

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18314

研究課題名（和文）頭頸部扁平上皮癌浸潤・転移におけるNHE1に関する検討

研究課題名（英文）The effect of NHE1 for invasion and metastases in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

木谷 卓史（Kitani, Takashi）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00568909

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：癌の転移という現象の全貌は未だ不透明である。癌の転移に寄与する因子は多数報告されているが、転移自体を標的とした治療は実用化の段階にない。今回我々は先行研究により頭頸部扁平上皮癌の転移への関与が判明した2つの因子、ナトリウムプロトン交換輸送体1（NHE1）およびリジルオキシダーゼ様因子2（LOXL2）を同時に抑制し、より効率的な転移抑制を目指した。ヒト舌扁平上皮癌細胞株を移植することで作成したマウスにおいて、これらの2つの因子を同時に抑制した群では、非抑制群と比較して統計学的有意差を持って転移率の低下が見られた。機序の異なるふたつの因子の同時抑制によるより高い転移抑制が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、NHE1を治療標的とすることでいまだ実用化の例のない「転移抑制治療」開発に挑む大きな研究の一部をなしている。転移抑制治療は従来の腫瘍細胞を殺傷することを目指す癌治療とは治療戦略が異なる。したがって両者を組み合わせることで、より効果的な相加的效果あるいは相乗的效果を持つ新規がん治療の創出を企図しているという点において、高い社会的意義を持っている。

研究成果の概要（英文）：The full picture of the phenomenon of cancer metastasis is still unclear. Although many factors have been reported to contribute to cancer metastasis, therapies targeting metastasis itself have not yet been developed for practical use. In this study, we aimed to inhibit metastasis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) more efficiently by simultaneously inhibiting two factors, Na⁺/H⁺ exchanger-1 (NHE1) and lysyl oxidase-like-2 (LOXL2), which were found to be involved in HNSCC metastasis in previous studies. In mice transplanted with a human tongue squamous cell carcinoma cell line, a statistically significant reduction in metastasis rate was observed in the group in which these two factors were simultaneously suppressed compared to the negative control group. The simultaneous suppression of these two factors, which have different mechanisms, is expected to suppress metastasis to a higher degree.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 リンパ節転移 NHE1 LOXL2 転移抑制治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

癌の脅威はその転移によるところが大きい。これに対し、細胞増殖の制御を宿命として背負う申請者らのような多細胞生物体は、組織構築の破綻を防ぎ、癌の進行に対して制限をかける多くの機構を持ってその組織構築を維持している。そのため癌細胞といえども転移に成功することは容易ではなく、実際に転移先臓器においてマクロ転移巣の形成にまで至るものは、潜在的に転移能をもつ腫瘍細胞のうちわずか 0.02% にとどまるとの試算もなされている (Cell, 147, 275-292, 2011)。頭頸部扁平上皮癌は転移標的として第一にリンパ節を好適部位とし、それはほぼ必ず遠隔転移に先立つ、という点で最初から肺などへの遠隔転移を起こしやすい腺癌などとは異なっている。したがって、このリンパ節転移を抑止できれば、予後の著明な改善につながると期待される。腫瘍細胞の原発巣からの遊離は転移の初期過程であるため、腫瘍細胞の周辺非癌組織中への浸潤を抑制することが転移の抑制において有効であると考えられているが、頭頸部扁平上皮癌においては、その浸潤・転移形質獲得の機序に関する報告がまだまだ少ない。癌の転移に至る腫瘍細胞の運動として、癌細胞が集団で移動して転移に至る collective migration の重要性への認識が近年高まっているが (Int. J. Mol. Sci, 13, 4564-4590, 2012)、申請者らは細胞内 pH の制御因子であるナトリウムイオン・プロトン交換輸送体 1 (NHE1) がヒト頭頸部扁平上皮癌において過剰発現していることを見出し、過剰発現した NHE1 が collective migration に関与することを報告してきた (Biochem. Biophys. Res. Commun, 22, 101-107, 2017)。

また、転移に成功する癌細胞は、いわば「巧みに」、転移標的となる組織を転移に先立って転移に好適に誘導・改変し、生体防御系細胞からの排除を逃れると考えられる事例が示されてきている。申請者らは、頭頸部扁平上皮癌が転移に先立って引き起こす分子イベントの解析より、前転移期に発現が上昇する分泌性因子として TGF および LOXL2 を見出した (Oral Oncology, 48, 663-670, 2012)。さらに申請者らはこれまでの検討で NHE1 ノックダウンにより活性化 TGF が減少することを確認しており、NHE1 は腫瘍の浸潤への寄与を通じてのみならず、リシルオキシダーゼ様因子 2 (LOXL2) など他の分泌性因子の活性化を通じて転移に寄与している可能性があり、新規の治療標的となるに値する分子であると考ええる。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌における転移カスケードに寄与すると考えられる NHE1, LOXL2 の阻害による転移抑制をめざす。また、複数因子同時抑制の試みはこれまでに報告されておらず、その効果について検証する。

3. 研究の方法

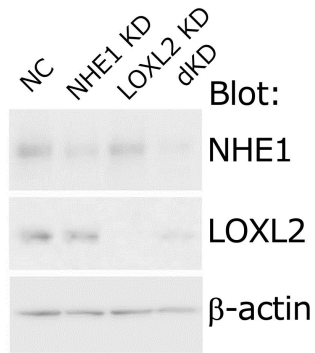
NHE1 および LOXL2 それぞれの ノックダウンによるリンパ節への転移性の減弱を先行研究において確認しており、これらの分子両方を阻害することで相加的な転移性減弱が期待できる。まず予備的研究として樹立した高転移株 (SASL1m) において NHE1 と LOXL2 両方のノックダウン (dKD) による転移性減弱の評価を行い、その後、NHE1 または LOXL2 単独 KD との差を検証する。

4. 研究成果

ヒト舌扁平上皮癌細胞株である SAS 細胞を元に転移性をより高めた SASL1m を作成し、ウイルスベクターにより shRNA を導入することでそれぞれの因子についてノックダウンし、ネガティブコントロール (NC) と 2 種類の単独 KD、そして dKD の計 4 種類の細胞を作成した。4 種類の細胞株

についてイムノブロットで、それぞれの因子の抑制ができていることを確認した。

【Immunoblot】



10 週齢以上のヌードマウスの舌に上記の細胞を注入し、NC 群:12 頭、LOXL2-KD 群:16 頭、NHE1-KD 群:22 頭、dKD 群:19 頭の 4 群のマウスを作成したが、それぞれの群で 1/12 頭、1/16 頭、1/21 頭、11/19 頭において舌腫瘍の形成がみられなかった個体が存在した。dKD 群では他の 3 群と比較して有意に舌腫瘍無形成の割合が高く、NHE1 と LOXL2 の同時抑制により舌組織への癌の定着性の低下が示唆された。

【舌腫瘍形成の有無】

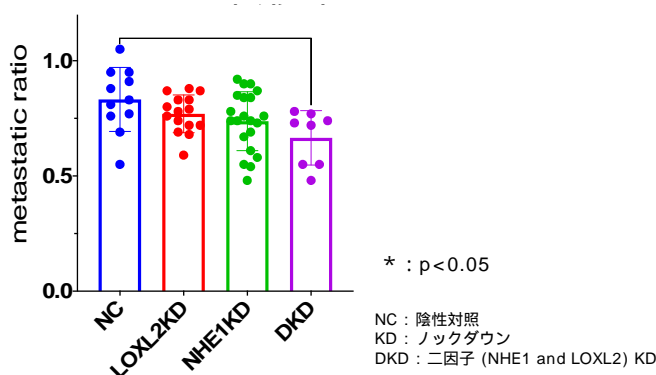
	NC	LOXL2-KD	NHE1-KD	dKD
(+)	11	14	21	8
(-)	1	2	1	11
計	12	16	22	19

dKD vs NC $p < 0.01$
vs LOXL2-KD $p < 0.05$
vs NHE1-KD $p < 0.001$
(Fisher's exact test)

上記の舌腫瘍を形成した 4 群のマウスについて、14 日後に舌および頸部リンパ節を採取し、総 RNA を調製して RT-PCR にてヒト、マウスのベータアクチン量を測定した。

先行研究(Biochem. Biophys. Res. Commun, 22, 101-107, 2017)での評価方法に準じて転移率の評価を行ったところ、NC 群と dKD 群での比較では dKD 群では有意に転移率が低下した。ふたつの単独 KD 群と dKD 群との比較では dKD 群で転移率が低下する傾向はあるが、有意差は見られなかった。

【転移率の比較】



これらの結果から NHE1 と LOXL2 を同時に阻害することによって、より効果的に頭頸部扁平上皮癌の転移性を減弱させることができる可能性が示唆された。

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 林祐志 木谷卓史 三谷壮平 羽藤直人
2 . 発表標題 がん転移に寄与する因子群を集学的に標的にすることによる効率的転移抑制の試み
3 . 学会等名 日本頭頸部外科学会
4 . 発表年 2022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
研究協力者	矢野 元 (Yano Hajime) (00284414)	愛媛大学医学系研究科・機能分子細胞生理学・准教授	

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