

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09912

研究課題名(和文) 新規口腔癌特異的遺伝子であるSTOX2の機能解明と診断・治療への応用の模索

研究課題名(英文) Elucidation of the function of STOX2, a novel oral cancer-specific gene, and its application to diagnosis and treatment

研究代表者

笹平 智則 (Sasahira, Tomonori)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90405374

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)：MIA gene familyは、口腔癌において腫瘍促進性の分泌タンパクとして機能している。申請者らはMIAの新たな下流シグナルとしてSTOX2を見いだしている。

本研究において、STOX2に関連する新たな分泌タンパクとしてSERPINE2とSRPX2を同定した。SERPINE2は口腔癌において血管・リンパ管新生を誘導し、予後不良因子となることが示された。また、SRPX2は血管・リンパ管新生、抗癌剤に対する耐性の獲得に寄与し、リンパ節転移や予後と関連することが明らかとなった。これらの分子を標的とした新たな口腔癌治診断、治療の可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は進行癌と発見されることが多く、予後不良ながんである。また広範囲にわたる手術を余儀なくされるために、術後の機能や審美性が著しく損なわれ、術後のQOLの低下をもたらすことが少なくない。本研究より、STOX2関連シグナル分子を標的とした新たな口腔癌治診断、治療の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The MIA gene family functions as a tumor-promoting secreted protein in oral cancer. The applicants have identified STOX2 as a novel downstream signal of MIA.

In this study, we identified SERPINE2 and SRPX2 as new secreted proteins related to STOX2, which induce angiogenesis and lymphangiogenesis in oral cancer and are poor prognostic factors. SRPX2 contributes to angiogenesis, lymphangiogenesis, and resistance to anticancer drugs, and is associated with lymph node metastasis and prognosis. Targeting these molecules is expected to be a potential new approach for diagnosis and treatment of oral cancer.

研究分野：口腔病理学、口腔腫瘍学

キーワード：口腔癌 MIA gene family 腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

Melanoma inhibitory activity (MIA) gene family はインテグリンを主なりガンドとする腫瘍関連シグナルである。それらのうち MIA は腫瘍促進性であるが、MIA2 は腫瘍抑制性に作用し、MIA gene family の作用は議論の余地が多い。

申請者らは MIA の下流に存在する新規分子として storkhead box protein 2 (STOX2) を同定している。STOX2 は正常の脱落膜に存在しており、その発現異常は子宮内胎児発育不全に関与するが、その機能については数篇の報告があるのみである。口腔癌において、STOX2 は MIA を介したパラクライン機構により活性化され、口腔癌細胞の増殖・浸潤能、多剤耐性能やアポトーシス抵抗性の獲得、がん微小環境の成立に関与する。然しながら、本来であれば抑制性の機能を有していると考えられる STOX2 が、口腔癌ではなぜ腫瘍促進性に作用するのかは不明であり、がんにおける STOX2 の詳細な機能と役割を解明することは不可欠であると考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では STOX2 に関連したシグナルを明らかにし、それらの腫瘍微小環境への影響、発現調節メカニズム等の詳細について解明し、分子標的や腫瘍マーカーとしての有用性を模索する。以下に主な目的を列記する。

- (1) STOX2 関連シグナルの腫瘍微小環境や転移の成立への影響
- (2) 口腔癌細胞における STOX2 の発現調節機構や関連シグナル
- (3) 口腔癌患者の腫瘍細胞、血中、唾液中で STOX2 関連シグナルの発現レベル

## 3. 研究の方法

### in vitro での STOX2 ならびに関連シグナルの機能解析

#### 【RNA-Seq 解析】

STOX2 の機能を明らかにするために関連シグナルを同定することは不可欠である。STOX2 を発現している 7 種類の口腔癌細胞株を用い、shRNA による STOX2 ノックダウン処理群とコントロール群で発現変化される遺伝子群を RNA シークエンシングにより網羅的に抽出する。これにより STOX2 関連シグナルの全貌を明らかにする。

#### 【STOX2 関連シグナルの機能解析】

上記解析により抽出された主な STOX2 関連シグナルを過剰発現ないし発現抑制した口腔癌細胞株を作製し、増殖/浸潤/遊走能、アポトーシス誘導能・薬剤耐性能等への影響を調べる。これらの解析を通して STOX2 関連シグナルの詳細な機能を解明する。

また申請者らは STOX2 が口腔癌の微小環境の形成や腫瘍免疫に関与することを見いだしている。網羅的発現解析の結果をもとに、口腔癌細胞株と間質系細胞の共培養の系を用いた STOX2 ならびに関連シグナルの血管・リンパ管新生能、腫瘍免疫能、線維芽細胞への影響を検討する。さらに FACS 等により STOX2 が免疫細胞へ及ぼす役割もあわせて解析する。

### 臨床検体による発現解析

#### 【パラフィン切片からの免疫組織化学・リアルタイム RT-PCR】

STOX2 関連シグナルの口腔癌における臨床病理学的な意義を明らかにするため、パラフィン切片から市販抗体を用いた免疫組織化学を行う。またパラフィン切片からレーザーマイクロダイクセクションにより分離した癌細胞ならびに間質組織から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行う。症例数は研究期間全体で 400 症例を目標とする。

#### 【血清・唾液を用いた発現解析】

STOX2 は分泌能を有する可能性があり、STOX2 関連シグナル中にも新規の分泌タンパクが含まれていることが期待される。パラフィン切片から発現解析を実施している同一患者と健常者 100 例から血清・唾液を採取する。STOX2 ならびに関連シグナルの発現、分泌レベルを ELISA 法、リアルタイム RT-PCR 法にて解析する。なお ELISA の検出系は市販のキットを使用する。これらにより腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 新たな STOX2 関連シグナル

STOX2 に関連する新たな分子として serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2 (SERPINE2) と sushi Repeat Containing Protein X-Linked 2 (SRPX2) を見いだした。SERPINE2 はがんの種類によって促進的にも抑制的にも作用することが報告されており、その機能は不明な点が多い。また、SRPX2 は uPAR のリガンドとして作用することで血管内皮細胞の増殖や管腔形成を促し、また、がんにおいては HGF と相互作用することで血管新生を促進することが知られている。しかし、

口腔癌における機能はよく分かっていない。

申請者らは SERPINE2 ならびに STOX2 の口腔癌における役割について検討したところ、以下の知見が得られた。

### (2) SERPINE2 の機能

・口腔癌細胞株を用いた検討において、培養上清中から SERPINE2 が検出されたことより、SERPINE2 は分泌タンパクであることが示唆された。SERPINE2 の発現を抑制した細胞株では増殖能、浸潤能が抑制されており、また、口腔癌細胞株と血管内皮細胞である HUVEC、リンパ管内皮細胞である HDLMVEC との相互作用により、口腔癌細胞と内皮細胞の接着能ならびに管腔形成能も阻害されることが明らかとなった、また、SERPINE2 の発現抑制により培養上清中への分泌レベルも減少した。以上より、SERPINE2 は分泌タンパクとして作用することで、口腔癌の増殖、浸潤、リンパ管新生・血管新生 (図 1) に関与している可能性が示唆された。

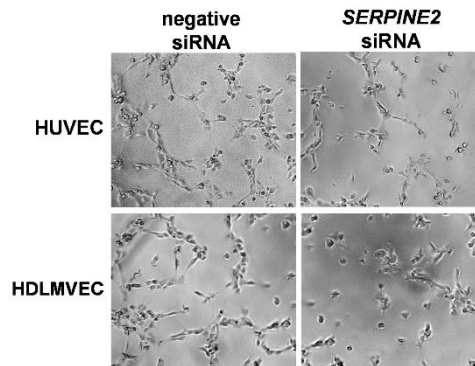


図 1 SERPINE2 による管腔形成能

・口腔癌患者に由来する検体を用いてリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行ったところ、正常粘膜と比較して SERPINE2 の発現レベルは口腔癌において有意に上昇していた。ELISA により腫瘍中への分泌レベルを測定したところ、口腔癌では SERPINE2 の分泌レベルが高かった (図 2)。167 例の口腔癌検体を用いた免疫組織化学において、SERPINE2 の発現は浸潤の深さ、リンパ節転移、微小血管・リンパ管密度 (MVD, LVD)、予後 (図 3) と有意に関連しており、多変量解析により独立した予後不良因子となることが明らかとなった。

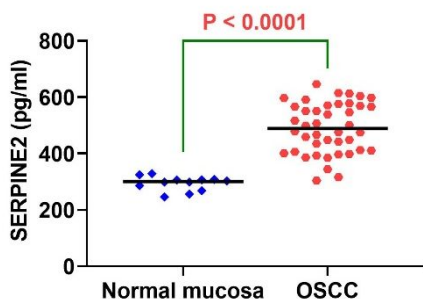


図 2 口腔癌における SERPINE2 の分泌レベル

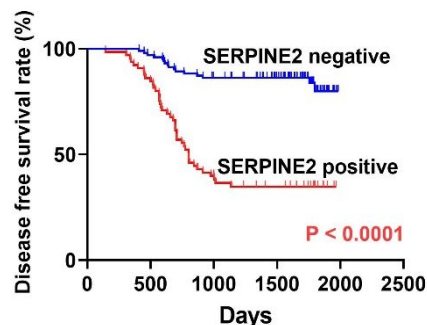


図 3 SERPINE2 の発現と口腔癌の予後

### (3) SRPX2 の機能

・口腔癌細胞株を用いた検討において、SRPX2 は分泌タンパクであることが示され、培養上清中への分泌レベルは uPAR や HGF 処理を併用することにより増強された。また、SERPINE2 の発現を抑制することで、口腔癌細胞株と内皮細胞の相互作用ならびに血管・リンパ管新生能が阻害されるが、その働きは uPAR や HGF 処理により減弱することが明らかとなった (図 4)。また、白金製剤に対する薬物耐性の獲得にも寄与していた (図 5)。以上より、SRPX2 は uPAR ないし HGF と相互作用することで分泌タンパクとして作用し、口腔癌のリンパ管新生・血管新生、治療反応性に関与している可能性が示唆された。

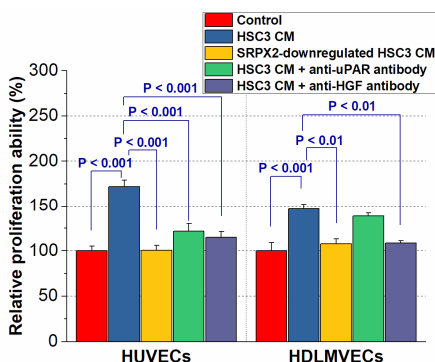


図 4 口腔癌細胞における SRPX2 と脈管新生能

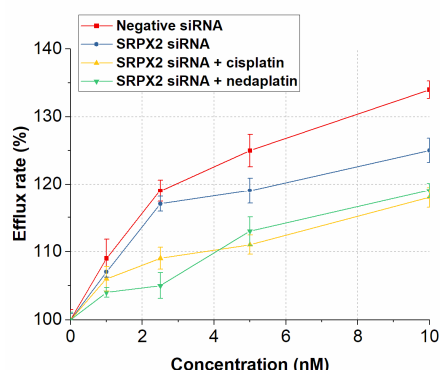


図 5 口腔癌細胞での SRPX2 と薬物耐性

・161例の口腔癌検体を用いた免疫組織化学をおこなったところ、リンパ節転移症例においてSRPX2は高い発現を示しており、さらに、SRPX2を発現する症例では有意に微小血管・リンパ管密度(MVD, LVD)が高かった。また、SRPX2を発現する症例はそうでない症例と比較して予後不良であった。リアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析では、正常粘膜より口腔癌においてSRPX2の発現が高く、また、SRPX2の発現レベルはuPARおよびHGFの発現レベルと正の相関を認めた。

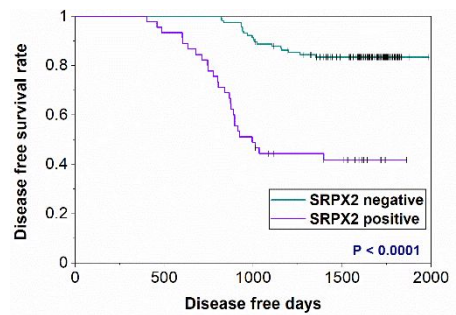


図6 SRPX2の発現と口腔癌の予後

以上より、SRERPINE2とSRPX2は口腔癌において腫瘍促進性の機能を有しており、これらを標的とした新たな診断、治療システムの開発に繋がる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Shimomura H, Kirita T	4. 巻 26
2. 論文標題 SERPINE2 is an oral cancer-promoting factor that induces angiogenesis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1831-1839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-01970-4.	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 該当する
1. 著者名 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Shimomura H, Bosserhoff AK, Kirita T	4. 巻 147
2. 論文標題 Identification of oral squamous cell carcinoma markers MUC2 and SPRR1B downstream of TANGO	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1659-1672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-021-03568-9.	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 該当する
1. 著者名 Kurihara-Shimomura Miyako, Sasahira Tomonori, Shimomura Hiroyuki, Bosserhoff Anja, Kirita Tadaaki	4. 巻 56
2. 論文標題 Mast cell chymase promotes angiogenesis and lymphangiogenesis mediated by activation of melanoma inhibitory activity gene family members in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1093-1100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.4996	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
1. 著者名 Sasahira Tomonori, Kurihara-Shimomura Miyako, Nishiguchi Yukiko, Shimomura Hiroyuki, Kirita Tadaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Sushi Repeat Containing Protein X-linked 2 Is a Downstream Signal of LEM Domain Containing 1 and Acts as a Tumor-Promoting Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3655 ~ 3655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103655	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 Kurihara-Shimomura Miyako, Sasahira Tomonori, Shimomura Hiroyuki, Kirita Tadaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Peroxisomal Peroxidase Deficiency Plays a Tumor-Promoting Role in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5416 ~ 5416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21155416	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 嶋 香織、近藤智之、別府真広、杉浦 剛、笹平智則
2. 発表標題 顎下部腫瘍
3. 学会等名 第32日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤智之、嶋 香織、吉村卓也、野添悦郎、中村典史、笹平智則
2. 発表標題 診断に苦慮した頬粘膜 mucoepidermoid carcinoma の一例
3. 学会等名 第3回南九州歯学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野裕右、石畑清秀、岐部俊郎、嶋 香織、近藤智之、淵上貴央、野添悦郎、笹平智則、中村典史
2. 発表標題 当科開設後40年間の新分類(WHO: 2017年)による歯源性腫瘍の臨床統計的検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笹平智則、栗原 都、下村弘幸、桐田忠昭
2. 発表標題 SRPX2はLEMD1の下流シグナルであり、口腔癌において腫瘍促進性に作用する新規分子である
3. 学会等名 第31回日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹平智則、栗原 都、下村弘幸、桐田忠昭
2. 発表標題 SRPX2は口腔癌における新規腫瘍促進因子である
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下村弘幸、栗原 都、桐田忠昭、笹平智則
2. 発表標題 NCAPH1は口腔癌のリンパ管新生、抗癌剤耐性に関与する
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗原 都、笹平智則、桐田忠昭
2. 発表標題 Mast cell chymaseはMIA gene familを介した脈管新生を促進する
3. 学会等名 第39日本口腔腫瘍学会総会
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	栗原 都  (Kurihara Miyako)  (40453170)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員   (24601)	
研究 分担者	桐田 忠昭  (Kirita Tadaak)  (70201465)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	

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