

令和元年6月14日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17266

研究課題名(和文) 温度感受性TRPチャネルをターゲットとする新規口腔癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for oral cancer targeting thermosensitive TRP channels

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

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)：本研究ではCa²⁺透過性のTRPチャネルによる口腔癌制御機構の解明と治療応用について検討した。TRPV4高発現細胞株であるHSC4は、低発現細胞株と比較しTRPV4アゴニスト刺激で顕著で持続的な細胞内Ca²⁺濃度上昇を認めた。HSC4-siTRPV4ではTRPV4低発現細胞株と同様に細胞内Ca²⁺濃度上昇が抑制され、細胞死やJNK、p38のリン酸化も抑制された。また、HSC4-siTRPV4ではHSC4-siCTRLと比較しEMT関連転写因子の発現に差はなかったが、細胞間接着分子が減弱し、移動能が亢進した。以上より、TRPV4の機能調節は口腔癌に対する新規の治療法になりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌におけるTRPチャネルを標的とした基礎的研究はこれまでに報告がなかった。本研究により口腔癌に発現するTRPチャネルの機能調節が癌細胞の性質を変化させ、治療応用も可能であることが示唆された。また、既存の抗癌剤を減量させる可能性も明らかにでき、副作用低減や完遂率の改善にも繋がる新しい多剤併用療法の可能性を秘めている。イオンチャネル製剤は低分子化合物であることから、比較的安価で大量生産が可能である。このことは、がん患者増加による医療費高騰に対しても、医療費抑制という社会的課題を解決する一つの方法にもなりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Transient receptor potential (TRP) channels are a family of Ca²⁺-permeable nonselective cation channels. In this study, we investigated regulation mechanisms and clinical application of TRP channels in oral squamous cell carcinoma. We found more TRPV4 expression in HSC4 than in HSC2 and HSC3. We observed that a selective TRPV4 agonist significantly and continuously increased intracellular Ca²⁺ concentration in HSC4. TRPV4 agonist-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentrations in HSC4-siTRPV4, HSC2, and HSC3 were lower than that in HSC4-siCTRL. In addition, TRPV4 stimulation-induced phosphorylation of Jun N-terminal kinase and p38, and cell death were also inhibited in HSC4-siTRPV4. Furthermore, knockdown of TRPV4 in HSC4 reduced adherens junction molecules and enhanced cell migration. These results suggest that regulation of TRPV4 channels would be a novel therapeutic approach for oral cancer.

研究分野：歯科口腔外科学

キーワード：TRPチャネル 口腔癌 温度感受性

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

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 (Prevarskaya et al., Nat. Rev. Cancer 2011)。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は腫瘍細胞の抗癌剤に対する耐性に関与することも報告されている (Wang et al., J. Biol. Chem. 2015)。がん細胞に発現するイオンチャネルの活性化は、がん細胞の悪性度と密接な関わりを持つことから、イオンチャネルの機能制御は新しいがん治療戦略になりうる。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、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ている (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進行に関与することに着想した。これまでに、口腔癌細胞株では温度感受性 TRP チャネル群が高く発現し、一部の細胞株では選択的な TRP チャネルの活性化により細胞死を誘導することが可能であることを明らかにしている。そこで、口腔癌細胞株に発現する TRP チャネル機能制御により悪性形質にどのような影響を与えるか、また、治療への応用について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、TRP チャネル機能制御が口腔癌細胞の悪性形質 (細胞間接着や細胞増殖など) に与える影響の解明とアゴニスト/アンタゴニストを利用した治療応用の可能性を探ることを目的とする。具体的には以下の検討を行う。

- (1) TRP チャネル活性化が口腔癌細胞の増殖や細胞死に与える影響
- (2) TRP チャネル活性化による細胞内シグナル伝達機構に与える影響
- (3) TRP チャネル活性化が口腔癌細胞の上皮間葉転換および浸潤・転移能へ与える影響
- (4) 既存の抗癌剤と TRP チャネル活性化剤の併用効果

3. 研究の方法

(1) TRP チャネル活性化が口腔癌細胞の増殖や細胞死に与える影響

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 TRPV4 の選択的アゴニスト (GSK1016790A)、TRPV4 チャネルのアンタゴニスト (Ruthenium Red)、選択的な TRPV4 アンタゴニスト (GSK2193874) を添加し WST-8 を用いて細胞数を調べた。

(2) TRP チャネル活性化による細胞内シグナル伝達機構に与える影響

TRPV4 チャネルの機能的な knockdown (siTRPV4) を行い、TRPV4 チャネル活性化による細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。また、各口腔癌細胞へ 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。

(3) TRP チャンネル活性化が口腔癌細胞の上皮間葉転換および浸潤・転移能へ与える影響

HSC4-siTRPV4 を用いて TRP チャンネル活性が上皮間葉転換へ与える影響を western blot 法および免疫細胞染色にて調べた。また scratch assay を用いて移動能に与える影響を調べた。

(4) 既存の抗癌剤と TRP チャンネル活性化剤の併用効果

PF 療法で用いられる cisplatin (CDDP) および 5-fluorouracil (5-FU) を既存の抗癌剤として用い、WST-8 にて細胞数の評価を行った。また EGFR の分子標的薬として cetuximab による効果も検討した。

4. 研究成果

(1) TRP チャンネル活性化が口腔癌細胞の増殖や細胞死に与える影響

先行研究で報告した HSC4 への TRPV4 の選択的アゴニストによる細胞死は、投与後 24 時間において HSC2、HSC3、HaCaT では確認されなかった。HSC4 での細胞死は先行研究と同様に Ruthenium Red や選択的な TRPV4 アンタゴニストで抑制された。

(2) TRP チャンネル活性化による細胞内シグナル伝達機構に与える影響

先行研究で報告した HSC4 への GSK1016790A による持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は Ruthenium Red や GSK2193874 により抑制された。そこで、3 種類の siRNA (Silencer Select siRNA、Ambion 社) を用いて HSC4 における TRPV4 チャンネルの機能的な knockdown (HSC4-siTRPV4) を確認し、GSK1016790A 添加による細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。HSC4-siCTRL では顕著で持続的に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していたのに対し、HSC4-siTRPV4 では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認めるものの、siCTRL と比較して少なく、さらには、経時的に漸減していた。これは HSC2、HSC3、HaCaT における細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と類似していた。また、HSC4-siCTRL への GSK1016790A 添加による細胞死のシグナル分子 (JNK および p38) のリン酸化は、HSC4-siTRPV4 で抑制されていた。また、HSC2、HSC3 ではこれらリン酸化を認めなかった。

(3) TRP チャンネル活性化が口腔癌細胞の上皮間葉転換および浸潤・転移能へ与える影響

siTRPV4 の transfection 後 day2, day5, day7 に総蛋白を回収し、上皮間葉転換に関与する転写因子である snail、slug の発現を調べたところ、HSC4-siCTRL および HSC4-siTRPV4 において両転写因子の明らかな発現量の差は認めなかった。また、上皮系マーカーである CK14 の発現にも明らかな差を認めなかった。一方、細胞間接着分子である E-cadherin および β -catenin の発現を免疫細胞染色にて調べると、HSC4-siTRPV4 では細胞間における発現が顕著に減弱し、局在の変化を認めた。さらに 24well プレートへコンフルエントに細胞を培養し、創傷作成後、経時的に創傷面積の変化を調べた。HSC4-siTRPV4 では HSC4-siCTRL と比較して早期に創傷面積が縮小し、移動能が亢進していることが分かった。HSC4-siCTRL でも創形成 24 時間でおおよそ創の閉鎖が確認された。

(4) 既存の抗癌剤と TRP チャンネル活性化剤の併用効果

各口腔癌細胞株に対して CDDP、5-FU、cetuximab を各種濃度で投与し細胞数の変化を調べた。CDDP および 5-FU で濃度依存的な細胞数の減少を認めたが、cetuximab では過去の

報告～1000 µg/mL の高濃度でも細胞数への影響が確認できなかった。cetuximab に薬剤耐性を生じるといった報告もあり、今後の検討事項とした。5-FU と比較して CDDP では細胞数に影響を与える閾値がより明確であったため、CDDP と TRPV4 アゴニストとの併用効果を WST-8 にて検討した。GSK1016790A 投与により、低濃度の CDDP でも高い抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。

本研究により、機能的な TRPV4 チャンネルが高発現する口腔癌細胞株が存在し、TRPV4 高発現細胞株では TRPV4 アゴニスト投与による選択的な細胞死を誘導できることが明らかとなった。また、本細胞死のメカニズムには、顕著で持続的な細胞内カルシウム濃度の上昇が重要な役割を担い、p38 や JNK リン酸化を介したアポトーシス誘導が関与することが示唆された。また、既存の抗癌剤と TRP チャンネル作用薬の併用により、より高い抗腫瘍効果が期待できることが明らかとなった。

以上より TRP チャンネルを介した細胞死誘導は、既存の抗癌剤とは異なる作用機序が期待できることが考えられた。TRP チャンネルを標的とした抗腫瘍効果は、副作用の軽減や完遂率の改善も期待できる新しい口腔癌治療法の開発に繋がるものであることが示唆された。

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 3 件)

Impaired junctions and invaded macrophages in oral epithelia with oral pain ,Reiko Yoshimoto, Reona Aijima, Yukiko Ohshima, Jyunko Yoshizumi, Tomoko Kitsuki, Yasuyoshi Ohsaki, AiLin Cao, Atsushi Danjo, Yoshio Yamashita, Tamotsu Kiyoshima, Mizuho A. Kido: *J. Histochem. Cytochem.*, 19:22155418812405. (2019) in press (査読有)

Activation of p53-mediated apoptosis pathway in HSC3 cancer cell irradiated by atmospheric DBD oxygen plasma , Nobuya Hayashi , Yukie Miyamaru , Reona Aijima , Yoshio Yamashita: *IEEE Transactions on Plasma Science*, 47(2): 1093-1099 (2019) (査読有)

Mechanism of inactivation of oral cancer cells irradiated by active oxygen species from DBD plasma. Keisuke Mine, Yukie Miyamaru, Nobuya Hayashi, Reona Aijima, Yoshio Yamashita: *Plasma Medicine.*, 7(3): 201-213 (2017) (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

西川達也, 林 信哉, 合島怜央奈, 山下佳雄, 後藤昌昭: 誘電体バリア放電を用いた免疫細胞の増殖・活性化の制御 . 第 35 回プラズマ・核融合学会年会, 2018, 12, 3-6

Nishikawa T, Inoue Y, Hayashi N, Kyumoto Y, Kukita T, Aijima R, Yamashita Y: Control of proliferation and activation of myeloid progenitor cells using plasma torch. DPS 2018 40th International Symposium on Dry Process, 2018, 11, 13-15

西川達也, 井上裕基, 林 信哉, 久本由香里, 久木田敏夫, 合島怜央奈, 山下 佳雄: プラズマトーチを用いた骨髄系前駆細胞の増殖・活性化の制御 . 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会, 2018, 9, 18-21

吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 藤井慎介, 張 旌旗, 曹 愛琳, 高 イ琦, 清島 保, 城戸瑞穂: TRPV4 遺伝子欠失マウスにおける口腔粘膜創傷治癒の解析 . 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018, 9, 5-7

高 イキ, 曹 愛琳, 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 張 旌旗, 城戸瑞穂: アレルギーモデルマウスの骨代謝調節とメカノセンサーチャンネルの機能 . 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018, 9, 5-7

曹 愛琳, 高 イ琦, 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 張 旌旗, 城戸瑞穂: 喘息モデルマウスの機械的アロディニアと TRPV1 . 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018, 9, 5-7

張 旌旗, 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 張 旌旗, 依田浩子, 久木田敏夫, 城戸瑞穂: 熱感受性 TRPV チャネル遺伝子欠損によるマウス歯エナメル質に及ぼす影響 . 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018, 9, 5-7

合島怜央奈, 森 啓輔, 下平大治, 檀上 敦, 山下佳雄: 全身麻酔法が顎口腔外科領域の術後合併症に与える影響 . 第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2018, 5, 11-13

合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦, 山下佳雄: 口腔扁平上皮癌に発現する温度感受性 TRPV4 チャネルの機能解 . 第 62 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017, 10, 20-22

合島怜央奈, 曹 愛琳, 高 イキ, 吉本怜子, 森 啓輔, 張 旌旗, 大崎康吉, 檀上 敦, 山下佳雄, 清島 保, 城戸瑞穂: TRP チャネルを標的とした口腔癌細胞制御 . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017, 9, 16 18

城戸瑞穂, 吉本怜子, 合島怜央奈, 曹 愛琳, 張 旌旗, 大崎康吉: 口腔粘膜における温度感受性 TRP チャネルのダイバーシティ . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017, 9, 16 18

曹 愛琳, 高 イキ, 吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 張 旌旗, 城戸瑞穂: 喘息モデルマウスの機械的アロディニアと TRPV1 . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017, 9, 16 18

吉本怜子, 合島怜央奈, 大崎康吉, 張 旌旗, 曹 愛琳, Gao WQ, 清島 保, 城戸瑞穂: 温度感受性イオンチャネル TRPV4 は口腔上皮細胞の細胞間接着と運動性を制御する . 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017, 9, 16 18

合島怜央奈, 吉本怜子, 曹 愛琳, 高 イキ, 檀上 敦, 清島 保, 城戸瑞穂, 山下佳雄: 口腔扁平上皮癌細胞における温度感受性 TRPV4 チャネルの機能解析 . 九州地区口腔癌研究会第 21 回学術講演会, 2017, 7, 7

合島怜央奈, 檀上 敦, 山下佳雄: 口蓋形成術後に ICU 管理を要した小下顎症の 2 例 . 第 41 回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 2017, 5, 18 19

〔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)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし