

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11709

研究課題名(和文) 血小板凝集因子ポドプラニンの機能制御による口腔癌の遠隔転移抑制

研究課題名(英文) Inhibition of distant metastasis of oral cancer by functional control of the platelet aggregation factor podoplanin

研究代表者

山近 重生 (Yamachika, Shigeo)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：60182565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、anoikis回避機構におけるポドプラニンの役割を明らかにすることを目的として、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるポドプラニン発現量と血小板凝集性との相関につき検討した。

作製したポドプラニン安定発現株および発現抑制株について各検討を行った結果、SAS細胞株において親株・安定発現株と比較して発現抑制株で増殖能および遊走能の低下が認められた。本検討では同検討を同条件にて繰り返し実施しているが、検討によっては結果に多少の差が生じることもあった。特に安定発現株や発現抑制株については細胞性状の確認のため、また動物実験を行うにあたりより多くの株数や検討数が必要ではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の遠隔転移に血小板凝集が重要な役割を果たしていることが注目され、関連した研究が行われているが、口腔癌の遠隔転移機構の解明を目的として、血小板凝集因子であるポドプラニンanoikis回避に着目した研究はまだ少ない。本検討にてポドプラニンを安定発現および発現抑制させて細胞株が樹立されたことおよび発現抑制株において口腔癌の転移に強く関連する細胞増殖能および遊走能の低下が確認されたことは、有意義な結果で、本検討は今後の口腔癌における遠隔転移メカニズムの解明や制御方法確立のための基礎的な検討であったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the correlation between podoplanin expression and platelet aggregation in human oral squamous cell carcinoma cell lines with the aim of clarifying the role of podoplanin in anoikis evasion mechanisms.

As a result of these studies on podoplanin stable-expressing and suppressor cell lines, reduced proliferative and migratory ability was observed in the suppressor cell lines compared to the parental and stable-expressing SAS cell lines. In this study, the same study was repeated under the same conditions, but the results differed slightly from one study to another. A larger number of strains may be necessary to confirm their cellular properties and to conduct animal experiments.

研究分野：口腔外科一般

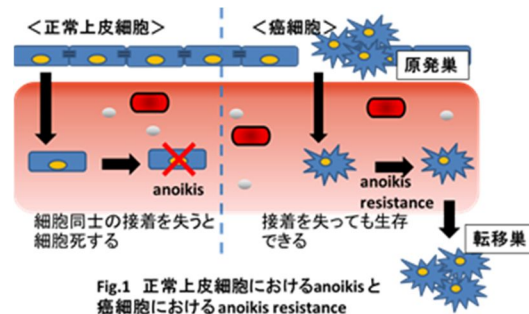
キーワード：ポドプラニン 遠隔転移 血小板凝集

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌が原発巣に局限している場合の5年生存率が約80%、所属リンパ節転移をきたした場合の5年生存率が約45%であるのに対して、遠隔転移をきたした場合の5年生存率は約10%まで急激に低下する¹⁾。口腔癌による死亡率の減少を実現するためには口腔癌転移の制御がきわめて重要であることを示唆しており、転移メカニズムのより詳細な解明および転移予防法・制御法の早急な確立が強く求められている。

上皮細胞は細胞同士や細胞外基質と接着し、さまざまなシグナルを交換しながら生存、増殖、機能しており、接着が消失した浮遊状態では増殖できず、細胞死が誘導される。このようにして誘導される細胞死は anoikis と呼ばれている。一方、癌細胞は原発巣から遊離した後も生存し、増殖を繰り返しながら血管やリンパ管に進入、血流やリンパ流を經由して他部位に到達、定着し、転移巣を形成する。血液中やリンパ液中に存在している癌細胞は浮遊状態においても細胞死に陥らず生存することから、癌細胞は何らかの機構で anoikis を回避しているものと考えられる²⁾。



ポドプランイン (podoplanin) は C 末端に膜貫通領域を有した I 型膜貫通型糖タンパク質で、ヒトでは 162 アミノ酸、マウスでは 172 アミノ酸からなる。リンパ管内皮細胞に発現し、血管内皮細胞に発現していないことからリンパ管の特異的マーカーとして利用されている。脳腫瘍、食道癌、肺癌、悪性中皮腫、頭頸部癌など、さまざまな腫瘍で発現が確認されており、さらに悪性度と相関して発現が亢進することから腫瘍マーカーとしての利用も進められている。また口腔扁平上皮癌に対する免疫組織化学的検討により、ポドプランインの高発現症例では 5 年生存率が有意に低いこと³⁾や高分化型ではポドプランインの陽性率が 0% であるのに対し、低分化型では 83% の陽性率を示すなど、ポドプランインの発現と口腔扁平上皮癌の悪性度が相関することが明らかとなっている⁴⁾。

さらにマウスを用いた実験では、ポドプランインを高発現する膀胱癌細胞や口腔扁平上皮癌細胞が高率に肺転移や腫瘍形成を生じるのに対し、ポドプランインの発現が少ない癌細胞ではほとんど生じないことが確認されている^{5,6)}。このことから、ポドプランインの持つ細胞生物学的機能が癌の悪性度や転移に何らかの役割を演じていると考えられる。一方、最近ポドプランインの持つ血小板凝集作用が注目され、血小板上のレセプターとして C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) が確認された。マウス肺転移モデルにおいて、CLEC-2 へのポドプランインの結合を抑制すると転移が著しく抑制されることが報告され⁷⁾、ポドプランインの血小板凝集作用と癌転移との関連も示唆された。しかしながら、実際にポドプランインがどのような機構で転移や造腫瘍性に関与しているのかについては未だ明らかとなっていないのが現状である。

参考文献)

- 1) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス ganjoho.jp
- 2) Kim YN: Int J Cell Biol 2012. 11page
- 3) Kreppel M: Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. Virchows Arch. 456(5):473-82 2010
- 4) Silvia de Sousa SF: Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. Appl Immunohistochem Mol Morphol. Dec 20(6):588-94 2012
- 5) Satoshi Takagi: Expression of Aggrus/podoplanin in bladder cancer and its role in pulmonary metastasis. Int. J. Cancer. 134(11):2605-2614 2014
- 6) Masayuki Tsuneki: Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. Laboratory Investigation. 93:921-932 2013
- 7) Kato Y: Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation using a novel anti-podoplanin antibody reacting with its platelet-aggregation-stimulating domain. Biochem Biophys Res Commun. 349(4):1301-7 2006

2. 研究の目的

癌の転移には、癌細胞が細胞同士や細胞外基質との接着性を失った後も生存を維持できるための anoikis 回避機構が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究は、この anoikis 回避機構が高転移性腫瘍に高発現が認められるポドプランインの血小板凝集作用に依存しているとの仮説に基づき、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、ポドプランイン発現量と血小板凝集性との相関、ポドプランイン発現量と SCID マウスでの肺転移形成率および造腫瘍性との相関につき検討する。これにより、anoikis 回避機構におけるポドプランインの役割を明らかにするとともに、口腔癌転移のメカニズムの一端を解明し、ポドプランイン

を標的とした転移制御法確立の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるポドプラニン発現の確認

ヒト舌癌由来細胞株 (HSC-2)、ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 (HSC-3)、ヒト舌癌由来細胞株 (HSC-4)、ヒト舌癌由来細胞株 (SAS)、ヒト歯肉癌由来細胞株 (Ca9-22) ヒト口腔癌細胞株におけるポドプラニンの遺伝子発現およびタンパク質発現につき PCR 法およびウェスタンブロット法を用いて確認した。実験に用いた細胞株は JCRB 細胞バンクより購入した。

(2) ポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株の作製

ヒトポドプラニン遺伝子を有する発現ベクター (pcDNA3.1) を作製、各細胞株に導入し、ポドプラニン安定発現株樹立を試みた。一方、ポドプラニン発現抑制株はアンチセンス遺伝子を有する発現ベクターを導入し樹立を試みた。いずれも遺伝子導入後のポドプラニン発現発現およびタンパク質発現の変化を RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により確認した。

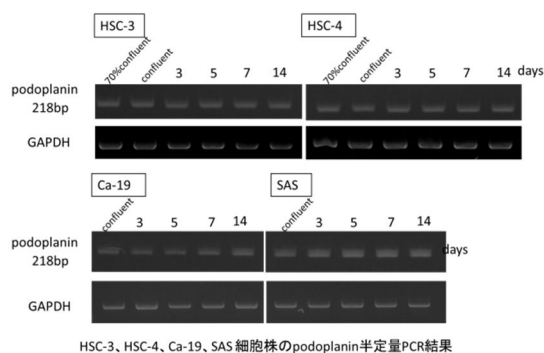
(3) ポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株を用いたポドプラニンの anoikis 抑制への関与の検討

実験2で樹立したポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株とそれぞれの親株の細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着・浸潤能、血小板凝集性、anoikisの差について検討し、健康人の血液から調整した多血小板血漿 Platelet Rich Plasma (PRP) 存在下において培養した場合と比較した。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるポドプラニン発現の確認

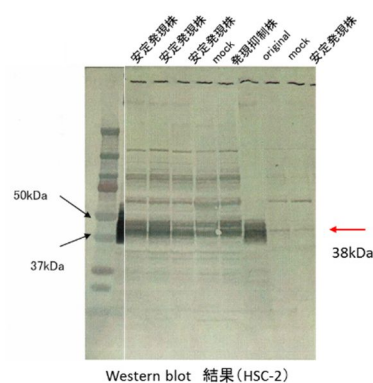
ヒト舌癌由来細胞株 (HSC-2)、ヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 (HSC-3)、ヒト舌癌由来細胞株 (HSC-4)、ヒト舌癌由来細胞株 (SAS)、ヒト歯肉癌由来細胞株 (Ca9-22) の各細胞株間において、ポドプラニンの遺伝子発現量に若干の違いが認められたが、大きな差は認められなかった。また、各細胞株ともに70%コンフルエント、コンフルエント、培養3~14日において発現量に差は認められなかった。タンパクの発現についてはHSC-2とSAS株間においてHSC-2株に多く発現が認められた。



HSC-3、HSC-4、Ca-19、SAS 細胞株のpodoplanin半定量PCR結果

(2) ポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株の作製

各細胞株に対して、ヒトポドプラニン遺伝子を有する発現ベクターを導入し、ポドプラニン安定発現株を樹立した。一方、ポドプラニン発現抑制株はアンチセンス遺伝子を有する発現ベクターを導入し樹立した。Western Blot 法による解析では、いずれの株においても分子量 38 kDa 付近で発現を認めた。本検討で用いたヒト口腔癌細胞株はいずれも元来ポドプラニン遺伝子の発現を認めており、安定発現細胞株との比較で発現量に有意差は認められなかった。また、ポドプラニン発現抑制株については、本検討では細胞毒性が強く出た影響で、得られた安定したタンパク発現抑制株数が少なかったため、有意差を検討できなかった。今後 siRNA を用いた発現抑制株の作製を検討する。



Western blot 結果 (HSC-2)

(3) ポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株を用いたポドプラニンの anoikis 抑制への関与の検討

各細胞作製後の培養時において、ポドプラニン安定発現株およびポドプラニン発現抑制株とそれぞれの親株を比較すると細胞の増殖性や接着性に差がある可能性が見られたため、まず、細胞の性質に差があるかどうかについて検討を行った。

MTT アッセイにより検討した細胞増殖性については、安定した安定発現株および発現抑制株が得られた HSC-2 細胞株で、親株・安定発現株・発現抑制株いずれにおいても有意な差は認められなかった。なお、SAS 細胞株においては、親株・安定発現株と比較して発現抑制株で若干の低下が認められた。一方いずれの株間においても血小板による影響は明らかでなか

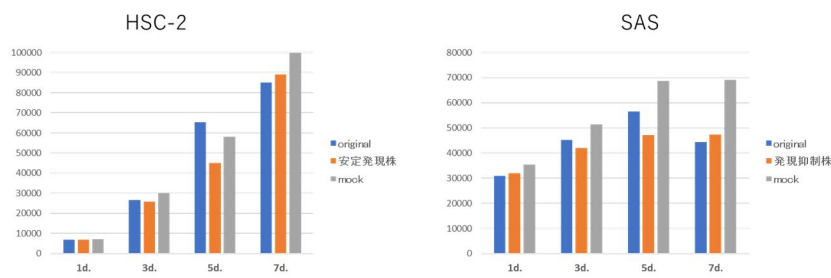
った。

スクラッチ法により検討した細胞遊走能については、安定した安定発現株および発現抑制株が得られた HSC-2 細胞株で、親株・安定発現株・発現抑制株いずれにおいても有意な差は認められなかった。なお、SAS 細胞株においては、親株・安定発現株と比較して発現抑制株で遊走能の低下が認められた。一方いずれの株間においても血小板による影響は明らかでなかった。

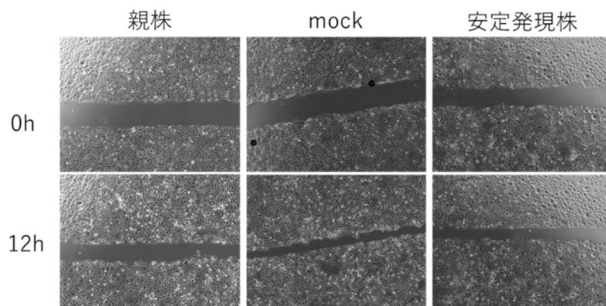
細胞接着性、血小板凝集性、anoikis の差違について検討することを目的に行ったアポトーシス細胞率についての検討においても同様の結果であった。

浸潤能については、HSC-2細胞株で血小板存在下と非存在下および親株と安定発現株との比較において、血小板存在下の安定発現株は血小板存在下の親株と比較して浸潤能が高い傾向が認められた。転位能を有しないとされているHSC-2細胞株においてポドプラニン遺伝子を安定発現させると浸潤能が増加する可能性が認められた点においては遠隔転移と関連して興味深いと思われた。今後各検討の検討数を増やし、検討が必要と思われた。

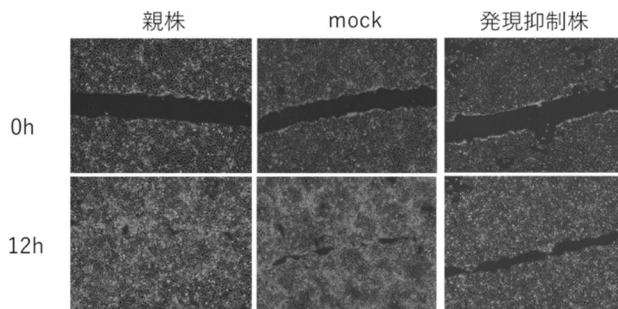
本検討では細胞株培養の条件や技術的な差異による影響を考慮して、同検討を3~5回ずつ同条件にて繰り返し実施している。結果の傾向は概ね均一であるが、検討によっては結果に多少の差が生じることもあった。特に安定発現株や発現抑制株は継代時期や培養条件によって細胞の性質が安定しない可能性も十分考えられるため、遺伝子導入株の品質評価のため、また動物実験を行うにあたりより多くの株数や検討数が必要ではないかと考えられた。



増殖アッセイ結果



遊走アッセイ結果(HSC-2)



遊走アッセイ結果(SAS)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	徳山 麗子 (Tokuyama Reiko) (20380090)	鶴見大学・歯学部・学内講師 (32710)	
研究分担者	寺田 知加 (Terada Chika) (40460216)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	田所 晋 (Tadokoro Susumu) (70552412)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	
研究分担者	里村 一人 (Satomura Kazuhito) (80243715)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	館原 誠晃 (Tatehara Seiko) (90380089)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	
研究分担者	今村 武浩 (Imamura Takahiro) (40771754)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	