

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06947

研究課題名(和文) Keratin17による抗アポトーシス機構を介した口腔癌新規治療薬開発を目指して

研究課題名(英文) Aiming at the development of new therapeutic agents for oral cancer via anti-apoptotic function by Keratin17

研究代表者

三上 友理恵 (MIKAMI, YURIE)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：70801661

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)：本研究においてはKeratin17 が果たす口腔扁平上皮癌における抗アポトーシス機構の分子基盤の解明を目的とした。Keratin17 が抗アポトーシスを介して腫瘍増殖を促進していることを示したため、siRNA を用いて抗アポトーシスに関連するKeratin17 の配列について明らかにし、その領域に結合するタンパク質を同定しようとした。しかし、Keratin17 の配列がUTR部分が短く、効率の良いsiRNAを作製することが困難であったため、配列の決定まで行えていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前の研究にてKeratin17 が口腔癌標本において腫瘍部に特異的に発現し、抗アポトーシス作用を介して腫瘍増殖を促進することを示した。また、本研究においてKeratin17 の配列のどの領域が抗アポトーシス作用に重要か同定し、その領域に結合する既存のアポトーシス関連タンパク質(Caspase family 等)または未知のアポトーシス関連タンパク質同定を試みたが、現在同定に至っていない。しかし未知のアポトーシス関連タンパク質の同定は、新たな分子標的薬となる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the molecular basis of the anti-apoptotic mechanism in oral squamous cell carcinoma that Keratin 17 plays. Having shown that Keratin 17 promotes tumor growth via anti-apoptosis, we used siRNA to elucidate the sequence of Keratin 17 related to anti-apoptosis and to identify proteins that bind to that region. However, since the sequence of Keratin 17 has a short UTR region and it has been difficult to produce an efficient siRNA, it has not been possible to determine the sequence.

研究分野：口腔外科

キーワード：Keratin17

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌の罹患率は上昇傾向にあるが口腔癌の知名度の拡大、新たな抗癌剤や開発等の医療技術の進歩によって5年生存率は50%を超えており、治療成績は向上している。しかし、初期では痛みや自覚症状が少なく、腫瘍が発見された時には進行している症例も見られる。また、リンパ節転移や遠隔転移などにより、予後不良の転帰を辿る症例も依然として少なくない。加えて、腫瘍の発生時期の若年化が進んでおり、発見された時には既に進行している症例も多い。また、口腔癌の治療の第一選択は切除療法であり、顎顔面領域は審美性および摂食嚥下、発語、発音、咀嚼など多くの機能を有するため、切除療法は術後の患者のQOLの低下の原因となる。そのため、侵襲の少ない新しい口腔癌特異的な根治的な治療法、治療薬の開発が臨まれている。

近年、上皮細胞および上皮由来細胞における細胞骨格の一部を成す中間径フィラメントのKeratinのファミリーであるKeratin17が、口腔内の上皮系悪性腫瘍において90%以上を占めている口腔扁平上皮癌において腫瘍部には高発現し、非腫瘍部には発現しないことが報告され (Toyoshima *et al.* J Cancer Res Clin Oncol 2008) 口腔癌特異的な腫瘍マーカーとして有用であることが知られている。他にも、carcinoembryonic antigen (癌胎児性抗原: CEA)、squamous cell carcinoma antigen (扁平上皮癌抗原: SCCA)、cytokeratin 19 fragments (CYFRA)、p63等が使用されているが、早期からOSCCの診断に役立つような感度の良いマーカーは未だ確立されておらず、Keratin17のマーカーとしての有用性および機能解析が注目されている。Keratin17は細胞骨格を制御するだけでなく、Kimらにより

Akt/mTORシグナルを活性化する14-3-3の足場タンパク質として機能し、細胞増殖を亢進する (Kim *et al.* Nature 2006) と報告された。また、GLI-2と相互作用することにより腫瘍増殖を亢進する (Hobbs RP *et al.* Nat Genet 2015) という知見もあり、Keratin17の新たな機能について明らかにされつつある。一方Keratin13は非腫瘍部の口腔扁平上皮には発現するが、腫瘍部の細胞には発現しないことが知られており (Kitamura *et al.* J Cancer Res Clin Oncol 2012)、Keratin17と異なる発現を示す。

申請者は最近口腔扁平上皮癌におけるKeratin17の発現、機能解析およびsonic hedgehog経路の転写因子

であるGLIとの関連について報告した (Mikami *et al.* J Cancer Res Clin Oncol 2017) すなわち、Keratin17が口腔癌標本において腫瘍部に特異的に発現すること (図1) 抗アポトーシス機能を介して腫瘍増殖を亢進すること (図2) およびKeratin17がGLIシグナルによって発現制御されていること (図3) を明らかにした。これらのこ

とから、Keratin17が特異的に腫瘍に発現するマーカーだけでなく、特異的に腫瘍で機能することが予測される。これまで、Keratin17が抗アポトーシス作用を介して腫瘍増殖に関連しているという知見は報告されておらず、その分子基盤は不明である。また、口腔扁平上皮癌特異的な発現を標的とした治療法も開発されていない。

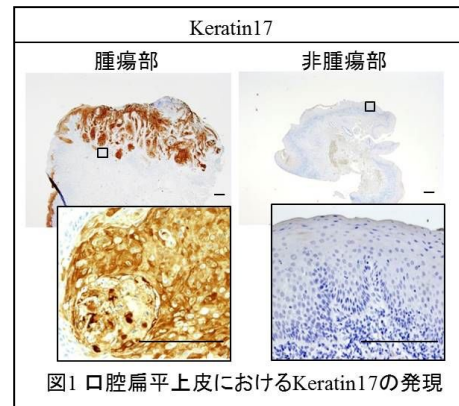
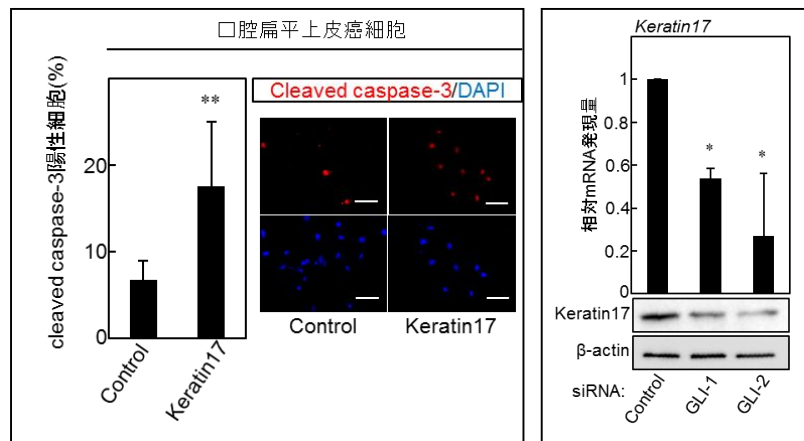


図1 口腔扁平上皮におけるKeratin17の発現



### 2. 研究の目的

本研究においてはKeratin17が果たす口腔扁平上皮癌における抗アポトーシス機構の分子基盤の解明およびKeratin17を標的とした新たな核酸医薬による口腔扁平上皮癌の新規分子標的薬の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

Keratin17の抗アポトーシス作用に重要な領域の同定

過去の報告を参考にKeratin17の重要とされている領域をそれぞれ欠損する変異体のKeratin17発現ベクターを作製する。Keratin17 siRNAを用いてアポトーシスを誘導した口腔癌

平上皮癌細胞株にそれぞれのベクターを導入する。結果として、アポトーシス誘導が解消されない変異体の領域が Keratin17 の抗アポトーシス作用に重要な領域であることが同定できる。変異体作製については手法が確立している。

#### アポトーシスに重要な領域に結合するタンパク質の同定

で同定した領域と、その領域を欠損する変異体を 293T 細胞に過剰発現させ、細胞溶解物を電気泳動後銀染色する。その結果、で同定した領域由来の細胞溶解物にのみ検出されるバンドを単離し、質量分析する。この結果、同定された抗アポトーシス関連因子と Keratin17 との相互作用について免疫沈降またはプルダウンアッセイにて直接結合するか検討する。

#### ゼノグラフトモデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスの背中の皮下に Keratin17 を高発現している癌細胞を移植するゼノグラフトモデルを用いて human Keratin17 siRNA を投与し、Keratin17 がノックダウンできていることを確認し、抗腫瘍効果（腫瘍の体積および重量）について検討する。

#### 舌発癌モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の検討

化学発癌物質である 4-nitroquinoline 1-oxide をヌードマウスに 10 週間経口摂取させることで舌発癌モデルマウスを作製する。Keratin17 の発現の高い時期を免疫組織化学染色にて確認し、その時期に Keratin17 siRNA を投与し、腫瘍の体積および重量から、抗腫瘍効果について検討する。

## 4. 研究成果

Keratin17 の腫瘍細胞増殖の促進について効果の確認のため、Keratin17 に対して複数の UTR (Untranslated Region) 領域において追加で作製した siRNA を用いて口腔扁平上皮癌細胞株の Keratin17 をノックダウンし、その結果十分ではなかったが癌細胞の数の減少を認めた。一方、Keratin17 過剰発現株を用いて細胞数の減少の回復を図ったが、結果が顕著に現れなかった。そのため、siRNA の配列の検討を行い、Open Reading frame (ORF) 領域にて口腔扁平上皮癌細胞株での腫瘍細胞増殖を抑制する siRNA を設計した。この siRNA でのノックダウン効率および細胞数の減少については良好な結果を得ている。さらにその siRNA 相当部に変異を加えた Keratin17 過剰発現安定株の作製を行った。現在、作製した株を用いて、腫瘍細胞増殖についてのレスキュー実験を行い、Keratin17 の腫瘍増殖促進の機能について検討を行っている。今後、Keratin17 の抗アポトーシス作用についても作製した Keratin17 過剰発現安定株を用いて行っていく。さらに Keratin17 の配列のどの領域が抗アポトーシス作用に重要か同定し、その領域に結合する既存のアポトーシス関連タンパク質 (Caspase family 等) または未知のアポトーシス関連タンパク質同定を試みる。未知のアポトーシス関連タンパク質の同定は、新たな分子標的薬となる可能性が高い。

その他に口腔癌の中でもかなり頻度の低い中間型腫瘍である低悪性筋線維芽細胞肉腫の症例を経験し、その免疫組織学的な特徴を検討した。この症例は、中間型腫瘍であるにも関わらず、腫瘍細胞が血管内に多数浸潤をしていた。また、患者のパラフィン標本より DNA を抽出し、主要な癌関連遺伝子について変異がないか検討し、変異がないことを確認し発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Mikami Y, Fujii S, Kohashi KI, Yamada Y, Moriyama M, Kawano S, Nakamura S, Oda Y, and Kiyoshima T. Low-grade myofibroblastic sarcoma arising in the tip of the tongue with intravascular invasion: A case report. *Oncol Lett*. 2018 Sep;16(3):3889-3894. doi: 10.3892/ol.2018.9115. Epub 2018 Jul 10.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 三上友理恵、川野真太郎、中村誠司、清島保  
口腔扁平上皮癌において GLI-KRT17 シグナルは腫瘍細胞増殖を促進する  
第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
2017 年 4 月 26 日~28 日 (ひめぎんホール、愛媛県)
2. 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 シグナルは腫瘍細胞増殖を促進する  
第 59 回歯科基礎医学会学術大会  
2017 年 9 月 16 日-18 日 (松本歯科大学キャンパス、長野県)
3. 三上友理恵、川野真太郎、中村誠司、清島保  
GLI-KRT17 シグナルは口腔扁平上皮癌において腫瘍の細胞増殖に関連する  
第 62 回 日本口腔外科学会総会・学術大会  
2017 年 10 月 20 日~22 日 (国立京都国際会館、東京都)
4. 三上友理恵、大部 一成、松原 良太、北村 亮二、清島 保、川野 真太郎、中村 誠司

後発転移リンパ節に腺扁平上皮癌を認めた舌原発扁平上皮癌の1例

第42回 日本頭頸部癌学会

2018年6月14日～6月15日 (京王プラザホテル、東京都)

5. **三上友理恵**、藤井 慎介、中村 誠司、清島 保、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 連関は抗アポトーシス作用を介して腫瘍細胞の増殖を促進する

第107回日本病理学会総会

2018年6月21日～23日 (ロイトン札幌、北海道)

6. **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回歯科基礎医学会学術大会

2018年9月5日～9月7日 (九州大学、福岡)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 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。