

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09822

研究課題名(和文) 脂肪酸合成を標的とした口腔癌の増殖・進展メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of proliferation and progression mechanisms in oral cancer which targeted fatty acid synthesis

研究代表者

福田 正勝 (Fukuda, Masakatsu)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：10311614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞Ca9-22細胞において強いFAS, SREBP1の発現を示した。Ca9-22細胞におけるSREBP1発現をノックダウンした時、FASおよびE-FABP発現は抑制され、その結果Ca9-22細胞の増殖活性は抑制され細胞数は減少した。口腔扁平上皮癌組織においてp53陽性(変異)症例に一致してFAS, SREBP1の陽性所見が認められた。以上の結果から、p53遺伝子変異を認めた口腔癌細胞において、SREBP1の過剰発現を引き起こし、その結果、脂肪酸合成が亢進することで口腔癌の増殖・進展が起こっている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの癌細胞がグルコース代謝を亢進させて主なエネルギー供給源として増殖していることは、ワールブルグ効果としてよく知られている。ところが本研究において、脂肪酸合成も口腔癌のエネルギー源として重要な役割を担っていることが確認された。そこで、赤ブドウの抽出液中に多く含まれるポリフェノールで、脂質代謝の改善作用を示すResveratrolを口腔癌細胞に作用させた際、腫瘍細胞に対して強い毒性を認めたものの、正常細胞にはほとんど無害であった。この事実は、より広い学術、あるいは癌患者のQOLの向上といった医療を通じた大きな社会的意義を持つと考える。

研究成果の概要(英文)：This study examined molecularbiologically the mechanisms of proliferation and progression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. The strong expression of Fatty Acid Synthase (FAS) and SREBP1 were observed in Ca9-22 cell line. When SREBP1 expression were knockeddown, the expression of FAS and E-FABP were downregulated, consequently the proliferative activity of Ca9-22 cells was inhibited. Furthermore, the positive immunoreactivities of FAS and SREBP1 were observed in human oral squamous cell carcinoma (HOSCC) tissues, and they were almost consistent with p53 positive (mutated) cases. In conclusion, it can therefore be hypothesized, based on both the present in vitro and in vivo observations, that a loss of p53 function results in SREBP1 activation, thereby upregulating FAS, and consequently, may promote HOSCC tumorigenesis.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 脂肪酸合成酵素(FAS) p53 SREBP 細胞死 Resveratrol E-FABP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学的手法および免疫学の目覚ましい発達は、癌の発生・増殖・進展に関係した様々な分子の発見とその機能解析に貢献してきた。多くの癌細胞がミトコンドリアでの呼吸をあまり使わずに、グルコース代謝（解糖系）を亢進させて主なエネルギー（ATP）供給源として増殖していることは、ワールブルグ効果としてよく知られている。この現象は、エネルギー産生から言えば極めて非効率的なシステムであるものの、癌が増殖する、即ち腫瘍が塊として増殖していく上では、酸素の消費を抑えて増殖するという利点を持っている。このことに加えて近年では、癌細胞が増殖していく上で脂肪酸合成が亢進していることもわかってきた(Plos one DOI: 10.1371/journal.pone.0064570, 2013)。細胞膜ではリン脂質が脂質二重層を形成し、主要な構成要素となっている。このリン脂質は、癌細胞内で新規に合成された脂肪酸をリン酸化して作られる。すなわち、癌細胞が分裂して増殖するためにはリン脂質が必要で、そのために新規の脂肪酸合成が亢進していると考えられる。このように、種々の臓器に発生した癌細胞では脂肪酸合成が亢進しており、脂肪酸合成の亢進が癌細胞の増殖・転移や抗癌剤抵抗性に関与していることが次第にわかってきた。これまでに数種類の脂質代謝酵素が癌の増殖や進展を促進することが知られており、これらが癌治療の新たな標的分子となる可能性が期待されている。中でも脂肪酸合成酵素(fatty acid synthase: FAS)は、アセチル CoA, マロニル CoA, NADPH の縮合反応により飽和脂肪酸であるパルミチン酸を合成する酵素で、肝臓と脂肪組織では、余ったエネルギーを脂肪として貯蔵する役割があり、また分泌乳腺では乳汁中の脂肪を作るために FAS の高発現が見られるが、それ以外の組織ではほとんど発現していない。ところが、多くの癌細胞で FAS の発現が亢進しており、特に乳癌や前立腺癌では癌化の初期段階から FAS の過剰発現がみられ、その発現量が多いほど、その癌細胞には抗癌剤が効きにくく、予後が悪いことが報告されている(Cancer Res, 66, 2006; Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9, 2006)。また近年の日本人の食生活の欧米化に伴い、高脂肪食の摂取でオートファジー（自己貪食）の抑制物質が増え、脂肪肝が悪化することが解明された(大阪大・吉森教授, 2016 年)。すなわち、脂質の過剰摂取によってオートファジーが抑えられれば癌の発生・増殖・進展においても好都合である。ここで、口腔癌の増殖・進展において脂肪酸合成がどのように関与しているのかという疑問が生じる。

2. 研究の目的

一方、今や癌は遺伝子変異によって発生するものと認識されるに至っており、口腔癌も例外ではなく、その中心的存在のひとつである癌抑制遺伝子 *p53* の変異は、実に 30~50% の症例において認められている。そして *p53* 遺伝子は、脂肪酸の調節を行う核内転写因子 **sterol regulatory element-binding protein (SREBP)** の発現を制御しているが、*p53* 遺伝子変異によって SREBP の過剰発現を引き起こし、その結果、脂肪酸合成が促進されるという事実が報告された (Cell 148, 2012)。しかしながら、口腔癌の発生・増殖・進展における FAS の

関与はいまだ検索されていない。ここで、もし口腔癌において *p53* 遺伝子変異に伴い FAS の発現が亢進していることが証明されれば、*p53* 遺伝子変異症例においては FAS の阻害剤を作用させることで癌細胞の増殖・進展を抑制し、細胞死が誘導される可能性が考えられ、効果的な治療法につながることを期待される。最近、抗酸化剤・ポリフェノールの1つで抗腫瘍活性、抗炎症作用、酸化ストレスからの保護といった多くの作用を持つ天然物質“Resveratrol”が、脂質代謝の改善および脂肪蓄積の軽減作用を示した(Mol Cancer Ther, 4, 2005)。我々もパイロットスタディとして、Resveratrol が口腔癌細胞株からの FAS の発現を抑制し、オートファジーを亢進させ最終的に細胞死を誘導することを確認している(日本癌学会, 2013)。近年、多様な臓器に発生した悪性腫瘍の増殖・浸潤における脂肪酸の関与については活発に検索が進められているが、口腔癌においては不明である。また口腔癌において核内転写因子 SREBP および FAS の発現解析とその相関関係を検索する研究手法は、新しい試みである。この検索によって、口腔癌の発生・増殖・進展における FAS の関与を明確にする。さらに Resveratrol は赤ブドウの抽出液中に多く含まれるポリフェノールで天然抽出物質であり、腫瘍細胞に対して強い毒性が認められるものの、正常細胞にはほとんど無害であり、人体に対する副作用は無視できるものと考えられる。ところが口腔癌に対する Resveratrol の有効性については未だ報告がない。大隅教授らの研究によって脚光を浴びているオートファジーも Resveratrol の作用に深く関わっていると考えられる。このことから本研究が成功した場合、口腔癌の増殖・進展メカニズムを解明するだけでなく、非常に効果的で理想的な口腔癌治療の先駆けとなる可能性が高く、今後の発展が急務である。

3. 研究の方法

(平成30年度)

1. 当院口腔外科に受診した多くの口腔癌患者の生検材料を用いて以下の実験を行う。

ホルマリン固定パラフィン包埋材料を作製し、HE 染色標本にて病理診断を行う。さらに抗 *p53* 抗体、抗 FAS 抗体および抗 SREBP 抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い、その発現強度および局在を確認する。*p53* タンパク質は正常組織の場合、作られてから消失するまでのターンオーバーが20分と早く検出できない。しかしながら、遺伝子変異が起こると核内に蓄積することによって検出できるようになる。従って、免疫染色で検出された *p53* タンパク質は遺伝子変異が起こっていると考えられる。この結果から、口腔がん組織において *p53* 遺伝子変異の有無と SREBP および FAS タンパク質の発現を検索し、その局在と組織学的悪性度、予後との相関性を解析する。以上の結果と個々の症例の臨床病理学的諸因子との相関関係について解析を行う。

2. 口腔癌の増殖・進展にFASがどのように関わっているのか解明する一手段として、ヒト口腔扁平上皮癌のモデルとして樹立された培養株HSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22 (*p53*変異型)およびSAS (*p53*野生型)を用い *in vitro* の系で研究を行う。

FASとSREBPの遺伝子・タンパク質の発現状況の解析: 各腫瘍細胞株を25 cm² のフラスコにconfluent (1x10⁶個)になるまで培養し、AGPC法にてRNA抽出

後，Real time qRT-PCR（現有設備）によりFAS mRNA，SREBP mRNAを定量する．次に各腫瘍細胞株よりタンパク質抽出・濃度測定後，FASとSREBPのタンパク質の発現をWestern blot法により定量する．その後p53遺伝子変異の有無とSREBP活性の相関について検討する．

口腔癌細胞のSREBP活性動態の確認：SREBPの活性増強した細胞株を，SREBP small interfere (si) RNAを用いて発現抑制(ノックダウン)した際のFASの発現を検索し，コントロールと比較するとともに，この際の腫瘍細胞の増殖阻害効果を細胞増殖活性測定法にて検索し，p53変異型と野生型細胞株とでそれぞれの結果を比較検討する．通常，細胞質内に存在するSREBPは活性化すると核内に移行してFASの発現増強を行う．このことを確かめるために細胞を細胞質・細胞膜・核の分画に分けてそれぞれタンパク質抽出を行うProteoExtract キットを用い，SREBPタンパク質の細胞質から核への移行動態をWestern blot法により解析する．これにより実際にSREBPの活性化が起こって細胞質から核に移行した結果，FASタンパク質が発現増強していることが証明できる．さらに核DNAと結合したSREBPが活性化して機能しているか否か証明するためにLuciferase reporter assay（現有設備）を行う．

口腔癌細胞の細胞死の検出：SREBPの活性化が証明された培養株を用い，SREBPの活性化した状態でFAS siRNAを遺伝子導入してFASをノックダウンした状態，あるいはResveratrolを作用させた際のFASの発現およびSREBP活性動態を検索し，非処理のコントロールと比較検討すると共に顕微鏡にて形態学的変化を観察する．細胞死が誘導されているのであれば，caspaseの活性化を介したアポトーシスの状態をCaspase-Glo assay（現有設備）にて，オートファジーの状態をWestern blot法にてそれぞれ確認する．

（平成31年度以降）

前年度に続き多数の口腔扁平上皮癌組織を用いて以下の実験を行う．

1. 実験進行中に新たに入手した試料についても随時ホルマリン固定パラフィン包埋材料を作製し，HE染色標本にて病理診断を行った上で，p53，FAS および SREBP の免疫染色による局在を確認する．これらの結果と個々の症例の臨床病態像との関連について統計学的な解析を行う．
2. ノードマウスにFAS陽性腫瘍細胞を播種・腫瘍形成した後，Resveratrolを濃度と時間をそれぞれかえて直接作用させた際のSREBPおよびFASの活性動態を同様に解析し，細胞死（アポトーシスあるいはオートファジー）の検索と副作用の有無を形態的および組織学的に行う．

以上の結果から，本研究において**脂肪酸合成を標的として口腔癌の増殖・進展メカニズムを解析するとともに，SREBPのシグナル伝達制御を介しての腫瘍の増殖・浸潤メカニズムを明らかにすることで，口腔癌の効果的治療法の開発を目指す**．

4．研究成果

1. 明海大学病院にて治療を受けたtotal 25例の口腔扁平上皮癌患者の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋材料について，まずHE染色標本にて病理診断を行った後，p53抗体，抗FAS抗体および抗SREBP抗体を用いた免疫組織

化学的検索を行い、その発現強度および局在を確認した。その結果、13例（52%）の腫瘍細胞の核に p53 タンパク質の陽性反応を認めた。p53 陽性症例全例の腫瘍細胞の細胞質に FAS の陽性所見が認められた。さらに 13例（52%）の腫瘍細胞の核に SREBP1 発現を認め、全 p53 陽性症例に一致して SREBP1 の陽性所見が認められた。

2. 5種類の人頭頸部扁平上皮癌培養株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS 細胞における FAS と SREBP の遺伝子ならびにタンパク質の発現状況を Real time qRT-PCR 法および Western blot 法にて確認した。その結果、各細胞株において FAS mRNA および SREBP mRNA の自発的な発現を確認した。

また、Ca9-22 細胞において最も強い FAS mRNA および SREBP mRNA の発現量を示し、タンパク質についても同様であった。SAS 細胞においてはいずれの発現も弱かった。この Ca9-22 細胞に Resveratrol を作用させると細胞死に陥ったが、FAS の発現には影響しなかった。この際 SREBP 1 と E-FABP は減少した。この時の Ca9-22 細胞の細胞死において、Caspase の活性化が認められなかったことから、オートファジー細胞死である可能性を考え、Resveratrol を時間と濃度を変えて作用させた際のオートファジーのマーカー p62, Beclin 1, LC3 の発現について検索した。その結果、時間依存性的および濃度依存的に p62 と Beclin 1 の発現量は亢進し、24 時間で最大となった。また、LC3-I から LC3-II への移行が認められた。さらにオートファジーのインヒビターである 3-Methyladenine を作用させることによって細胞死が抑制されたことから、この際の細胞死はアポトーシスではなくオートファジー細胞死である事が確認された。尚、SAS 細胞においても同様の実験を行い、同様の結果が得られた。また、この Ca9-22 細胞を SREBP small interfere (si) RNA を用いてノックダウンした際 FAS の発現は抑制され、この際の Ca9-22 細胞の増殖活性は明らかに抑制され細胞数の減少が認められた。そして、E-FABP の発現量も減少した。以上の結果から、p53 遺伝子変異株である Ca9-22 細胞において、SREBP の過剰発現を引き起こし、その結果、脂肪酸合成酵素である FAS の発現が増強されていることが示唆された。ここで TNF- α の刺激によって SREBP の活性が増強されるという報告があることから、Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) にて経時的に刺激した際の SREBP タンパク質の細胞質から核への移行動態を ProteoExtract にて検索したところ、刺激後 1 h で核内での SREBP1 発現量が亢進した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにて SREBP 1 を transfect した Ca9-22 細胞を TNF- α (10 ng/ml) で刺激した際 SREBP1 活性の亢進を認め、Resveratrol で刺激した際 SREBP1 活性の低下を認めた。

3. ノドマウスの背部に 1×10^6 個の Ca9-22 細胞を播種し、腫瘍塊を形成させたところで、Resveratrol (50 μ M) で処理した際、腫瘍塊の変性細胞死を認めた。この時の腫瘍塊をノドマウスから切除して取り出し凍結保存した。このサンプルを使い FAS 及び SREBP1 プロブを用いた in situ hybridization を行なったところ、いずれも発現亢進を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 FUKUDA MASAKATSU, OGASAWARA YUDAI, HAYASHI HIROYASU, OKUYAMA AYAKO, SHIONO JUNYA, INOUE KATSUYUKI, SAKASHITA HIDEAKI	4. 巻 41
2. 論文標題 Down-regulation of Glutathione Peroxidase 4 in Oral Cancer Inhibits Tumor Growth Through SREBP1 Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1785 ~ 1792
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masakatsu FUKUDA and Hideaki SAKASHITA
2. 発表標題 Impact of glutathione peroxidase enzyme 4 (GPX4) in human oral cancer
3. 学会等名 第77回 日本癌学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masakatsu FUKUDA and Hideaki SAKASHITA
2. 発表標題 The role of sterol regulatory element binding protein (SREBP) in the growth and progression of oral cancer.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masakatsu FUKUDA and Hideaki SAKASHITA
2. 発表標題 Resveratrol inhibits proliferation of oral cancer cells and induces autophagic cell death by blocking SREBP1 activity
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masakatsu Fukuda and Hideaki Sakashita	4. 発行年 2019年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 22
3. 書名 Prevention, Detection and Management of Oral Cancer	

〔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	坂下 英明 (Sakashita Hideaki) (10178551)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	
研究 分担者	大森 喜弘 (Ohmori Yoshihiro) (50194311)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	

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
---------	---------