

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20584

研究課題名(和文) IL-6シグナル伝達経路を介した口腔扁平上皮癌細胞の抗癌剤抵抗性獲得に関する研究

研究課題名(英文) A study on the expression and function of interleukin-6 in oral squamous cell carcinoma -its possible involvement in chemotherapeutic resistance-

研究代表者

神野 哲平 (Jinno, Teppei)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：60755247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌に対しては、手術のみならず化学療法や放射線療法を併用した集学的治療がなされており、良好な治療成績が得られている。しかしながら、局所進展例においては依然として経過が不良となる症例が多く、その理由の1つとして抗癌剤抵抗性を獲得した癌細胞の存在が考えられている。本研究では、OSCCにおけるIL-6の発現を検索するとともに、IL-6がOSCC細胞の抗癌剤抵抗性に与える影響について検討を行った。本研究により、OSCC細胞におけるIL-6の発現が抗癌剤に対する抵抗性の獲得に関与しており、STAT3シグナルを介した伝達経路がその重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma is one of the most common malignancies arising in oral cavity. Remarkable advancement in reconstructive surgery and diagnostic modalities has improved the survival rate of OSCC patients. However, treatment failure for OSCC patients has lethal potential due to locoregional recurrence and distant metastasis. Recently, possible involvement of IL-6 signaling in the resistance to chemotherapy and radiotherapy has been documented in recent studies. We showed that IL-6 signaling is involved in the progression and treatment resistance of OSCC, and IL-6 expression in cancer cells could be a useful predictive factor of poor response to chemotherapy and radiotherapy and unfavorable prognosis. Furthermore, we showed that the transmission pathway via STAT3 signal plays the important role.

研究分野：口腔外科学

キーワード：インターロイキン6 口腔扁平上皮癌 抗癌剤抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) は、口腔粘膜に由来する悪性腫瘍で、口腔がんの 90%以上を占める。現在、OSCC 局所進展例に対しては、外科的治療のみならず化学療法や放射線療法を併用した集学的治療が行われており、比較的良好的な治療成績が報告されている。しかしながら、依然として経過が不良となる症例も多く、その理由の 1 つとして抗癌剤抵抗性を獲得した癌細胞の存在が考えられている。癌細胞が抗癌剤抵抗性を獲得するメカニズムについてはいまだ不明な点が多いが、近年、様々な癌において、局所における慢性炎症が癌細胞の浸潤・転移能や抗癌剤抵抗性などの悪性形質獲得に深く関与していることが報告されている。それゆえ、OSCC においても局所の慢性炎症が癌細胞の抗癌剤抵抗性獲得に関与している可能性が推察される。

がんと慢性炎症との関連についての歴史は古く、Virchow が腫瘍組織内に白血球が浸潤していることに注目して、「がんは慢性炎症から発生する」という仮説を提唱したことに始まる。その後、発癌における慢性炎症の促進的な役割が明らかにされてきた。Wang らは、アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬の長期内服によって、大腸癌の発癌リスクが有意に低くなることを報告しており、Parkin らは、悪性腫瘍の約 20%が感染症に伴う慢性炎症と密接に関連していることを示している。特に、ヘリコバクター・ピロリ菌と胃癌や B 型および C 型肝炎ウイルスと肝臓癌などの関連性はよく知られている。また、Rakoff らは、大腸癌マウスモデルにおいて、Toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR) のアダプター分子である MyD88 遺伝子を欠損させることで、癌の発生が有意に減少することを見出ししており、TLR を介した自然免疫の活性化によって誘導された慢性炎症が発癌に関与している可能性を示した。さらに最近

の研究では、慢性炎症が癌細胞の増殖や生存、血管新生や転移、さらに放射線抵抗性や抗癌剤抵抗性を促進させることにより、癌細胞の悪性形質獲得に関与していることが明らかにされつつある。Oshima らは、自然免疫を介したシグナルが炎症性微小環境を形成することにより、癌細胞が悪性形質を獲得することを示しており、これにはインターロイキン 6 (interleukin-6: IL-6) などの炎症性サイトカインが関与していると報告している。

IL-6 は主に T 細胞、マクロファージ、線維芽細胞、単球などから産生され、炎症反応のみならず、免疫応答や造血、神経系細胞の分化誘導、腎メサンギウム細胞の増殖誘導などにおいても重要な役割を果たしている多機能サイトカインである。IL-6 と結合した IL-6 受容体 (IL-6 receptor: IL-6R) 鎖は、glycoprotein130 (gp130) と会合し、gp130 分子の二量体形成を誘導する。その後、gp130 に会合している janus kinase (JAK) のリン酸化に引き続き、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) がリン酸化されて二量体を形成し、核内に移行することで標的遺伝子の転写を調節する。また STAT3 は、IL-6 シグナルの負のフィードバックに機能する suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の転写も誘導する。SOCS3 が gp130 に結合して JAK のリン酸化を抑制することにより、IL-6 シグナルは収束する。IL-6 からのシグナルは、JAK/STAT3 経路以外にも mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) -Akt 経路が知られている。

生体内における IL-6 の過剰産生は、関節リウマチやキャスルマン病などの自己免疫疾患のみならず、心筋梗塞や骨粗鬆症の発症と進展にも関与していると考えられている。最近では、多発性骨髄腫や前立腺癌を始めとするさまざまながん細胞の増殖などにも IL-6 が深く関与していることが報告され

ている。特に、腎細胞癌や肝細胞癌においては、癌細胞自身から産生された IL-6 が、autocrine 増殖因子として作用することが示されている。また、IL-6 のシグナル伝達分子である STAT3 はがん遺伝子として同定されており、多発性骨髄腫、乳癌および悪性黒色腫などにおいて、STAT3 が恒常的に活性化していることが知られている。さらに、IL-6 シグナルを介する STAT3 の活性化が、抗癌剤抵抗性獲得に関与していることが明らかにされつつある。

癌細胞が抗癌剤抵抗性を獲得する機序については、これまでに多くの報告がなされている。Fulda らは、アポトーシス誘導機構からの回避が、抗癌剤抵抗性獲得において重要な特性であることを示唆している。アポトーシスは、ミトコンドリア膜の透過性亢進によって細胞質に漏出したチトクロム c がカスパーゼを活性化することで誘導される。アポトーシス抑制遺伝子である B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ファミリー遺伝子は、ミトコンドリア膜の透過性を抑制することによってアポトーシスの制御を行っており、その発現亢進が抗癌剤抵抗性を誘導していることが知られている。Yan らは、肺癌において IL-6 が Bcl-2 ファミリー遺伝子である Bcl-extra large (Bcl-xL) や Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) の発現を増強することを報告しており、IL-6 シグナル伝達系が、アポトーシス抑制遺伝子の発現を誘導することによって、癌細胞の抗癌剤抵抗性獲得に関与している可能性が考えられる。さらに近年、腫瘍組織中に自己複製能や多分化能といった、造血幹細胞や神経幹細胞などの組織幹細胞と類似の性質を有する癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC) が存在していることが明らかにされており、これらの細胞が抗癌剤抵抗性に関与していることがわかってきた。Iliopoulos らは、IL-6/STAT3 シグナル伝達系の活性化が、乳癌細胞の CSC 形質獲得に関与している可能性を

示しており、IL-6 シグナルが CSC の抗癌剤抵抗性獲得にも関与している可能性が推察される。

一方、OSCC と IL-6 との関連についても、これまでにいくつかの報告がなされている。Chen らは、組織、血液および唾液における IL-6 の発現が、OSCC の早期診断や予後の判定に有用であることを示している。また、Shinriki らは、OSCC における IL-6 シグナル伝達系が、血管新生やリンパ管新生を制御することで癌の進展に関与している可能性を示している。しかしながら、OSCC における IL-6 発現の意義や機能についてはいまだ不明な点が多く、特に抗癌剤抵抗性との関連について検討した報告はない。

## 2. 研究の目的

このような学術的背景から、まず OSCC 患者の生検および切除標本における IL-6 の発現を免疫組織化学的に検索し、その発現と臨床病理学的所見ならびに予後との関連について検討を行った。次に、OSCC 細胞株を用いて、IL-6 および IL-6 シグナル伝達関連分子の発現を検索するとともに、recombinant human (rh) IL-6 protein が OSCC 細胞の増殖や抗癌剤抵抗性に与える影響について解析を行った。

## 3. 研究の方法

OSCC 患者 78 名より採取した生検および切除標本を用いて、IL-6、IL-6 受容体 (IL-6R)、phospho-signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) の局在を免疫組織化学的染色法にて検索した。また、癌細胞における IL-6 陽性細胞率を算出し、高発現群、低発現群および陰性群にそれぞれ分類し、臨床病理学的所見との関連について解析した。さらに、累積 5 年生存率を算出し、予後との関連性について検討を行った。

次に、OSCC 細胞株を用いて、IL-6 シグナ

ル伝達関連分子の発現を RT-PCR 法、real-time PCR 法、ELISA 法および western blotting 法にて解析した。また、OSCC 細胞に recombinant human (rh) IL-6 protein と抗癌剤 (5-fluorouracil <5-FU>または cisplatin<DDP>) を添加し、増殖や抗癌剤抵抗性に与える影響について WST-8 assay にて解析した。さらに、IL-6 の中和抗体である抗 IL-6R 抗体を添加し、同様に解析を行った。

#### 4. 研究成果

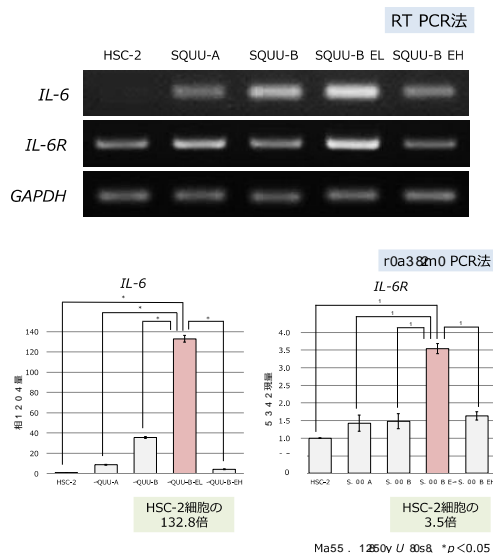
##### (1) OSCC の生検および切除標本における IL-6、IL-6R および pSTAT3 の免疫組織化学的検討

全症例のうち、IL-6 高発現群は 32 例、低発現群は 22 例、陰性群は 24 例であった。OSCC 生検組織において、IL-6 は主に癌細胞の細胞質に発現を認め、癌巣周囲の一部の細胞にも発現を認めた。IL-6 高発現群では、癌細胞の核内に pSTAT3 の発現を認めた。また、IL-6 高発現群は陰性群および低発現群に比べ、頸部リンパ節転移と遠隔転移の発生頻度が有意に高く、術前放射線化学療法による病理組織学的抗腫瘍効果が乏しかった。また、切除標本のほとんど全ての残存癌細胞に IL-6、IL-6R および pSTAT3 の発現を認めた。さらに、疾患特異的累積 5 年生存率は、高発現群が 68.0%、陰性群および低発現群が 90.0%であり、高発現群は陰性群および低発現群と比較して有意に低く、予後が不良であった。

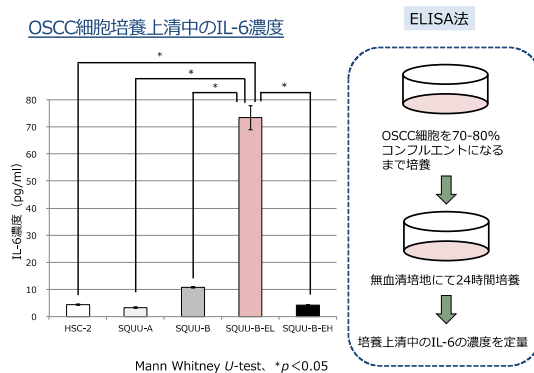
##### (2) OSCC 細胞株における IL-6 シグナル伝達関連分子の発現と IL-6 による抗癌剤抵抗性に関する検討

IL-6 および IL-6R の発現は、全ての OSCC 細胞株で認められ、SQUU-B-EL 細胞で最も発現量が高く、HSC-2 細胞で最も低かった。

#### OSCC細胞におけるIL-6およびIL-6Rの発現

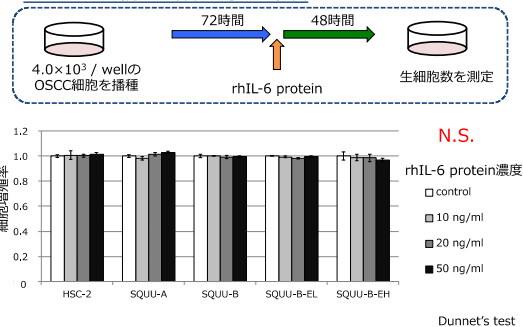


#### OSCC細胞培養上清中のIL-6濃度



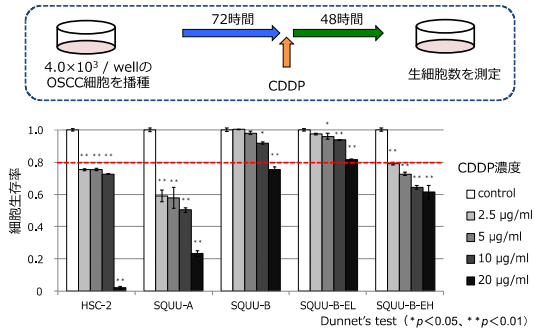
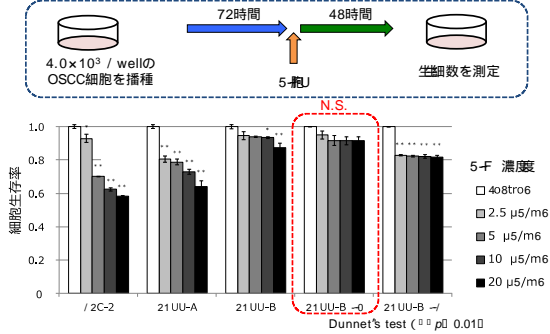
また、rhIL-6 protein 添加による OSCC 細胞の増殖促進効果は認められなかった。

#### IL-6がOSCC細胞の増殖に与える影響



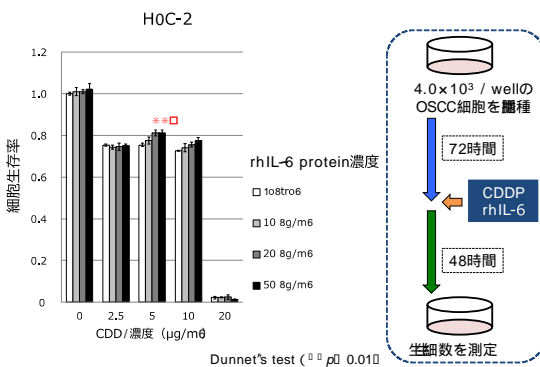
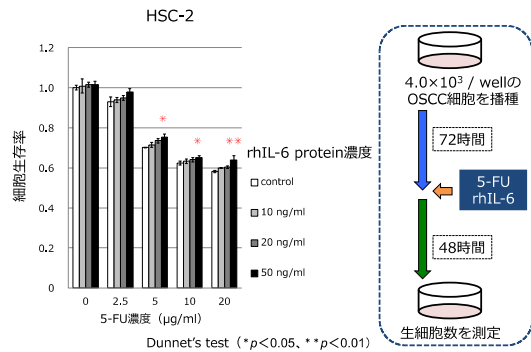
多くの OSCC 細胞株において抗癌剤の濃度が高くなるにつれて細胞生存率の低下を認めしたが、SQUU-B-EL 細胞では抗癌剤に対し抵抗性を示した。

抗癌剤がOSCC細胞の生存に与える影響



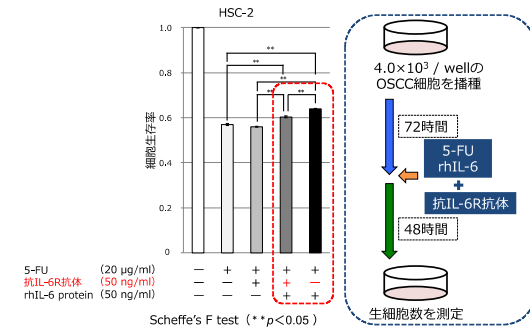
また、HSC-2 細胞において rhIL-6 protein の濃度が高くなるにつれて抗癌剤による細胞生存率の低下が抑制された。

rhIL-6 proteinがOSCC細胞の抗癌剤抵抗性に与える影響



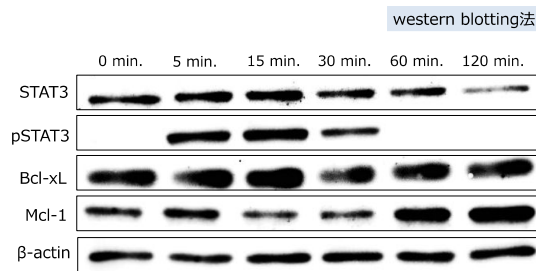
さらに、抗 IL-6R 抗体を添加したところ、IL-6 の抗癌剤抵抗性が減弱した。

抗IL-6R抗体がOSCC細胞の抗癌剤抵抗性に与える影響



rhIL-6 protein 添加によって、pSTAT3 やアポトーシス抑制遺伝子である myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) の発現上昇を認めた。

rhIL-6 protein添加によるIL-6シグナル伝達関連分子の活性化



本研究により、OSCC 細胞における IL-6 の発現が抗癌剤に対する抵抗性の獲得に関与しており、STAT3 シグナルを介した伝達経路がその重要な役割を果たしていると考えられた。

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7件)

Kaneko N, Kawano S, Yasuda K, Hashiguchi Y, Sakamoto T, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Morioka M, Hattori T, Tanaka S, Tanaka H, Kiyoshima T, Nakamura S. Differential roles of kallikrein-related peptidase 6 in malignant transformation and Np63 - mediated

epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. World Journal of Surgical Oncology 75: 148-157, 2017

Kitamura R, Toyoshima T, Tanaka H, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Oobu K, Nakamura S.

Cytokeratin 17 mRNA as a prognostic marker of oral squamous cell carcinoma. Oncology Letters 14 (6) : 6735-6743, 2017

Hashiguchi Y, Kawano S, Goto Y, Yasuda K, Kaneko N, Sakamoto T, Matsubara R,

Jinno T, Maruse Y, Tanaka H, Morioka M, Hattori T, Tanaka S, Kiyoshima T, Nakamura S. Tumor-suppressive roles of Np63 -miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2. Journal of Cellular Physiology, 2017

Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Kaneko N, Hashiguchi Y, Hattori T, Tanaka S, Kitamura R, Kiyoshima T, Nakamura S. Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via Np63 -mediated epithelial-mesenchymal transition. Oral Oncology 69: 15-25, 2017

Kubota K, Moriyama M, Furukawa S, Rafiul HASM, Maruse Y, Jinno T, Tanaka A, Ohta M, Ishiguro N, Yamauchi M, Sakamoto M, Maehara T, Hayashida JN, Kawano S, Kiyoshima T, Nakamura S. CD163+CD204+ tumor-associated macrophages contribute to T cell regulation via interleukin-10 and PD-L1 production in oral squamous cell carcinoma. Scientific Reports 7 (1) : 1755, 2017

Kaneko N, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Sakamoto T, Hashiguchi Y, Iida M, Nakamura S. Tongue squamous cell carcinoma producing both parathyroid hormone-related protein and granulocyte colony-stimulating factor: a case report and literature review. World Journal of Surgical Oncology 14 (1) : 161, 2016

Kawano S, Zheng Y, Oobu K, Matsubara R, Goto Y, Chikui T, Yoshitake T, Kiyoshima T, Jinno T, Maruse Y, Mitate E, Kitamura R, Tanaka H, Toyoshima T, Sugiura T, Nakamura S. Clinicopathological evaluation of pre-operative chemoradiotherapy with S-1 as a treatment for locally advanced oral squamous cell carcinoma. Oncology Letters 11 (5) : 3369-3376, 2016

〔学会発表〕(計 5 件)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.omfs1.dent.kyushu-u.ac.jp>

## 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者  
神野 哲平 (JINNO, Teppei )  
九州大学・大学病院・医員  
研究者番号 : 60755247

( 2 ) 研究分担者  
なし

( 3 ) 連携研究者  
なし

( 4 ) 研究協力者  
なし