

令和元年6月21日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11501

研究課題名(和文) Ar14cを標的とした核酸医薬による口腔がんの新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the novel oral cancer therapy using molecular targeted nucleic acid medicine for Ar14c

研究代表者

藤井 慎介 (Fujii, Shinsuke)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60452786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Ar14cの扁平上皮癌における発現とその発現制御機構の解明、および発癌における機能について明らかにした。

Ar14cは免疫組織学的にヒト肺扁平上皮癌で80.6%、ヒト舌扁平上皮癌では73.7%の症例で過剰発現していた。ヒト肺扁平上皮癌細胞株およびヒト舌癌細胞株においてCRISPR/Cas9システムを用いてAr14cをノックアウトしたところ、増殖能や運動能が抑制された。口腔扁平上皮癌細胞株におけるAr14cの高発現はMEK/MAPKに依存していた。肺扁平上皮癌細胞株におけるAr14cの高発現はAr14c DNAの3'非翻訳領域における低メチル化に依存していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

扁平上皮癌は悪性度が高いことが知られているが、他の癌腫に認められるような遺伝子変異の報告がこれまで報告されていない。そのため新たな癌マーカーおよび治療標的となる因子の同定が待望されている。本研究の成果は、Ar14cがヒト扁平上皮癌において増殖因子シグナルに加えてDNAのメチル化により発現制御されていること、また、扁平上皮癌における新規診断マーカーや治療の標的になる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was shown that the expression of ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4c (Ar14c) in lung and tongue squamous cell carcinoma (SCC), its expression mechanism and its effect on SCC tumorigenesis.

Immunohistochemical analysis showed that Ar14c was not observed in non-tumor regions, but was overexpressed in tumor lesions in 70～80% of lung and tongue SCC. Knockout of Ar14c expression in NCI-H520 lung SCC cells and SAS tongue SCC cells reduced proliferation and migration capabilities in vitro. Ar14c expression was depended on MEK/MAP kinase signaling, but not on Wnt/β-catenin in SAS cells. Although inhibition of Wnt/β-catenin or MEK/MAP kinase signaling did not decrease Ar14c expression in NCI-H520 cells, Ar14c DNA was clearly hypomethylated in the 3'-untranslated region (UTR), leading to increase of Ar14c expression.

研究分野：口腔病理

キーワード：Ar14c 扁平上皮癌 増殖 DNAメチル化 増殖因子シグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は Wnt シグナルと EGF シグナルの協調的作用によって発現し、三次元培養下において正常上皮の形態形成を制御する因子として Arl4c を同定した。Wnt シグナルと EGF-Ras シグナルの異常活性化は各種ヒトがんの発がんおよび悪性化に密接に関与することが知られている。しかし、これまでに Arl4c のがん組織における発現や機能については全く報告されていなかった。そこで、申請者は Arl4c がヒト肺および大腸癌において高発現し、これらの癌形成に関与することを明らかにした。

一方、口腔がんにおける Arl4c の発現や機能についてはこれまでに全く報告されてない。口腔がんの 8 割以上は扁平上皮癌であることから舌扁平上皮癌症例における Arl4c の発現について予備的に検討したところ、間質への浸潤先端部のがん細胞特異的に高発現していた。また、扁平上皮癌における Arl4c の発現制御機構は不明である。加えて、口腔がんに対する核酸医薬を用いた有効な分子標的治療法は未だ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究実績をもとに Arl4c の口腔扁平上皮癌の発癌および悪性化への関与を明らかにすること、扁平上皮癌細胞における Arl4c の発現制御メカニズムの解明、および Arl4c を標的とした核酸医薬による口腔がんの新規分子標的治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)免疫組織学的手法を用いた扁平上皮癌(肺および舌)における Arl4c の発現頻度の検討
(2)Arl4c が扁平上皮癌の腫瘍形成に与える影響についての検討：運動・浸潤・増殖への影響の解明

(3) Arl4c の発現制御機構の解明

4. 研究成果

(1)扁平上皮癌(肺および舌)における Arl4c の発現頻度の検討

ヒト肺扁平上皮癌で 80.6%(60 症例中 52 例陽性)、ヒト舌扁平上皮癌では 73.7%(57 症例中 42 例陽性)の症例で過剰発現していた(図 1)。特に舌扁平上皮癌では間質に浸潤する癌細胞において発現が高かった。一方、Arl4c は周囲の非腫瘍部の肺胞上皮組織および非腫瘍部の舌扁平上皮組織では発現を認めないことから、腫瘍細胞特異的に高発現することが明らかとなった。

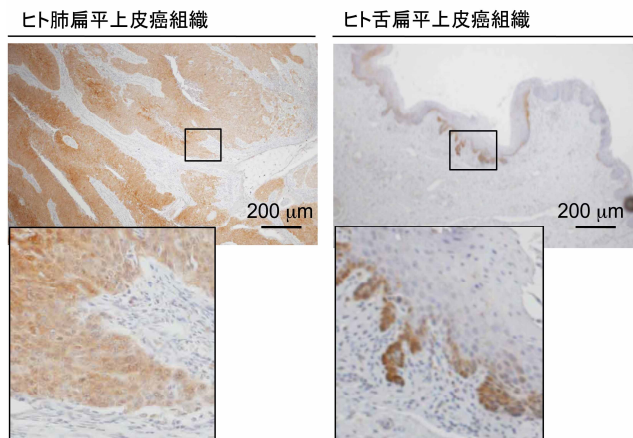


図 1. ヒト悪性腫瘍における Arl4c 発現

肺扁平上皮癌症例ならびに舌扁平上皮癌症例において Arl4c は高頻度に腫瘍細胞特異的に高発現していた。

(2)Arl4c が扁平上皮癌の腫瘍形成に与える影響についての検討：運動・浸潤・増殖への影響の解明

NCI-H520 細胞株(肺扁平上皮癌細胞株)および SAS 細胞株(舌扁平上皮癌細胞株)は A549 細胞株(肺腺癌細胞株：Arl4c の発現が腫瘍形成に必要であることが明らかになっている)と同程度に Arl4c を高発現していた。

上記の細胞株において Arl4c をノックダウンすると運動能が抑制されたが、Arl4c の過剰発現によりその抑制効果は回復された。

上記の細胞株において Arl4c の機構解析をするために、Arl4c を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトしたところ、*in vitro*での癌細胞の増殖能や運動能が抑制された(図 2)。

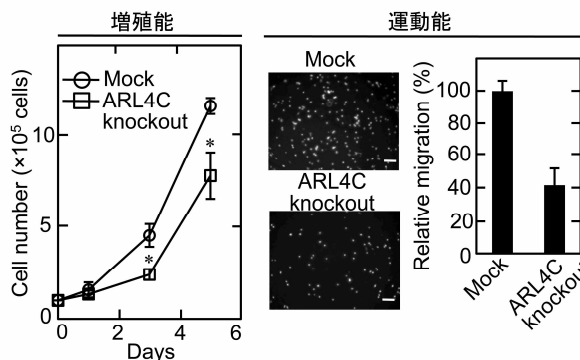


図 2. Arl4c のノックアウトによる癌細胞の増殖能・運動能抑制

二次元培養下またはコラーゲンコートした Boyden chamber を用いて、増殖能と運動能を解析した。ヒト肺扁平上皮癌細胞株 NCI-H520 において、Arl4c をノックアウトすることによって、コントロールと比べ、増殖能や運動能が有意に抑制されることが示された。

(3) SAS 細胞株および NCI-H520 細胞株における Arl4c の発現制御機構の解明

SAS 細胞株を含む 4 種類の口腔扁平上皮癌細胞株における Arl4c の発現制御機構について検討したところ、この発現は β -カテニンに依存しないが、MEK/MAPK に依存していた。

NCI-H520 細胞株における Arl4c の高発現は、 β -カテニンおよび MEK/MAPK に依存していなかった。Arl4c DNA の 3' 非翻訳領域が低メチル化状態となっていた。この細胞株において脱メチル化酵素 TET1-3 をノックアウトすると、Arl4c DNA の 3' 非翻訳領域が高メチル化され、Arl4c の発現が低下した。加えて、ヒト肺扁平上皮癌症例において腫瘍部は非腫瘍部と比較して、Arl4c DNA の 3' 非翻訳領域が低メチル化状態であった (図 3)。がんゲノムアトラス(The Cancer Genome Atlas)を用いたヒト肺扁平上皮癌 379 症例の解析において、申請者の結果と同様に、腫瘍部において Arl4c が高発現し、Arl4c DNA の 3' 非翻訳領域が低メチル化状態であった。

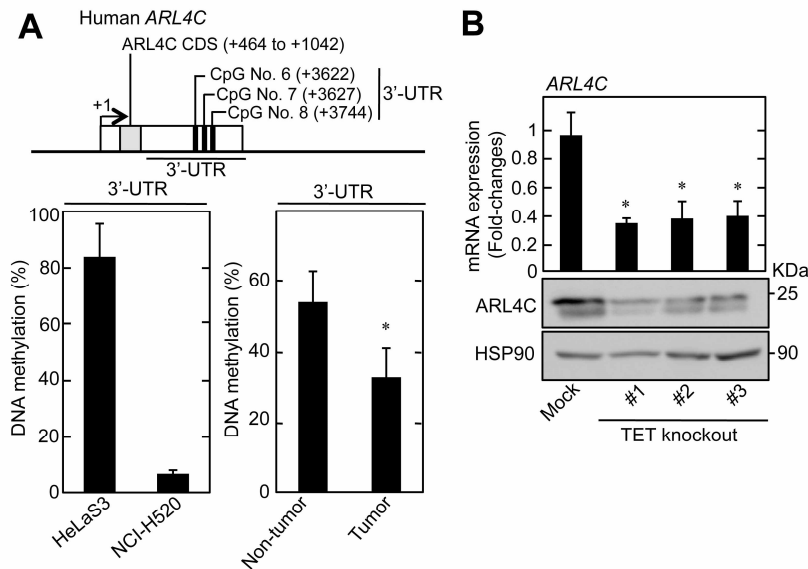


図 3. DNA 3' 非翻訳領域におけるメチル化による Arl4c の発現制御

A. Arl4c を高発現する NCI-H520 は、Arl4c を低発現する HeLaS3 と比較して 3' 非翻訳領域における DNA が低メチル化状態であった。また、ヒト肺扁平上皮癌症例において腫瘍部は非腫瘍部と比較して、Arl4c DNA の 3' 非翻訳領域が低メチル化状態であった。

B. NCI-H520 において TET1-3 をノックアウトすると、Arl4c の発現が有意に低下した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Fujii S., Nagata K., Matsumoto S., Kohashi K., Kikuchi A., Oda Y., Kiyoshima T., and Wada N. (2019): Wnt/ β -catenin signaling, which is activated in odontomas, reduces Sema3A expression to regulate odontogenic epithelial cell proliferation and tooth germ development. *Sci Rep* 9: 4257. 査読あり doi: 10.1038/s41598-019-39686-1.

Harada T., Matsumoto S., Hirota S., Kimura H., Fujii S., Kasahara Y., Gon H., Yoshida T., Itoh T., Haraguchi N., Mizushima T., Noda T., Eguchi H., Nojima S., Morii E., Fukumoto T., Obika S., and Kikuchi A. (2019): Chemically Modified Antisense Oligonucleotide Against ARL4C Inhibits Primary and Metastatic Liver Tumor Growth. *Mol Cancer Ther* 18: 602-612. 査読あり doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0824.

Mikami Y., Fujii S., Kohashi K., Yamada Y., Moriyama M., Kawano S., Nakamura S., Oda Y., Kiyoshima T. (2018): Low-grade myofibroblast sarcoma arising in the tip of the tongue with intravascular invasion: A case report. *Oncol Lett*. 16, 3889-3894, 査読あり doi: 10.3892/ol.2018.9115.

Mikami Y., Fujii S (co-first), Nagata N., Wada H., Hasegawa K., Abe M., Yoshimoto RU., Kawano S., Nakamura S., and Kiyoshima, T. (2017): GLI-mediated Keratin17 expression promotes tumor cell growth through the anti-apoptotic function in oral squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 143, 1382-1393. 査読あり doi: 10.1007/s00432-017-2398-2.

Matsumoto S., Fujii S., and Kikuchi A. (2017): Arl4c is a key regulator of tubulogenesis and tumorigenesis as a target gene of Wnt/ β -catenin and growth factor-Ras signaling. *J Biochem*. 161, 27-35. 査読あり doi: 10.1007/s00432-017-2398-2.

Fujii S., Shinjo K., Matsumoto S., Harada T., Nojima S., Sato S., Usami Y., Toyosawa S., Morii E., Kondo Y., and Kikuchi A. (2016): Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3' -untranslated region, promotes tumorigenesis of lung

squamous cell carcinoma. Oncotarget. 7, 81571-81587. 査読あり doi: 10.18632/oncotarget.13147.

〔学会発表〕(計 16 件)

藤井慎介, 歯牙腫における Wnt シグナル依存的 Sema3A の発現を介する増殖制御機構の解明, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018.09.05.

田尻祐大, 藤井慎介, 大関悟, 清島保, ヒト口腔癌における TRPV4 の発現と機能解析, 第 60 回歯科基礎医学会, 2018.09.06.

三上友理恵, 藤井慎介, 中村誠司, 清島保, 腺扁平上皮癌におけるエピジェネティックな変化は扁平上皮組織を腺組織に転換する, 第 60 回歯科基礎医学会, 2018.09.05.

長谷川佳那, 藤井慎介, 清島保, 機械感受性イオンチャネル Piezo1 の発現は口腔扁平上皮癌の細胞増殖を制御する, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018.09.05.

藤井慎介, 永田健吾, 清島保, 和田尚久, 歯牙腫における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は軸索伸張制御因子(Sema3A)を介して増殖を制御する, 第 107 回日本病理学会総会, 2018.06.23.

三上友理恵, 藤井慎介, 清島保, 口腔扁平上皮癌において GLI-KRT17 連関は腫瘍における増殖を抗アポトーシス作用を介して促進する, 第 107 回日本病理学会総会, 2018.06.22.

藤井慎介, 永田健吾, 清島保, 和田尚久, 歯牙腫における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化は軸索伸張制御因子を介して増殖を制御する, 第 63 回日本病理学会秋期特別総会, 2017.11.02.

藤井慎介, 清島保, 松本真司, ヒト肺癌(腺癌および肺扁平上皮癌)における Arl4c の発現は癌形成を促進する, 第 59 回歯科基礎医学会大会, 2017.09.18.

三上友理恵, 藤井慎介, 永田健吾, 和田裕子, 長谷川佳那, 安部みさき, 吉本怜子, 中村誠司, 清島保, 口腔扁平上皮癌において GLI-KRT17 連関は腫瘍細胞の増殖を促進する, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017.11.

藤井慎介, 松本真司, 清島保, 菊池章, ヒト肺腺癌および肺扁平上皮癌における Arl4c の発現はがん形成を促進する, 第 106 回日本病理学会総会, 2017.04.27.

藤井慎介, 低分子量Gタンパク質Arl4cはヒト大腸癌および肺癌における癌形成を促進する, 第 2 回口腔医科学フロンティア研究会, 2017.03.05.

藤井慎介, 松本真司, 清島保, 菊池章, ヒト大腸癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌における Arl4c の発現はがん形成を促進する, 第 62 回日本病理学会秋期特別総会, 2016.11.10.

藤井慎介, 松本真司, 菊池章, Arl4c expression is involved in tumorigenesis of colorectal cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016.10.07.

藤井慎介, 松本真司, ヒト大腸癌、肺腺癌および扁平上皮癌における Arl4c の発現とその機能解析, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016.08.25.

藤井慎介, 松本真司, 菊池章, ヒト大腸がんおよび肺がんにおける Arl4c の高発現はがん形成を促進する, 第 13 回日本病理学会カンファレンス, 2016.07.29.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔病理学研究分野

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。