

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792210

研究課題名(和文) 口腔内腫瘍病変の悪性化と環境因子の相関 TRPチャネルをめぐって

研究課題名(英文) Up-regulated expression of transient receptor potential cation channel subfamily V receptors in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

榭原 晶子 (Sakakibara, Akiko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00569866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内に発症する扁平上皮癌(以下SCC)を中心とする悪性腫瘍では、発ガンの危険因子として喫煙や飲酒の他に、持続的な物理的刺激が挙げられる。近年になり、物理刺激の受容体であるTRP(transient receptor potential)イオンチャネルが上皮系に発現していることが明らかとなった。本研究課題では、TRPと発癌の相関を解析し、癌化の予防および担癌患者における腫瘍進展のコントロールを目指した。まず、TRPVが人の口腔粘膜に発現していることが確認された。また、正常粘膜と、口腔扁平上皮癌では、癌の方がより多く発現していた。タバコ、酒の影響は、嗜好がある人ほど、発現量が多かった。

研究成果の概要(英文)：The oral cavity is exposed to various stimuli. TRPV1–4 are expressed in skin and neurons and activated by external stimuli. We investigated the expression of TRPV1–4 in human oral mucosa, which receives a variety of external stimuli during the act of eating. In addition, we compared the levels of TRPV1–4 in human squamous cell carcinoma to those in normal oral mucosa. The receptors were expressed in oral mucosa at all sites in the oral cavity and the expression was stronger in squamous cell carcinoma than in normal epithelia. Furthermore, alcohol consumption and tobacco were strongly associated with the occurrence of oral cancer and were found to have a remarkable influence on expression of TRPV in normal oral mucosa. We conclude that various external stimuli may influence the behavior of cancer cells. These findings could contribute to the establishment of novel strategies for cancer therapy or prevention.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：TRPV

1. 研究開始当初の背景

口腔内癌や咽頭・食道癌の発症には喫煙や飲酒が深く関与している。これらは化学物質による DNA 損傷の誘引をその原因とする。一方で歯牙による慢性的な機械刺激や過熱した食餌の摂取により損傷した粘膜の修復過程では“急速な”細胞増殖を伴い、DNA の複製時に癌抑制遺伝子による生物学的な suppression が十分に機能せず、エラーが増幅してしまい癌化に至ると考えられる。

機械刺激や熱刺激を生体が受容するにあたり、下等生物から高等生物に至るまで共通して環境からの防御を目的とする忌避のため、運動という output を導き出す。故に神経系にその刺激を信号として集めるために受容体は神経細胞であると考えられてきた。

1997年にカプサイシン受容体である TRPV1 が同定された。TRPV1 は TRP (transient receptor potential) イオンチャネルスーパーファミリーに属する。また、TRPV1 は温度受容体としても機能することが明らかとなった。その後、6つの温度受容体としての TRPV サブファミリーが同定された(文献 2,3)。当初、これらの受容体は神経系にのみ発現するとされていたが、皮膚や口腔粘膜などの上皮系にも発現していることが明らかとなりつつあるが、その機能については未だ解明されていない。

TRPV サブファミリー(以下、TRP-X)はその特異的な温度を始めとする外的刺激を受容した後、神経系では細胞内シグナル伝達系として細胞増殖シグナルとして知られる ERK1/2 をリン酸化し、活性化することが明らかとなった。上皮系において ERK1/2 の発現は様々な研究により明らかであり、統合して推察すると、例えば口腔内においては外的刺激により損傷した粘膜組織を修復するために、損傷を免れた上皮細胞が刺激を受容し、細胞増殖シグナルを活性化することで細胞増殖を促進することが想定される。

2. 研究の目的

これまでの知見により、TRPV1 は口腔内 SCC 病変において、その発現量が up-regulate されていることが明らかとなっている。前癌病変での TRPVX の発現、および TRP-X と癌化の相関については明らかとなっていないが、白板症などの前癌病変において、TRP-X の発現が up-regulate されると仮定すると、上皮での細胞レベルにおける外的刺激に対する感度は高められ、軽微な外的刺激に対しても細胞増殖シグナルが容易に活性化されてしまい、遺伝子複製でのコピーエラーの確率を高める可能性が考えられる。逆に考えれば、前癌病変を有する場合、または外科的切除の待機および化学療法・放射線療法を行っている担癌患者では、これらの受容体に対する外的刺激を抑制することで、癌化および癌の進展を抑制できる可能性がある。

3. 研究の方法

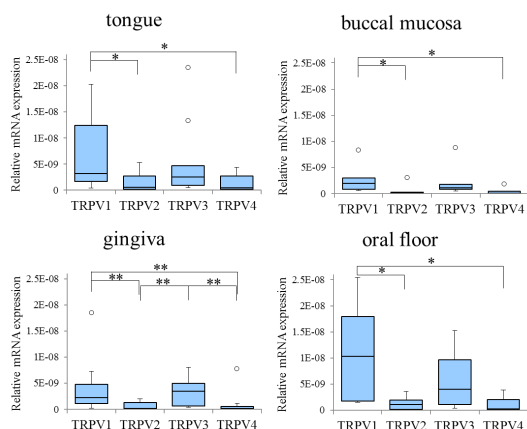
対象は 2012 年 6 月から 2015 年 1 月までに、神戸大学医学部附属病院歯科口腔外科で外科切除術を施行された 37 人の口腔扁平上皮癌患者。各患者から口腔扁平上皮癌組織と正常粘膜組織を採取した。臨床データは、後ろ向きに年齢、性別、腫瘍の場所、病理学的所見を含む。外科切除術において得られる腫瘍組織と正常組織は、直ちに凍結して、その後の使用まで、マイナス 80 度で保存された。

採取した癌と正常粘膜から得たトータル RNA を用いて、それぞれ、定量的リアルタイム PCR による mRNA 発現レベルの測定を行った。また、免疫組織化学染色にて、TRPV の発現を確認した。

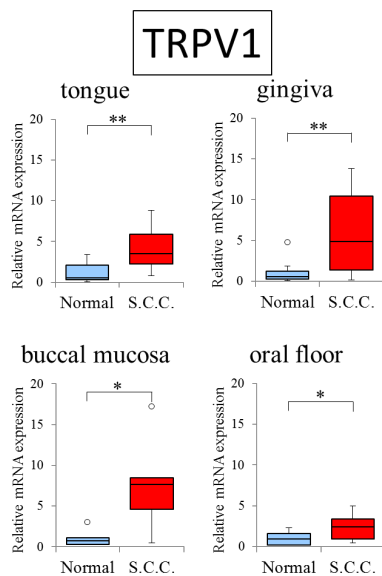
4. 研究成果

これまでのわれわれの研究では、real time PCR 法および、免疫組織化学染色法により、TRPV1,2,3,4 全てにおいて、ヒト口腔正常

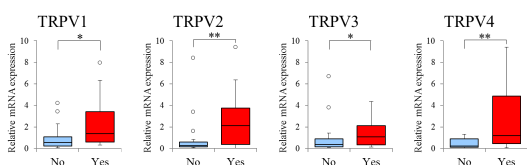
粘膜（舌、歯肉、頬粘膜、口底）での発現が確認された。



口腔扁平上皮癌と口腔正常粘膜における TRPV1, 2, 3, 4 の発現量は、扁平上皮癌の方が有意に増加していた。

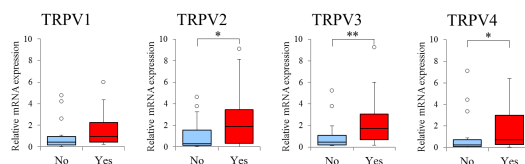


TRPV1, 2, 3, 4 全てにおいて、ヒト口腔正常粘で‘飲酒あり’群の方が、‘飲酒なし’群よりも有意に増加していた。



TRPV2, 3, 4 において、ヒト口腔正常粘膜で‘喫煙あり’群の方が、‘喫煙なし’群より

も有意に増加しており、TRPV1 も増加傾向にあった。



本実験では正常ヒト口腔領域の歯肉、舌、口底、頬粘膜のいずれにおいても TRPV1 ~ 4 のすべての発現が定量的・定性的確認できた。このことは、熱やカプサイシンなどの化学物質が口腔粘膜になんらかの作用を示唆する。各 TRPV の発現量は 1 と 3 が多くまた、正常粘膜部位別にはいずれの TRPV も舌、口底に多く、歯肉、頬粘膜と続くことが明らかとなった。各 TRPV はそれぞれに活性化する温度感受域や化学物質がことなるため、日常では少ない温度刺激となる 52 以上に感受域をもつ TRPV4 の発現が少ない事は予測された。一方で、TRPV3 と 4 は感受域がオーバーラップしているにも関わらず、有意に TRPV3 の方が多く発現していた事より、暴露される温度刺激の頻度と発現量とは相関しない事が推測される。そもそも、刺激に対するシグナル変換のアウトプットが未知であり、また、刺激に対するシグナル変換効率が明らかとされていない今日、各 TRPV 間での発現量と機能とを結びつけて考察する事は困難である。ただし、組織学的特徴として一定のパターンがある事は明らかとなった。また口腔内各部位における発現量に差が認められた事より、一定の刺激に対してのシグナル変換はそれぞれの部位で異なる事が示唆された。今後、正常口腔粘膜における TRPV を介して変換されたシグナルのアウトプットが何なのかが明らかとなれば、興味深い見が得られる可能性がある。

ヒト正常粘膜と、扁平上皮癌を比較した所、扁平上皮癌の方が、全例で発現量が増加していた。癌細胞における TRPV の発現に関して

は、直腸がん、膀胱癌や前立腺癌などの泌尿器系癌、肺癌、肝芽腫などにおいて、検討が行われている。これまでに得られた知見では、その多くが TRPV1 へのアゴニストを作用させる事で migration は抑制されるとされている。そのため、カプサイシンを始めとする TRPV1 作動性の化学物質が癌の伸展の抑制に作用する事が示唆されており、制癌剤としての使用が期待されている。一方で、hepatoblastoma などでは、細胞そのものや血管内皮細胞の migration が TRPV1 シグナルにより活性化する事が示されており、この場合は antagonist に制癌作用が期待される事となる。悪性腫瘍の発現部位によってシグナルの作用が異なるのか、などについては今後さらに慎重な検討 / 議論が必要ではある。また、TRPV4 では正の stimulation が腫瘍細胞そのものの migration のみならず血管新生を促す事が示されており、血行性転移との相関が示唆されている。口腔領域の SCC における TRPV シグナルの作用は今後検討が必要であるが、疫学的に外的刺激が悪性腫瘍の発生因子であることを考えると antagonist が発癌の抑制作用や制癌作用を持つと考える方が自然である。一方で、カプサイシンが口腔扁平上皮癌の増殖を抑制するという知見がある。Gonzales らはカプサイシンを単離培養された口腔扁平上皮癌に作用させる、ないしは腫瘍病変に局所注射することでアポトーシスを誘導できることに注目し、その作用機序について検討を行った所、TRPV1 を介したシグナル伝達には依存せず、ROS の発生による細胞死であると結論づけた。実際にカプサイシンが発癌因子であるという見解はなく、疫学的にもカプサイシンを習慣的に摂取する民族において口腔癌の発生が高くなったという知見は得られていない。ただし、カプサイシンクリーム の長期利用が皮膚癌の発症の危険因子であるということが示されている。カプサイシンを起点とする発癌ないしは制

癌作用については複数の経路があることが示唆されており、濃度依存的にいずれの作用も示しうる可能性がある。

正常粘膜では喫煙や飲酒により TRPV が増加することがわかった。喫煙や飲酒は、癌危険因子であるが、正常細胞の癌化プロセスに TRPV の活性や増加が関与している可能性がある。正常細胞において TRPV の活性化が細胞増殖に働くとすれば、喫煙飲酒の外的刺激により異常増殖の悪循環となる。よって正常細胞の悪性化の転機となる可能性があると考えられる。アルコールやタバコの煙に含まれる化学物質は各 TRPV のアゴニストとして作用することは示されておらず、飲酒や喫煙により TRPV シグナルが増強された結果、これらの受容体の発現が up-regulate されたとは考えにくい。逆に飲酒や喫煙といった環境因子が正常粘膜に作用した結果、細胞がある程度の形質転換を起こし、受容体の発現量が増加していると考えられる。前癌病変である白板症での TRPV 発現量の検討を行なうことで TRPV 発現量と癌化の危険度との相関を示す事が出来る可能性がある。つまり、常習的に喫煙や飲酒を行っている者の口腔粘膜をスクラッチして TRPV mRNA 量を計測する事で、発癌の危険度を示し、alert をならず事が出来るようになるかもしれない。ただし、白板症の治療においては切除された病変の詳細な病理評価が必要となる為、検体の採取は倫理的に困難であり、われわれはこの検討を行う事が出来なかった。今後、動物モデルでの検討が必要と考えられる。

正常口腔粘膜において、部位別検討においても、口腔全体での検討においても優位さは認められなかったものの舌 / 口腔底において各 TRPV1-4 の発現量が多く、頬粘膜、歯肉には少なかった。実際に口腔癌の発生部位は舌および口腔底に多く、頬粘膜や歯肉には少ない事が示されている。このことも TRPV の

発現量の増加による外的刺激への感受性の増大が腫瘍化を促進する事を支持する結果なのかもしれない。

口腔粘膜および口腔扁平上皮癌における TRPV の作用については現時点では明らかにされていない。TRPV はそのものが外的刺激に対する開閉型のカルシウムチャンネルであり、直接に分子間相互作用するセカンドメッセンジャーを持たない。この事は、TRPV タンパクの発現は細胞における刺激受容後のイオン勾配の形成を示唆するため、細胞挙動に影響を及ぼす可能性が高い。また、表皮や粘膜といった上皮系細胞では Gap junction を介してイオン勾配を伝達する事で隣接する細胞とのシグナル伝達が行われている事が示されている。これらを併せると、TRPV を介する外的刺激はその刺激を受容した細胞に隣接する細胞へと伝達され、局所として変化をもたらす可能性が推測される。

また、TRPV の活性化により炎症性サイトカインを放出する事が示されている。この炎症性サイトカインが痛覚の受容体に作用すると痛みとして認識されることが実験的に示されている。実際にカプサイシンへの暴露は TRPV1 を介して痛みとして認識されることは広く知られた事実である。ただし、この系は神経系において示されている。癌患者では局所の強い疼痛を訴える事が多く、われわれのデータからは癌組織において TRPV の発現量が亢進していることから、TRPV の過剰発現が外的刺激に対する感受性の増強の一因となっている事が示唆される。

いずれにしても正常口腔粘膜および口腔扁平上皮癌における TRPV の発現および発現様式は興味深い知見であり、更なる研究が外的刺激と腫瘍化との関連を明らかにしていくであろう。

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 6 件、他)

1 . Sakakibara A, Minamikawa T, Hashikawa K, Sakakibara S, Hasegawa T, Akashi M, Furudo S, Komori T. Does salivary duct repositioning prevent complications after tumor resection or salivary gland surgery? J Oral Maxillofac Surg.73(5):1003-7, 2015.

2 . Sakakibara A, Suzuki H, Yamashita A, Hasegawa T, Minamikawa T, Furudo S, Komori T. Facial emphysema after sinus lift. J Surg Case Rep. 18(6), 2015.

3 . Sakakibara A, Furudo S, Sakakibara S, Kaji M, Shigeta T, Matsui T, Minamikawa T, Komori T. Tunnel Technique for the Closure of an Oroantral Fistula with a Pedicled Palatal Mucoperiosteal Flap. J Maxillofac Oral Surg. 14(3): 868-74, 2015.

4 . 榊原 晶子, 榊原 俊介, 南川 勉, 重田 崇至, 橋川 和信, 古森 孝英. 顎下部壊死性筋膜炎に伴う切開排膿後の難治性瘻孔に V.A.C. ATS 治療システムによる局所陰圧閉鎖療法を用いた 1 例. 日口外誌 60: 71-75, 2014.

5 . Sakakibara A, Hashikawa K, Yokoo S, Sakakibara S, Komori T, Tahara S. Risk factors and surgical refinements of postresective mandibular reconstruction: a retrospective study. Plast Surg Int. 893746, 2014.

6 . 榊原 晶子, 古森 孝英. 全身疾患と抜歯-最新の知識による適切な対応-脳血管障害を有する患者の抜歯-. 歯科医療 29: 25-29, 2015.

[学会発表] (計 5 件)

第 34 回口腔腫瘍学会

第 60 回口腔外科学会

第 59 回口腔外科学会

第 58 回口腔外科学会

第 57 回口腔外科学会

6 . 研究組織

(1)研究代表者

榊原 晶子 (SAKAKIBARA , Akiko)

神戸大学医学部附属病院 特定助教

研究者番号 : 00569866