

令和 4 年 8 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18721

研究課題名(和文) 口腔癌微小環境におけるTGF- β 阻害による抗腫瘍効果の検討研究課題名(英文) Evaluation of antitumor effect by TGF- β inhibition in oral cancer microenvironment

研究代表者

須河内 昭成 (Sugauchi, Akinari)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80839184

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)：口腔癌、とりわけ舌癌において頸部リンパ節転移は重大な予後不良因子の一つであり、そのメカニズムの解明は舌癌の診断、治療、予後の改善のため極めて重要である。癌の浸潤、転移において癌細胞の上皮間葉転換(EMT: Epithelial Mesenchymal transition)が関与しており、細胞に対してTGF- β (Transforming growth factor- β) 刺激することによりEMTを示すことが知られている。本研究ではTGF- β 刺激時の細胞周期、運動性について検討を行ってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在口腔癌に対して外科治療、放射線療法、化学療法を併用して行うが、局所進行症例や一次治療後の再発転移症例においては既存の治療法ではコントロール不良となることも多い。口腔癌の頸部リンパ節転移において、EMTが深く関与していると言われていたが、その細胞周期について詳細に調べることで、なぜ頸部リンパ節転移が予後不良につながるか、またその結果に直接寄与している因子が何であるか解明することは、口腔癌の治療法の開発や頸部リンパ節転移のメカニズムの解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cervical lymph node metastasis is one of the poor prognostic factors in oral cancer, especially tongue cancer, and elucidation of its mechanism is important in the diagnosis, treatment, and prognosis control of tongue cancer. It is known that epithelial mesenchymal transition (EMT) of cancer cells is involved in cancer infiltration and metastasis, and that EMT is exhibited by stimulating cells with TGF- β (Transforming growth factor- β). In this study, we have investigated factors related to EMT of cells during TGF- β stimulation.

研究分野：口腔外科

キーワード：TGF- β 口腔癌の転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- β (TGF- β) は生体内で細胞の分化やアポトーシス、運動能の制御や免疫応答、血管新生等に関与しているとされ、恒常性の維持に必須なシグナル系の1つである。その中でも最も重大な作用の一つである細胞増殖抑制能については、がんの浸潤や転移に強く関与しているとされている。頭頸部領域の中でも40%占める口腔癌においても同様のことが示されており、TGF- β シグナルの下流で発現する Smad2 は口腔癌の予後不良マーカーであるとの報告もある (Mangone et al. 2010)。その機序として TGF- β 刺激により細胞の Growth arrest および浸潤・転移に関与する上皮間葉転換 (EMT) を示すことが知られているが、われわれは東京医科歯科大学 大学院 医歯学総合研究科 硬組織病態生化学分野 渡部徹郎教授のグループとの共同研究でその関連について検討を行ってきた。具体的にはヒト扁平上皮癌細胞株である SAS に Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci) のシステムを導入することで蛍光観察により細胞周期の確認が可能である SAS-Fucci 細胞を用いることで転移細胞の特性を検討した。本細胞は、細胞周期依存的なタンパク質である Geminin および Cdt1 にそれぞれ monomeric Azami-Green: mAG と monomeric Kusabira-Orange2: mKO2 で蛍光標識しており、前者は S/G2/M 期に増加し、後者は G1 期に増加する傾向があるため、核内において S/G2/M 期は緑色、G1 期は赤色の蛍光が観察される。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌、とりわけ舌癌の頸部リンパ節転移は重大な予後不良因子であり、現在の集学的治療でも根治し得ない症例も多い。一方そのメカニズムや転移する細胞の特徴等に関して未だ不明な点が多く、これらを解明し、制御することは OSCC の治療において非常に重要である。先行研究により、舌への同所移植により頸部リンパ節転移を形成することが知られているヒト OSCC 細胞である SAS に細胞周期の確認が可能となる Fucci システムを用いて作成した SAS-Fucci 細胞を使用し、マウス舌癌モデルを作成して原発巣とリンパ節転移巣における腫瘍細胞周期をそれぞれ観察し、腫瘍細胞集団の性質の違いを解析する。

3. 研究の方法

TGF- β 阻害効果の検討のため、まずマウスのメラノーマ細胞である B16 細胞を用いて *in vitro* における T β R-Fc 抗体の効果を検討した。Fc 融合タンパク質を含んだ希釈液を、プレートに播種し培養した B16 細胞に添加し 72 時間回収、TGF- β による間葉系マーカーの発現等を定量的 RT-PCR、Western blotting、細胞免疫染色等の手法を用いて解析した。

また、B16 の細胞表面に T β R-Fc 抗体を発現させ、*in vitro* および *in vivo* マウスモデルにおける腫瘍抑制効果の検討を行った。*in vitro* では細胞培養を行い、*in vivo* での検討については、作成した細胞をマウスの側背皮下に投与し、腫瘍径の測定を経日的に行った。

また、SAS-fucci 細胞を用いて、*in vivo* での同所移植実験を行うこととした。BALB/c-nu/nu マウスの舌に SAS-Fucci を投与し、リンパ節転移をきたす腫瘍接種後約 2 週間で原発巣およびリンパ節転移巣における細胞周期の割合を計測した。

4. 研究成果

TGF- β の受容体には T β R I と T β R II の2種類があり、これに対する抗体として T β R I-Fc および T β R I-T β R II-Fc を使用し検討を行った。*in vitro* での B16 に対する TGF- β 刺激時の T β R I-Fc と

TβRI-TβRII-Fc の作用として、全ての TGF-β isoform による TGF-βシグナル伝達を TβRI-TβRII-Fc が抑制し、また間葉系マーカーの発現亢進を抑制した。

TβRI-TβRII-Fc の細胞表面への発現は、細胞の増殖能自体に変化は示さないものの、血管新生の抑制、TGF-βシグナルの抑制効果を示し、腫瘍形成を抑制した。

上記は Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor-β isoforms with an Fc chimeric receptor. Shingo K, et al. Oncology reports 46(3) 2021.9 にて報告した。

また、SAS-fucci を用いた実験において、原発巣の舌と頸部リンパ節転移巣のそれぞれの細胞周期を比較したところ、舌原発巣は S/G2/M 期と G0/G1 期の細胞の割合はほぼ同じであったのに対し、リンパ節転移巣は S/G2/M 期と比して G0/G1 期の細胞が有意に増加していた。このことから、growth arrest をきたした G0/G1 期の細胞がリンパ転移に関与している可能性が示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Shingo Kodama, Katarzyna . Podyma-Inoue, Toshihiro Uchihashi, Kyoko Kurioka, Hitomi Takahashi, Akinari Sugauchi, Kazuki Takahashi, Toshihiro Inubushi, Mikihiro Kogo, Susumu Tanaka, Tetsuro Watabe	4. 巻 46
2. 論文標題 Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor- isoforms with an Fc chimeric receptor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8148	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maki Saito
2. 発表標題 Oral cancer cells under transforming growth factor- (TGF-)-induced cell cycle arrest exhibit motile phenotypes through induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT)
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Takahashi
2. 発表標題 Oral cancer cells under TGF- -induced cell cycle arrest exhibit motile phenotypes through induction of EMT
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inoue Katarzyna Anna
2. 発表標題 TGF- -induced cell cycle arrest is correlated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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