

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792010

研究課題名（和文） アポトーシス抵抗性の解除に着目した口腔癌転移克服への新戦略

研究課題名（英文） The mechanisms of resistance to apoptosis in oral cancer cells:
New strategy to overcome cancer metastases

研究代表者

日野 聡史 (HINO SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90359927

研究成果の概要（和文）： アポトーシスと呼ばれる計画的な細胞死に抵抗性を獲得した癌細胞が転移巣形成に寄与するという仮説の下、転移能力の有無で口腔癌細胞を2群に分けて、外因性のアポトーシス誘導剤 TRAIL に対する感受性（抵抗性）や、その差違に関わるメカニズムを検討した。これらの検討から、転移能の有無と TRAIL に対する感受性は相関しており、これには TRAIL 受容体の細胞内局在が関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In this study I focused on the extrinsic apoptosis pathways, to determine which components influence metastasis. Poorly-metastatic human oral cancer cells were sensitive to TRAIL, whereas highly-metastatic cancer cells showed robust resistance. Further understanding of how sensitivity might be augmented comes from the observation that TRAIL receptor does not localize on cell surface in highly-metastatic cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、転移、アポトーシス、アノイキス、TRAIL

1. 研究開始当初の背景

癌の転移巣形成には、癌細胞の原発巣から

の離脱、脈管内への浸潤、足場非依存性の生存、2次臓器への到達、異所環境下での増殖

のすべてが要求される。転移癌細胞に特有のこれら能力は、複数の遺伝子異常が蓄積することによって獲得される。

一方で、本来宿主は前述の各段階で癌細胞にアポトーシスを誘導する機構を備えており、転移巣を形成しようとする癌細胞に対してマルチステップバリアーを有している。つまり、宿主のアポトーシス誘導能は、有効に機能しさえすれば、転移巣形成を阻止するセーフガードとなり得る。

これまでの癌治療に関わるアポトーシスの研究では、放射線療法や化学療法によって癌細胞の DNA に傷害を与えて内因性アポトーシス経路を活性化させ、原発巣に対する治療効果をいかに高めるかに主眼が置かれてきた。しかしながら、放射線療法や化学療法に抵抗性を獲得した癌細胞は、すなわち、外因性アポトーシス誘導刺激に対しても抵抗性を獲得しており、マルチステップバリアーを容易にすり抜け、転移巣を形成できるものと推察される。したがって、こうした細胞を生み出さないこと、あるいは、この細胞を効果的に殺す方法の発見こそが、転移を阻止できる新規の治療法になると考えられる。

2. 研究の目的

転移の有無が癌の予後を決定する最重要因子であることに疑問の余地はない。長年にわたって、癌転移に関する旺盛な研究が続けられている。実験医学の進歩とともに、研究結果が臨床にフィードバックされるようにもなったが、転移治療に対して十分な成果が上がっているとは言えない。これまでの研究が、既存の転移巣に着目してなされてきた事が、原因の一つだと考えられる。

原発巣を形成する癌細胞の中から、あるいは、脈管内を遊走する癌細胞群の中から、実際に転移巣形成に寄与できる細胞にはどのような特性があるのかを解析し、転移巣形成の初期段階をターゲットにした治療戦略を立てる必要がある。

脈管浸潤や血管新生を阻害しようとした従来の研究に比べて、アポトーシスを誘導しようとする本研究は、直接的な癌細胞死を引き起こすという点で、積極的な治療効果を望める可能性が高く、転移巣の形成自体を抑制する治療法の開発につなげることを目的としている。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株を、転移能の有無によって2群に分けた。転移能を有するものとして B88 細胞を、転移能を持たないものとして SAS 細胞を使用した。これらの細胞を使って、外因性アポトーシス誘導刺激である Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) に対する感受性を、

WST-1 assay 法を用いて検索した。

次に、細胞培養用プレートの表面を加工して、細胞が接着しにくくなったプレートを使用して、転移能の有無と細胞の足場の喪失によるアポトーシス誘導能の関係を評価した。また、これに TRAIL を上乗せすることで、足場非依存性、つまり脈管内を遊走中の癌細胞の TRAIL に対する感受性を評価した。

さらに、転移能を有する細胞の TRAIL に対する抵抗性のメカニズムを探索するために、TRAIL の 4 つの Receptors、Caspases とその Inhibitors の発現レベルを quantitative real-time PCR による mRNA、immunoblotting による蛋白質の両面から解析した。

また、TRAIL Receptors の細胞内局在を、界面活性剤処理、未処理を使い分け、間接免疫蛍光抗体法で検索した。

4. 研究成果

単層培養条件下に、10 ~ 100 ng/ml の濃度で TRAIL を作用させたところ、転移能を持たない SAS 細胞では 10 ng/ml の濃度で約半数の細胞にアポトーシスが誘導され、100 ng/ml にまで濃度を上昇させることで、約 70% の細胞にアポトーシスが認められた。

一方で、転移能を有する B88 細胞は、100 ng/ml の濃度で TRAIL を作用させた場合でも、全くアポトーシスが誘導されなかった。

細胞培養用プレートの表面を加工し、細胞が接着しにくくなったプレートを使用して細胞が接着・増殖するための足場を喪失させてやると、転移能を持たない SAS 細胞では、約 40% の細胞がアポトーシス (アノイキス) に陥り、TRAIL を上乗せすることで約 80% の細胞が死に至った。転移能を有する B88 細胞では、足場を喪失したのみでは約 10% の細胞にしかアポトーシス (アノイキス) は誘導されなかったが、TRAIL を添加してやることで、アポトーシスが増強された。転移巣形成のためには、癌細胞は足場非依存性の生存・増殖能を獲得する必要がある。転移能の有無と TRAIL に対する感受性は相関しており、足場を喪失した条件下での TRAIL 感受性をさらに高めてやることで、転移を抑制できる可能性が示唆された。

さらに、転移能を有する細胞の TRAIL に対する抵抗性のメカニズムを探索するために、TRAIL の Receptors である DR4、DR5、Decoy receptors である DcR1、DcR2、receptor からのシグナルを受けて順次活性化される Caspase 8、Caspase 10、Caspase 3 とその Inhibitors である cFLIP、IAP-1、IAP-2、XIAP、Mcl-1 について、mRNA と蛋白質の発現レベルを評価したが、転移能に違いのある両細胞間で TRAIL への抵抗性の違いを説明するに足る発現差は見いだせなかった。

TRAIL Receptor が Ligand である TRAIL の

結合により、下流にシグナルを伝達できているか否かを確認するために、それらの細胞内局在を検討した。界面活性剤で細胞を処理した場合には抗体は細胞内に侵入し抗原となる蛋白質を認識できるが、界面活性剤処理を行わなかった細胞では抗体は細胞膜表面に存在する抗原しか認識できない。この違いを利用して、DR4 と DR5 の細胞内局在を検索したところ、TRAIL に抵抗性を示す転移細胞では DR4 の大部分が細胞内に局在しており、細胞膜表面にはわずかに発現するのみであった。DR5 の細胞内局在は転移能の有無によらず、細胞膜表面に発現が認められた。

リン酸化やグリコシル化など、DR4 の細胞内局在を調整している因子を検索し、転移癌細胞が脈管内へ侵入した（足場を喪失した）際に、DR4 を細胞膜表面にリクルートできれば、免疫細胞から産生される TRAIL によって効率よく当該細胞にアポトーシスを誘導することが可能になると予測され、新規の治療法開発につながるものと予測される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) Hino S, Hamakawa H, Miyamoto Y, Ryoke K, Sekine J, Sasaki A, Yamamoto T, Oral Cancer Study Group of Chugoku-Shikoku
Effects of a concurrent chemoradiotherapy with S-1 for locally advanced oral cancer
Oncology Letters 査読有り
In press, 2011

(2) Phipps LE, Hino S, Muschel RJ
Targeting Cell Spreading: A Method of Sensitizing Metastatic Tumor Cells to TRAIL-induced Apoptosis
Molecular Cancer Research 査読有り
9: 249-258, 2011

〔学会発表〕（計 10 件）

(1) 日野聡史、浜川裕之、宮本洋二、領家 和男、関根浄治、佐々木 朗、山本哲也
口腔癌に対する TS-1 と放射線同時併用療法
の多施設共同臨床第 I/II 相試験
第 29 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
平成 23 年 1 月 27-28 日 熊本

(2) 浜川知大、日野聡史、岡 亮太、中城 公一、浜川裕之
剖検と遺伝子発現解析によって診断した頬
粘膜癌多発性肺転移の一例
第 39 回 日本口腔外科学会地方会
平成 22 年 5 月 22 日

(3) 日野聡史、村瀬隆一、合田啓之、殿木 亜紗美、中城公一、浜川裕之
口蓋に生じた多形腺腫由来筋上皮癌の一例
第 28 回 日本口腔腫瘍学会総会
平成 22 年 1 月 28-29 日 東京

(4) 日野聡史、西川由希子、新谷智佐子、篠原こずえ、松本絵美、徳永奈津子、浜川裕之
当院における口腔ケアの現状と課題
第 6 回 日本口腔ケア学会総会・学術大会
平成 21 年 11 月 20 日-21 日 宇都宮

(5) 城下 優、村瀬隆一、日野聡史、中城 公一、浜川裕之
下顎智歯抜歯後に生じたガス産生性口底部
蜂窩織炎と考えられた 1 例
第 57 回 日本口腔科学会地方会
平成 21 年 11 月 14 日 岡山

(6) 中城公一、合田啓之、殿木亜紗美、日野聡史、住田知樹、浜川裕之
口腔扁平上皮癌に対する抗癌薬感受性試験
の有用性
第 47 回 日本癌治療学会学術集会
平成 21 年 10 月 22 日-24 日 横浜

(7) 日野聡史、荒本孝良、加藤友美、田中 宏史、寺門永顕、中城公一、浜川裕之
下顎骨に生じた二次型エナメル上皮癌の一例
第 54 回 日本口腔外科学会総会・学術大会
平成 21 年 10 月 9 日-11 日 札幌

(8) Hiroyuki Goda, Koh-ichi Nakashiro, Jun Onodera, Yukiko Nishikawa, Ryota Oka, Satoshi Hino, Hiroyuki Hamakawa
Atelocollagen-mediated systemic delivery of small interfering RNA targeting Akt1 in oral cancer
68th JCA Annual Meeting
October 1-3, 2009 Yokohama

(9) 殿木亜紗美、中城公一、合田啓之、日野聡史、住田知樹、浜川裕之
口腔癌化学療法における抗癌薬感受性試験
の意義
第 8 回 中四国口腔癌研究会
平成 21 年 8 月 29 日 岡山

(10) 村瀬隆一、住田知樹、加藤友美、荒本孝良、日野聡史、中城公一、浜川裕之
核医学的検出法と Indocyanine Green (ICG) 蛍光法を併用した口腔癌センチネルリンパ節生検の試み
第 63 回 日本口腔科学会学術集会

平成 21 年 4 月 16 日-17 日 浜松

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/dentistry/
index.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/dentistry/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 聡史 (HINO SATOSHI)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90359927