

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17103

研究課題名(和文) Piezo1による抗腫瘍効果を活用した次世代型口腔癌治療薬の開発を目指して

研究課題名(英文) Development of novel oral cancer therapy through the anti tumor effect of Piezo1

研究代表者

長谷川 佳那 (Hasegawa, Kana)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30793989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍は腫瘍細胞からなる実質とその周囲の間質から構成される。特に間質の硬さが腫瘍形成を促進することが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では、口腔癌の臨床所見として観察される硬結つまり、間質に生じる機械的变化に着目し、機械受容器Piezo1が腫瘍形成に与える影響について解析を行った。

その結果、siRNAによるPiezo1の発現抑制によりOSCC細胞株の増殖が変動した。すなわち、Piezo1の発現が口腔扁平上皮癌の細胞増殖を制御する可能性が示唆された。機械受容器が口腔癌の新規の治療標的となりうる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、機械侵害受容器であるPiezo1が口腔扁平上皮癌の増殖を制御する可能性が示唆された。この結果と併せ今後は、基質硬さの調節およびPiezo1による抗巣用効果の検討をヌードマウスを用いたin vivo実験を含めて行う。これらの研究にて得られる成果は、口腔癌のみならず様々な悪性腫瘍にも適用できると考えられる。また、Piezo1をはじめとした機械受容器の癌形成機序が解明され、新規治療法の分子基盤の提供へ繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A tumor consists of neoplastic cells and stromal cells. It has been reported that stiff stroma could promote tumorigenesis, but its molecular mechanism is not yet understood. This study focused on the mechanical change in the stroma to investigate the effect of mechanosensitive channel Piezo1 on the tumorigenesis in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell lines. Knockdown of Piezo1 by siRNA affected cell proliferation in OSCC. It is suggested that the expression of Piezo1 may regulate cell proliferation in OSCC. This result raises the possibility that mechanosensitive channel may be one of the new therapeutic target in oral cancer.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 機械受容器 Piezo1

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

### 1. 研究開始当初の背景

現在、口腔癌の治療法は切除療法が主体であるが、口腔という解剖学的構造上、機能面に加え、審美的にも既存の治療法では患者への負担が大きい。そのため、低侵襲でかつ副作用の少ない治療法の確立が期待されている。

腫瘍は腫瘍細胞からなる実質とその周囲の間質から構成される。口腔癌では腫瘍周囲に硬さを触知する。つまり間質に機械的変化が生じていることが予想される。近年、悪性腫瘍における細胞外基質の硬さが細胞内シグナル伝達経路の活性化や EMT の誘導により腫瘍形成や浸潤に影響を及ぼすことが報告されている (Levental *et al.*, Cell, 2009; Kim *et al.*, Sci Rep, 2014)。しかし、間質の機械的変化が腫瘍形成を促進する詳細な分子機構は不明である。

一方、Piezo1 は機械侵害受容器と近年同定されたイオンチャネルである。血管や神経の発生および形態形成に加え、細胞密度の変化による伸展刺激を感知し上皮細胞数の制御に関与することが報告されている。しかし、腫瘍におけるその機能については不明である。そこで、間質に生じる機械的変化を Piezo1 が感知し腫瘍形成に関与していると推察し、Piezo1 が腫瘍実質で機能するだけでなく、硬さを感知した Piezo1 がさらに腫瘍形成を促進すると予想した。

### 2. 研究の目的

Piezo1 が腫瘍細胞へ及ぼす影響を解明するとともに、間質の機械的変化を Piezo1 が機械刺激として感知し、その下流シグナル経路が腫瘍形成に与える影響を明らかにすることで、腫瘍実質と間質の両方を標的とした新規の口腔癌の治療法の開発を目指した基礎研究を行った。

そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌における Piezo1 の発現および Piezo1 が腫瘍細胞の増殖に与える影響を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) 細胞株における Piezo1 の発現および機能解析

複数のヒト OSCC 細胞株 (図 1) における Piezo1 の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。また、その機能を解析するため、Piezo1 高発現 OSCC 細胞株と低発現 OSCC 細胞株を用いて細胞内カルシウムイオン流入を Ca イメージングにて評価した。

#### (2) OSCC 細胞株における Piezo1 の増殖への影響の解明

Piezo1 に対する siRNA の発現抑制効果の確認  
siRNA を OSCC 細胞株に導入し細胞回収後、mRNA およびタンパクの発現をそれぞれ、リアルタイム PCR および Western blot (WB) 法にて発現抑制効果を確認した。加えて、Ca イメージングにてカルシウムイオンの流入を評価した。

Piezo1 の細胞増殖への影響  
OSCC 細胞株において siRNA により Piezo1 のノックダウンを施し、細胞増殖への影響をセルカウントおよび免疫染色法にて検討した。

シグナル伝達経路検索  
シグナル伝達経路への影響を Piezo1 発現抑制下の OSCC 細胞株にて WB 法を用いて検討した。

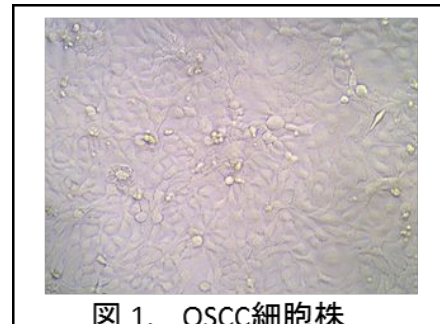


図 1. OSCC細胞株

### 4. 研究成果

#### (1) OSCC 細胞における Piezo1 の発現および機能解析

複数の OSCC 細胞株において Piezo1 は高発現していた。また、Piezo1 高発現 OSCC 細胞株と低発現 OSCC 細胞株を Piezo1 アゴニストにて刺激したところ、高発現 OSCC 細胞株でカルシウムイオンの流入がみられた。つまり Piezo1 アゴニストは Piezo1 発現量依存的に、また Piezo1 アゴニスト濃度依存的に細胞内カルシウムイオンの流入を促進した。

#### (2) OSCC 細胞株における Piezo1 の増殖への影響の解明

Piezo1 に対する siRNA の発現抑制効果  
siRNA を用いた Piezo1 ノックダウンにて mRNA およびタンパクレベルでその効果を確認した (図 2)。

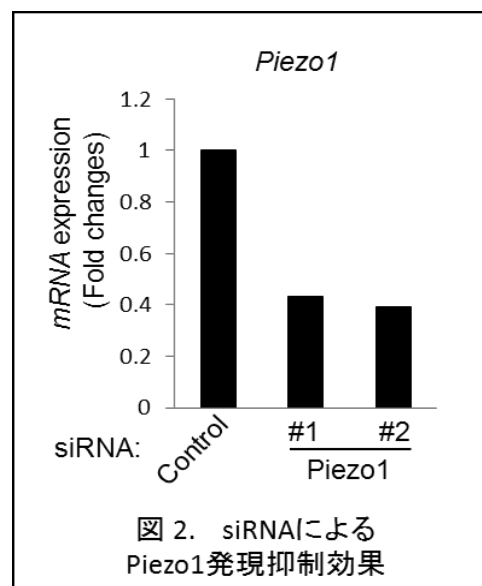


図 2. siRNAによる Piezo1発現抑制効果

また、Piezo1 ノックダウンは Piezo1 アゴニスト依存的な細胞内カルシウムイオンの流入を抑制した (図 3)。つまり、Piezo1 が機能的にも抑制されていることを確認した。

**Piezo1 の細胞増殖への影響**  
Piezo1 ノックダウンにより、ki-67 陽性細胞数に差が見られた。さらに、1, 3, 5 日間の細胞数をカウントすると、日数経過とともに細胞数への影響も確認された。つまり、Piezo1 の発現が OSCC において細胞増殖に影響することが示唆された。

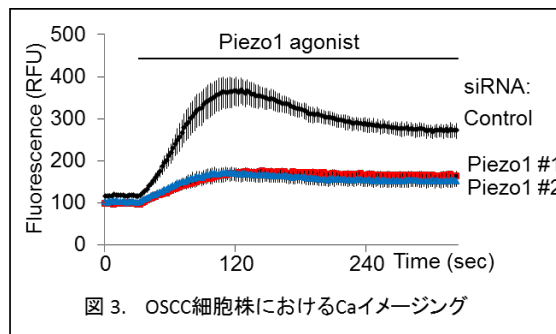


図 3. OSCC細胞株におけるCaイメージング

#### シグナル伝達経路検索

Piezo1 アゴニスト刺激が ERK のリン酸化に影響することが報告されている (Sugimoto *et al.*, *Sci Rep.* 2017)。また、Piezo1 が OSCC 細胞株の増殖に影響することが示唆されたので、Piezo1 の ERK のリン酸化への影響を WB 法にて検討した。OSCC 細胞株を Piezo1 アゴニスト刺激すると、Piezo1 アゴニスト濃度および時間依存的に ERK のリン酸化に差が見られた。次に、Piezo1 の ERK のリン酸化への影響を検討した。Piezo1 をノックダウンした OSCC 細胞株に Piezo1 アゴニストを作用させると ERK のリン酸化が変動した。つまり、OSCC において、Piezo1 は ERK シグナルの活性化に影響する可能性が示唆された。

これらの研究結果から、Piezo1 が口腔扁平上皮癌の細胞増殖を制御する可能性が示唆された。今後は Piezo1 が悪性腫瘍に生じる基質硬さ感知する分子メカニズムの解明および病理組織標本と口腔癌患者データを併せた臨床病理学的な検索を行う。加えて、ヌードマウスを用いた *in vivo* 実験にて、Piezo1 および間質の硬さ調節による抗腫瘍効果の検討し、さらに解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 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増殖を制御する, 第 60 回歯科基礎医学会 2018.9.6. 九州大学 百年記念講堂 (福岡)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

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。