

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10096

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の微小環境 - 癌細胞間シグナルの解明とその制御強化による新規治療戦略

研究課題名（英文）Analysis of the signal pathways between oral squamous cell carcinoma cells and surrounding microenvironment as novel therapeutic target for novel anti-cancer therapy

研究代表者

清島 保 (Kiyoshima, Tamotsu)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20264054

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）：近年、癌微小環境変化による癌形質への影響が予想されている。しかし、口腔扁平上皮癌（OSCC）における分子機構は未だ不明である。本研究では、OSCC周囲の微小環境変化による癌形質へ影響するシグナル連関の解明を目的とした。

OSCC由来細胞株におけるYAPシグナルの活性化を確認し、PIEZO1発現制御および細胞増殖との関係、癌形質変化への関与が示唆された。OSCCの希少variantを用いてキャラクタリゼーションを行い、SCC関連マーカーの発現低下にはエピジェネティックな制御が関与し、細胞形態に変化が現れた。また、網羅的遺伝子発現変化の検索にて挙げた特定因子の発現調節機構の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍は遺伝子異常の蓄積により生じる。一方、癌微小環境変化による癌形質への影響も予想される。しかし、OSCCにおける詳細な分子機構は不明である。そこで、本研究ではOSCC周囲の癌微小環境変化により癌形質へ影響する重要な分子やシグナル経路を解明し、細胞内・細胞間シグナル連関を検討した。また、OSCCにおけるYAPシグナルの活性化や関連因子の変化によりOSCCの細胞増殖や細胞異型などの癌形質への変化に影響することや特定因子の発現調節機構の一部を明らかにした。これらの研究成果が手掛かりとなり、新たな癌形質判定法や癌形質を調節する補助併用療法の開発へと繋がると思われる。

研究成果の概要（英文）：Recently, the changes in the cancer microenvironment have been predicted to affect the cancer behaviors and characteristics. However, the molecular mechanisms in oral squamous cell carcinoma (OSCC) are unknown. The aim in this study was to elucidate the signaling cascades that affect cancer behaviors and characteristics due to changes in the microenvironment surrounding OSCC.

The results of examinations suggested that activation of YAP signaling in OSCC may induce PIEZO1 expression, resulting in the behaviors and characteristics of OSCC. The rare variant of OSCC shows downregulation of several markers of SCC-associated intracellular signaling pathways, which are associated with cellular atypical changes through altered epigenetic regulation. In addition, a comprehensive analysis in gene expression partially revealed the regulatory mechanisms of some of the factors identified.

研究分野：口腔病理学

キーワード：癌微小環境 癌形質変化 口腔扁平上皮癌 細胞集団浸潤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

浸潤・転移において上皮間葉転換 (EMT) は重要な特性で、治療標的としての研究が盛んである。近年、癌周囲の細胞外基質 (ECM) の硬さが、癌形成や浸潤に影響を及ぼすことが報告され (Levental *et al.*, Cell, 2009; Mouw *et al.*, Nat Med, 2014; Maheswaran & Haber, Nature, 2015)、我々も口腔扁平上皮癌 (OSCC) 周囲の ECM の硬さが癌形質 (細胞増殖や細胞移動他) に影響することを見出している (Fujii *et al.*, Lab Invest, 2020)。しかし、OSCC における詳細な分子機構は不明である。

ECM の硬さを変えた OSCC 細胞株の網羅的検索にて、我々は Eph-ephrin やサイトケラチン (CK) の変動を確認している (Tanaka *et al.*, J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 2020; Mikami *et al.*, J Cancer Res Clin Oncol, 2017; Naher *et al.*, Int J Oncol, 2012) が、今回確認された CK は過去に報告されておらず、癌形質へ影響を検索することで新たな知見が期待される。

近年、転移が EMT に依らない場合も示唆されており (Maheswaran & Haber, Nature, 2015)、浸潤先端部では数個の癌細胞が集まった “集団浸潤” をしばしば観察する。“集団浸潤” はアノキス抵抗性に有利であり、細胞集団移動には Eph-ephrin や CK が重要である。そこで EMT の研究に加え、癌細胞の “集団浸潤” 機構の解明は、治療標的の選択肢を広げる可能性がある。

上記背景から、本研究では OSCC 周囲の ECM の硬さにより癌形質へ影響する重要な分子やシグナル経路を、Eph-ephrin シグナルや CK 発現変化に着目して解明し、細胞内・細胞間シグナル連関の検討と “集団浸潤” 機構の解明を目的とする。さらに研究成果に基づく癌形質判定法や癌形質を調節する補助併用療法の開発の手掛りを探る。

### 2. 研究の目的

以下の研究項目を展開し、癌形質判定法や治療法の手掛りを探る。

- (1) 癌微小環境変化による関連因子の発現変化と癌形質変化の解析
- (2) 病理組織標本を用いた関連因子および標的候補因子の臨床病理学的検索
- (3) 関連因子の発現変化による癌細胞の集団浸潤機構の解析

### 3. 研究の方法

- (1)- 病理組織標本や OSCC 細胞株を用いて OSCC における Hippo-yes-associated protein (YAP)/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) 伝達経路 (Hippo-YAP/TAZ 伝達経路) の活性化と、その伝達経路と癌微小環境変化の受容関連因子との関与を検索した。
  - Hippo-YAP/TAZ 伝達経路が活性化させた実験系を用いて遺伝子発現に影響を受ける、あるいは受けないサイトケラチン (CK) を含む因子の検索を行った。
- (2)- 非腫瘍部、初期癌化部および癌浸潤部領域において差別的発現をする遺伝子を解析するため、病理標本の各領域から RNA 抽出を行い、各領域間における差別的遺伝子発現について DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行った。

- i)-1, -2 や ii)-1 で挙げた候補因子や関連因子に対して、病理組織標本を用いた免疫組織化学染色を行った。
  - 非常に稀な OSCC の variant のキャラクターゼーションを免疫組織化学的検索と通常型 OSCC と比較して発現変化を認めた因子を OSCC 細胞株にて発現調節を行い、癌形質の変化を解析した。
- (3) 関連因子の発現変化による癌細胞の集団浸潤機構の解析を行うため、細胞形質変化の評価を試みた。有意な変化が確認された形質転換細胞における活性化シグナル経路の検索に取り組んだ。

#### 4. 研究成果

- (1)- siRNA や阻害剤による loss-function 実験や、OSCC 患者から採取した組織標本の免疫組織化学的解析によって Hippo-YAP/TAZ 伝達経路が OSCC の細胞増殖への関与が示された。次に、Hippo-YAP/TAZ 伝達経路の転写標的として Ca<sup>2+</sup>チャネルの Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (PIEZ01) が同定された。OSCC 細胞において PIEZ01 アゴニスト依存性の Ca<sup>2+</sup>細胞内流入および細胞増殖に PIEZ01 の上昇が必要であった。核/細胞質における YAP の過剰発現は、PIEZ01 と Ki-67 が高発現する癌領域で免疫組織化学的に検出された。これらの結果から Hippo-YAP/TAZ-PIEZ01 連関が OSCC の細胞増殖の促進に関与していることが示唆された (Hasegawa *et al.*, J Pathol, 2021)。
- Hippo-YAP/TAZ 伝達経路が活性化させた実験系を用いて遺伝子発現に影響を受ける、あるいは受けないサイトケラチン (CK)を含む因子の検索を行い、636 遺伝子に発現上昇を認め、351 遺伝子に発現減少がみられた。OSCC 細胞株において遺伝子発現に影響を受ける、あるいは受けない因子の遺伝子発現を確認した。また、候補として挙げてきた因子の遺伝子および関連因子の発現調節機構の一部を明らかにした。
- (2)- 非腫瘍部、初期癌化部および癌浸潤部領域において差別的発現をする遺伝子を解析するため、病理標本の各領域から RNA 抽出を行い、各領域間における差別的遺伝子発現について DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的解析等により、p63 の発現上昇、MEK/ERK-MAPK 経路の活性化が初期癌化部および癌浸潤部領域において認められた。免疫組織化学的解析にて p63 が初期癌化部で発現上昇し、ERK は浸潤癌病変で順次活性化されることが明らかになった。ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4c (ARL4C)の発現は、OSCC 細胞において p63 および/または MEK/ERK-MAPK 経路によって誘導され、腫瘍形成を促進することが報告されており、病理標本においても ARL4C は初期癌化部よりも癌浸潤部領域でより頻繁に検出された。さらに、浸潤癌病変では、ARL4C とリン酸化 ERK が結合していることが多かった。因子間の段階的な活性化が、ARL4C の発現制御を介して OSCC 腫瘍細胞の増殖への関与が示唆された (Alkhatib *et al.*, Pathol Res Pract, 2023)。
- i)-1, -2 や ii)-1 で挙げた候補因子や関連因子に対して、病理組織標本を用いた免疫組織化学染色を行った (Hasegawa *et al.*, J Pathol, 2021; Hasegawa *et al.*, Pathol Res Pract, 2022; Alkhatib *et al.*, Pathol Res Pract, 2023)。

- 非常に稀な OSCC の variant である、明細胞扁平上皮癌 (clear cell SCC; CCSCC) のキャラクターゼーションを行った。本症例は、切除後再発し、頸部リンパ節と両肺に転移を来した予後不良であった。用いた CCSCC は従来の SCC に部分的に取り囲まれており、免疫組織学および病理組織学的に、高 Ki-67 指数、分裂像の増加、核の肥大を伴う細胞の異型性を示していた。p40 (p63 のアイソフォーム)、ARL4C、YAP 及び 5-メチルシトシン (5mC) の発現が低下していたが、非腫瘍領域と比較して ARL4C 発現は上昇し、YAP の核転移を確認した。また、OSCC 細胞株において p63 の発現が ARL4C の発現に必要であり、p63 および YAP/PDZ 結合モチーフを持つ TAZ シグナルによって DNA メチル化が誘導される可能性が認められた。細胞内シグナル伝達経路が抑制されている CCSCC は、エピジェネティックな制御が変化しており、SCC の未分化型として特徴づけられることが示唆された (Hasegawa *et al.*, *Pathol Res Pract*, 2022)。

- (3) 関連因子の発現変化による癌細胞の集団浸潤機構の解析を行うため、細胞形質変化の評価を試み、一部結果を得た。有意な変化が確認された形質転換細胞における活性化シグナル経路の検索に取り組み、一部結果を得た。

癌微小環境変化による関連因子の発現変化と癌形質変化の解析を通して、細胞内・細胞間シグナル連関が徐々に解明されることにより、“集団浸潤”機構の解明に近づいたかと思われる。これらの研究成果に基づいて、今後新たな癌形質判定法や癌形質を調節する補助併用療法の開発の手掛りを探る。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13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 Fujii S, Hasegawa K, Maehara T, Kurppa KJ, Heikinheimo K, Warner KA, Maruyama S, Tajiri Y, Nor JE, Tanuma JI, Kawano S, Kiyoshima T.	4. 巻 254
2. 論文標題 Wnt/ -catenin-C-kit axis may play a role in adenoid cystic carcinoma prognostication	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 155148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2024.155148.	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 Alkhatib DZR, Thi Kim Truong T, Fujii S, Hasegawa K, Nagano R, Tajiri Y, Kiyoshima T.	4. 巻 246
2. 論文標題 Stepwise activation of p63 and the MEK/ERK pathway induces the expression of ARL4C to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 154493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2023.154493.	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 Fujii S, Kiyoshima T.	4. 巻 73
2. 論文標題 The role of Wnt, ARL4C, and Sema3A in developmental process and disease pathogenesis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 217-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13325.	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 Nagano R, Fujii S, Hasegawa K, Maeda H, Kiyoshima T.	4. 巻 630
2. 論文標題 Wnt signaling promotes tooth germ development through YAP1-TGF- signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 64-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.012	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 -

1. 著者名 Fujii S, Fujimoto T, Hasegawa K, Nagano R, Ishibashi T, Kurppa KJ, Mikami Y, Kokura M, Tajiri Y, Kibe T, Wada H, Wada N, Kishida S, Higuchi Y, Kiyoshima T.	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 153991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.153991	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 Hasegawa K, Fujii S, Kurppa KJ, Maehara T, Oobu K, Nakamura S, Kiyoshima T.	4. 巻 235
2. 論文標題 Clear cell squamous cell carcinoma of the tongue exhibits characteristics as an undifferentiated squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Res Pract.	6. 最初と最後の頁 153909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.153909	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 Kawano S, Hattori T, Mikami Y, Chikui T, Kawazu T, Sakamoto T, Maruse Y, Tanaka S, Hamada E, Hiwatashi M, Shiraishi Y, Oobu K, Kiyoshima T, Nakamura S.	4. 巻 52
2. 論文標題 Prediction of nodal metastasis based on intraoral sonographic findings of the primary lesion in early-stage tongue cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Oral Maxillofac Surg.	6. 最初と最後の頁 515-523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2022.08.021	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 Fujii S, Ishibashi T, Kokura M, Fujimoto T, Matsumoto S, Shidara S, Kurppa KJ, Pape J, Caton J, Morgan PR, Heikinheimo K, Kikuchi A, Jimi E, Kiyoshima T.	4. 巻 256
2. 論文標題 RAF1-MEK/ERK pathway-dependent ARL4C expression promotes ameloblastoma cell proliferation and osteoclast formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 119-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5814.	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 Hasegawa Kana, Fujii Shinsuke, Matsumoto Shinji, Tajiri Yudai, Kikuchi Akira, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 253
2. 論文標題 <scp>YAP</scp> signaling induces <scp>PIEZ01</scp> to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 80 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5553.	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16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤井 慎介、Dania Zuhier Ragheb Alkhatib、Thinh Thi-Kim Truong、長谷川 佳那、長野 良子、清島 保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるp63とMAPKシグナルによる低分子量Gタンパク質ARL4Cの発現制御機構解明
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 慎介、自見 英治郎、清島 保
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質ARL4Cの発現はエナメル上皮腫における腫瘍 細胞増殖と破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌においてp63シグナルはYAPシグナルと協調的に細胞内シグナルおよびDNAメチル化を制御する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長野 良子、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 Wnt経路はYAP1-TGF- 経路を介して歯胚の発生を促進する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本 龍史、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 唾液腺発生と腺様嚢胞癌腫瘍形成における軸索誘導因子Semaphorin 3A (Sema3A)の役割の解明
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 慎介、自見 英治郎、清島 保
2. 発表標題 エナメル上皮腫における低分子量Gタンパク質ARL4Cの発現は腫瘍細胞増殖と破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔癌においてYAPシグナルは異型性および上皮間葉転換を誘導する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 長谷川 佳那、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 未分化な扁平上皮癌の特徴を有する舌に生じた clear cell squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会（3学会合同学術大会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井慎介、長谷川佳那、清島保
2. 発表標題 YAP-PIEZO1シグナルは口腔扁平上皮癌の細胞増殖を制御する
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本龍史、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 軸索誘導因子Sema3Aによる唾液腺形態形成および腺様嚢胞癌の増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川佳那、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 YAP-PIEZO1シグナルは口腔扁平上皮癌の細胞増殖を促進する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井慎介、清島保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における「腫瘍実質-間質連関」による細胞増殖制御機構 の解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川佳那、藤井慎介、清島保
2. 発表標題 Hippo-PIEZO1 signal regulates cell proliferation in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020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	藤井 慎介  (Fujii Shinsuke)  (60452786)	九州大学・歯学研究院・講師   (17102)	
研究分担者	和田 裕子  (Wada Hiroko)  (70380706)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	
研究分担者	長谷川 佳那  (Hasegawa Kana)  (30793989)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	

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			
フィンランド	University of Turku	Abo Akademi University	Turku University Hospital	
米国	University of Michigan	Massachusetts General Hospital	Harvard Medical School	