

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09807

研究課題名(和文) 口腔癌におけるCDP排出系遺伝子ATP7Bの発現抑制を利用した感受性獲得の解明

研究課題名(英文) Acquisition of susceptibility by suppressing the expression of the cisplatin efflux transporter gene (ATP7B) in oral cancer

研究代表者

吉澤 邦夫 (Yoshizawa, Kunio)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：60452108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗癌剤治療は補助的な役割に過ぎないが、シスプラチンを腫瘍細胞外へ排出する機能を有するATP7Bの機能発現を抑制させることで、口腔癌病巣局所での感受性を高め、根治的療法にまで質を高めることを目標とした。

悪性度の高い高浸潤がんやシスプラチン耐性を有した腫瘍細胞において、ATP7B発現を高く維持することが判明し、一方で発現抑制をさせることで、細胞内のシスプラチン蓄積量が上昇し、口腔癌細胞株におけるシスプラチンの抗腫瘍効果が高くなることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔癌で用いられる主要な抗癌剤の一つであるシスプラチンの治療効果を高めることを目的に行っている。これまで抗癌剤治療は補助的な役割に過ぎなかったが、シスプラチンを腫瘍細胞外へ排出する機能を有するATP7Bの機能発現を抑制させることで、口腔癌病巣局所での感受性を高め、根治的療法にまで質を高めることを目標とした。研究成果から悪性度の高い高浸潤がんやシスプラチン耐性を有した腫瘍細胞において、高いATP7B発現を認めており、今後はATP7Bの発現抑制化による治療応用を検討している。

研究成果の概要(英文)： In this study, we aimed to increase the sensitivity of cisplatin by suppressing the expression of ATP7B, which functions to efflux cisplatin from tumor cells, making it a curative therapy, although anticancer drug therapy currently plays only an adjunctive role.

We found that high ATP7B expression was observed in highly malignant invasive carcinoma and cisplatin-resistant tumor cells, while suppression of ATP7B expression increased the anti-tumor effect of cisplatin.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：ATP7B 浸潤様式 口腔扁平上皮癌 シスプラチン

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の組織型は、90%が口腔扁平上皮癌であり、5年生存率はいまだ60%程度であるため、さらに口腔扁平上皮癌の治療効果を上げることが望まれている。また、難治性口腔癌は、高度ながん浸潤・転移を来し、外科療法を中心に放射線療法・化学療法を主体とした集学的治療を行ったとしても救命できない場合が多く、外科切除後において会話、咀嚼、審美性の面で生活の質を容認できないほど低下させている。

CDDP は口腔扁平上皮癌に最も有効な抗癌剤の一つであるが、腫瘍細胞の自然耐性と獲得耐性化により、CDDP の感受性および治療効果は減弱することが分かっている。本研究では、CDDP の治療効果を上げ、さらに CDDP 有害事象を軽減することで化学療法による根治的療法を目指すことに着手した。

2. 研究の目的

近年は EGFR 阻害薬のセツキシマブや PD-L1 阻害薬のオプシーボが頭頸部がんの適応になり、抗分子標的薬に注目が集まっているが、治療奏効率は 5-30%程度で、かなりの個人差があり、十分とは言えない。そのため、頭頸部癌の代表的な抗がん剤であるシスプラチンの耐性化に関わる phenotype を明らかにすることとともに、新たな治療関連ターゲット因子として ATP7B の役割について検討することにした。

その具体的な研究項目は 細胞内 CDDP 取り込み量と ATP7B 遺伝子レベルおよびタンパク機能発現レベルで調べる、CDDP 自然耐性化の関連ターゲット因子を調べる事である。さらに、浸潤様式の由来が明らかな細胞株と樹立済みの CDDP 耐性株を用いることで、がん浸潤と CDDP 治療効果や耐性化機序との関連を調べ、治療応用に生かすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の実験に供した口腔扁平上皮癌細胞株については、口腔扁平上皮癌の悪性化の指標として国内で頻用されているがん浸潤様式山本・小浜分類の由来が明確である細胞株に限定し、臨床にフィードバックしやすいようにした。また、病理組織切片および口腔癌由来細胞株の浸潤能を段階的に差別化することで、効率的に浸潤能と抗がん剤感受性に関わるメカニズムを解明することに寄与した。

In vitro では ATP7B の siRNA 抑制実験を PCR 法、Western blotting 法を用いて確認した。その後、ノックアウトが確認された時点で、その浸潤モデルや抗癌剤感受性試験、蛍光発現ベクター導入、免疫蛍光染色法を用いて、ATP7B 抑制によるがん組織・細胞への影響作用を確認した。実験に供する細胞株は、これまで系統的に浸潤能を分析・確立してきた、浸潤様式 3 型、4C 型、4D 型由来細胞株をそれぞれ用いた。

最終的にはヌードマウスを用いて ATP7B siRNA 群と CDDP 耐性株群とコントロール群を正所性移植モデルとして使用し、それぞれの浸潤様式由来細胞株において、それぞれの群別における腫瘍制御率、抗がん剤感受性試験、浸潤能の変化の関連を明らかにすることを目標とした。

(1) Western blotting 法、PCR 法：口腔扁平上皮癌由来細胞株における ATP7B 発現と浸潤様式との関連性の検討

6つの細胞株(3型由来:HSC-4, OSC-20, 4C型由来:OSC-19, OTC-04, 4D型由来:HOC313, TSU)を利用して調べた。

(2) 上記細胞株の CDDP 耐性株樹立：ATP7B 発現や他のシスプラチン輸送系因子の発現レベルを調べ、さらに細胞内シスプラチン蓄積量を検討した。

4. 研究成果

浸潤能が高い 4D 型では、他の浸潤様式由来の細胞株に比べて CDDP 排出系遺伝子の ATP7B 発現が強く、元々 CDDP 自然耐性化を来していることを示した。また、浸潤能が高いと、uPA, uPAR の細胞外マトリックス分解酵素が強く発現し、一方でその抑制化に働く Maspin が減弱していることを報告してきた。

これらの高浸潤がんにおいて CDDP 排出トランスポーター ATP7B の発現上昇および細胞外マトリックス分解能が亢進していることに合わせて、上皮間葉移行誘導転写因子である Snail, ZEB1 などの発現が上昇し、その下流にあるシグナル伝達系の変化による形質発現を学会や論文にて報告してきたが、代表的な研究成果を下記する。

ATP7B 発現の作用発現が、実際に CDDP が腫瘍細胞に暴露された経過時間別に発現が変化するのかわかるところ、1-2 時間暴露した時間帯で ATP7B がコントロール時の約 2 倍程度発現上昇を認めたと。一方で、CDDP 取り込みトランスポーターの CTR1 についても同様に調べた結果、その発

現強度は変化に乏しく、CDDP 耐性化には、取り込みトランスポーターよりも排出トランスポーターが強く関わっていることが示唆された。そして、高浸潤能 4D 型由来細胞株の HOC313 を用いて、ATP7B siRNA 抑制化確認済みの ATP7B 抑制処理細胞株を用いて、CDDP 細胞内蓄積量を調べた結果、non-sense siRNA 処理群であるコントロールに比べて、ATP7B siRNA 処理群において細胞内蓄積量が、有意に上昇しており、その際の IC50 においては 2.3 倍の高感受性を示し、ATP7B 抑制化による CDDP 感受性の増強が示唆される結果が示された。

また、同様に CDDP 暴露下による継体培養を行い、選択的に CDDP 獲得耐性化した細胞株における ATP7B 発現を調べたところ、IC50 の上昇と ATP7B の発現上昇が相同し、一方で CTR1 の発現変動は認めなかった。各種浸潤様式別の CDDP 自然耐性の程度を調べたところ、高浸潤癌である 4D 型では、3 型、4C 型と比べて、ATP7B 発現量は多く、CDDP 抵抗性が強いことが分かった。しかし、なぜ上皮間葉移行の形質発現を有するタイプが、in vitro 上でも CDDP 排出トランスポートの発現が強くなり、CDDP 抵抗性を有するのかが不明であったため、次に、上皮間葉移行の形質発現を有する 4D 型における phenotype を維持する関連機序について調べた。ひとつの結果として、4D 型由来細胞株においては、ZEB1 の発現とスプライシングによる FGFR b から c のアイソザイム変化が認められた。それゆえに、高浸潤癌に対する治療薬剤の開発や CDDP 抵抗性を解除する治療法として、特異的に FGFR c への変換を抑制する機序を利用することも考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osada Asami Hotta, Endo Kaori, Kimura Yujiro, Sakamoto Kei, Nakamura Ryosuke, Sakamoto Kaname, Ueki Koichiro, Yoshizawa Kunio, Miyazawa Keiji, Saitoh Masao	4. 巻 14
2. 論文標題 Addiction of mesenchymal phenotypes on the FGF/FGFR axis in oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0217451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto Kaname, Endo Kaori, Sakamoto Kei, Kayamori Kou, Ehata Shogo, Ichikawa Jiro, Ando Takashi, Nakamura Ryosuke, Kimura Yujiro, Yoshizawa Kunio, Masuyama Keisuke, Kawataki Tomoyuki, Miyake Kunio, Ishii Hiroki, Kawasaki Tomonori, Miyazawa Keiji, Saitoh Masao	4. 巻 10
2. 論文標題 EHF suppresses cancer progression by inhibiting ETS1-mediated ZEB expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-021-00313-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshizawa K, Hidetoshi A, Hotta A, Tsunoda T, Kimura Y, Moroi A, Ueki K.
2. 発表標題 Automatic classification of the mode of invasion (Yamamoto Kohama-criteria) using machine learning with pathological specimens of oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 7th WORLD CONGRESS of the International Academy of Oral Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田達哉、吉澤邦夫、堀田麻実、木村裕二郎、上木耕一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞におけるNF- κ B経路を介したPlatycodinDの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田麻実、吉澤邦夫、角田達哉、木村裕二郎、諸井明德、上木耕一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞とFGF受容体 c isoform
3. 学会等名 第38回 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田達哉、吉澤邦夫、堀田麻実、木村裕二郎、諸井明德、上木耕一郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞における、NF-kB経路を介したPlatycodin Dの細胞増殖・浸潤能の抑制機構の解析
3. 学会等名 第38回 日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田麻実、中村亮介、吉澤邦夫、齋藤正夫
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるFGFRc isoformの機能解析
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角田達哉、吉澤邦夫、堀田麻実、諸井明德、上木耕一郎
2. 発表標題 プラチコジンDのNF-kB経路を介したヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制の検討
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	上木 耕一郎 (Ueki Koichiro) (40313663)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	
研究 分担者	齋藤 正夫 (Saitoh Masao) (90345041)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------