

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861543

研究課題名(和文) NOTCHシグナルを介した血管新生に癌関連線維芽細胞が果たす役割

研究課題名(英文) The role of Cancer-Associated Fibroblasts in Angiogenesis regulated by NOTCH signaling

研究代表者

栢森 高 (Kayamori, Kou)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10569841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌が形成する癌微小環境において、NOTCHシグナルが果たす役割を病理形態学的、分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、およそ舌扁平上皮癌の1/3の症例で、癌浸潤部の胞巣周囲にNOTCH3陽性を示す癌関連線維芽細胞が誘導されていること、NOTCH3発現が腫瘍の大きさと有意な関連があること、そのNOTCH3を介して血管新生が促進されていることが明らかとなった。また、NOTCH3陽性癌関連線維芽細胞が誘導されている症例は、陰性例に比して予後が不良である事も分かった。本研究結果から、癌微小環境のNOTCHシグナルをターゲットとした新たな口腔癌治療の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the role of NOTCH signaling in the tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Immunohistochemical study using human OSCC samples revealed that about one third of OSCCs showed NOTCH3 expression in cancer-associated fibroblasts (CAFs), and this NOTCH3 expression significantly correlated with tumor-size. Immunohistochemical and morphometric analysis using human OSCC samples demonstrated that NOTCH3 expression in CAFs significantly correlated with micro-vessel density in tumor stroma, and in vitro angiogenesis assay showed that OSCC cells promoted tube formation by HUVEC dependent on NOTCH3-expression in human dermal fibroblasts. Moreover, NOTCH3 expression in CAFs was related to poor prognosis of the OSCC patients. These results provided the possibility of NOTCH3-targeted therapeutic approach in OSCC treatment.

研究分野：口腔病理学

キーワード：NOTCH3 CAF Angiogenesis Oral Cancer

1. 研究開始当初の背景

本邦において口腔癌患者の数は増加傾向にある。最も頻度が高いのは扁平上皮癌(以下 SCC)であり、進行すると速やかに周囲組織へ浸潤し、更には頸部リンパ節転移・他臓器転移をきたす予後不良の疾患である。

癌浸潤巣周囲では様々な細胞や細胞外基質により独特の「微小環境」が形成されている。癌微小環境を構成する重要な細胞の1つに、線維芽細胞(Cancer-Associated Fibroblasts: 以下 CAF)が挙げられ、様々な癌腫において、CAFが腫瘍の増殖・浸潤や転移を促進させるという報告がなされている。しかしながら、口腔癌におけるCAFの役割は十分に解明されてはいないのが現状である。

一方、近年癌の増殖・浸潤・血管新生や転移に関わる因子の1つとして、NOTCHシグナルが注目されている。口腔癌では、癌細胞自身におけるNOTCH1の発現が低下しており、口腔癌発癌プロセスにおける癌抑制遺伝子としての機能が報告されている。しかしながら、癌細胞におけるNOTCHシグナルの重要性に関する研究はされているものの、癌周囲の微小環境でのNOTCHシグナルの意義に関しては十分把握されてはいない。

2. 研究の目的

口腔 SCC と CAF との相互作用が、癌の血管新生に及ぼす影響を、NOTCHシグナル(特にNOTCH3)に焦点を絞って、ヒト材料、培養細胞を用いた *in vitro* での実験系を用いて、病理形態学的、分子生物学的に解析して、口腔癌の新たな治療法の開発に貢献する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)本学歯学部付属病院口腔外科において、SCCの診断のもと、外科的切除された検体(舌癌93症例、歯肉癌9例、頬粘膜癌10例、口腔底癌9例)を用いて、癌浸潤巣におけるNOTCH3と α -SMA(CAFのマーカー)の発現を免疫組織化学的に検討した。

(2)ヒト舌癌93症例において、CAF陰性例(29症例)、NOTCH3陰性CAF症例(33症例)、NOTCH3陽性CAF症例(31症例)各々の生存率を Kaplan-Meier法により解析・検討した。

(3)ヒト舌癌症例で、CAFにおけるNOTCH3発現の有無と、臨床病理学的因子(年齢、性別、癌の大きさ、リンパ節転移の有無、癌の分化度)との間に関連があるか否かをフィッシャーの正確確率検定、二乗検定で統計的に検討した。

(4)*in vitro* での口腔癌による線維芽細胞のNOTCH3発現誘導メカニズムの解析

各種ヒト口腔 SCC 細胞株(H01-N-1, SAS, BHY, Ca9-22, HSC-3, HSC-4, SKN-3)と siRNA

(siRNA negative control: 以下 siCtrl, siRNA for human NOTCH3: 以下 siN3) 処理したヒト皮膚線維芽細胞(以下 NHDF)とを共培養させた後、anti-fibroblast microbeads(Miltenyi Biotec)でNHDFを分離してきて、NHDFにおけるNOTCH3, Hey1, α -SMAの発現をウェスタンブロット、ないしはリアルタイムPCR法で解析・検討した。

ヒト口腔 SCC 細胞株 H01-N-1 と NHDF を共培養して、NOTCH3 と AE1/AE3(上皮マーカー)、NOTCH3 と α -SMA の蛍光二重染色を行った。

口腔癌による NHDF の NOTCH3 発現誘導が cell-to-cell contact によるものか、癌細胞が産生する液成因子によるものかを共培養、分離培養をして検討した。

H01-N-1 と NHDF の共培養系で、NHDF における NOTCH1-4 の mRNA 発現をリアルタイムPCRで解析した。

(5)NOTCH3 が癌細胞の増殖に関与するかを検討した。具体的には、あらかじめ培養プレートの well にリコンビナントのヒト NOTCH3 を播種した後、H01-N-1 細胞(NOTCH リガンドである JAGGED1 を強く発現している)を播種して、その増殖活性を Cell Counting Kit-8(Dojindo)で測定した。

(6)NOTCH3 陽性 CAF が腫瘍血管新生に及ぼす影響を検討した。具体的には、

ヒト舌癌検体で、NOTCH3 陰性 CAF 症例と NOTCH3 陽性 CAF 症例とで、腫瘍間質中の血管密度に差があるかどうかを、蛍光二重染色法(NOTCH3 陰性 CAF 症例は α -SMA と CD34、NOTCH3 陽性 CAF 症例は NOTCH3 と CD34 で比較解析)により得られた画像を NIH image J ソフトウェアを用いる事で形態学的に定量・解析した。

H01-N-1 細胞株と NHDF, HUVEC を共培養して、癌周囲に形成される HUVEC の network の様子を蛍光二重染色(NOTCH3 と CD31)により観察した。

H01-N-1 細胞株と siRNA 処理した NHDF, および HUVEC を共培養して、HUVEC が形成する network を CD31 抗体を用いて検出。その画像を NIH Image J により定量的に解析した。

(7)以上の *in vitro* で得られた結果が、口腔 SCC に特異的なものなのかを、他の臓器に由来する癌細胞株(子宮頸部 SCC: HeLa、肺腺癌: A549、乳癌: MCF-7、胃腺癌: MKN-74、大腸腺癌: HCT-15、膵癌: Panc-1)を用いて検討した。具体的には、

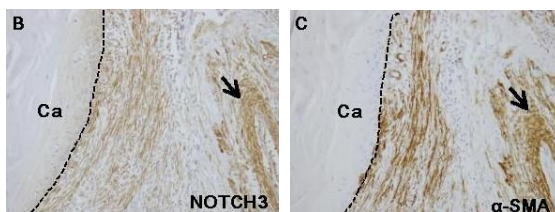
他臓器由来の癌細胞株と NHDF を共培養して後、NHDF を anti-fibroblast microbeads にて分離して、NOTCH3 の発現をウェスタンブロットにて解析した。

A549 癌細胞株と siRNA 処理した NHDF, および HUVEC を共培養して、HUVEC が形成する network を CD31 抗体を用いて検出。その画像を NIH Image J により定量的に解析した。

(8)NOTCH3 を発現する NHDF の pro-angiogenic activity をより明確に示すために、以下の実験を検討した。
 あらかじめ siRNA で処理した NHDF を一定期間 H01-N-1 細胞株と共培養して後、NHDF を anti-Fibroblast microbeads で分離してくる。分離した NHDF と HUVEC を共培養して、HUVEC が形成する network を定量・評価した。

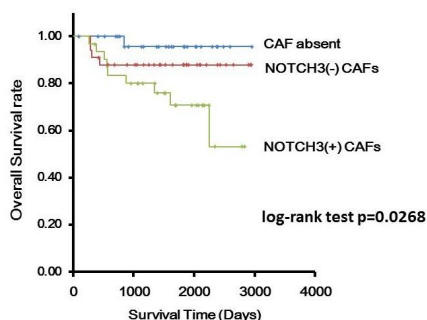
4. 研究成果

(1)ヒト舌癌手術材料を用いた免疫組織化学的検討の結果、浸潤部では癌巣周囲に NOTCH3 陽性を示す線維芽細胞が 93 症例中 31 症例 (33.3%) で認められた。更に、これら NOTCH3 陽性を示す線維芽細胞は全例、 α -SMA にも陽性を示す、すなわち CAF である事が示された (矢印: 血管壁で internal positive control)。



他の部位由来の口腔癌でも同様の免疫組織化学的検討を行った結果、歯肉癌では 9 症例中 4 症例 (44.4%)、頬粘膜癌では 10 症例中 3 例 (30%)、口腔底癌では 9 症例中 3 例が確認された。

(2)ヒト舌癌 93 症例の生存率を解析した所、CAF 陰性症例、NOTCH3 陰性 CAF 症例のいずれよりも、NOTCH3 陽性 CAF 症例は生存率が低い事が分かった。

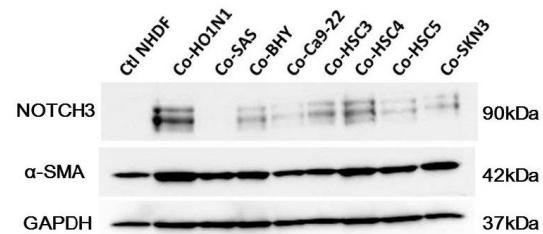


(3)ヒト舌癌症例を用いた解析の結果、CAF における NOTCH3 発現の有無は、癌の大きさ ($p=0.0292$) とリンパ節転移の有無 ($p=0.0023$) とに有意な関連がある事が示された。

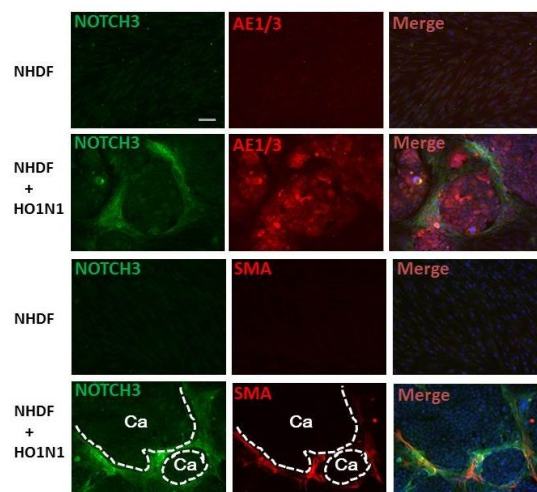
(4)

各種ヒト口腔 SCC 細胞株は、共培養した NHDF における NOTCH3 発現を種々の程度に上昇させた。その効果は特に H01-N-1 細胞株で顕著であった。そこで、H01-N-1 細胞株と NHDF の共培養系でさらに詳細に検討したところ、NHDF では α -SMA と NOTCH シグナル下流の因子の 1 つである Hey1 の発現が有意に上昇し

ていること、siN3 で処理した NHDF ではこれらの発現が有意に抑制される事が分かった。



蛍光二重染色では、AE1/AE3 陽性を示す H01-N-1 癌巣周囲に NOTCH3 陽性の NHDF を認めた。また、これら NOTCH3 陽性細胞は、 α -SMA にも種々の程度に陽性所見を確認できた。これらはヒト口腔癌材料の免疫染色で認められた像と類似する結果である。



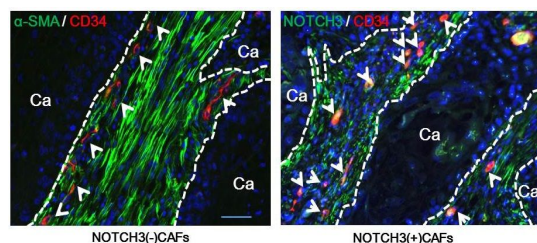
NHDF における NOTCH3 の発現は、H01-N-1 との分離培養系では認められず、共培養した場合にのみ確認された。NOTCH3 発現誘導には癌細胞との cell-to-cell contact が必要であることが示唆された。

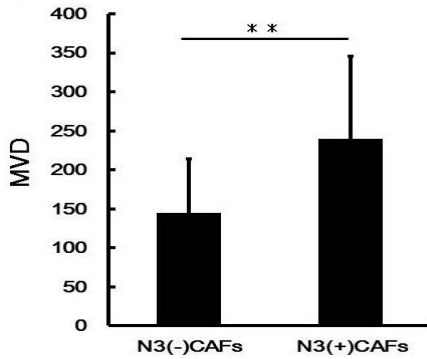
H01-N-1 と NHDF の共培養系で解析した結果、NHDF においては NOTCH1-4 のうち、NOTCH3 の発現上昇が最も強く認められた。

(5)H01-N-1 癌細胞株の増殖活性はコントロールと比較しても有意な上昇は認められなかった。

(6)

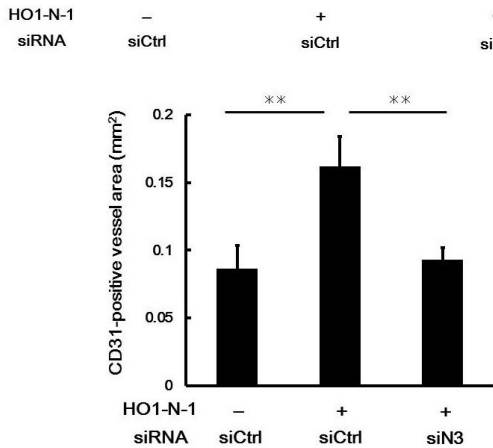
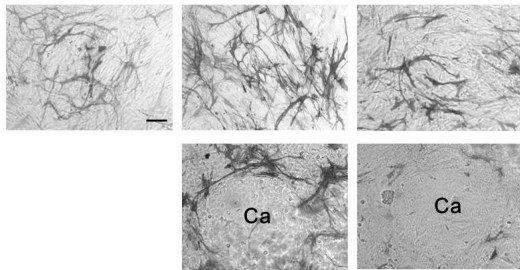
ヒト舌癌症例において、NOTCH3 陽性 CAF 症例は、NOTCH3 陰性 CAF 症例と比較して、腫瘍間質中の血管密度が有意に高かった (Ca: 癌、矢頭: 血管、 $p<0.01$)。





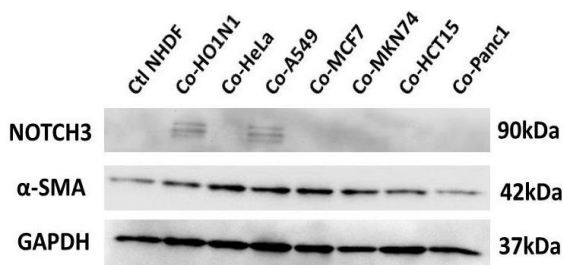
in vitro の系では、HO1-N-1 胞巣周囲に NOTCH3 陽性を示す NHDF と、CD31 陽性を示す HUVEC による network の形成が確認された。

siCtrl 処理 NHDF + HUVEC の共培養系と HO1-N-1 + siN3 処理 NHDF + HUVEC 共培養系では、後者のほうが HUVEC による network 形成面積が有意に大きかった。この network 形成は NHDF を siN3 で処理することにより、有意に抑制された。

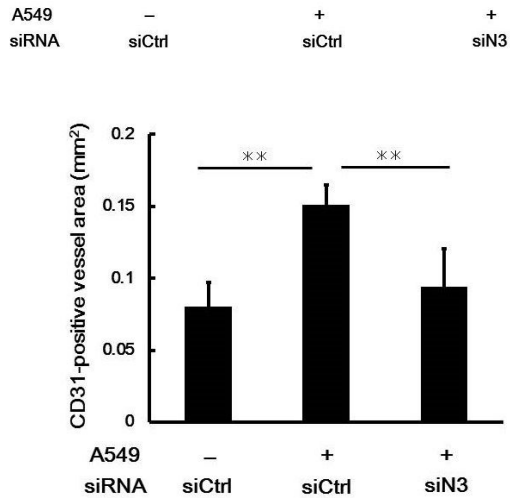
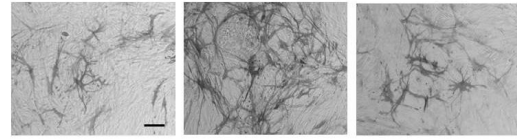


(7)

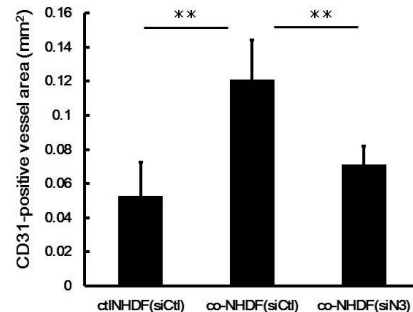
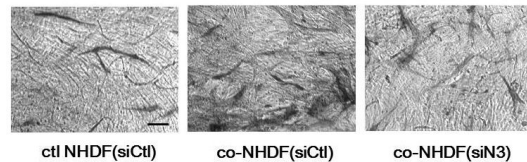
他臓器由来癌細胞株のうち肺腺癌由来の A549 細胞株が、NHDF における NOTCH3 発現誘導が確認された。



siCtrl 処理 NHDF + HUVEC の共培養系と A549+siN3 処理 NHDF + HUVEC 共培養系では、後者のほうが HUVEC による network 形成面積が有意に大きかった。この network 形成は NHDF を siN3 で処理することにより、有意に抑制された。



(8)NHDF 単独培養後に分離してきたコントロール群 (ctlNHDF(siCtrl)) と比較して、HO1-N-1 と共培養後に分離してきた NHDF 群 (co-NHDF(siCtrl)) の方が、HUVEC による CD31 陽性を示す network 形成が有意に認められた。この network 形成はあらかじめ siN3 で処理した NHDF 群 (co-NHDF(siN3)) では有意に抑制された。



以上より、口腔扁平上皮癌では、癌浸潤部において cell-to-cell contact を介して CAF の NOTCH3 発現を誘導する事により腫瘍血管新生を促進し、その結果癌の growth を増進させていることが示された。本研究結果から、癌微小環境、とくに CAF の NOTCH シグナルを抑制する様な分子標的薬を

用いることにより、新たな口腔癌治療の開発を提唱できると期待される。

(3)連携研究者
()

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)

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計 1 件)
Kou Kayamori, Ken-ichi Katsube, Kei Sakamoto, Yoshio Ohyama, Hideaki Hirai, Akane Yukimori, Yae Ohata, Takumi Akashi, Masao Saitoh, Kiyoshi Harada, Hiroyuki Harada, Akira Yamaguchi, 'NOTCH3 Is Induced in Cancer-Associated Fibroblasts and Promotes Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma', PLoS ONE, 2016 Apr 28;11(4): e0154112, doi:10.1371/journal.pone.0154112. eCollection 2016. 査読あり

〔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：
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
栢森 高 (KAYAMORI, Kou)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：10569841

(2)研究分担者
()

研究者番号：