

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19203

研究課題名(和文) 口腔癌細胞の浸潤を制御するリソソーム転写因子の同定と生体内動態の解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of biokinetics of a lysosomal transcription factor that controls the infiltration of oral cancer cells

研究代表者

坂元 裕 (Hiroshi, Sakamoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：40836748

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)：癌細胞が患者の生命を奪う最大の要因は浸潤と転移である。我々は独自の研究から、扁平上皮癌の浸潤能と相関する転写因子TFEBを同定した。TFEBはリソソームタンパク質を制御するマスター分子として機能する。本研究の目的は、我々が見出したTFEBの扁平上皮癌による浸潤と転移の関与について、in vitroの実験とin vivoつまりマウス個体を用いて明らかにする事である。まずin vitroの実験で、扁平上皮癌細胞においてTFEBを抑制すれば浸潤能が劇的に低下することを見出した。次にヌードマウス移植した担癌マウスモデルを作製して抗腫瘍効果を比較し、ほぼ同様の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞が患者の生命を奪う最大の要因は浸潤と転移であるが、この2つを防ぐ有効な治療法は未だない。癌細胞におけるリソソーム性プロテアーゼの分泌量と癌細胞の浸潤・転移には強い相関がある事が報告されており、リソソーム性プロテアーゼは癌細胞が周辺組織を浸潤する際に大量に分泌され、癌転移において重要な役割を果たす。従って、本研究の結果より、リソソームのマスター分子として機能するTFEBを制御すれば、癌細胞の浸潤・転移に予防、診断、治療への幅広い応用が可能である。

研究成果の概要(英文)：Invasion and metastasis are the major factors that cause cancer cells to kill patients. From our own research, we identified the transcription factor TFEB, which correlates with the invasion of oral squamous cell carcinoma. TFEB functions as a master regulator that controls various lysosomal proteins. The purpose of this study is to clarify the involvement of invasion and metastasis of TFEB found by squamous cell carcinoma using in vitro experiments and in vivo experiments using mice. First, in vitro experiments showed that suppression of TFEB in squamous cell carcinoma cells dramatically reduced invasion. Next, a cancer-bearing mouse model transplanted with nude mice was prepared and the anti-tumor effects were compared. As a result, almost the same results were obtained.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 リソソーム 浸潤・転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 癌細胞の浸潤・転移を防ぐ治療法は未だ開発されていない

現在日本人の3人に1人が癌で亡くなると言われている。現在の癌治療は細胞増殖を防ぐ薬物が主流である。しかし、癌が患者の生命を奪う最大の要因は浸潤と転移であるが、この2つを防ぐ有効な治療法は未だない。癌細胞が浸潤と転移を起こす際には、癌組織を取り囲む基底層の破壊や分解が最重要事項である。従って、癌浸潤・転移の分子レベルでの解明と細胞外基質の分解の抑制は、浸潤と転移を制御できる新たな治療法の開発に極めて重要である。

#### (2) 癌細胞はリソソーム性プロテアーゼを細胞外へ分泌する

癌細胞が浸潤する時には、細胞外基質分解活性を持つリソソーム性プロテアーゼ(タンパク質分解酵素)を分泌する。癌細胞におけるリソソーム性プロテアーゼの分泌量と癌細胞の浸潤・転移には強い相関がある事が報告されており、リソソーム性プロテアーゼは癌細胞が周辺組織を浸潤する際に大量に分泌され、癌転移において重要な役割を果たす。またタンパク質の分解だけではなく、血管新生因子など種々の癌増殖因子を不活性型から活性型へと変換させるスイッチ因子としても重要である。

#### (3) TFEB はリソソームタンパク質のマスター転写因子である

転写因子 EB (TFEB) は MiTF/TFE ファミリーに属する転写因子であり、リソソームを制御するマスター分子として機能する(図1)。TFEB 遺伝子を細胞に過剰発現すると種々のリソソームやオートファジー関連タンパク質が一斉に増大し、同遺伝子をノックダウンすると逆の現象が観察される(図1)。TFEB はある種の発癌誘発性を有していると報告されている。しかしながら、TFEB の癌細胞における役割については、まだ不明な点が多い。

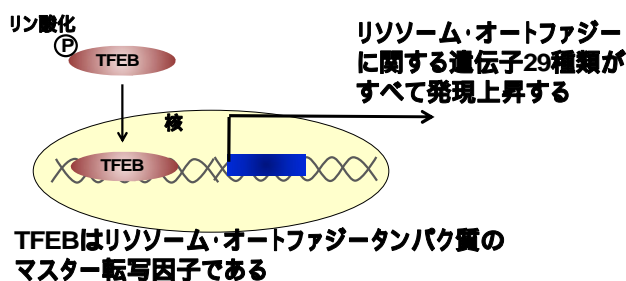


図1: TFEB の機能

### 2. 研究の目的

本研究では癌細胞における TFEB の浸潤と転移の役割について明らかにする。具体的には我々は *in vitro* で6種類の扁平上皮癌細胞を用いて、TFEB のノックダウン実験を行い、浸潤能の影響を試みた。当初、TFEB 遺伝子抑制した癌細胞は転移能が抑制している可能性が高いことが予測された。従って、本研究の目的は、我々が見出した TFEB の扁平上皮癌による浸潤と転移の関与について、*in vitro* の実験と *in vivo* つまりマウス個体を用いて明らかにする事である。

### 3. 研究の方法

口腔扁平癌細胞株である HSC2, HSC3, HSC4, OSC20, SAS, SCC25 に対し、10%FBS および Ham's F-12 Nutrient Mixture 含有ダルベッコ変法イーグル培地で培養を行った。mRNA の発現レベルの解析は定量性リアルタイム PCR (RT-PCR) で、タンパク質レベルの解析はウエスタンブロッティングを行った。TFEB の機能については同遺伝子に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を用いた遺伝子ノックダウンにより実験を行った。増殖能はプレートにて各細胞株を培養して細胞数を計測した。浸潤能は Bio Coat Matrigel invasion chamber を使用し、それぞれ一定時間に透過した細胞数を計測した。接着能は一定時間に接着する細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、クリスタルバイドレットで染色して吸光度 540nm で解析した。形態学的解析では、初期エンドソームのマーカータンパク質として EEA1 をリソソーム/後期エンドソームのマーカータンパク質として LAMP1 の特異抗体を用いて蛍光標識して共焦点顕微鏡で解析した。ヌードマウスを用いた担癌モデルではマウスの皮内・口腔内(舌)・静脈内にコントロール細胞と TFEB ノックダウン細胞を移植した担癌マウスモデルを作製し、抗腫瘍効果を比較した。抗腫瘍効果の評価と並行して、血液学的検査、血液生化学的検査、病理組織学的検査等も実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) TFEB の発現量

各細胞における TFEB の発現量に関して解析した。6種類の細胞の中で HSC2 と HSC4 では TFEB は比較的高い発現が認められたが、HSC3 は殆ど検出できなかった。

#### (2) TFEB ノックダウン実験

HSC2 と HSC4 の2つを用いてノックダウン実験を行い、HSC3 細胞で過剰発現系を作成した。し

かしノックダウン実験は TFEB の発現低下が確認できたが、過剰発現は作製できなかった。増殖能について TFEB ノックダウン細胞とコントロール細胞を用いて比較したが、両者の間に有意な差は認められなかった。共焦点顕微鏡を用いて形態学的解析を行ったところ、TFEB ノックダウン HSC4 細胞ではコントロール細胞に比べてリソソーム/後期エンドソームや初期エンドソームが大きくなっていたが、ゴルジ体の大きさの変化は観察できなかった。

### (3) 浸潤能、遊走能、接着能への影響

浸潤能、遊走能に関しては、TFEB ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べそれぞれ低下していた(図2)。接着能においては、TFEB ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ若干の増加を認めた。

具体的には右の図2は浸潤能のデータを示している。マトリゲル浸潤チャンバーを使用して、コントロールおよび TFEB ノックダウン HSC 細胞の浸潤能を調べた。48 時間のインキュベーション後、マトリゲルを分解して浸潤した細胞数を数えた。TFEB ノックダウン HSC2 細胞の場合、コントロール細胞と比較して有意差は認められなかった(図2A)。これはおそらく、実験誤差が大きいためと考えられた。一方、HSC4 細胞について浸潤した細胞数を比較すると、TFEB ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べて浸潤した細胞数は有意に少なかった(図2B)。

さらに、72 時間のインキュベーション後では、HSC2 および HSC4 細胞において、浸潤した TFEB ノックダウン細胞数は、両方ともコントロール細胞の数よりも有意に少なかった(図2C および D)。これらの結果は、TFEB を欠損すると、扁平上皮癌の浸潤が損なわれる事を示唆している。

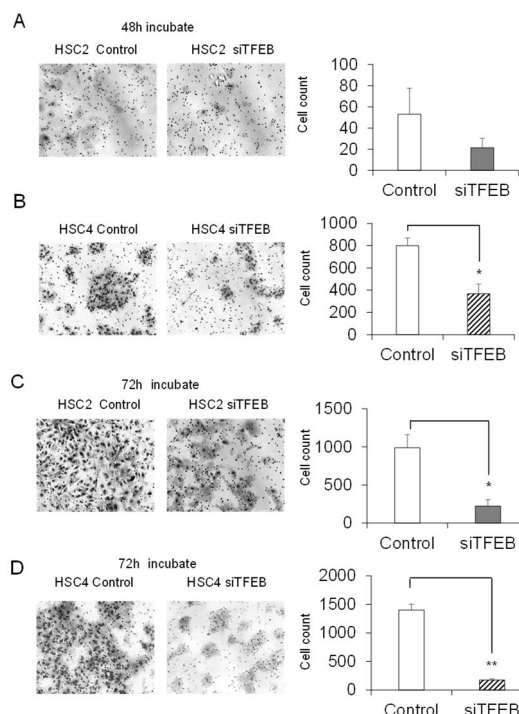


図2： 口腔扁平上皮癌の浸潤能に対する TFEB の効果

マトリゲル侵入チャンバーを使用して評価した。24 ウェルチャンバーを 37 °C で 48 時間または 72 時間培養した。上から下のウェルに侵入した細胞を固定し、メイギムザ溶液で染色した。光学顕微鏡を使用して細胞数を数えた。(A) および (C) は、それぞれコントロールおよび TFEB ノックダウン HSC2 細胞 (B) および (D) は、それぞれコントロールおよび TFEB ノックダウン HSC4 細胞 (A) (B): 48 時間のインキュベーション後のデータ (C) (D): 72 時間のインキュベーション後のデータを示している。各データは、3 回の独立した実験の平均+SD として示す \* $P < 0.05$ , \*\*対照群の  $P < 0.01$ 。

遊走能についてもほぼ同様の結果を得ている。48 時間のインキュベーション後、培養血清に応答した遊走能を測定すると、対照細胞と比較して、TFEB ノックダウンした HSC2 細胞と HSC4 細胞では共に僅かな遊走能の低下を認めた。更に 72 時間のインキュベーション後、コントロール細胞に比べ TFEB を欠損させた HSC2 および HSC4 細胞では、有意に遊走した細胞数が低下していた。

今回 TFEB の TFEB ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ浸潤能、遊走能が低下し、接着能が若干増加していた。TFEB 関与による遊走能の低下は癌細胞共通の特徴であると考えられる。以前の研究では肺癌細胞である A549 や H1299 細胞では TFEB をノックダウンするとスクラッチアッセイによる 2 次元的な遊走能は低下すると報告されていた。今回の口腔扁平癌細胞を使った 3 次元的なトランスウエルを用いた解析で同様の結果が得られた。また TFEB の発現レベルが低下すると浸潤能が低下していた。浸潤能が遊走能およびマトリクス分解能を測定していると仮定すれば、TFEB の低下によりマトリクス分解能も低下していた可能性が考えられる。

### (4) ノードマウスを用いた担癌モデル

ノードマウスの皮下に TFEB ノックダウン細胞とコントロール細胞とを比べたが、増殖能には有意な差は認められなかった。浸潤能に関しては、リンパ節への転移や肺への転移能を解析しているが、個体差が大きいため差異にばらつきが生じている。そのため、皮膚の投与方法や細胞数を変化させ、解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto H, Fujita S, Umeda M, Rokutanda S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Odontogenic gingival epithelial hamartoma with a pleomorphic histological appearance: a case report and review of the literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Oral Maxillofac Surg	6. 最初と最後の頁 1182-1186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2021.01.007.	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 -

1. 著者名 Rokutanda S, Yamada SI, Yanamoto S, Sakamoto H, Furukawa K, Rokutanda H, Yoshimi T, Nakamura T, Morita Y, Yoshida N, Umeda M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Anterior relapse or posterior drift after intraoral vertical ramus osteotomy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60838-1.	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 Rokutanda S, Yamada SI, Yanamoto S, Sakamoto H, Morita Y, Rokutanda H, Kohara H, Yoshimatsu M, Yoshimi T, Nakamura T, Ino-Kondo A, Moriuchi E, Umeda M.	4. 巻 128(6)
2. 論文標題 Effects of the changes in the condylar long axis angle and condylar position on temporomandibular symptoms after intraoral vertical ramus osteotomy: a preliminary study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.	6. 最初と最後の頁 597-605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oooo.2019.08.012.	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂元裕、大鶴光信、柳本惣市、大森景介、梅田正博
2. 発表標題 口腔内出血を契機に発見されたメトトレキセート長期服用由来で重度血小板減少をきたした1例
3. 学会等名 第89回日本口腔外科学会九州支部学術集会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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