

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06497

研究課題名(和文) TRPチャンネルを標的とした口腔癌に対する新規診断・治療法の探索

研究課題名(英文) Search for diagnosis and therapy of oral cancer targeting TRP channels

研究代表者

合島 怜央奈 (Reona, Aijima)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30756143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内のカルシウムは、がんの進展・転移に重要な役割を担う。本研究ではカルシウム透過性の高い非選択的陽イオンチャンネルであるTRPチャンネルの口腔癌における機能を調べた。高分化型扁平上皮癌であるHSC4には機能的なTRPV4チャンネルが高く発現していた。TRPV4の機能的なノックダウンにより細胞間接着分子の局在が変化し、遊走能が亢進した。HSC4へTRPV4アゴニストを添加すると、濃度依存的に細胞数が減少し、細胞死誘導のシグナル分子であるJNKおよびp38のリン酸化が増強された。以上の結果より、TRPV4分子が口腔癌の新しい治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intracellular calcium plays an important role in cancer progression and metastasis. In this study, we investigated the role of transient receptor potential (TRP) channels, Ca²⁺-permeable nonselective cation channels, in oral squamous cell carcinoma (OSCC). HSC4, well-differentiated OSCC cell line, highly expressed functional TRPV4 channel. Knockdown of TRPV4 showed the change of localization of the adherens junction molecules. Furthermore, TRPV4 silencing induced enhancement of migration in HSC4. Additionally, TRPV4 activation led cell death presumably via JNK/p38 pathway. These results suggest that TRPV4 would be a novel therapeutic target for oral cancer therapy.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 温度感受性 TRPチャンネル

1. 研究開始当初の背景

細胞内外のカルシウム濃度変化は、がんの病態発生や進展・転移において重要な役割を担う。がん細胞において、細胞外からの Ca^{2+} 流入は主に細胞膜に存在するチャネルを介して行われる。チャネル活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、がん細胞の増殖が促進する。一方で、定常的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はがん細胞を細胞死に誘導する。すなわち、がん細胞の細胞内カルシウム流入に関与するチャネルの発現は、がん細胞の悪性化に深く関与する (Prevarskaya et al., Nat. Rev. Cancer 2011)。TRP (transient receptor potential) チャネルは細胞内外の多様な刺激により活性化される Ca^{2+} 透過性の高い非選択的陽イオンチャネルである。チャネル活性化により細胞増殖、分化、移動能を調節し、恒常性を維持する。申請者はこれまでに、温度刺激により活性化される温度感受性 TRP チャネル群が口腔上皮に発現し、上皮成長因子受容体 (EGFR: epidermal growth factor receptor) シグナルを調節することを明らかにした (Aijima et al., FASEB J. 2015)。EGFR の過剰な活性は癌の悪性化に深く関与することから、TRP チャネル活性化が口腔癌の発生や浸潤・転移能を制御することに着想した。

2. 研究の目的

本研究では、TRP チャネルを基盤とする新規の診断・治療法の開発を目指し、以下を明らかにすることを目的とする。

- ①口腔癌の悪性度（分化度、転移能）の違いが TRP チャネル発現や活性化に与える影響
- ②TRP チャネル活性化が生存能・転移能に与える影響
- ③TRP チャネル活性化の下流にある細胞内シグナル伝達の解明

3. 研究の方法

①口腔癌の悪性度（分化度、転移能）の違いが TRP チャネル発現や活性化に与える影響

分化度の異なる複数の口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2、HSC3、HSC4) と正常皮膚上皮細胞 (HaCaT) を用いて以下を調べた。

- A. 温度感受性 TRP チャネル群の発現 (real-time PCR 法および western blot 法)
- B. 機能的な TRP チャネルの発現解析 (カルシウムイメージング法)

②TRP チャネル活性化が生存能・転移能に与える影響

siRNA にて TRP チャネルの機能的な knockdown を行い以下を解析した。

- A. 細胞増殖へ与える影響 (WST-8 assay)
- B. 細胞間接着分子の局在変化 (免疫染色)
- C. 移動能への影響 (scratch assay)
- D. EGFR 活性化への影響 (western blot 法)

また、TRP チャネルアゴニストによる抗腫瘍効果を WST-8 assay (E) を用いて検討した。

③TRP チャネル活性化の下流にある細胞内シグナル伝達の解明

口腔癌細胞へ TRP チャネルアゴニストを投与し総蛋白を回収、抽出、western blot 法にて細胞の生存や細胞死に影響を与える各細胞内シグナル分子のリン酸化への影響を調べた。

4. 研究成果

【①口腔癌の悪性度の違いが TRP チャネル発現や活性化に与える影響】

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC2、HSC3、HSC4) では HaCaT と比較し TRPV3 の遺伝子発現が高かった。高分化型扁平上皮癌である HSC4 では、TRPV4 が mRNA およびタン

パクレベルで高く発現していた。このHSC4に TRPV4 のアゴニスト刺激を加えると、顕著で持続的に細胞内 Ca²⁺濃度が上昇した。

【②TRP チャネル活性化が生存能・転移能に与える影響】

3種類の siRNA (Silencer Select siRNA、Ambion 社)を用いて TRPV4 チャネルの機能的な knockdown (siTRPV4)を確認した。siTRPV4 では Control と比較し、培養後 24 時間での細胞数に変化を認めなかった。一方、siTRPV4 では細胞間接着分子である E-cadherin や β -catenin 発現が細胞間で減弱していた。また、scratch assay にて細胞の移動能は亢進する傾向にあった。さらに、siTRPV4 では EGFR のリン酸化が増強していた。HSC4 へ TRPV4 の選択的アゴニスト (GSK1016790A) を添加すると濃度依存的に細胞数が減少した。この応答は、TRPV4 チャネルのアンタゴニスト (Ruthenium Red) や選択的な TRPV4 アンタゴニスト (GSK2193874) で抑制された。

【③TRP チャネル活性化の下流にある細胞内シグナル伝達の解明】

HSC4 へ GSK1016790A を添加すると細胞死のシグナル分子である JNK および p38 のリン酸化が増強された。この応答は Ruthenium Red や GSK2193874 で抑制された。

本研究により、口腔扁平上皮癌には機能的な TRPV4 が発現し、がん細胞の遊走や細胞死誘導に関与することが明らかとなった。TRPV4 分子は口腔がんの転移や増殖を制御する新しい治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① Ono R, Ohtsubo T, Hayashi N, Aijima R, Yamashita Y, Goto M. Inactivation of oral cancer cell using active species generated by atmospheric plasma. *J. Photopolym. Sci. Tec.* 29(3) 443-445, 2016 (査読有)
- ② Kido MA, Yoshimoto R, Aijima R, Cao AL, Gao WQ. Oral mucosal membrane and TRP channels. *J. Oral Sci.* in press (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

- ① 合島怜央奈, 山下佳雄, 森 啓輔, 靄岡祥子, 檀上 敦, 清島 保, 城戸瑞穂. ヒト口腔扁平上皮癌における温度感受性 TRP チャネルの役割. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会. 2017 年 1 月 26-27 日. 福岡.
- ② 合島怜央奈, 吉本怜子, 曹 愛琳, 森啓輔, 張 旌旗, 大崎康吉, 檀上 敦, 山下佳雄, 清島保, 城戸瑞穂. ヒト口腔癌細胞株における TRP チャネルの機能解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2016 年 8 月 24-26 日. 札幌.
- ③ 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 曹 愛琳, 張 旌旗, 清島 保, 城戸瑞穂. TRPV4 チャネルを介した温度変化による口腔上皮細胞調節. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2016 年 8 月 24-26 日. 札幌.
- ④ 合島怜央奈, 山下佳雄, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦, 後藤昌昭. プラズマ照射によるヒト口腔癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討. 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2016 年 4 月 15-17 日. 福岡.
- ⑤ 合島怜央奈, 木附智子, 吉本怜子, 大崎康吉, 張 旌旗, 檀上 敦, 山下佳雄, 村田祐造, 曹 愛琳, 城戸瑞穂. 口腔創治癒過程における上皮間葉転換関連分子の発現変化. 第 9 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会. 2015 年 11 月 28-29 日. 福岡.
- ⑥ 木附智子, 合島怜央奈, 畠山純子, 大崎康吉, 吉本怜子, 張 旌旗, 城戸瑞穂. 歯肉付着上皮バリアへの TRPV4 チャネルの関与. 第 9 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会. 2015 年 11 月 28-29 日. 福岡.
- ⑦ 吉本怜子, 合島怜央奈, 木附智子, 吉住潤子, 大山順子, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂. シェーグレン症候群患者に認められた口唇粘膜上皮の変性と痛み感覚. 第 9 回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会. 2015 年 11 月 28-29 日. 福岡

- ⑧Kido MA, Kitsuki T, Aijima R, Utsunomiya R, Zhang JQ, Ohsaki Y. Temperature sensitive TRP channels in Oral epithelial barrier. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception 2015, 11, 3-5, Fukuoka.
- ⑨ Yoshimoto RU, Aijima R, Oyama Y, Yoshizumi J, Kitsuki T, Danjo A, Yamashita Y, Kido MA. Burning sensation and degeneration in labial epithelium of xerostomia patients. The 13th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception, 2015, 11, 3-4, Fukuoka.
- ⑩Kitsuki T, Aijima R, Hatakeyama J, Ohsaki Y, Zhang J, Kido M. Effect of TRPV4 gene deletion to barrier function in gingival epithelium. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2015, 10, 30-31, Fukuoka.
- ⑪ Yoshimoto R, Aijima R, Oyama Y, Yoshizumi J, Kitsuki T, Danjo A, Yamashita Y, Kido M. Hydropic degeneration of labial mucosal epithelium and infiltration of macrophages in xerostomia patients. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2015, 10, 30-31, Fukuoka.
- ⑫合島怜央奈, 王 冰, 高尾知佳, 三原 弘, 加塩麻紀子, 大崎康吉, 張 旌旗, 木附智子, 村田祐造, 富永真琴, 城戸瑞穂. 温度感受性 TRP チャネルを介した口腔粘膜の創傷治癒制御. 生理学研究所研究会「生体ホメオスタシスの gateway としての上皮膜輸送マイクロホメオスタシス機構」. 2015年9月15-16日. 岡崎.
- ⑬合島怜央奈, 木附智子, 吉本怜子, 大崎康吉, 張 旌旗, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂. マウス口蓋創傷モデルの治癒過程における上皮間葉転換関連分子の発現解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2015年9月11-13日. 新潟.
- ⑭木附智子, 合島怜央奈, 畠山純子, 大崎康吉, 張 旌旗, 城戸瑞穂. TRPV4 遺伝子欠失が歯肉付着上皮における物質透過性に与える影響. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2015年9月11-13日. 新潟.
- ⑮吉本怜子, 合島怜央奈, 吉住潤子, 木附智子, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂. 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2015年9月11-13日. 新潟.
- ⑯合島怜央奈, 木附智子, 王冰, 高尾知佳, 三原 弘, 加塩麻紀子, 大崎康吉, 張 旌旗, 富永真琴, 城戸瑞穂. 口腔粘膜における TRPV3 チャネルの EGFR シグナルを介した速やかな創傷治癒への関与. 第 120 回日

本解剖学会総会・全国学術集会第 92 回日本生理学会大会 (合同大会). 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸.

- ⑰木附智子, 合島怜央奈, 畠山純子, 大崎康吉, 張 旌旗, 城戸瑞穂. 歯肉上皮バリア機能への TRPV4 の関与. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 第 92 回日本生理学会大会 (合同大会). 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸.

- ⑱張 旌旗, 合島怜央奈, 木附智子, 大崎康吉, 久木田敏夫, 城戸瑞穂. 温度感受性 TRPV チャネル遺伝子欠失マウスにおけるエナメル質の形成異常. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 第 92 回日本生理学会大会 (合同大会). 2015 年 3 月 21-23 日. 神戸.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

佐賀大学医学部歯科口腔外科学講座 H p
<http://www.saga-u-oms.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

合島怜央奈 (AIJIMA, Reona)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 30756143

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし