

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10293

研究課題名(和文) 口腔癌の進展・転移を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms to control the progression and metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

野島 淳也 (Junya, Nojima)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50364766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮がんは頭頸部がんの中で最も多い。大規模データベースの駆使と口腔扁平上皮がん細胞を用いたIn vivo, In vitroの実験系により, Smad-4, Netrin-4, およびSirtuin-7の機能を検討した。Netrin-4の発現量は生存率と有意な差はなかったが, 発現量が高いほど予後が悪い傾向にあった。Netrin-4の過剰発現により細胞の増殖や移動能が亢進し, さらにIn vivoでNetrin-4を過剰発現した細胞はコントロールと比較して大きな腫瘍を形成した。以上からNetrin-4は口腔扁平上皮がんの悪性度に関与している可能性があることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では分泌タンパク質のNetrin-4が口腔扁平上皮がんの悪性度に関連する可能性を示した。今後Netrin-4の発現や機能解析がさらに進めば, 手術療法が中心の口腔がんにおいて, Netrin-4を, 血液検査におけるバイオマーカーとすることで, 再発や転移のリスクを治療前に判定し, 的確な切除範囲の設定と予防郭清を可能にするかもしれない。また, 創薬の観点からも有利であり, 今後Netrin-4の中和抗体や阻害薬は, 実現可能な治療法のターゲットとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma is the most common type in head and neck cancer. We investigated the functions of Smad-4, Netrin-4, and Sirtuin-7 using a large database and in vivo and in vitro experiments using oral squamous cell carcinoma cell lines. The overexpression of Netrin-4 increased the cell proliferation and migration. The cells overexpressed Netrin-4 in vivo formed larger tumors than controls. These results indicate that Netrin-4 may be involved in the malignant potential of oral squamous cell carcinoma.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮がん Smad-4 Netrin-4 Sirtuin-7

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 早期口腔がん患者 (T1or T2, node-negative) に対して、原発巣切除と同時に予防的頸部郭清を行う群と原発巣切除後に経過観察し、後発頸部リンパ節転移が認められた場合に頸部郭清を行う群との前向き比較試験が行われ、3年の時点での全生存率 (80.0% : 67.5%)、無病生存率 (69.5% : 45.9%) と臨床的に頸部リンパ節転移が認められなくても、予防的頸部郭清を同時に行った方が生存率で有意性があると報告された (D' Cruz AK, et al., N Engl J Med, 2015). また局所の脈管侵襲の有無や臨床型, YK 分類などが、手術後の後発頸部リンパ節転移の危険因子となることが示唆されている (山川ら, 口腔腫瘍 2014). 腫瘍の局所進展と頸部リンパ節転移の制御がいかにか生命予後を左右するかを反映した結果と考えられる. しかしこれら個々の症例において腫瘍の進展様態を左右する原因やメカニズムについては明らかになっていない.

(2) Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) は、がんの進展・転移の重要な機構として知られ、EMT により上皮細胞は徐々にその構造を失い間葉系の特徴へと変化し運動能や浸潤能を獲得するようになる (Gupta GP & Massague J., Cell, 2006). 口腔扁平上皮においてもその機構の重要性が示唆されている (Yang H et al., Oncol Lett, 2017). EMT の主役は Transforming growth factor (TGF) - $\beta$  である. TGF- $\beta$  signaling では receptor が活性化されると、下流の R-Smads をリン酸化する. さらに Smad-4 と複合体を形成し、核内へと移行し EMT 関連の転写因子を発現、がん細胞の分裂や浸潤を促進するとされている (Tsai J et al., Cancer Cell, 2012). 逆に TGF- $\beta$  はがんの初期ステージでは、CDK インヒビターを介してがん増殖に対して抑制的に作用している (Roberts AB et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2003).

(3) Smad-4 は TGF- $\beta$  の中心的なシグナル伝達因子である他、がん抑制遺伝子として知られ、Smad-4 の変異は大腸がんや膵臓がんの増殖や転移性を著しく助長する. また頭頸部領域の扁平上皮がんにおいても Smad-4 の loss of function は EMT を引き起こすとされている (H. Ozawa et al., Clin Cancer Res, 2017). しかし、乳がんにおいては、Smad-4 の欠落はむしろ転移を抑制し、別の報告では Smad-4 の強発現が口腔前がん病変の白板症の悪性化に関与するなどの報告があり口腔がんが進展、転移していく過程における Smad-4 の役割は未だ不明な点が多い (Xia RH et al., PLoS One, 2013). Sirtuin-7 は、Sirtuin family の中で唯一核内に局在するタンパク脱アセチル化酵素で、老化や寿命に関与する遺伝子である.

(4) Sirtuin-7 がヒトやマウスモデルでの乳がんの肺転移で著し抑制され、乳がんの転移に抑制的に作用する遺伝子とされ注目されている (Tang X et al., Nat Commun, 2017). Tang らは、resveratrol を投与することで、Sirtuin-7 の脱アセチル化活性が上昇し、肺転移を抑制することを示した. また Sirtuin-7 が頭頸部がん組織においても有意に正常組織と比べて抑制されていたとの報告がある (Lai CC et al., Tumor Biol, 2013). Li らは Sirtuin-7 が口腔がんの EMT や肺転移を抑制し、前述した Smad-4 の脱アセチル化および分解を介していることを示している (Li W et al., J Exp Clin Cancer Res, 2018).

(5) Netrin-4 は乳がんにおいて発現が低下することが知られており、EMT に関連するマーカーの発現を低下させて、乳がんの転移を抑制する可能性が示唆されている (Xu X et al., Oncol Rep, 2017). 乳がんは骨組織に高頻度に転移し骨破壊を引き起こすことから、Netrin-4 は乳がんの骨転移抑制に重要な役割を果たすことが予想される. さらに興味深いことに、resveratrol は Netrin シグナルとクロストークすること (Wang F et al., Mol Med Rep, 2018), Smad は Netrin 受容体である Neogenin の下流に存在すること (Hagihara M, J Biol Chem, 2011) が報告されている.

### 2. 研究の目的

口腔扁平上皮がん細胞の挙動に与える Smad-4, Netrin-4, Sirtuin-7 の作用を検討する.

### 3. 研究の方法

(1) 世界最大のがんデータベース The Cancer Genome Atlas (TCGA) とがん細胞株データベース Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) を利用した. TCGA に収載されている頭頸部扁平上皮がん患者の基本情報やステージ分類などと、がん組織に発現する Smad-4, Netrin-4, Sirtuin-7 を解析した. CCLE に収載されている口腔扁平上皮がん細胞株における遺伝子発現を検討した.

(2)HOK (正常口腔扁平上皮), 6種類の口腔扁平上皮がん細胞 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, SCC-4, Ca9-22) を用いて Smad-4, Netrin-4, および Sirtuin-7 の発現ベクターをトランスフェクションした. 細胞増殖アッセイ, アポトーシスアッセイ, さらにトランスウェルマイグレーション法とゼラチンゼイモグラフィ法により, 細胞の移動・浸潤能およびマトリックスメタプロテアーゼによる基質分解能を検討した. さらに増殖マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で検討した.

(3)10 週齢雄ヌードマウス背部皮下に Netrin-4 を恒常的に過剰発現させた HSC-4 細胞を摂取した. 接種後, 1 週, 2 週, 3 週, 4 週で形成した腫瘍ならびに周囲組織を採取する. 組織学的, 分子生物学的解析により腫瘍の増殖 (大きさ) と周囲骨格筋組織への浸潤を評価する. コントロールとして Empty plasmid を恒常的に発現した細胞を摂取した.

#### 4. 研究成果

(1)TCGA の解析から, Smad-4 の発現量で生存率に差はなかったが, 発現量が低いほど予後が悪い傾向にあった. さらに, Netrin-4 もその発現量と生存率に有意な差は認めなかったものの, やはり発現量が高いほど予後が悪い傾向にあった. しかし, Sirtuin-7 発現量が低いと有意に生存率が低下した.

(2)CCLE の解析から, 口腔扁平上皮がん細胞株全般に Smad-4 と Sirtuin-7 は発現量がたかかったが, Netrin-4 の発現量は低かった.

(3)Smad-4 と Sirtuin-7 の過剰発現は口腔扁平上皮がんの細胞の挙動にほとんど影響を与えなかった. 一方で Netrin-4 の過剰発現により細胞増殖が亢進した. また, 細胞周期関連遺伝子 CyclinA2, CyclinD2 のメッセンジャーRNA 量が増加した. さらに Netrin-4 の過剰発現で細胞の移動能が増加することが明らかとなった.

(4)細胞の挙動への影響が一番強くみられた Netrin-4 を恒常的に過剰発現した HSC-4 細胞をヌードマウス背部皮下に摂取したところ, コントロール細胞の接種群に比べて, 有意に大きな腫瘍を形成した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水田 奏, 松原 琢磨, 後藤 晶乃, 宮脇 有希, 野島 淳也, 佐藤 毅, 柳沼 樹, 吉賀 大午, 富永 和宏, 吉岡 泉, 古株 彰一郎
2. 発表標題 がん遺伝子Src結合分子Plectinは悪性黒色腫の増殖, 移動および接着を制御する
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021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	中平 光彦 (Nakahira Mitsuhiko) (10253353)	埼玉医科大学・医学部・教授  (32409)	
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro) (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授  (27102)	
研究分担者	佐藤 毅 (Sato Tsuyoshi) (60406494)	埼玉医科大学・医学部・准教授  (32409)	

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