

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17095

研究課題名（和文）炎症シグナルが誘導するサイトカインネットワークと口腔癌転移機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the relationship between the cytokine network induced by inflammatory signals and the mechanism of oral cancer metastasis

研究代表者

馬場 隼一（BABA, Junichi）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40644539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌の頸部リンパ節転移は最も重要な予後不良因子の1つであり予後改善には口腔癌細胞の転移の分子機構解明が望まれている。癌細胞の転移能はサイトカイン等の炎症シグナルによって亢進することが知られている。癌細胞に炎症刺激が加わるとシグナル伝達経路を介して多くの遺伝子・タンパク質の発現が変動し、その結果癌細胞自身がサイトカインを分泌するようになり、それらが周囲の細胞に作用して複雑なサイトカインネットワークを形成する。口腔癌における炎症シグナルとサイトカインネットワークの関連を解明することを目的に研究を行った。高転移能を有する口腔癌細胞株を用いて遺伝子網羅解析を行い、炎症や癌進展に関わる因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の罹患数および死亡率は上昇している。口腔癌の予後悪化につながる要因は複数知られているが、その中でも頸部リンパ節転移は最も良く知られた予後不良因子である。口腔癌細胞の頸部リンパ節転移を引き起こす遺伝子の発現や機能が報告されているが、その詳細は不明な点が多いのが現状である。本研究は炎症シグナルに焦点を当て、口腔癌転移のモデル細胞株を用いて転移や予後に関する因子の同定を目指した。本研究の成果から炎症が転移に関わることが示唆され、サイトカインネットワークを阻害することが口腔癌転移の制御に重要であることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：Cervical lymph node metastasis of oral cancer is one of the most important adverse prognostic factors. In order to improve the prognosis, the molecular mechanisms of oral cancer metastasis should be elucidated.

It has been widely reported that the metastatic potential of cancer cells is enhanced by inflammatory signals such as cytokines. Inflammatory stimulation to cancer cells alters the expression of various genes and proteins through signal transduction pathways. Subsequently, cancer cells themselves begin to secrete cytokines, which act on surrounding cells to form complex cytokine networks.

We conducted the research with the aim of clarifying the relationship between inflammatory signals and cytokine networks in oral cancer cells. Comprehensive gene expression analyses were performed using oral cancer cells with high metastatic potential. We identified several genes and proteins involved in inflammation and oral cancer progression.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌転移 サイトカイン 炎症シグナル 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療法は外科的切除が第一選択であり、早期癌の場合は根治も見込める。しかし口腔領域には豊富なリンパ管が存在しており、リンパ節転移をきたしやすく予後不良となる。集学的治療法の開発も進んでいるが、口腔癌転移は未だ不明な点が多く、その分子機構を解明することは重要な課題の1つである。

生体内の細胞は、微小環境中で様々な刺激にさらされている。それらの刺激の中で「炎症」が癌の発症に関わることが種々論じられてきた。口腔は慢性的に刺激を受けやすく炎症反応が遷延化しやすい臓器であり、炎症刺激は口腔癌の発症リスク要因の一つと考えられる。

炎症刺激は癌の進展にも関与する。サイトカインなどの炎症刺激が癌細胞に加わると、炎症性シグナル伝達(以下、炎症シグナル)の活性化や遺伝子転写制御の連鎖が起こり、転移に関連する遺伝子群の発現が変動する。その結果、癌細胞自体がサイトカインを分泌するようになる。分泌サイトカインは周囲の癌細胞や炎症細胞に作用し、増殖や転移に関する複雑なネットワークを形成する。近年このサイトカインネットワークの連鎖を断ち切ることが癌進展を制御する方法として注目されているが、不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌における炎症シグナルとサイトカインネットワークの関連を明らかにすることである。我々はこれまでに口腔癌転移のモデル細胞株として HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の比較解析を行ってきた。2つの細胞の遺伝子発現の網羅的解析では、HSC-3-M3 細胞で炎症シグナル亢進が示唆されている。本研究は、これらの細胞内におけるタンパク質発現プロファイルや分泌タンパク質の比較から、口腔癌転移の新たな診断マーカーや治療標的分子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

舌癌細胞株 HSC-3 細胞とその高転移能株 HSC-3-M3 細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources 細胞バンクから入手した。10% FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium で培養した。細胞増殖は CCK-8 assay で測定した。

(2) 抗体アレイ

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞から抽出したタンパク質を用いて、NF- κ B Phosphorylation Antibody Array を行い、タンパク質リン酸化状態を比較した。また、HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の培養上清液を回収して、Quantibody Human TH17 Array を行い、分泌タンパク質の比較を行った。

(3) プロテオーム解析

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞から抽出したタンパク質を用いて、iTRAQ-based Quantitative Proteomic Analysis を行った。タンパク質消化、iTRAQ ラベリング、LC-MS/MS 解析から発現変動タンパク質を同定した。

(4) 遺伝子エンリッチメント解析

発現変動タンパク質リストを用いて、Metascape (Zhou et al., 2019) による Gene Ontology (GO) 解析と KEGG pathway 解析を行った。

(5) 生存分析

The Cancer Genome Atlas (TCGA) の頭頸部癌データセットを利用した Kaplan-Meier 解析を行った。UFM1、GLMN、TXNRD1、AKR1C3、ANXA4 について、高発現症例と低発現症例に分けて、cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>) (Cerami et al., 2012) によって全生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の細胞増殖能の比較

高転移能株 HSC-3-M3 細胞は、ヌードマウスを用いた *in vivo* スクリーニングによって HSC-3 細胞から樹立された (Matsui et al., 1998)。この 2 つの細胞株は同一人物由来ではあるが、HSC-3 細胞と比較して、HSC-3-M3 細胞は転移能が亢進している。

CCK-8 assay を行い、培養プレート上における細胞増殖能の違いを解析した。その結果、過去の報告通り (Matsui et al., 1998)、これら細胞株の増殖能に差は認められなかった。

(2) 抗体アレイ

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞から抽出したタンパク質を用いて、抗体アレイを行い、NF- κ B 経路に関するタンパク質のリン酸化状態を比較した。その結果、HSC-3-M3 細胞では、MSK1 (Phospho-Ser376)、p38 MAPK (Phospho-Tyr322)、NF κ B-p105 (Phospho-Ser927) などのリン酸化が亢進していることが示唆された。

また HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の培養上清液中の分泌タンパク質を比較検討したところ、HSC-3-M3 細胞では TNF α の分泌量が高い可能性が考えられた。

(3) プロテオーム解析

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞からそれぞれタンパク質を抽出し、iTRAQ プロテオーム解析を行い、2 つの細胞のタンパク質発現を比較定量した。p 値 < 0.05 および |fold change| > 1.5 を threshold として比較を行うと、476 個の発現変動タンパク質 (differentially expressed proteins: DEPs) が認められた。HSC-3-M3 細胞で発現が増加している DEPs は 372 個、低下している DEPs は 104 個であった。

(4) GO 解析と KEGG pathway 解析

DEPs リストを用いて、GO 解析と KEGG pathway 解析を行った。HSC-3-M3 細胞で発現増加する DEPs は、「cadherin binding」、「focal adhesion」、「microtubule」などの GO term が有意に enrich された。また KEGG pathway 解析では「Tight junction」などの経路にも関与することが示唆された。

一方、HSC-3-M3 細胞で発現低下する DEPs は、「nucleosomal DNA binding」、「chromosome organization」などの GO term がみられた。KEGG pathway 解析では「Ribosome biogenesis」などとの関連が挙げられた。

(5) プロテオームとトランスクリプトームの統合解析

我々の研究グループは、HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、2 つの細胞間の発現変動遺伝子 (differentially expressed genes: DEGs) を報告している (Ideta et al., 2021)。HSC-3-M3 細胞で発現が増加する DEGs は 638 個、低下する DEGs は 380 個である。このトランスクリプトームデータと、本研究のプロテオームデータを統合解析したところ、5 つの RNA・タンパク質 (UFM1、GLMN、TXNRD1、AKR1C3、ANXA4) が、HSC-3-M3 細胞で発現増加していた。

(6) 予後解析

UFM1、GLMN、TXNRD1、AKR1C3、ANXA4 が予後因子となりえるか検討した。TCGA の頭頸部癌データセットを用いて Kaplan-Meier 法によって予後解析をすると、UFM1、TXNRD1、AKR1C3 の 3 つについては、低発現症例と比較して高発現症例で全生存率が有意に低かった。GLMN と ANXA4 については、有意差は認められなかった。

(7) 考察

HSC-3 細胞とその高転移能株 HSC-3-M3 細胞は、細胞増殖能に差は認められないが、転移能に差があることが知られている。過去の我々の報告から HSC-3-M3 細胞では炎症シグナルに関連する遺伝子の発現が増加している (Ideta et al., 2021)。本研究はこの 2 つの細胞の比較から、転移に関する炎症シグナル伝達や因子を明らかにすることを目的とした。

抗体アレイから、HSC-3-M3 細胞では NF- κ B 経路の各因子のリン酸化が亢進しており、TNF- α を培養液中に分泌していることが考えられた。頭頸部癌の高転移能株や抗癌剤耐性株では、定常状態においても NF- κ B が恒常的に活性化していることが報告されており (Almeida et al., 2014)、HSC-3-M3 細胞においても同様の分子機構で炎症シグナルが亢進していることが示唆される。

プロテオーム解析では 476 個の DEPs が認められ、これらのタンパク質発現が HSC-3-M3 細胞の表現型に影響を与えている可能性が考えられた。トランスクリプトームデータとの統合解析では、overlap する RNA・タンパク質は 5 つ (UFM1、GLMN、TXNRD1、AKR1C3、ANXA4) と少なかった。しかし RNA とタンパク質の発現が相関しない場合、RNA レベルとタンパクレベルで異なる発現制御機構が存在する可能性もある。

統合解析で得られた 5 つの RNA・タンパク質のうち、UFM1、TXNRD1、AKR1C3 の高発現は頭

頸部癌の予後不良因子であった。今後はこれらの因子の機能解析を通して、口腔癌転移の分子機構を明らかにする。

引用文献

- Almeida, L. O., Abrahao, A. C., Rosselli-Murai, L. K., Giudice, F. S., Zagni, C., Leopoldino, A. M., et al. (2014). NF B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Bio* 4, 96-104. doi: 10.1016/j.fob.2013.12.003.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., et al. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2, 401-404. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
- Ideta, Y., Tagawa, T., Hayashi, Y., Baba, J., Takahashi, K., Mitsudo, K., et al. (2021). Transcriptomic profiling predicts multiple pathways and molecules associated with the metastatic phenotype of oral cancer cells. *Cancer Genomics and Proteomics* 18, 17-27. doi: 10.21873/CGP.20238.
- Matsui, T., Ota, T., Ueda, Y., Tanino, M., and Odashima, S. (1998). Isolation of a highly metastatic cell line to lymph node in human oral squamous cell carcinoma by orthotopic implantation in nude mice. *Oral Oncol.* 34, 253-256. doi: 10.1016/S1368-8375(97)00093-6.
- Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., et al. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* 10. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 BABA Junichi, IWAI Toshinori, SUGIYAMA Satomi, IDETA Yuka, TAKEDA Atsushi, MITSUDO Kenji	4. 巻 67
2. 論文標題 A case of retention cyst of the parotid gland treated successfully by intraoral marsupialization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 395 ~ 398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.67.395	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 SAKURAI KOUHEI, NAGAI AKIRA, ANDO TATSUYA, SAKAI YASUHIRO, IDETA YUKA, HAYASHI YUICHIRO, BABA JUNICHI, MITSUDO KENJI, AKITA MASAHARU, YAMAMICHI NOBUTAKE, FUJIGAKI HIDEISUGU, KATO TAKU, ITO HIROYASU	4. 巻 20
2. 論文標題 Cytomorphology and Gene Expression Signatures of Anchorage-independent Aggregations of Oral Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 64 ~ 74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20365	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0件

〔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
---------	---------