた。



(6) 線維芽細胞における PTHrP 受容体の発現と下流のシグナル伝達系 線維芽細胞株 MRC5, DP31, DP36 は PTHrP 受容体である PTH1R を発現していた。レセプターチロシンキナーゼの下流に MAP キナーゼのリン酸化シグナルがある。ERK のリン酸化についてウェスタンブロッティングで検索したところ、HSC2 培養上清で処理した DP31, DP36 は通常培養下のものと比較し ERK のリン酸化が亢進することが分かった。



今回の検索の結果、次の諸点が明らかになった。

- 口腔扁平上皮癌は PTHrP を産生し、PTHrP 陽性症例では間質の線維芽細胞に  $\alpha$  SMA 陽性の cancer associated fibroblast (CAF) が有意に多いことが示された。さらに CD34 陽性の血管内皮細胞は径が小型で幼若なものが多いことが明らかになった。
- PTHrP 処理により線維芽細胞は増殖活性の亢進、 $\alpha$  SMA の発現など CAF の形質を獲得することが明らかになった。
- 線維芽細胞は PTHrP の受容体である PTH1R を発現し、PTHrP 処理により ERK のリン酸化が生じることが明らかになった。

以上の検索結果は、口腔癌細胞が産生した PTHrP が PTH/PTHrP レセプターを介した ERK 活性化を介して周囲微小環境の線維芽細胞を CAF に誘導することを示唆している。今後、腫瘍の発生・進展における周囲微小環境の変化の詳細が明らかになることで、腫瘍の性質の把握、腫瘍の早期における検出に役立つことが期待され、さらに腫瘍間質をターゲットにした遺伝子治療への応用も期待される。

## 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 3 件)

- ① 長 太一、小野貢伸、北村哲也、松田 彩、東野史裕、大廣洋一、鄭 漢忠、進藤正信：舌扁平上皮癌における予後関連因子の臨床病理学的検討. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015/5/13-15 大阪国際会議場 (大阪市)
- ② 鳥居ちさほ、秋山廣輔、川本泰輔、間石奈湖、鄭 漢忠、進藤正信、樋田泰浩、樋田京子：腫瘍微小環境において、腫瘍由来の miRX により血管内皮は IL-6 をオートクラインで利用し、薬剤耐性や幹細胞性を獲得している. 第 69 回日本口腔科学会学術集会 2015/5/13-15 大阪国際会議場 (大阪市)
- ③ Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M: Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and podoplanin in oral leukoplakia and the risk of malignant transformation. 第 25 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会. 2014/8/27-29 メディアシップ日報ホール (新潟市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 千晴 (SATO CHI HARU)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：50222013

(2) 研究分担者

東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：50301891

北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：00451451

間石 奈湖 (MAISHI NAKO)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：00632423

(3) 連携研究者

なし