

口腔がんの分子病理

Molecular pathology of oral carcinoma.

進藤 正信¹⁾

Masanobu SHINDOH

樋田 京子²⁾

Kyoko HIDA

要旨

口腔癌における遺伝子異常について検索を行った。その結果、がん抑制遺伝子 p53 の変異・欠失が 70% 以上の症例で見られることや、*ets* がん遺伝子群転写因子 E1AF が細胞外基質分解酵素の活性亢進をもたらすこと、テロメラーゼ活性化により口腔癌の発症・悪性化に関与していることを明らかにした。AU-rich element (ARE) をもつ mRNA は生理的状态ではエキソゾーム内で素早く分解されるが、がん細胞では HuR が恒常的にがん遺伝子や細胞増殖因子の ARE に結合・安定化させ発現を亢進し、発がんにおける non-coding RNA の重要性を示した。これまで腫瘍周囲間質は正常細胞からなっていると考えられてきたが、近年、腫瘍微小環境の異常性が指摘されている。腫瘍微小環境に存在する腫瘍血管の解析を行ったところ、腫瘍血管内皮細胞は細胞学的に異常性をもち正常血管内皮細胞と異なった遺伝子/遺伝子産物を発現しており、腫瘍血管をターゲットにした医薬分子送達システムにより特異的かつ効率的な治療効果を得られる可能性が示された。

Molecular pathological investigation of oral carcinogenesis was described. Mutation and deletion of p53, a potent anti-oncogene, were observed in more than 70% of oral carcinoma, and close relationship was observed between oral carcinomas and *ets* transcription factor E1AF. E1AF upregulate MMPs that induce cancer cell invasion by degrading extracellular matrices. The significance of non-coding RNA on carcinogenesis, especially concerning ARE (AU-rich element) mRNA was shown. Many oncogenes contain ARE in its untranslated region, and ARE mRNA is stabilized and transported in cancer cells by CRM-1 independent manner. Blood vessels in tumor microenvironment were investigated. Tumor endothelial cells had abnormalities compared to normal endothelial cells, and specific genes/gene products in tumor endothelial cells will be targets of gene therapy.

1) 天使大学看護栄養学部

(2017年10月2日受稿、2018年1月30日審査終了受理)

2) 北海道大学遺伝子病制御研究所血管生物学分野

キーワード：口腔癌 (Oral carcinoma)
分子病理 (Molecular pathology)
がん遺伝子 (Oncogene)
がん抑制遺伝子 (Anti-oncogene)
RNA 非翻訳領域 (Non-coding RNA)
腫瘍微小環境 (Tumor microenvironment)

1. はじめに

がんは複数の遺伝子異常の蓄積により発症・進展し、DNA レベルで遺伝子の変異、転座、欠失、増幅などの異常があることが知られている。その発症には原がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活性化など複数の遺伝子異常が蓄積することで正常細胞が不死化さらに形質転換（がん化）するという多段階発がん機構があることが明らかになった。このような DNA レベルでの遺伝子異常に加えて、mRNA への転写やタンパク質への翻訳、あるいは翻訳後の修飾段階での異常など多様な機構が存在することが明らかになってきた。この総説では我々がこれまで行ってきた主として口腔癌の発生に関する分子病理学的検索の概要について述べていくことにする。

2. がん抑制遺伝子 p53 の異常と発がん

造血細胞や上皮細胞のように分裂を繰り返す不安定細胞、必要に応じて旺盛な増殖活性をもつ安定細胞である肝細胞などは、増殖因子とその受容

体による制御を受け、精緻な細胞分裂調節機構を有している。この細胞が分裂するサイクルを細胞周期と呼び、DNA が 2 倍体である G0/G1 期から 4 倍体への DNA 合成が行われる S 期、合成が終了した G2 期と複製された遺伝子をもつ同一細胞 2 個へ分裂する M 期からなっている。細胞周期の進行にはサイクリン (Cyclin) とサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin dependent Kinase; CDK) が関与している。G1 期から S 期へ移行する G1/S と G2 から M 期への G2/M の 2 ヶ所にそれぞれチェックポイントがあり、正常細胞では G1 期で細胞周期が一旦停止 (G1 arrest) し DNA の損傷の有無がチェックされ、G2 期での細胞周期停止 (G2 arrest) において DNA 複製が正しく行われているか、細胞分裂への準備状態がチェックされ、これらに異常がある場合は修復が行われ、修復できないほどの異常細胞はアポトーシスにより細胞を死滅させることで細胞がん化を防いでいる。

p53 はゲノムの守護神とよばれる代表的ながん抑制遺伝子である。p53 は 393 個のアミノ酸からなる 53kD のタンパク質で、N 末端に転写活性化ドメイン、C 末端に四量体形成ドメイン、そして中央部

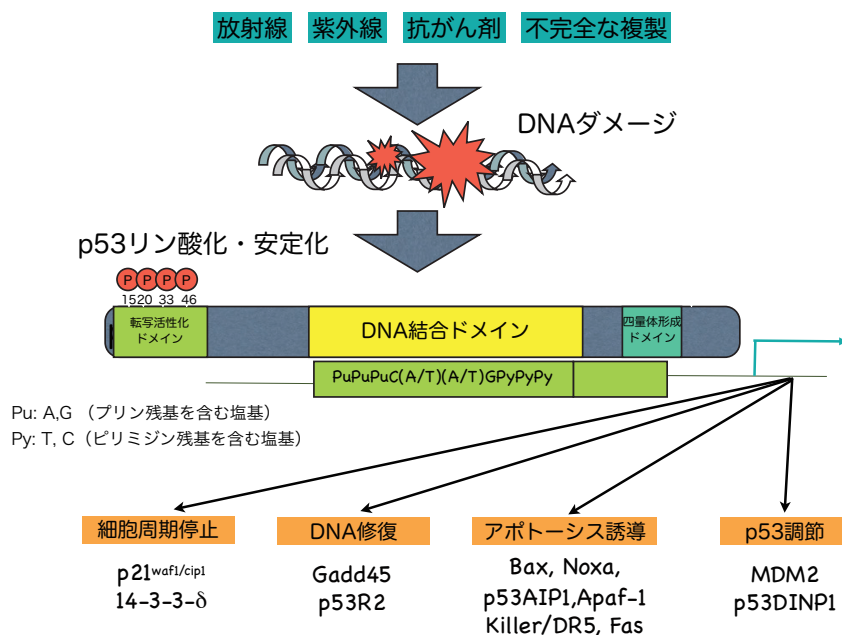


図1 p53の活性化機構と転写される下流遺伝子

種々の細胞ストレスにより p53 は安定化し、下流の遺伝子の転写を亢進する。

に DNA 結合ドメインをもつ転写因子で、通常は細胞内でユビキチンプロテアゾーム系により素早く分解され機能することはないが、細胞にストレスが加わり DNA にダメージが生じる場合や細胞分裂の際には、p53 の主に N 末端のセリンがリン酸化され安定化する。安定化した p53 は下流遺伝子の転写調節領域に存在する PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy のコア配列に結合し転写を活性化する。p53 は Gadd45, p53R2 などの DNA 修復機能をもつ遺伝子産物、G1 arrest を起こす p21^{waf1/cip1/sdi1} や G2 arrest を誘導する 14-3-3 δ のような細胞周期調節遺伝子産物、アポトーシス誘導タンパク質である Bax, Noxa, Apaf-1, Fas などの遺伝子産物をコードする遺伝子の転写活性化にはたらく (図 1)。p53 は遺伝子の異常を修復し、修復が出来ない細胞は遺伝子異常が蓄積しないように遺伝子異常を生じた細胞をアポトーシスにより除去することで細胞がん化を防いでいる。このような p53 のがん抑制遺伝子としての機能が p53 自身の変異により喪失することで細胞がん化が導かれる (loss of function) ことがこれまで強調されてきた。実際、がん抑制遺伝子 p53 はあらゆる「がん」の 50% 以上で変異のあることが示され、口腔癌でも 30~70%

の症例で p53 に変異のあることが報告されている。しかし、p53 に変異のある症例では、p53 のもつ細胞周期の停止、DNA 修復、アポトーシス誘導という機能で説明される以上のがんとしての強い悪性形質を発現していることは臨床的に経験することが多く、変異型 p53 がより積極的にがんの悪性形質発現に関わっている (gain of function) ことが示されつつある。

p53 が発現亢進する下流遺伝子産物の一つに E3 ユビキチンリガーゼ (Ubiquitin ligase) の MDM2 がある。ユビキチンプロテアゾーム系はタンパク質の選択的分解に働き、E1 ユビキチン活性化酵素、E2 ユビキチン結合酵素が順次活性化され、E3 ユビキチンリガーゼがターゲットとなるタンパク質に特異的に結合しユビキチンに標識されたタンパク質をプロテアゾームが分解していく。MDM2 は E3 ユビキチンリガーゼで、p53 は自身が活性化する MDM2 により分解される。これは、細胞の遺伝子異常をチェックしがん化を抑制する働きをもつ p53 の発現を必要な場合 (細胞分裂等) にとどめ、細胞の増殖・生存にとって負の働きを抑制するという生理的機構に沿ったものと考えられる。MDM2 の過剰発現により p53 の機能が損なわれているがんの報

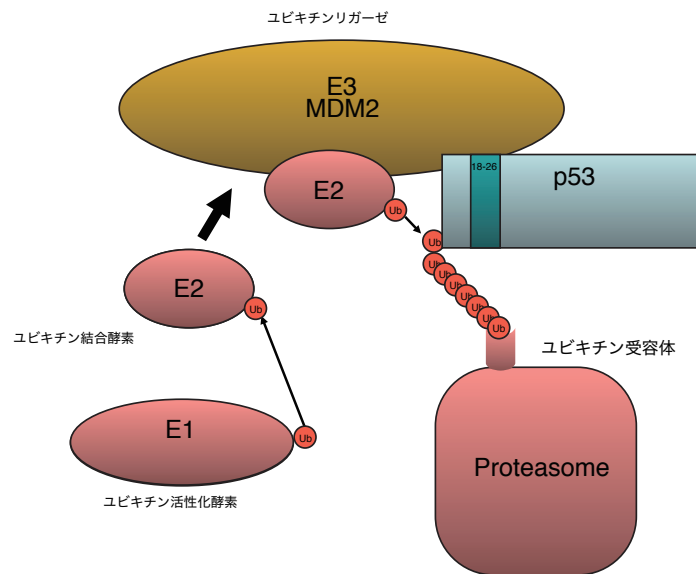


図 2 ユビキチンプロテアゾーム系による p53 の分解機構

p53 にユビキチンリガーゼ E3 である MDM2 が結合することでユビキチンプロテアゾーム系による分解が生じる。

告もある。(図2)

増殖活性の高さは悪性腫瘍の大きな特徴の一つである。前述のように細胞周期調節タンパク質であるサイクリン (Cyclin) は、サイクリン依存性キナーゼ (Cyclin dependent kinase: CDK) と複合体をつくり細胞周期の進行に働き、G1 期から S 期への移行には Cyclin D/CDK4 あるいは CDK6 と Cyclin E/CDK2 の複合体が重要な役割を演じている。p53 が活性化すると p21 は Cyclin E/CDK2 の活性を阻害し S 期の進行を抑制することが知られている。これらの複合体は代表的ながん抑制遺伝子である RB をリン酸化し S 期促進遺伝子の転写を活性化する。Cyclin B/Cdc2 複合体の活性化により G2 から M 期の移行が起こるが、p53 の下流遺伝子産物である 14-3-3 δ は Cyclin B/Cdc2 の活性を阻害し、G2 arrest を起こす (図3)。これらの細胞増殖シグナルは正常細胞では厳密に制御されているが、悪性腫瘍ではこの調節機構が破綻し、細胞増殖が無秩序に進行する。

我々も口腔癌における p53 の異常について検索を行った。その結果、前癌病変である白板症が細胞異型を増すにつれて p53 の変異頻度が高くなり、

口腔癌では約70%の症例で遺伝子異常が生じていることを明らかにした^{1,2,3)}。次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により頭頸部癌の遺伝子異常を検索した近年の論文でも p53 の異常がヒトパピローマウイルス (Human Papilloma Virus; HPV) 感染のない症例では70%以上であることが示されている⁴⁾。

3. ETSがん遺伝子群転写因子E1AFと発がん

アデノウイルスはげっ歯類細胞に腫瘍を発生させるがんウイルスとしてこれまで研究が行われてきた。アデノウイルスの初期転写遺伝子産物には E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4 があるが、その中でも E1A と E1B は代表的ながん遺伝子で、E1A は RB, E1B は p53 のがん抑制遺伝子機能を抑制することでがん化を導くことが明らかになった。アデノウイルスによる細胞がん化はげっ歯類細胞には高頻度に生じるが、ヒト細胞には腫瘍化は起こさず、ヒトに感染した際には、感染細胞の融解性変化に基づく炎症が生じることが示されている。アデノウイルス E1A 遺伝子はアデノウイルスが感

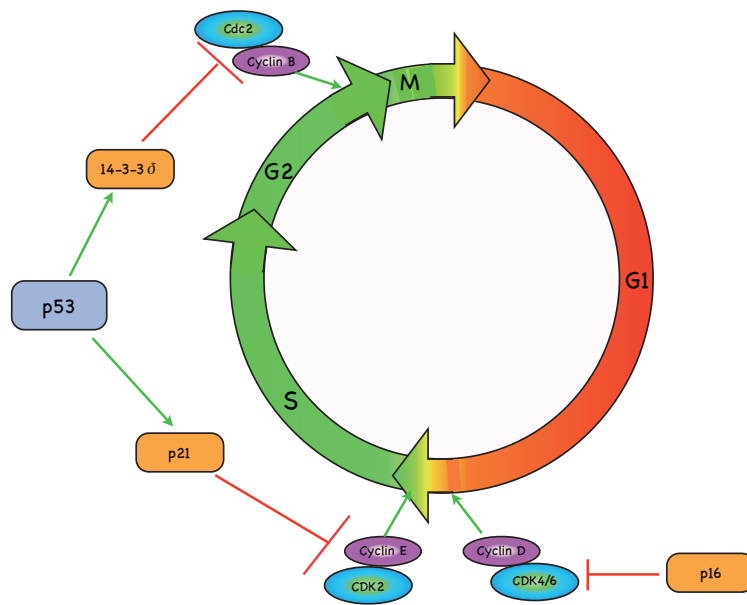


図3 細胞周期と進行に関与する遺伝子/遺伝子産物

Cyclin/CDK 複合体による G1 期、S 期、G2/M 期へと移行とこれを阻害する因子との関係

染した際、最も早く転写され他の初期遺伝子の発現を活性化するのはたらしきをもっているため、E1A 遺伝子がヒト細胞へのアデノウイルスの感染の際に自己増殖するために重要な役割を果たしていることが明らかになっている。E1AF はアデノウイルス E1A の転写調節領域に結合する転写因子として HeLa 細胞のライブラリーからクローニングされたヒト細胞の遺伝子である。塩基配列を基にしたアミノ酸解析により、E1AF は 381 個のアミノ酸からなり、C 末端側にトリプトファンリピートやヘリックスループヘリックスなど 85 アミノ酸からなる ETS ドメインを有する ETS ファミリー転写因子であることが明らかになった。E1AF は他の ETS ファミリーと同様にターゲット遺伝子の転写調節領域の GGAA/T のコア配列を認識・結合し、N 末端側の酸性アミノ酸に富む Acidic domain やグルタミンの豊富な Q rich domain のような活性化ドメインの働きによってターゲット遺伝子の転写活性化を促すものと考えられている。E1AF はヒト 17 番染

色体の長腕に位置していること、ユーイング腫瘍では E1AF を含めた ETS ファミリーと EWS 遺伝子の転座が高頻度で生じており、ユーイング腫瘍の発生に関わっていることが示されている。このような ETS ファミリー転写因子 E1AF の機能解析を行った結果、次のような諸点が明らかになった；

1) E1AF は細胞外基質分解酵素・マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現を亢進し、がん細胞の浸潤・転移物質と関連している

MMP は N 末端側のプロペプチドドメインや亜鉛活性化ドメインなどを機能構造としてもつプロテアーゼファミリーで、その構造・機能によってコラゲナーゼ群 (MMP-1, -8, -13, -18), ゼラチナーゼ群 (MMP-2, -9), ストロメライシン群 (MMP-3, -10), 細胞膜貫通型 MMP 群 (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5, MT-6), その他 (MMP-7, -11, -12, -19, -20) のサブタイプに分けられている。MMP の転写調節領域には AP1, SP1, NF κ B などの転写因子結合部

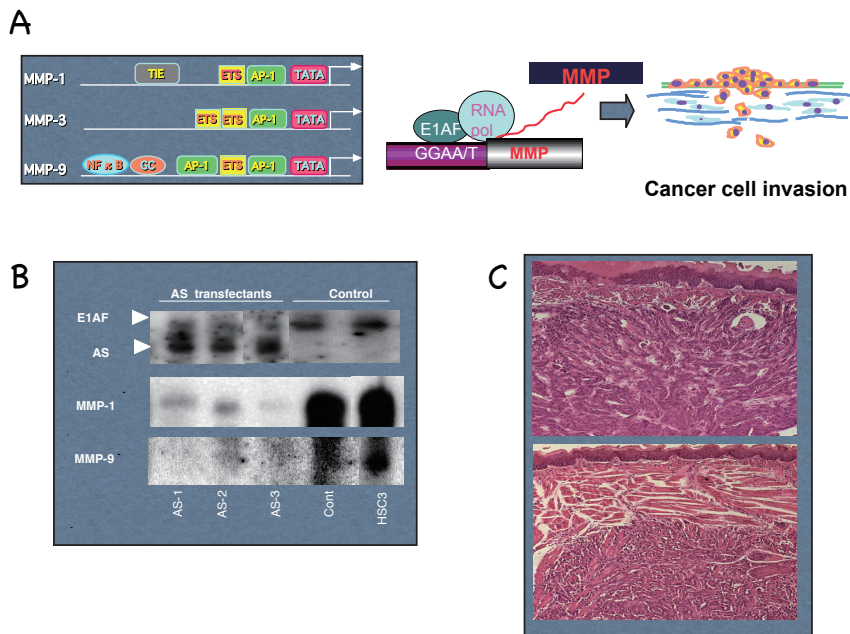


図 4 E1AF による MMP 遺伝子の活性化機構とその抑制効果

A. MMP-1, -3, -9 遺伝子の転写活性化領域には ETS 転写因子結合領域が存在し、これにより E1AF による転写活性化とがん細胞の浸潤が誘導される。
 B. Northern Blot による mRNA 発現検索 ; E1AF antisense 遺伝子導入により MMP-1, -9 mRNA の発現が抑制されている。
 C. ノードマウス舌移植 HSC3 細胞の組織像 : 親株である HSC3 は舌筋層内で浸潤増殖しているが (上段)、antisense E1AF 導入細胞では膨張性発育を示している (下段)

位に加えて、しばしば ETS 結合配列が存在する。ETS-1 や ETS-2 がストロメライシン (MMP-3) の転写亢進を示すことや AP-1 と協調して MMP-1 や MMP-3 の転写を亢進することが報告されている。我々は E1AF が MMP-1, -3, -9 の転写を亢進することをクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (Chlororamphenicol acetyl transferase ;CAT) アッセイにより明らかにした。CAT アッセイは細胞内における転写活性を測定するために用いられる実験方法だが放射線同位元素をもちいることから、現在では蛍光検索のできるルンフェラーゼアッセイが多用されている。その結果、口腔扁平上皮癌細胞株でも浸潤性増殖を示す HSC3 で E1AF と MMP-1, -9 の相関した発現が認められた⁵⁾。HSC3 にアンチセンス (anti-sense:AS) E1AF 発現ベクターを導入することで、MMP の発現抑制と浸潤活性の低下が認められ⁶⁾、E1AF は MMP の転写亢進を介して腫瘍細胞の浸潤性増殖に関与していることが明らかになった。さらに臨床検体を用いた実際の腫瘍における発現検索の結果でも、口腔癌で発

現亢進し悪性形質と関与していることが示されている⁷⁾。(図4)

2) E1AF は肝細胞増殖因子のシグナル伝達機構に関与している。

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor;HGF) は細胞分散因子として、細胞運動や浸潤に関連している増殖因子である。我々は HGF の発現が口腔扁平上皮癌の形質におよぼす影響を検索し、その結果、HGF レセプターである c-MET を発現している口腔癌細胞 HSC3 では、HGF 刺激により E1AF の転写亢進を介した MMP の発現増加がみられ、c-MET の発現のみられない細胞株 Ca9.22 に c-met を遺伝子導入し HGF で刺激した際にも E1AF の発現亢進を介した浸潤活性の増強が認められた⁸⁾。(図5)

3) E1AF による p21 の転写活性化

p21 は Cyclin/CDK の活性化を抑制することで細胞周期の阻害に働くことが示されている。p21 は細胞の老化や分化にもなって発現が亢進することや、細胞が様々なストレスに曝された時に発現することが知られており、その発現機構には p53

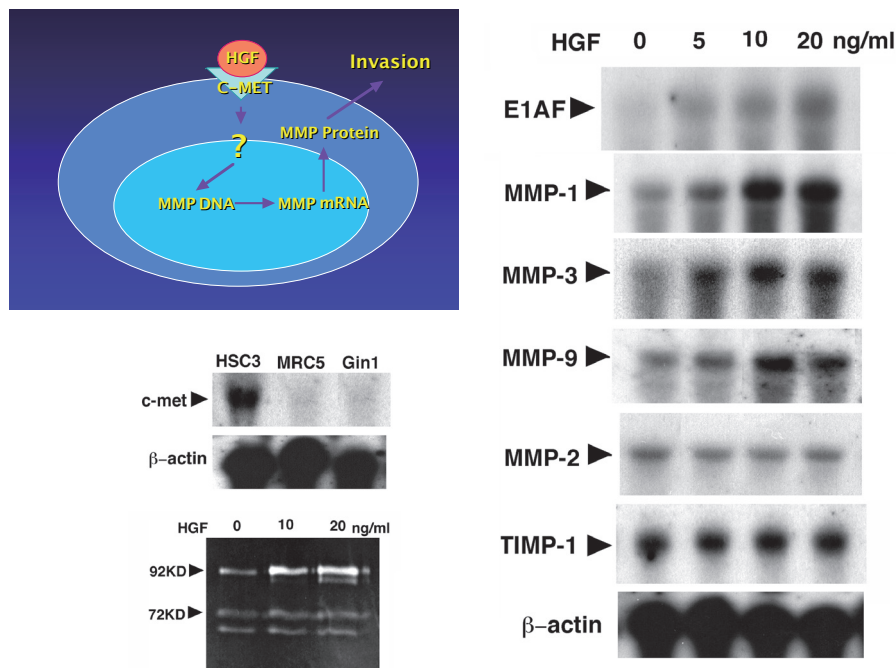


図5 HGF, c-MET による MMP 遺伝子の転写活性化機構に及ぼす E1AF の効果

口腔がん細胞 HSC3 は c-met を発現し、ザイモグラフィで MMP-9, MMP-2 は活性化している。HGF 濃度依存性に MMP-9HGF 濃度依存性に E1AF, MMP-1, -3, -9 の相関した発現亢進がみられる。

が大きな役割を演じている。我々は子宮頸がん由来細胞株 SiHa を抗がん剤シスプラチンで処理すると *E1AF* と関連した *p21* の mRNA 発現が生じることを見いだした。*p21* の転写調節領域には 2 か所の *p53* 結合配列が存在するが、我々は *p53* 結合配列に近接した ETS 結合配列を見だし、これらが *p53* 非依存的に *p21* の転写活性化を促すことを明らかにした⁹⁾ (図 6)。

4) EWS/ETS キメラ遺伝子によるテロメラーゼ (telomerase) の活性化

EWS 遺伝子と ETS ファミリー遺伝子が染色体上で相互に転座・融合することから生じる EWS/ETS キメラは小児～青年期に多く発生する肉腫であるユーイング腫瘍で特異的に生じている遺伝子変異で、その遺伝子産物は転写因子としていくつかの遺伝子の転写を制御することが報告されている。染色体末端に存在するテロメアは細胞分裂により短縮し、一定の長さになると細胞分裂は停止し細

胞老化が導かれる。テロメラーゼはテロメアを伸長させる酵素で、テロメラーゼの活性が高いとテロメア短縮が起らず細胞は増殖することが可能となる。近年多くのがんでテロメラーゼ活性及び、その活性を触媒するサブユニットテロメア逆転写酵素 (Telomerase reverse transcriptase ; TERT) の発現が確認されているが、ユーイング腫瘍ではその報告はなかった。我々は、EWS/ETS が TERT の発現及びテロメラーゼ活性に与える影響について検討し、*ews/e1af* と *ews/fli1* でがん化したマウス線維芽細胞で顕著なテロメラーゼ活性の亢進と *TERT* mRNA の発現増加を認め、さらに当時新規に開発された二本鎖 RNA を用いた RNA 干渉法 (RNA interference ; RNAi) による遺伝子のノックダウンを行い、*ews/fli1* ノックダウン・ユーイング腫瘍細胞では、*ews/fli1* の活性低下と関連した *hTERT* mRNA の発現抑制がみられ EWS/ETS は human TERT の活性化と深い関連があることが示された (図 7A)

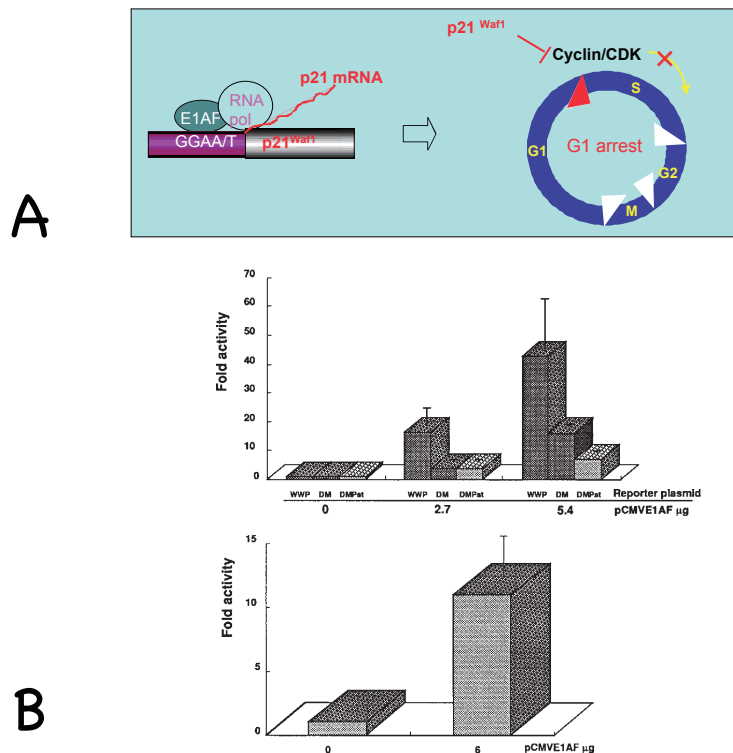


図 6

細胞周期を停止させる *p21* の転写調節領域には ETS 結合部位が存在し (A)、レポーターアッセイで E1AF の濃度依存的に *p21* の転写活性化が生じている (B)

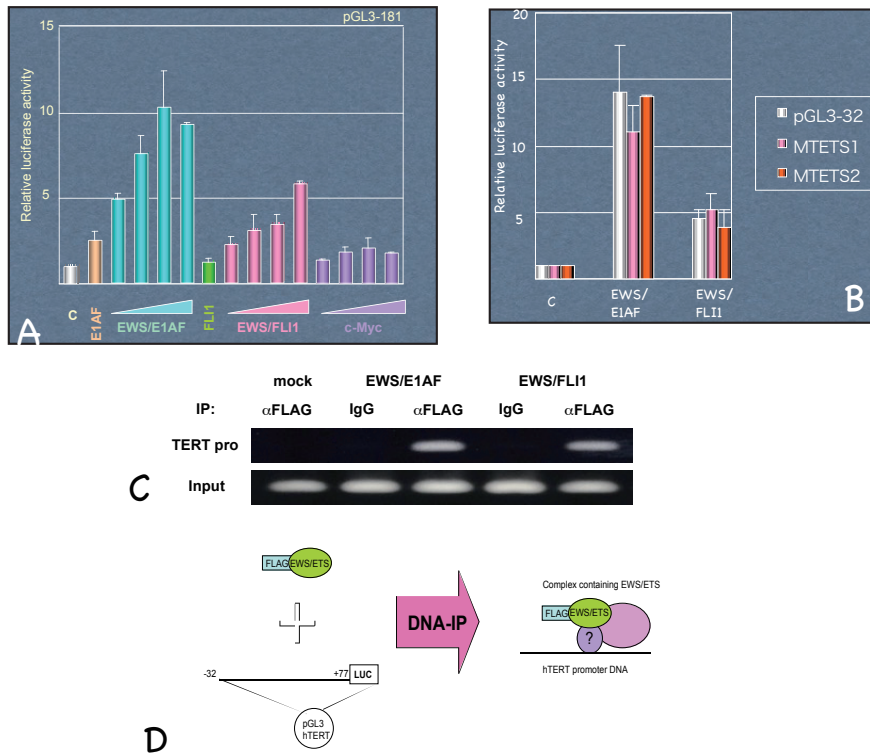


図7 EWS/ETS は他の転写因子とタンパク複合体を形成し hTERT の転写を亢進する

A. ルシフェラーゼアッセイによる ETS ファミリー転写因子の hTERT プロモーター活性。濃度依存的な転写活性がみられる。 B. ETS 結合領域 deletion mutant での転写活性に変化はみられない。 C. ChIP 法による転写因子結合部位に存在するタンパク複合体を検索したところ EWS/E1AF, EWS/FLI1 は hTERT プロモーターに結合している。 D. 転写因子複合体による hTERT 転写活性化機構の概念

が、その転写活性化には ETS 結合配列は関与していない (図 7B) ため、EWS/ETS が直接転写因子として働くものではないことが示唆された。クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP 法) によって *hTERT* 転写因子複合体での EWS/ETS の存在を確認したところ、EWS/ETS と hTERT 転写調節領域 DNA は結合しており (図 7C)、これらの結果は、EWS/ETS は転写活性化因子としてユーイング肉腫細胞中で *hTERT* 遺伝子の転写を介してヒトテロメラーゼを活性化する (図 7D) ことを示していた¹⁰⁾。

4. non-coding RNA の重要性

ゲノムプロジェクトが 2003 年に終了し、その結果、約 30 億塩基からなっているヒト遺伝子がコー

ドしている遺伝子産物は当初考えられていた数より遥かに少ないことが明らかになった。ポストゲノム時代を迎えて、細胞のがん化、およびがん細胞の悪性化におけるタンパク質に翻訳されない non-coding RNA や転写後調節の重要性が認識されるようになってきた。網羅的な cDNA 解析の結果、全遺伝子の約半分がタンパク質をコードしない non-coding RNA 領域であることが報告され、その結果、これまでジャンクとされてきた領域からも多数の転写産物が発見され、現在では 1 つの遺伝子から多数の RNA が転写され、その RNA の約半分が non-coding RNA として、遺伝子発現制御などの機能を発揮すると考えられている。これまで、生物種が高等になるとそれに伴い遺伝子数は増えると考えられてきた。しかし、ゲノムプロジェクトが終了した結果、ヒトの遺伝子は 2.2 万個である

ことが予測され、生物種による遺伝子数の差はさほどないことが明らかになった。一方、生物種が高等になると non-coding RNA が全 RNA の中に占め

る割合が多くなること明らかになり、non-coding RNA がさまざまな生命現象をコントロールしている可能性が示されている。

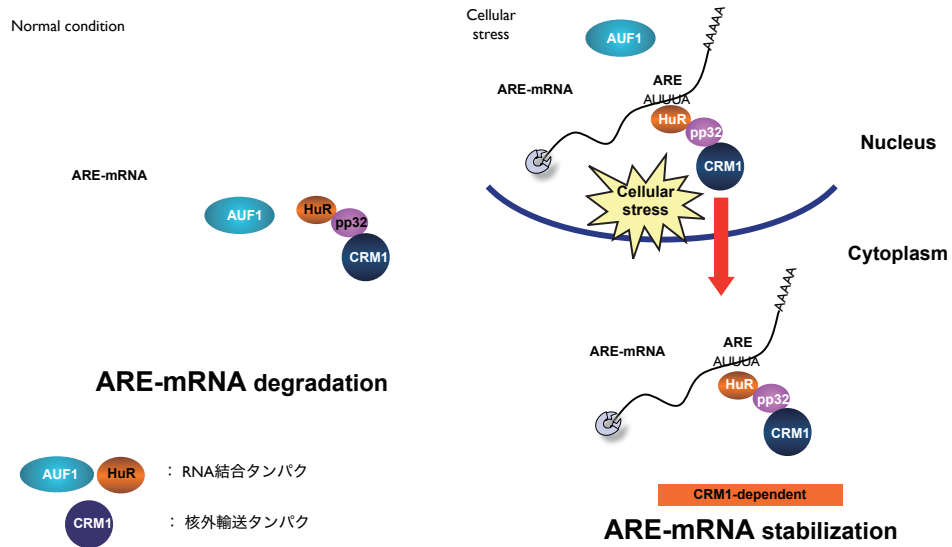


図8 ARE-mRNA の分解・安定化機構

ARE-mRNA は生理的状态ではすばやく分解されているが、細胞にストレスが加わった状態では安定化・核外輸送されている。

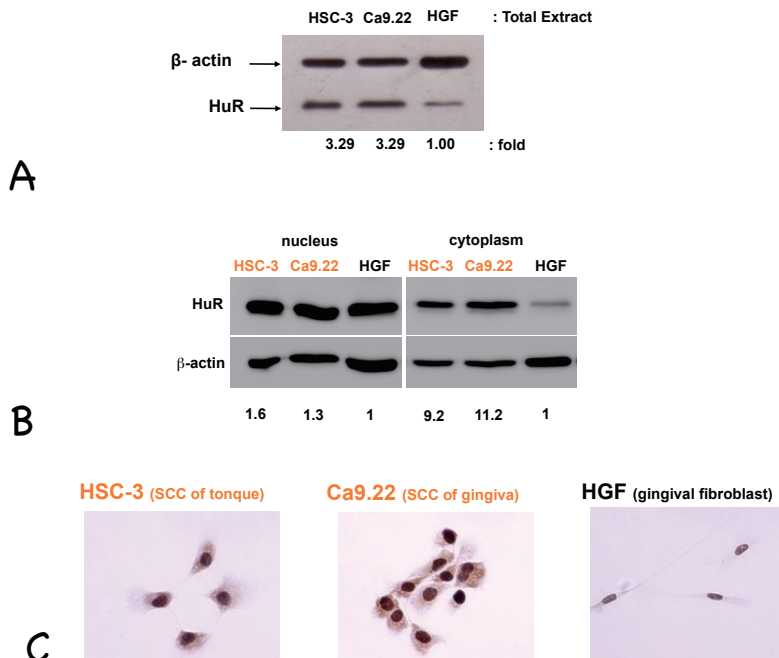


図9 口腔癌細胞での HuR 発現

- A: 口腔癌細胞株 HSC3 と Ca9.22 では正常線維芽細胞株 HGF に比し 3 倍以上の HuR タンパクの発現がみられる
- B: 核・細胞質分画での HuR 発現結果。HGF では細胞質での発現はほとんどみられないが、HSC-3、Ca9.22 では著しい細胞質発現が認められる。
- C: 免疫染色による HuR 発現。癌細胞では細胞質での HuR 発現が著明である。

mRNA の非翻訳領域 RNA も non-coding RNA の一つで、この中に mRNA の主として 3' 側の非翻訳領域に存在する AUUUA をコア配列とするアデニンとウラシルに富んだ AU-rich element (ARE) とよばれる領域をもつ mRNA がある。現在までに、約 4000 種類の ARE-mRNA が同定され、がん遺伝子や細胞周期調節/増殖関連遺伝子などから転写される mRNA に ARE が認められる。生理的状态では、ARE-mRNA は RNA 結合タンパク質である AUF1 などが結合し、エキソゾームで素早く分解されるが、細胞にストレスがかかると同じく RNA 結合タンパク質である HuR (326 アミノ酸からなる 36kD のタンパク質) が AUF-1 と拮抗して ARE-mRNA に結合し、核から細胞質への輸送タンパク質である Chromosome region maintenance 1 (CRM1) と結合し核外輸送・安定化する (図 8)¹¹⁾。HuR は全ての細胞で発現しているが、この HuR と CRM1 を介した ARE-mRNA の輸送安定化は正常細胞では一時的なもので、通常は核に局在している。しかし、がん細胞では HuR が恒常的に核外輸送され (図 9) がん遺伝子や増殖関連

遺伝子の mRNA を CRM1 非依存的に核外輸送し発現を亢進していた (図 10)^{12, 13)}。

5. 腫瘍微小環境における血管の異常性

腫瘍は遺伝子の病気であることが明らかになり、様々な遺伝子異常が報告されてきたが、腫瘍周囲に存在する間質は正常細胞からなっていると考えられてきた。しかし、近年、腫瘍周囲の血管結合組織 (腫瘍微小環境) を構成する細胞にも正常とは異なる形質の発現がみられることが報告されている。樋田は世界に先駆けて腫瘍微小環境に存在する血管内皮細胞を分離培養することに成功し、その性状について解析してきた。

1) 腫瘍血管内皮細胞は細胞学的に異常性をもっている

これまで形態的に腫瘍間質に存在する血管は走行が不規則で、血管周囲に存在し微小血管の構造的安定性に関与している周皮細胞との結合が不十分で血管内容物がリークしやすいなどの性質が知

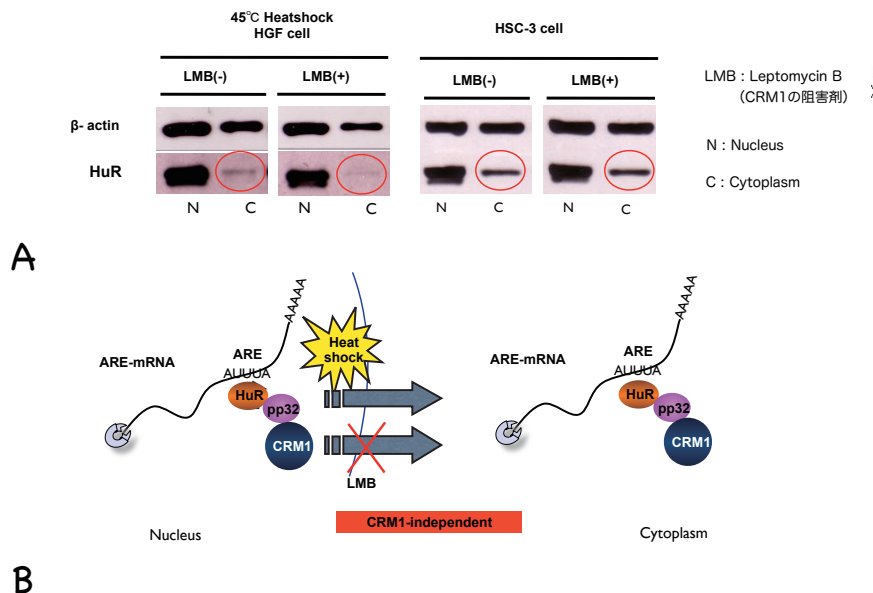


図 10

A: 正常線維芽細胞 (HGF) では加温によるストレス刺激で細胞質に HuR が発現するが CRM1 阻害薬 LMB 存在下では HuR の細胞質発現は抑制される。一方、口腔癌細胞株 HSC3 では HuR の細胞質発現は正常細胞に比べ亢進しており、LMB 存在下でも抑制はみられない。

B: 口腔癌細胞における ARE-mRNA である HuR の CRM1 非依存的核外輸送の模式図

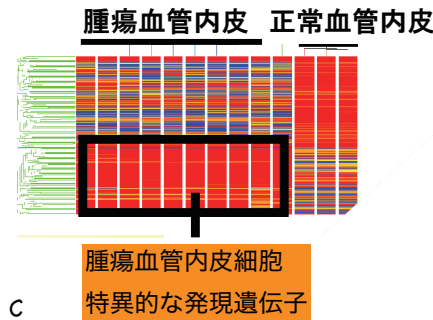
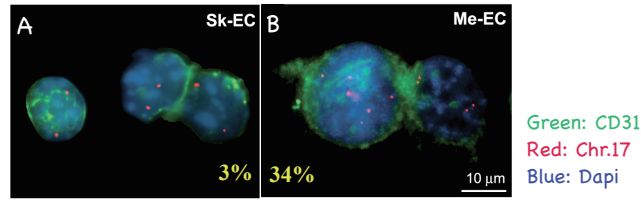


図 11 腫瘍血管の異常性

正常血管内皮細胞(A:Sk-EC)とは異なり腫瘍血管細胞 (B:Me-EC) の核には異数体がみられ aneuploidy を示している。C: DNA マイクロアレイによる検索結果。腫瘍血管内皮細胞に特異的に発現する遺伝子が認められる。

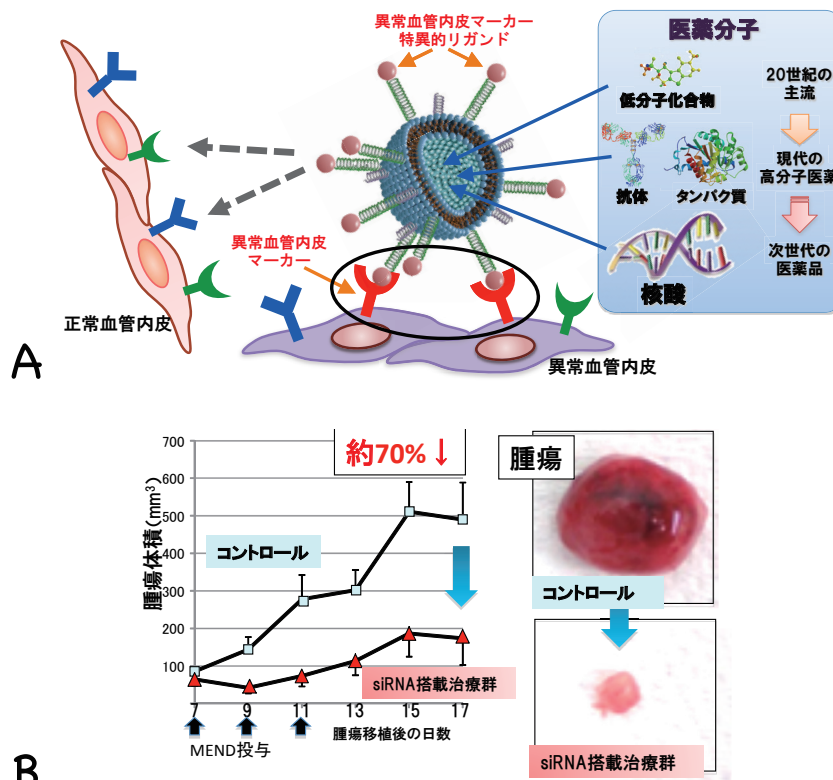


図 12 腫瘍血管をターゲットにした遺伝子治療の概要

A: 医薬分子の種類と次世代医薬品を用いた遺伝子治療の概要

B: 腫瘍血管に特異的なマーカーを認識するリガンドを表面に付加し、多層化した壁の内部に抗がん性物質を含有した MEND をヌードマウスに移植した実験的腫瘍モデルに応用したところ 70%の縮小効果が認められた。

られていたが、樋田らはマウスに移植したヒトがん細胞周囲微小環境から分離した血管内皮細胞は正常血管内皮細胞に比べて増殖速度が早く、周囲に分散しやすい傾向をもっていることや通常の血管内皮には発現していない上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) を発現していること、さらにクロモソーム解析で腫瘍血管内皮細胞は染色体異数性 (aneuploidy) をもっていることを明らかにした (図 11A, B)^{14,15)}。さらに DNA マイクロアレイの検索で腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と異なった遺伝子/遺伝子産物を発現していることが明らかになった (図 11C)。分離した腫瘍血管内皮細胞は Sca-1 (Stem cell antigen-1) などの幹細胞マーカーを発現し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を高発現していること¹⁶⁾、さらに HuR の細胞質での発現も亢進していることが明らかになった¹⁷⁾。VEGF は腫瘍細胞が分泌し自らの周囲に血管を新生させ、腫瘍細胞の増殖を誘導すると考えられてきたが、腫瘍周囲の血管内皮細胞にオートクライン (autocrine) な増殖誘導をさせがん細胞の増殖に関与する可能性が示された。VEGF の mRNA レベルでの発現は HuR ノックダウンにより減弱したことから、VEGF の発現は HuR 依存性であることが示され、HuR は腫瘍血管内皮細胞の生存や管腔形成能とも深く関わっていた。この他に腫瘍血管内皮細胞が Lysil oxidase^{18,19)} や ALDH (aldehyde dehydrogenase) を分泌し血管新生と転移に関わっていること²⁰⁾、MDR (multi drug resistance gene)-1 を発現していること²¹⁾、腫瘍の違いに関わらず biglycan の発現がみられること^{22,23)} などが明らかになった。このように腫瘍微小環境に存在する腫瘍血管は正常血管と異なった性状を示していることが明らかになり、今後、腫瘍血管をターゲットにした医薬分子送達システムにより特異的かつ効率的な治療効果を得られる可能性があり (図 12)、現在研究を進めている。

6. 終わりに

これまで私たちのグループが主に口腔癌について行ってきた遺伝子・遺伝子産物の解析、その変化に伴う形態変化に関する研究についての概要を述べた。看護学・栄養学の分野においてもこのような研究方法を応用し、研究の発展に貢献できれば幸いと考えている。

参考文献

- 1) Shindoh M et al.: Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer*, 76:1513-1521, 1995
- 2) Chiba I et al.: Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Oncogene*, 12:1663-1668, 1996
- 3) Kashiwazaki H et al.: High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene*, 15:2667-2674, 1997
- 4) Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517:576-582, 2015
- 5) Shindoh M et al.: Correlated expression of matrix metalloproteinases and *ets*-family transcription factor E1A-F in invasive oral-squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol*, 148:693-700, 1996
- 6) Hida K et al.: Antisense E1AF transfection restrains oral cancer invasion by reducing

- matrix metalloprotease activities. *Am J Pathol*, 150:2125-2132, 1997
- 7) Hida K et al.: Expression of E1AF an ets-family transcription factor is correlated with the invasive phenotype of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 33:426-430, 1997
- 8) Hanzawa M et al.: Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma (SCC) cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis*, 21:1079-1085, 2000
- 9) Funaoka K et al.: Activation of the p21^{Waf1/Cip1} promoter by the ets -oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem Biophys Res Commun*, 236:79-82, 1997
- 10) Takahashi A et al.: EWS/ETS fusions activate telomerase in Ewing's tumors. *Cancer Res*, 63:8338-8344, 2003
- 11) Higashino F et al.: Adenovirus E4orf6 targets pp32/LAMP to export AU-rich element containing mRNAs by perturbing CRM1-dependent mechanism. *J Cell Biol*, 170:15-20, 2005
- 12) Hasegawa H et al.: HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *Br J Cancer*, 100:1943-1948, 2009
- 13) Kakuguchi W et al.: HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Cancer Res*, 8:520-528, 2010.
- 14) Hida K et al.: Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*, 64:8249-8255, 2004
- 15) Hida K et al.: Understanding abnormality of tumor endothelial cells to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci*, 99:459-466, 2008
- 16) Ohga N et al.: Inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Cancer Sci*, 100:1963-1970, 2009.
- 17) Kurosu T et al.: HuR keeps an angiogenic switch on by stabilizing mRNA of VEGF and COX-2 in tumor endothelium. *Br J Cancer*, 104:819-829, 2011.
- 18) Osawa T et al.: Prostacyclin receptor in tumor endothelial cells promotes angiogenesis in an autocrine manner. *Cancer Sci*, 103:1038-1044, 2012
- 19) Osawa T et al.: Lysyl oxidase secreted by tumor endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *Br J Cancer*, 109:2237-2247, 2013.
- 20) Ohmura-Kakutani H et al.: Identification of tumor endothelial cells with high aldehyde dehydrogenase activity and highly angiogenic phenotype. *PLoS ONE*, 9:e113910, 2014.
- 21) Akiyama K et al.: Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR-1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. *Am J Pathol*, 180: 1283-1293, 2012
- 22) Yamamoto K et al.: Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumor endothelial cells. *Br J Cancer*, 106:1214-1223, 2012.
- 23) Maishi N et al.: Tumor endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep*, 6:28039, 2016