

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792238

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子CYLDの機能解析による口腔癌の分子基盤の新展開と個別化治療への発展

研究課題名(英文) Roles of the tumor suppressor CYLD in progression and personalized medicine of oral cancer

研究代表者

神力 悟 (Shinriki, Satoru)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00583048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により以下のような知見が得られた。1. Cyldromatosis (CYLD) の発現は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の浸潤領域において低下しており、それは過剰なSmad3リン酸化と不良な生命予後と関連していた。2. OSCC細胞におけるCYLD発現抑制は、SMURF2依存的なTGFBR1の分解を抑制することでTGFβシグナリングを活性化し、間葉系質の獲得、運動能の亢進を誘導した。3. CYLD発現抑制は、シスプラチン抵抗性を誘導したが、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤への感受性を逆に増加させた。4. CYLD発現抑制はin vitroにおいてOSCC細胞の長期分裂静止状態を誘導した。

研究成果の概要(英文)：We obtained the results as follows;1. Expression of Cyldromatosis (CYLD) was reduced in invasive region in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues, which was significantly associated with increased Smad3 phosphorylation and worse prognosis. 2. CYLD knockdown inhibited SMURF2-dependent degradation of TGFBR1, leading to promoted TGFbeta signaling activation, acquisition of mesenchymal state and increased migration. 3. CYLD repression led to resistance to cisplatin but increased susceptibility to EGFR tyrosine kinase inhibitor-inducible apoptosis in OSCC cells. 4. Loss of CYLD induced long-term quiescent state in OSCC cells in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：国際情報交換 口腔扁平上皮癌 CYLD TGF EMT

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌は頭頸部癌の約 60% を占める疾患であり、その 90% 以上を口腔扁平上皮癌 (OSCC) が占めている。近年、頭頸部癌で初の分子標的薬である抗上皮成長因子受容体 (EGFR) 抗体が進行癌患者の生命予後を過去 30 年間で唯一改善することが判明し、分子レベルでの病態の把握が予後を改善しうることが示された。しかし、現段階では有効症例の特定や効果予測ができず、全体としての効果も必ずしも十分とは言えず、さらなる分子レベルでの病態把握により、個別化された治療法の開発が不可欠となっている。

(2) CYLD 遺伝子は癌抑制遺伝子として認識されているものの、癌の病態における役割は未だに謎に包まれている。申請者はヒト OSCC を対象に検討を行ってきたところ、CYLD 発現の低下は細胞レベルでさまざまな悪性形質を誘導することが明らかとなってきた。また、CYLD はトランスフォーミング増殖因子 (TGF β) シグナルや EGFR と密接な関係にあることが判明した。これらを標的とした治療は、現在すでに OSCC を含む多くの癌で臨床や臨床試験で応用されているが、治療効果に直結する分子特性には不明な点が多い。CYLD は癌抑制遺伝子としての機能をもつ一方で、それらの分子標的治療の感受性を規定している可能性がある。

本研究では、CYLD の発現や機能に密接に携わる分子群を見つけ出し、OSCC の分子基盤の解明と個別化治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

(1) OSCC における CYLD 発現・変異の臨床的意義の解明

OSCC 組織における CYLD タンパク質の発現動態や遺伝子変異とそれらの臨床的意義を検討する。

(2) OSCC の発生・進展における CYLD の機能の解明

CYLD の上皮間葉転換 (EMT) および転移過程への影響とその分子機構の解明 ~ TGF β シグナルの癌促進作用選択的な治療法の開発 ~

近年、予後を大きく左右する癌の浸潤・転移の過程は EMT に基づくと考えられている。申請者は既に、多くの OSCC 細胞株と正常上皮細胞の CYLD 発現を抑制することで、TGF β 受容体 1 (ALK5) 活性依存的に EMT が誘導されることを見出した。さらにその ALK5 依存性は癌細胞に特異的で、リガンド非依存的であることが示された。TGF β によって誘導されるシグナルは、正常上皮や初期癌においては腫瘍抑制的に働く一方で、進行癌においては EMT・浸潤などを介して悪性化促進的に働くが、その二面性を規定する要因はほとんどわかっていない。本研究では、OSCC の浸潤・転移機構の解明および TGF β シグナルの癌促進作用選択的治療の開発を目指す。

CYLD による EGFR シグナリングの調節機構の

解明

近年 OSCC 治療に導入された EGFR 標的治療の問題点として、患者選択の手段がなく、全体としての効果も十分とはいえない。そのような状況の中、申請者が検討を行ったところ、CYLD の発現を抑制した OSCC 細胞は、抗癌剤シスプラチンに対して著しく耐性を示すにも関わらず、EGFR チロシキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の抗腫瘍効果に対する感受性は逆に極めて高いことが判明した。詳細な分子機構の解明は、EGFR 標的治療の患者選択や耐性機構の解明のみならず、新たな標的治療の開発に貢献すると考えられる。本研究では OSCC の個別化治療実現のために CYLD が EGFR 標的治療の感受性を規定する分子機構の解明を目指す。

(3) CYLD の発現制御機構の解明

近年 CYLD の多彩な機能が明らかとなってきたにも関わらず、CYLD 遺伝子・タンパク質の発現制御機構はほとんどわかっていないため、OSCC における CYLD 発現制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) OSCC における CYLD の発現とその臨床的意義の解析

正常組織、OSCC 組織での CYLD 発現様式を免疫組織化学染色にて解析し、その結果と臨床情報との関連を検討した。

(2) OSCC における CYLD の機能の解析

CYLD 発現低下が誘導する EMT の分子機構の解析

5 種類の OSCC 細胞株 (SAS、Ca9-22、HSC3、Tu4、SCC-NA、SCC-KN) と HaCaT 上皮細胞を対象として、siRNA による CYLD の一過性発現抑制を行い、増殖、生存能、抗癌剤感受性、上皮・間葉系質、運動能、各種発現解析 (タンパク質、遺伝子) の評価と、それらの変化の根底にある分子機構の解析を行った。特に CYLD 発現低下が EMT を誘導する知見に関しては、TGF β シグナリングを中心に解析した。すなわち、典型的な ALK5 やその下流エフェクター分子の発現、活性化や標的遺伝子の発現を評価した。個別因子の解析と並行して、CYLD 発現抑制株およびコントロール株より抽出した RNA をもとに Affymetrix 社製 GeneChip システムを用いて網羅的に遺伝子発現変化を解析した。また、Halo-tag 標識野生型 CYLD を OSCC 細胞に導入後、Halo をプルダウンし、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) を用いて CYLD に結合する分子を網羅的に解析した。

一方、CYLD 安定発現抑制株の作製を試みた。また、それを前提として、GFP などの蛍光物質やホタルルシフェラーゼを組み込んだ OSCC 細胞株の樹立を行った。

CYLD による EGFR シグナリングの調節機構の解析

CYLD 発現抑制細胞で EGFR-TKI (ゲフィチニブ、AG1478) による細胞増殖抑制作用が増強する分子機構を解析した。FACS によりアポト

ーシスを評価するとともに、感受性変化の普遍性を各種OSCC細胞株やHaCaT細胞を用いて検討した。また、現時点でOSCC治療において承認が得られている抗EGFR抗体（セツキシマブ）への感受性変化も併せて検討した。

EGFR標的治療に対する感受性増加の分子機構の解析として、Pathscan RTK array（CST）を用いて、EGFRやその下流分子を含む39種類のチロシンキナーゼの活性変化を解析した。

（3）CYLD の発現低下誘導メカニズムに関する検討

低酸素環境下で CYLD の発現が低下する自身の知見を受けて、同現象の普遍性を他の細胞種を用いて検証するとともに、再酸素化の影響などを解析した。

4. 研究成果

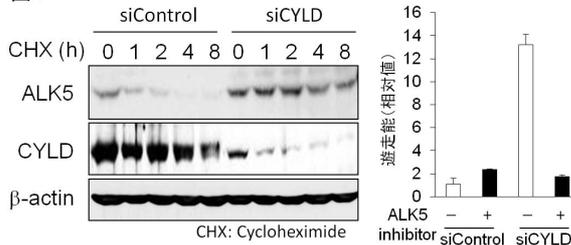
（1）OSCC における CYLD 発現とその意義

正常口腔粘膜上皮や OSCC の上皮内癌において CYLD 発現は認められたものの、浸潤型 OSCC の浸潤領域や低酸素（CA IX 高発現）領域において CYLD の発現は低下していた。そのような CYLD 発現低下は、不良な全生存期間と関連しているとともに、TGFβシグナリングにおける重要なエフェクターである Smad3 の高度なリン酸化と関連していた。

（2）OSCC における CYLD の機能解析

CYLD は OSCC 細胞において SMURF2 依存的な ALK5 の分解を促進することで、TGFβシグナリングを抑制していることが明らかとなった。ALK5 の分解は、リソソームとプロテアソーム双方を介していた。逆に、OSCC 細胞の CYLD 発現を一過性に抑制すると、ALK5 の安定化と TGFβシグナリングの活性化を介して運動能の亢進を伴う EMT 様変化が誘導された（図1）。この結果と一致する様に網羅的遺伝子発現解析と global gene-set enrichment analysis（GSEA）の結果、CYLD 発現低下により TGFβ 応答遺伝子群が大きく変動していることも明らかとなった。LC-MS/MS の結果、いくつかの興味深い分子と CYLD との結合が確認されている。現在、上記知見を活かしつつ正常上皮細胞との比較検討により、TGFβシグナリングのスイッチ機構の解析を行っている。

図1

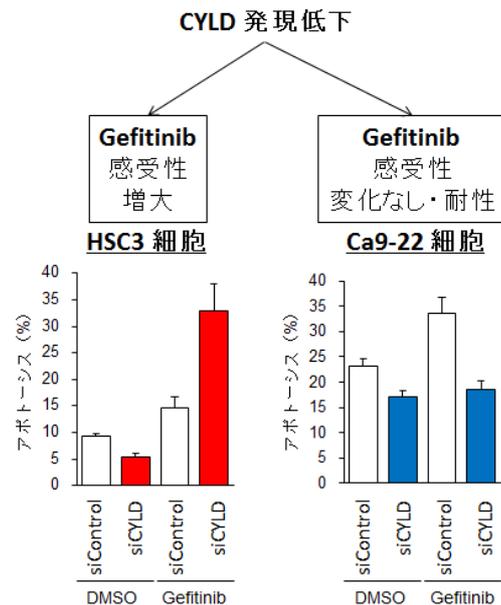


CYLD 発現抑制は OSCC 細胞の生存能を上昇させるとともに、シスプラチン耐性を誘導した。EGFR-TKI 誘導性のアポトーシスは、CYLD 発現抑制後に増加する群（HaCaT 上皮細胞と SAS を含む OSCC 3 株）、低下する群（OSCC 3 株）、変わらない群（OSCC 1 株）に分かれた

（図2）。興味深いことに、SAS 細胞ではセツキシマブによる EGFR シグナリング阻害に対する感受性は著しく低下していた。同じ EGFR を標的とした治療薬でも効果が真逆に別れるという本知見は、自身の知る限り初めてであり、EGFR シグナリング機構の詳細な解明や個別化治療の実現において重要である。

チロシンキナーゼの活性化を幅広く解析したところ、EGFR-TKI に対する感受性増加には Met の発現もしくは活性が関与していることが示唆された。今後はさらに詳細に解析するとともに、EGFR の局在や修飾などを重点的に解析する必要があると考えられる。

図2



OSCC 細胞において、CYLD 発現抑制は in vitro で安定した分裂静止状態を誘導した。GSEA では、この知見と一致する結果が得られた。現在、恒常的発現抑制ではない CYLD 発現制御システムを開発中であり、システム確立後に、詳細な in vitro 解析と in vivo 実験に供する。

（3）CYLD 発現低下の分子機構

低酸素による CYLD 発現低下は、用いた全ての OSCC 細胞や HaCaT 細胞、神経膠芽腫細胞において認められた。SAS 細胞を対象とした再酸素化実験の結果、そのような CYLD 発現低下は不可逆的であることが示唆された。

本研究結果より、低酸素や未知の原因を介した OSCC における CYLD 発現低下は、TGFβシグナリングの活性化亢進による EMT 様変化を介して OSCC の浸潤と、tumor cell dormancy 様の現象を介して OSCC 患者の不良な予後に関連している可能性が示された。しかし、そのような悪性度の高い細胞の一部の分画に対しては、抗 EGFR 抗体ではなく EGFR-TKI が有効であると考えられた。今後の詳細な解析は、OSCC の転移機構の解明や個別化治療の発展に寄与すると考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

神力悟, 城野博史, 中村拓哉, 郭建工イ, 林光博, 田崎雅義, 大林光念, 篠原正徳, 安東由喜雄. CYLD の発現低下は ALK5 の安定化を介して口腔扁平上皮癌の遊走を促進させる. 第 72 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜.

Shinriki S, Jono H, Li JD, Nakamura T, Hayashi M, Guo J, Shinohara M, Ando Y. Loss of CYLD promotes cell migration through stabilized ALK5 in human oral squamous cell carcinoma cells. 104th AACR Annual Meeting 2013. April 6-10, 2013. Washington DC, USA.

神力悟, 中村拓哉, 林光博, 篠原正徳, 安東由喜雄. CYLD の発現低下は口腔扁平上皮癌の進展を促進すると同時に EGFR 標的治療の感受性を増加させる. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌.

神力悟, 城野博史, 大林光念, 田崎雅義, 安東由喜雄. 頭頸部扁平上皮癌における CYLD の発現低下は EGFR を介して高度悪性形質の獲得を誘導する. 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会, 2012 年 9 月 7-9 日, 盛岡.

Shinriki S, Jono H, Nakamura T, Hayashi M, Yamamoto Y, Ibusuki M, Sueyoshi T, Ota T, Shinohara M, Ando Y. Downregulation of CYLD leads to acquisition of mesenchymal state and increased migration via ligand-independent TGFβR1 activation in human oral squamous cell carcinoma cells. 103rd AACR Annual Meeting 2012. April 1-4, 2012. Chicago, Illinois, USA.

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神力 悟 (SHINRIKI, Satoru)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 00583048