

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792362

研究課題名（和文） ADAM17 活性による口腔癌転移機構の解析と治療への応用

研究課題名（英文） Application to the treatment and analysis of oral cancer metastasis mechanism by ADAM17 activity.

研究代表者

高宗 康隆 (TAKAMUNE YASUO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50467982

研究成果の概要（和文）：これまで、TNF α がメタロプロテアーゼ ADAM-17 の proform を mature form に変換することで、接着分子 CD44 を切断し、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤が促進することを明らかにした。さらに切断された CD44 タンパクが細胞内へと移行していくことが知られている。今回は、唾液腺癌の一種である腺様嚢胞癌に着目して、ADAM-17 とその活性、CD44 の存在とそれらの意義についてタンパクレベルで解析を行ったが、明らかな発現を見出すことはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

By converting the mature form of the proform metalloprotease ADAM-17, TNF α revealed that cutting the adhesion molecule CD44, invasion of oral squamous cell carcinoma cells to promote. This time, in view of the adenoid cystic carcinoma is a type of salivary gland cancer, its activity and ADAM-17, was analyzed at the protein level significance of their existence and CD44, but can be found a clear expression did not.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：細胞接着、癌の浸潤・転移、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

（1）口腔内における主要な悪性腫瘍は全癌に対する 1～3%程度で、頭頸部領域の悪性腫瘍のうちでは 35%以上を占める。口腔癌に罹患すると食事や嚥下、会話などが困難となり、患者の生活の質（Q.O.L）は著しく低下する。また、口腔癌患者の予後は癌の進展度、すなわち癌転移に左右され、時として不幸な転帰を迎えることも少なくない。その口腔癌の治

療として、外科療法、放射線治療、化学療法などがあり、主にこれらの治療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、これらの治療法の進歩にも関わらず近年の口腔癌の治療成績はほとんど向上していない。その原因は癌転移の制御の失敗にあり、特に転移巣には放射線も抗癌剤も効果が乏しい。

したがって口腔癌の浸潤・転移に関連する分子を明らかにし、口腔癌の分子標的療法を確

立すれば、今後の治療成績を向上させる上でも極めて重要であると考えられる。その進行性の口腔癌が浸潤・転移するためには細胞間及び細胞-細胞外基質の接着から切り離される必要がある。近年、接着分子である CD44 や ADAM-17 と呼ばれるプロテアーゼが浸潤転移に重要な働きをしていることが解明されてきている。

2. 研究の目的

実際の CD44 タンパクや ADAM-17 タンパクの細胞内での局在を確認するべく、最近、口腔扁平上皮癌細胞を蛍光染色で染色した。すると、TNF α で刺激した場合、CD44 細胞内ドメインの一部は細胞質内へと移行し、ある一定の場所で集積していた。そればかりか、切断されると細胞膜の外側へと切り離されるはずの CD44 細胞外ドメインまでもが細胞質内へと移行して、その一部は細胞質内で集積している事が認められた。何故、細胞外ドメインまでもが細胞質内へと移行していくのか、そしてその際の ADAM-17 タンパクの局在についての詳細についてなど、口腔癌では未だ解明されていない事象が多い。そもそもこれまでの研究で、神経鞘腫細胞株において、CD44 細胞内ドメインは切り離されると、核内移行することが判明しているが、口腔癌ではその点は不明のままである。今後は、TNF α などのサイトカインで刺激を受けた口腔癌細胞の CD44 や ADAM-17 などのタンパクを中心に、細胞のどの部分でどのような変化を遂げるのか、そしてこれらが細胞にどのような影響（細胞のラフリングや間葉系細胞近似の形態変化の有無）を与えているかを更なる実験で明らかにしていく。そして次に実際の臨床において、特に臨床的予後因子（転移や再発）とこれら細胞やタンパクの変化との関係を解析し、比較検討し、将来の分子標的治療へと応用する礎を形成していく。

3. 研究の方法

本研究を達成するため、口腔癌細胞の中でも新たに扁平上皮癌細胞株と腺様嚢胞癌細胞株の2種類を適宜培養し、それら細胞に TNF α や TPA などのサイトカインを用いて刺激を加え、その後の細胞の変化を観察していく。特に CD44 タンパク（細胞内外両ドメインの変化）や ADAM-17 タンパクなどの局在を視覚的に確認して、さらにそれら分子の活性と経路および伝達シグナルを解明していく。そして、臨床的予後因子（転移・再発）とタンパクとの因果関係を比較するために、実際の臨床で得られた組織を用いてタンパクの存在と変化・発現を確認し、それから得られる情報から次の分子標的治療への応用へと研究を進めていく。

まずは新たに扁平上皮癌細胞株、腺様嚢胞癌細胞株を樹立する。これまでの研究では、口腔癌の中でも最も発生頻度の高い扁平上皮癌にのみ焦点を当てていたが、他の口腔癌、なかでも唾液腺癌の一種である腺様嚢胞癌に着目した。この細胞はプロテアーゼを強く発現し、間葉組織の細胞外基質を強く分解しながら浸潤すると言われている。そもそも腺様嚢胞癌は他の口腔癌と比べて臨床的に著名な浸潤増殖性があり、特に神経、血管、結合組織など周囲軟組織に対して著名であり、疼痛や麻痺などの神経症状を示すことも少なくない。且つ組織学的に篩状の胞巣形成を示す、という特徴がある。よって今後は、これまでの研究結果を踏まえ、扁平上皮癌と腺様嚢胞癌の両者に焦点を当て、各々の細胞の変化を観察していく予定である。

（１）この２種の細胞株に炎症性サイトカインである TNF α による刺激や protein kinase C (PKC) の活性化〔ホルボールエステル (TPA) 処理〕などを用いて処理を行う。

（２）（１）で処理した後、CD44 の状態の変化をメインに対する抗体を使った Western

Blotting 法によって行う。TNF α を介した CD44 の状態変化、つまり切断が明らかになれば、そのプロテアーゼを同定するために TNF α 効果による ADAM-17 の発現と活性を調べる。

(3) 次に刺激後の細胞の蛍光染色を行い、細胞そのものの形態変化や、CD44 細胞内外ドメイン両者の局在とその集積状況、CD44 切断に直接関係していると思われる ADAM-17 分子の局在などを視覚的に観察する。特に刺激前後の細胞の変化、分子の視覚的变化を確認する。

(4) 腺様嚢胞癌細胞の ADAM-17 の RNA 干渉を行い、ADAM-17siRNA を導入後、TNF α あるいは TPA で刺激して cell lysate を調整し、Western Blotting 法による ADAM-17 の発現程度ならびに CD44 切断状態を調べる(扁平上皮癌細胞での実験は既に済み)。

(5) 腺様嚢胞癌細胞の浸潤能における TNF α の効果をインベーションアッセイにて検討する。タイプIVコラーゲンなど基底膜構成タンパクよりなる Matrigel™ をコートした膜上に細胞を播種し、膜の下室に TNF α を添加するボイデンチャンバー変法にて測定する。細胞が Matrigel™ 内に浸潤し、Matrigel™ 膜の下面に移動すれば TNF α の存在が細胞の浸潤(運動)を刺激する効果があることが確認できる(扁平上皮癌での実験は既に済み)。

(6) 腺様嚢胞癌切除組織を用いてこれを2つに分け、①免疫組織化学的染色を行い、CD44 の切断状態及び ADAM-17 の発現を検索。②Western Blotting 法によって CD44 タンパク切断の有無及び活性化 ADAM-17 タンパクを検出(扁平上皮癌での実験は既に済み)を行う。

以上の①②の結果を臨床的予後因子、特に転移と比較検討する。

口腔扁平上皮癌と腺様嚢胞癌、各々へのサイトカイン刺激後の細胞の形態変化の両者の違いと分子(CD44やADAM-17)の活性の変

化の違いを確認し、将来の分子標的治療への応用について模索していく。

4. 研究成果

腺様嚢胞癌細胞の浸潤能における TNF α の効果をインベーションアッセイで検討した。タイプIVコラーゲンなど基底膜構成タンパクよりなる Matrigel™ をコートした膜上に細胞を播種し、膜の下室に TNF α を添加するボイデンチャンバー変法にて測定する。細胞が Matrigel™ 内に浸潤し、Matrigel™ 膜の下面に移動すれば TNF α の存在が細胞の浸潤(運動)を刺激する効果があるという確認を得られることになるのだが、明らかな結果は得られなかった。次に腺様嚢胞癌切除組織を用いてこれを2つに分け、①免疫組織化学的染色を行い、CD44 の切断状態及び ADAM-17 の発現を検索した。またもう一方の②Western Blotting 法によって CD44 タンパク切断の有無及び活性化 ADAM-17 タンパクの検出(扁平上皮癌での実験は既に済み)を行った。結果、腺様嚢胞癌細胞は CD44 や ADAM-17 の発現は明らかには認められず、当初予想した接着分子の発現は認められなかった。また実験の臨床データと比較したが、再発や転移のある症例とそうでない症例との間には明らかな差異は認められなかった。しかし、CD44 の切断は単なる蛋白質の代謝としてではなく、細胞-基質間接着やシグナル伝達において積極的な意義を持つことが確認されている。今回の研究では新しい結果は得られなかったが、特に CD44 切断による細胞への影響は未確認な部分が多く、細胞それ自体の形態変化やその変化による細胞機能の変化を確認することで、さらなる CD44 の働きが明確になると思われる。また、臨床的にも炎症性疾患や癌においてこの現象の亢進が報告され様々な疾患との関連が示唆されており、この解析は病

態の解明だけでなく、臨床的応用すなはち分子標的治療への応用へとつながることが期待できると考えている。

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)

①Tetsuro Ikebe , Keiko Yamasaki ,
Yasuo Takamune , Hideki Nakayama ,
Masanori Shinohara.

Reduced expression of nuclear
factor κ B in oral mucosa
undergoing preoperative
chemoradiotherapy

Oral Science International .9 巻 2 号 P33
~37 2012 年 11 月 査読有

②Takuya Tanaka, Hideki Nakayama,
Yoshihiro Yoshitake, Atsushi
Irie, Masashi Nagata,
Kenta Kawahara, Yasuo Takamune,
Ryoji Yoshida, Yoshihiro
Nakagawa, Hidenao Ogi, Satoru
Shinriki, Kazutoshi Ota,
Akimitsu Hiraki, Tetsuro Ikebe,
Yasuharu Nishimura and
Masanori Shinohara.

Selective inhibition of nuclear
factor- κ B by nuclear factor- κ B
essential modulator-binding
domain peptide suppresses the
metastasis of highly metastatic
oral squamous cell carcinoma.

Cancer Science .103 巻 3 号 P455~463
2012 年 3 月 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

高宗 康隆 (TAKAMUNE YASUO)

熊本大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 50467982