The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	口腔癌頸部リンパ節転移の分子メカニズムの解明
Author(s)	森田, 祥弘
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58462
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【13】

氏　　名	森　田　祥　弘（もり　た　よし　ひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４４７０　号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	口腔癌頸部リンパ節転移の分子メカニズムの解明
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　俊之 （副査） 教　授　由良　義明　　准教授　大倉　正也　　准教授　小川　裕三

論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】

抗癌療法の格段の進歩により、悪性腫瘍の原発巣の治療成績は向上し、癌患者の生存率は大幅に改善した。しかしながら、所属リンパ節や遠隔臓器への転移の制御はいまだ不十分であり、癌患者の管理、予後を左右する大きな一因となっている。口腔癌においても同様の状況が見られ、頸部リンパ節への転移の有無が生存率に大きく影響することが示されているが、口腔癌の頸部リンパ節転移の制御、またそのメカニズムの解明は未だ十分ではない。本研究では、再現性の高い頸部リンパ節転移動物モデルを樹立することにより、リンパ節転移の分子メカニズムの解明を試みた。

【試料および方法】

1. 頸部リンパ節転移の動物実験モデル

レンチウイルスシステムにより緑色蛍光タンパク質(GFP)を安定発現させたヒト扁平上皮癌細胞株 SAS 細胞（以下 SAS-GFP 細胞）をヌードマウスの舌に接種し、舌原発巣を形成させた後、蛍光実体顕微鏡下にて頸部リンパ節転移巣の摘出、SAS 細胞の分離培養、舌への再接種を 3 回繰り返し、頸部リンパ節高転移能株 SAS-LM3 細胞を樹立した。

2. 免疫組織染色

担癌マウスの腫瘍を切除し、4%PFA にて固定後、凍結切片あるいはパラフィン切片を作製、抗 LYVE-1 抗体、抗 COX-2 抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。また、臨床病理検体を用いてパラフィン切片を作製し、抗 COX-2 抗体、抗 VEGF-C 抗体にて免疫組織染色を行った。

3. リンパ管新生の評価

免疫組織染色により、リンパ管内皮細胞の特異的マーカー、LYVE-1 発現を示すリンパ管内皮細胞の面積を ImageJ を用いて測定し、腫瘍面積あたりに占める割合を算出した。

4. リンパ管新生誘導因子の発現の検討

SAS 細胞から mRNA を採取し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成した。リンパ管新生誘導因子 VEGF-C、VEGF-D、および COX-2 の発現をリアルタイム PCR 法により検討した。さらに、VEGF-C の分泌・産生量を ELISA 法により測定した。

5. 舌癌臨床検体を用いた検討

和歌山県立医科大学歯科口腔外科ならびに社会保険紀南病院歯科口腔外科を受診した患者のうち、インフォームドコンセントの得られた舌癌症例 31 例の病理検体を用いて、COX-2 ならびに VEGF-C の発現と頸部リンパ節転移の相関性の検討を行った。

【結果】

1. リンパ節転移の動物実験モデルおよびリンパ節高転移能株の樹立

SAS-LM3 細胞は、親株の SAS-GFP 細胞と比較して、有意に高い頸部リンパ節転移能を示し、再現性の高い頸部リンパ節転移モデルを樹立できた。SAS-LM3 担癌マウスは経時的に体重減少を呈し、死亡した。

2. SAS-LM3 細胞におけるリンパ管新生

免疫組織染色により SAS-LM3 腫瘍は、SAS-GFP 腫瘍に比較してリンパ管新生が顕著に亢進していた。この結果に一致して、SAS-LM3 細胞においてはリンパ管新生誘導因子 VEGF-C の発現量ならびに分泌・産生量の増加を認めた。一方、VEGF-D の発現量に変化は認められなかった。

3. 頸部リンパ節転移における COX-2 の関与

近年、リンパ管新生における COX-2 の重要性が報告されている。頸部リンパ節転移における COX-2 の発現を免疫組織染色により検討した結果、SAS-LM3 腫瘍で COX-2 が高発現していた。また、SAS-LM3 細胞は SAS-GFP 細胞と比較し、COX-2 の発現量が増加していることがリアルタイム PCR 法により明らかとなった。COX-2 の選択的阻害剤 NS398 は培養 SAS-LM3 細胞において VEGF-C の発現ならびに分泌・産生を抑制し、さらに、担癌マウスに対する NS398（20mg/kg）の投与は、原発巣での SAS-LM3 腫瘍のリンパ管新生を抑制するのみならず、頸部リンパ節への転移も阻害した。その結果、担癌マウスの生存率は有意に改善した。

4. 舌癌臨床検体における COX-2 および VEGF-C 発現とリンパ節転移の関連

頸部リンパ節転移を認めた舌癌症例 11 例中 6 例（55%）に COX-2 の発現を認め、10 例（91%）に VEGF-C の発現を認めた。一方、頸部リンパ節転移を認めなかった症例 20 例では COX-2 の発現は 6 例（30%）、VEGF-C の発現は 4 例（20%）であった。さらに，VEGF-C と COX-2 を共に発現していた症例は頸部リンパ節転移を認めた症例では 11 例中 6 例（55%），頸部リンパ節転移を認めなかった症例では 20 例中 2 例（10%）であった。

【結論・考察】

本研究により，口腔癌細胞を用いた再現性の高い頸部リンパ節転移モデルが確立された。この動物実験モデルを用いた解析により，COX-2 依存性の VEGF-C の発現増加とそれに伴うリンパ管新生の亢進が、口腔癌の頸部リンパ節転移に深く関与することが明らかとなり，リンパ節転移における VEGF-C/COX-2 カスケードの重要性が明らかとなった。将来的にはこの動物実験モデルをさらに多面的に解析することにより口腔癌のリンパ節転移の病態および分子メカニズムの理解を深めるとともに，このモデルを用いた抗癌剤の開発など，効果的な分子標的治療法の開発にも取り組みたいと考えている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、口腔癌患者の生命予後に大きく影響する頸部リンパ節転移のメカニズムの解明をめざした研究である。研究の結果、COX-2 依存性の VEGF-C の発現増加と、それに伴