

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：87105  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K10302  
研究課題名(和文) 癌微小環境の機械侵襲と新規癌遺伝子シグナル制御の相互強化による新たな癌治療戦略

研究課題名(英文) A new anti-cancer therapeutic strategy targeting the interrelation between tumorous mechanical extracellular microenvironment and novel oncogene-related gene signaling

研究代表者  
大関 悟 (ozeki, satoru)

独立行政法人国立病院機構九州医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・客員臨床研究員

研究者番号：80117077

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、口腔扁平上皮癌(OSCC)におけるTransient receptor potential vanilloid 4(TRPV4)の発現と機能を検討し、その分子基盤を明らかにすることを目的とした。本研究の結果から、TRPV4は口腔癌病理標本において腫瘍部に高発現し、また、OSCC細胞株に発現しており、TRPV4を介したCa<sup>2+</sup>細胞内流入がCaMKIIの活性化を介してAKTシグナル伝達を活性化することで、OSCCの細胞増殖が促進されることが示唆された。このことは、細胞外環境をOSCCの腫瘍細胞が認識し、細胞増殖を制御する機構の一端を見出したと考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、OSCCにおけるTRPV4の発現制御機構、およびTRPV4の活性化メカニズムを明らかにすることを企図したものである。特に、TRPV4の発現制御機構について、OSCC患者から得られた同一組織標本内における腫瘍部と非腫瘍部を比較し、腫瘍部においてTRPV4が高発現していることを見出したことは、学術的な意義が高い。加えて、TRPV4/CAMKII/AKTシグナル伝達を標的とした、抗腫瘍療法の開発につながる可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the expression and function of TRPV4 in OSCC and to clarify its molecular mechanism. It was suggested that TRPV4 is expressed in tumor lesion of oral cancer pathological specimens and OSCC cell lines, and TRPV4-mediated Ca<sup>2+</sup> intracellular influx activates AKT signaling via CaMKII activation, thereby promoting OSCC cell proliferation.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔がん TRPチャンネル TRPV4 扁平上皮癌

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍では腫瘍実質における DNA の遺伝子異常が原因となり、細胞が自律的に無秩序に増殖する。本邦では、実質の遺伝子異常を標的とする臨床応用が試みられているが、口腔癌では他の癌腫に認められるような遺伝子変異が少ない。そのため、腫瘍実質において、異常に活性化した細胞内シグナル伝達とその異常を引き起こす責任分子を同定する必要がある。

口腔における悪性腫瘍の多くは、上皮組織由来の扁平上皮癌である。癌細胞は動的な状態となっており、増殖能の亢進だけでなく、基底膜を破壊して間質へと浸潤する。この過程において癌細胞は、間質内にて細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) と接し、その相互作用を介して腫瘍が形成されていくと考えられている。口腔癌が進展すると、ECM の硬さが変化して硬結として触知するため、口腔癌の診断を行う上で重要な臨床所見の一つとして知られている。また、最近の研究では、ECM の硬さが増加すると、腫瘍細胞の増殖能や遊走能が増加することが示されている。すなわち ECM の硬さが増加することは、癌の診断だけでなく腫瘍形成においても極めて重要な影響を与えていると考えられている。

Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) は、Ca<sup>2+</sup>透過性の高い非選択的陽イオンチャネルで、物理刺激 (温度・機械刺激) や化学刺激を感知する受容器として同定された。最近、TRPV4 が乳癌や胃癌などの複数の癌において腫瘍形成を制御することについて報告されているが、その詳細な分子基盤は不明である。加えて、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における TRPV4 の発現と機能も不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、OSCC における TRPV4 の発現と機能を検討し、TRPV4 を介したシグナル伝達の OSCC における機能解析を行うことである。

### 3. 研究の方法

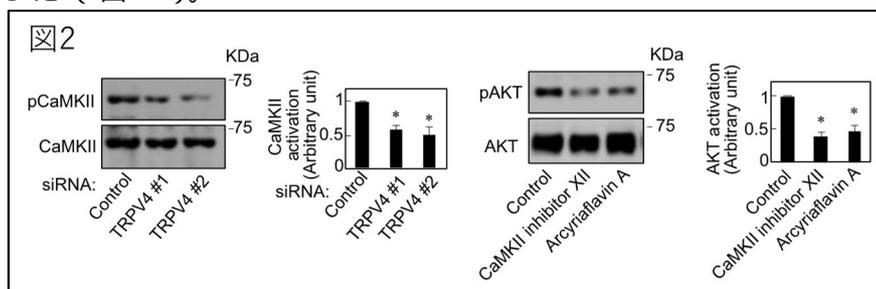
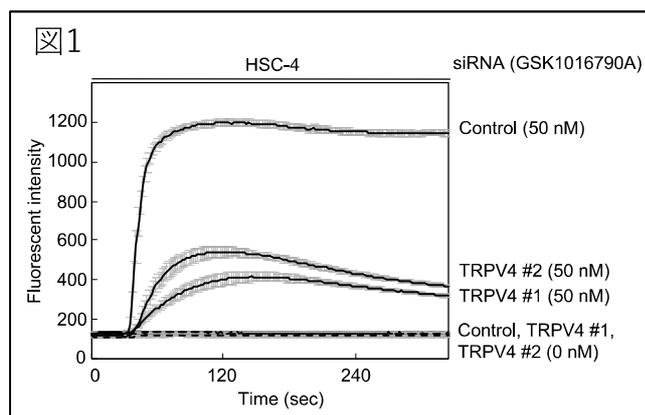
PCR 法を用いて複数の OSCC 細胞株における TRPV4 の発現量を検討した。TRPV4 を高発現する OSCC 細胞株を用いて、TRPV4 を介した Ca<sup>2+</sup>細胞内流入、増殖能、遊走能を検討した。また、western blotting 法を用いて、TRPV4 が CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin 依存性プロテインキナーゼ II) および AKT のリン酸化に与える影響について解析した。さらに、ゼノグラフトモデルによる *in vivo* 実験と、ヒト病理組織標本による検討により TRPV4 の発現と機能について検討した。

### 4. 研究成果

TRPV4 は正常口腔扁平上皮細胞株と比較して、複数の OSCC 細胞株で高く発現しており、アゴニスト依存的な Ca<sup>2+</sup>細胞内流入はその発現に依存していた。また、TRPV4 を発現している OSCC 細胞株において siRNA を用いて TRPV4 を knock down (KD) すると、細胞内 Ca<sup>2+</sup>が減少したことから、内因性 TRPV4 の発現が Ca<sup>2+</sup>チャネルとして機能していると考えられた (図 1)。

さらに、TRPV4 を KD すると、OSCC 細胞株の細胞増殖能と細胞遊走能が低下した。加えて、細胞内外の Ca<sup>2+</sup>をキレートすると、細胞増殖能が低下した。その程度は siRNA を用いて TRPV4 を KD した場合や、siRNA を用いた TRPV4 の KD とキレート剤を併用した場合と同程度であったことから、内因性 TRPV4 の発現が細胞増殖を制御するのに十分であると考えられた。そこで、TRPV4 の下流シグナルについて検討したところ、TRPV4 の KD は、CaMKII と AKT のリン酸化を抑制した (図 2)。

また、shRNA を用いて TRPV4 を恒常的に KD したところ、低接着培養と 2D 培養では増殖能に有意差は認められなかったが、3D 培養における tumor sphere



の大きさと増殖能は減少した (図 3)。これらのことから、TRPV4 は ECM の硬さを含めた細胞外環境を感知して増殖を制御していると考えられた。

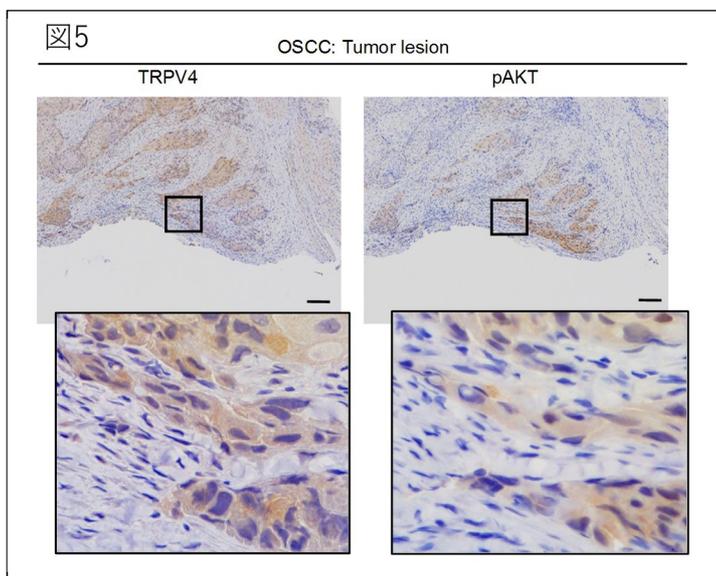
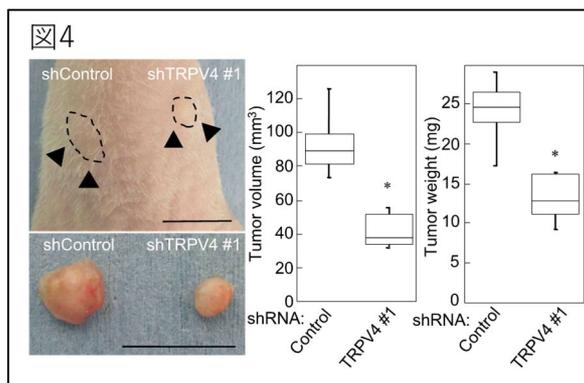
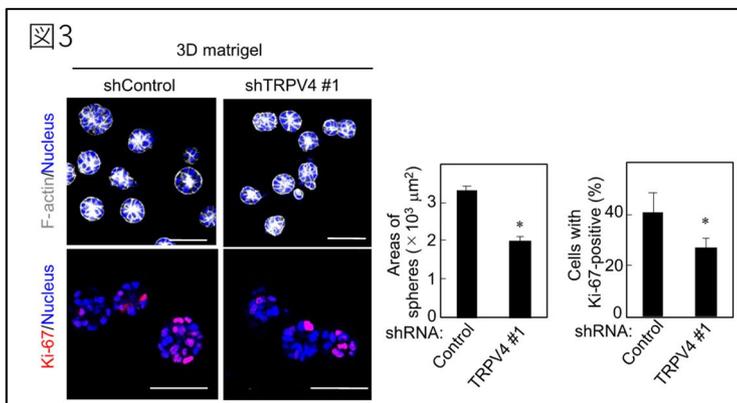
さらに、ヌードマウスを用いたゼノグラフトモデルにて、shRNA を用いて TRPV4 を恒常的に KD すると、腫瘍細胞増殖と AKT のリン酸化が抑制されたことから、TRPV4 の発現は *in vivo* における腫瘍細胞増殖に必要であった (図 4)。

加えて、OSCC 患者 36 例から得られた病理組織標本を免疫組織化学染色にて検討したところ、TRPV4 が非腫瘍部では発現が少なかったのに対し、腫瘍部では細胞膜と細胞質により多く発現しており、TRPV4 の発現を示す細胞には AKT のリン酸化が高頻度に認められた (図 5)。

本研究の結果から、TRPV4 は、複数の OSCC 細胞株および口腔癌病理標本の腫瘍部において高発現しており、*in vitro* と *in vivo* において、Ca<sup>2+</sup>チャネルである TRPV4 が細胞外環境に应答し、CaMKII を介して AKT シグナル伝達を活性化し、OSCC 細胞増殖を促進すると考えられた。そして、腫瘍細胞周囲の細胞外環境によって活性化される TRPV4/CaMKII/AKK シグナル伝達が、OSCC 腫瘍細胞の増殖に寄与していると考えられる (図 6)。

このことは、細胞外環境を OSCC の腫瘍細胞が認識し、細胞増殖を制御する機構の一端を見出したと考えられた。

図 1 ~ 図 5 : The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation より引用、一部改変。



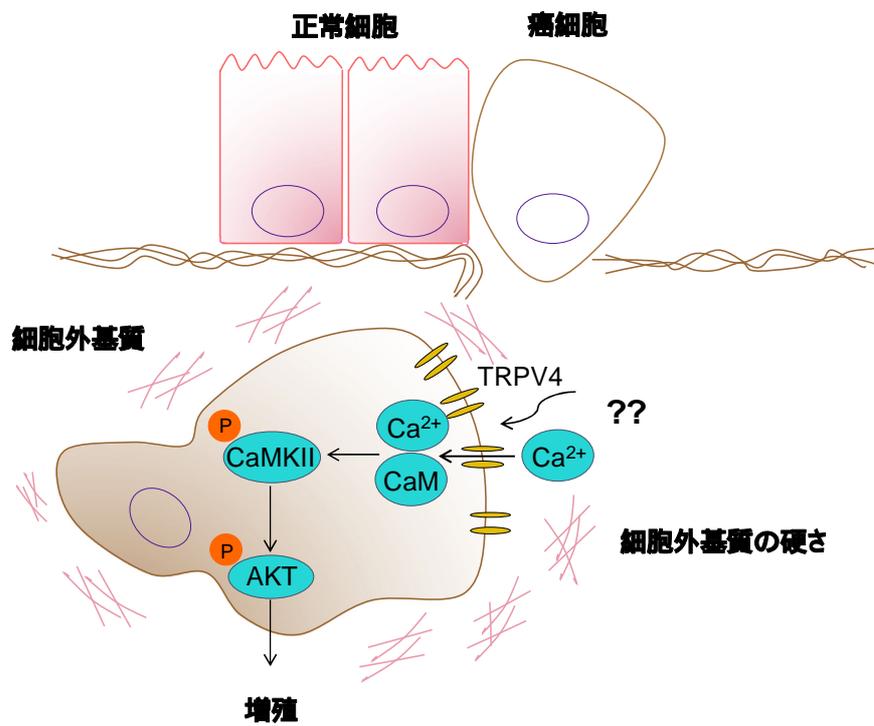


図6 TRPV4/CaMKII/AKTシグナル伝達の様式図

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii S, Tajiri Y, Hasegawa K, Matsumoto S, Yoshimoto RU, Wada H, Kishida S, Kido MA, Yoshikawa H, Ozeki S, Kiyoshima T.	4. 巻 100
2. 論文標題 The TRPV4-AKT axis promotes oral squamous cell carcinoma cell proliferation via CaMKII activation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 311-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-019-0357-z.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田尻 祐大、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 TRPV4を介したカルシウム細胞内流入はCaMKII/AKTシグナル伝達を活性化し口腔扁平上皮癌細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第97回 九大病理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 祐大、藤井 慎介、吉川 博政、清島 保
2. 発表標題 TRPV4はヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第65回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 祐大、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌に高発現した機械受容器TRPV4はCaMKII/AKTシグナル伝達を介して癌細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 祐大、藤井 慎介、大関 悟、清島 保
2. 発表標題 機械受容器TRPV4はヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井慎介、田尻祐大、大関悟、清島保
2. 発表標題 機械受容器TRPV4はヒト口腔癌細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第108回日本病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>口腔顎顔面病態病理学分野（九州大学）  <a href="http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/about/field/field4/field4_01/">http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/about/field/field4/field4_01/</a></p>
--

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	清島 保  (KIYOSHIMA TAMOTSU)  (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤井 慎介  (SHINSUKE FUJII)  (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師    (17102)	
研究分担者	田尻 祐大  (TAJIRI YUDA1)  (30820659)	独立行政法人国立病院機構九州医療センター（臨床研究センター）・その他部局等・歯科・口腔外科 客員臨床研究員    (87105)	

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