

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593037

研究課題名(和文) アポトーシス、アノイクス抵抗性の解除に着目した転移制御研究

研究課題名(英文) Resistance to apoptosis/anoikis and metastatic ability in oral squamous cell carcinoma

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の治療成績向上のためには、潜在転移の可能性を念頭においた治療戦略が練られなければならない。脈管内を遊走する転移癌細胞に効率的にアポトーシスを誘導できれば、潜在転移の芽を摘むことが可能になると期待できる。しかしながら、多くの癌細胞はアポトーシスを誘導するTRAILに抵抗性を有しており、本研究ではこの抵抗性を解除する方法を検討することを目的とした。研究の結果、Srcの活性化と定常状態でのA20の過剰発現がTRAIL抵抗性に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 order to improve the outcome from oral cancer treatments, we have to pay constant attention to the occult metastases. We focused that the almost cancer cells showed the resistance to apoptosis, and aimed to release these resistance. In this study, we have used oral squamous cell carcinoma cell lines with and without distinct metastatic ability, and revealed the relationship between their apoptosis sensitivity and the metastatic ability. SAS cells which have no metastatic potency showed modest sensitivity to TRAIL, whereas SAS-T5 cells and SAS-L1 cells, a clone with high metastatic potential showed robust resistance. We found that the mechanisms underlying the differences in these resistance to TRAIL was an activity of Src kinase and the basal levels of A20 expression.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 転移 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療では、根治治療後、なかには長期経過後に、原発巣の再発はないものの後発転移が明らかになる症例をしばしば経験する。これは、一次治療前から臨床的には同定できない微小な転移巣が、既に所属リンパ節や遠隔臓器に存在していたことを意味している。こうした潜在的な転移は、口腔癌症例の約 15~45%に見られると報告されている。

一方で、原発巣のサイズだけをみると T1 や T2 のいわゆる早期例であっても、明らかな転移巣を認め進行癌に分類される症例も経験する。つまり、原発巣からごく早期に独立した転移癌細胞は、原発巣の増大と同時に増殖する場合と、異時性に増殖する場合があります。臨床的に転移巣として認識されるタイミングに大きな違いが生じていると解釈できる。したがって、初診時あるいは根治治療後臨床的に転移が明らかでない場合にも、潜在転移の可能性を念頭においた治療戦略が練られなければならない。

これまでの研究から、口腔癌細胞はごく早期に比較的容易に脈管内へ浸潤・移行するものの、この現象自体は口腔癌転移の決定的なステップではなく、脈管内で生存し、異所環境下(転移部位)での増殖を可能にする能力を獲得することが転移巣形成の最重要段階であると考えられる。脈管内では宿主の免疫監視や血液・リンパ液による動態力学的ストレスが、異所環境下では周囲微小環境変化が、癌細胞にアポトーシスを誘導する刺激となる。申請者は、主に悪性黒色腫や乳癌において癌細胞がアポトーシス抵抗性を獲得することこそが、転移巣形成を可能にする最重要段階であることを明らかにしてきた。また、脈管内の免疫監視システムにはアポトーシス誘導刺激である TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) が最も重要な役割を担っており、TRAIL 感受性には細胞接着が関

与している可能性を明らかにした。さらに、原発巣の癌細胞塊からの離脱や脈管内遊走中に相当する、足場の喪失(非接着浮遊)状態の癌細胞に誘発される細胞死(アノイクス)への抵抗性が、癌細胞の転移能と強く相関していることも明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、転移癌細胞がどのようなメカニズムでアポトーシス、アノイクスへの抵抗性を獲得するのかを明らかにすることを目的とした。また、TRAIL によるアポトーシス誘導に拮抗する細胞生存シグナルを検索し、シグナル経路上の重要分子を明らかにすることを目的とした。シグナル伝達の阻害剤や上記の重要分子の発現を抑制する核酸医薬を併用することで、脈管内を遊走する転移癌細胞に効率的にアポトーシスを誘導できれば、転移巣の形成自体を抑制する治療法の開発に繋がることが期待できる。また、癌細胞の浸潤阻害や血管新生抑制を目的とした研究と比べて、アポトーシスを誘導しようとする研究は、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い。

3. 研究の方法

所属研究室で所有している口腔扁平上皮癌細胞株の中、ヌードマウスにおける造腫瘍能、転移能の有無が明らかな細胞株を使用する。

TRAIL を含有する細胞培養液で処理し、24 時間後の生存細胞数を WST assay で評価した。アノイクスの感受性は、細胞が接着できないように表面加工したプレートで培養し、同様に WST assay によって生存細胞数を評価した。これらのデータを、各種細胞株の転移能の有無と照らし合わせて相関関係の有無を検討した。

TRAIL に低感受性で高転移能を有する細

細胞株と、TRAIL に高感受性で転移能を有さない細胞株を使用し、TRAIL 処理によって発現量が変動する分子を micro array 解析を使用して同定した。

これまでの研究から、TRAIL に対する感受性と細胞の接着能や運動能には関係があることが知られている。Src、ERK、PI3K、NF- κ B などのいわゆる細胞生存シグナル伝達系は、その下流に細胞の接着や運動を制御する分子を有していることから、個々の細胞生存シグナルと TRAIL 感受性の関連を検討した。

4. 研究成果

ヒト舌癌組織から樹立された扁平上皮癌細胞株と、この細胞をマウスへ繰り返し同所移植することによって転移能を獲得させた細胞株、さらに頸部リンパ節転移巣から樹立した細胞株を使用し、口腔扁平上皮癌細胞の転移能の獲得と、TRAIL によるアポトーシスへの抵抗性の獲得に相関があることが明らかになった。しかしながら、細胞が接着できないように表面を加工したプレート上での細胞培養でアノキス抵抗性を検討したところ、転移能の有無とアノキス抵抗性の間に明らかな相関関係は見いだせなかった。

次に、転移能を持たない細胞と転移能を有する細胞を比較することで TRAIL 抵抗性の解除方法を探る手法をとった。種々の癌細胞でタンパク量や活性が上昇し、浸潤や転移など癌の悪性形質や細胞生存に深く関わるということが知られる Src、ERK、PI3K、NF- κ B に着目した。口腔癌においても、活性型 Src (Tyr416) の発現量は悪性形質 (転移能の有無) と相関していた。Src シグナルの阻害剤を使用すると、Src シグナルに依存度の高い転移癌細胞に、より顕著に細胞増殖抑制効果が見られた。また、siRNA を用いて Src の発現を抑制したところ、転移能を有する細胞株の TRAIL 抵抗性を解除することに成功した。

さらに、転移能を持たない細胞と転移能を

有する細胞を TRAIL で処理した際に、発現亢進 (あるいは発現低下) する分子を探求するために、micro array 解析を行った。その結果、TRAIL 抵抗性に関わると推察される複数の候補分子を同定した。A20 (TNFAIP3) は、TRAIL に抵抗性の転移能を有する細胞では定常状態で高発現しており、TRAIL に感受性の転移能を持たない細胞では定常状態で発現が低く、TRAIL 処理により発現が亢進することが明らかになった。つまり、A20 (TNFAIP3) の発現量調節が、TRAIL によるアポトーシス誘導シグナルのブレーキ役になっている可能性が明らかになった。

TRAIL と Src あるいは A20 (TNFAIP3) を標的としたアポトーシス誘導療法は、軽微な副作用で高い抗腫瘍効果を得ることが期待できる。口腔癌の原発巣のみならず、転移巣をも克服可能な理想的な治療法として、臨床応用に向けた研究の進行が期待される。

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 1 件)

日野 聡史、浜川 裕之

副作用のない口腔癌治療を目指して

愛媛医学 32 巻 2 号 108-109, 2013

査読無

[学会発表](計 3 件)

Satoshi Hino, Tomohiro Hamakawa, Koh-ichi Nakashiro, Hiroyuki Hamakawa.: Overexpression of A20 and activated-Src result in TRAIL resistance in Oral cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015, April 18-22, 2015, Philadelphia, USA

Tomohiro Hamakawa, Satoshi Hino, Koh-ichi Nakashiro, Hiroyuki Hamakawa.: Knockdown of Src expression dissolves

resistance to TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013, April 6-10, 2013, Washington DC, USA

Tomohiro Hamakawa, Satoshi Hino, Koh-ichi Nakashiro, Hiroyuki Hamakawa.: TRAIL resistance and metastatic ability in oral squamous cell carcinoma cell lines. 第71回日本癌学会学術総会, 平成24年9月19日~9月21日, ロイトン札幌・さぼろ文芸館・札幌市教育文化会館(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<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