

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：87105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463124

研究課題名(和文) 薬剤抵抗性口腔扁平上皮癌におけるSTAT3の腫瘍抑制系ネットワークへの関与

研究課題名(英文) Study for the tumor suppressor network through STAT3 regulation in drug-resistance of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

大関 悟 (Ozeki, Satoru)

独立行政法人国立病院機構九州医療センター(臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：80117077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死誘導抵抗性に関わるSTAT3を腫瘍の薬剤抵抗性に関わる標的因子として解析した。口腔扁平上皮癌症例におけるIL-6高発現症例はリン酸化STAT3発現を認め、リンパ節転移、術前化学放射線療法抵抗性や予後不良等との相関性を示した。抗癌薬剤として注目されるV-ATPase阻害剤に対する口腔扁平上皮癌細胞株の抵抗性について検討した処、薬剤抵抗性細胞株を認めた。腫瘍の薬剤抵抗性を解除するといわれるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を薬剤抵抗性細胞株に併用すると、細胞増殖抑制効果が確認され、STAT3のリン酸化にも変化が認められた。口腔扁平上皮癌症例の治療抵抗性にはSTAT3発現の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The overcome of the resistance of such tumors to the chemotherapeutic agents is required to improve the tumor specificity for OSCC. We studied the tumor suppressor network through regulation of STAT3 in drug-resistance of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The high IL-6 expression OSCCs showed highly expression of phosphorylated STAT3 and correlated closely with cervical lymph node metastases, preoperative chemoradiotherapy resistance and unfavourable prognosis. Because V-ATPase plays a critical role in tumor progression, the effects of a V-ATPase inhibitor on the proliferation and apoptosis of OSCC were investigated. The treatment of V-ATPase inhibitor combined with a histone deacetylase inhibitor changed STAT3 phosphorylation in the drug-resistant OSCC cells. These cells became more susceptible to the V-ATPase inhibitor. These results suggested that the regulation of activated STAT3 in the cancer cells could help improve poor response to chemotherapy and unfavorable prognosis.

研究分野：外科系歯学 臨床腫瘍学

キーワード：口腔扁平上皮癌 STAT3 アポトーシス 薬剤抵抗性 腫瘍細胞活性ネットワーク 腫瘍増殖活性化 腫瘍増殖抑制

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

病理組織学的に同じ範疇に入る悪性腫瘍が様々な細胞増殖や浸潤・転移能、薬剤抵抗性および炎症細胞の反応性等を呈し、症例間で画一的ではないことを臨床上しばしば経験する。中でも腫瘍に薬剤抵抗性を付与する因子は格好の標的因子であるが、腫瘍の薬剤抵抗性のメカニズムは未だ十分には解明されていない。

我々の一連の研究で各腫瘍細胞の形質を解析していく過程で、多くの腫瘍の治療に用いられるcisplatinや現在抗癌剤としても注目されるV-ATPase阻害剤に強い薬剤抵抗性を示す口腔扁平細胞癌細胞株が見つかった。そこで、本課題ではこれらを用いて腫瘍に薬剤抵抗性を付与する標的因子を検索することとし、まずsignal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)を標的因子として腫瘍抑制系ネットワークへの関与を解析した。

STAT3はcytokineをはじめとする外部刺激により活性化する転写因子であり、様々な生理的作用を有し、腫瘍化、発育や浸潤・転移に関わる。口腔扁平上皮癌をはじめとする多くの悪性腫瘍で、STAT3の恒常的高発現が見られる。我々は最近、IL-6 やIL-22といったcytokineに反応して口腔扁平上皮癌がSTAT3を活性化し、cytokeratin、SCC 抗原 (SCCA) 他様々な遺伝子の発現変化をもたらすことを報告した (Naher et al, Int J Oncol, 2012)。また我々は、代表的な扁平上皮癌の腫瘍マーカーであるSCCAがミトコンドリアを介するアポトーシス経路に作用し、アポトーシス抵抗性に関与すること (Hashimoto et al, Tumour Biol, 2005) を明らかにし、STAT3が口腔扁平上皮癌で高発現するS100A7の発現制御にも関わることを示唆してきた (Fukuzawa et al, BBA, 2006)。

さらにSTAT3がARF-p53腫瘍抑制系ネットワークの不活性化にも関わり、薬剤抵抗性を有する腫瘍における標的因子の候補に挙げられている (Barré et al, Trends Mol Med, 2007)。2012年にHaung et al.は、次のように報告している。ヒト胃腺癌細胞由来培養細胞より株分けしたcisplatin抵抗性細胞群はSTAT3の発現上昇を示し、STAT3抑制によってその薬剤抵抗性は減弱した (Cancer lett, 2012)。

ヒトのヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) はヒストン修飾により遺伝

子発現を制御し、1996年にクローニングされた。ヒトのHDACは現在18種類に及び、ヒドロキサム酸系HDAC阻害剤の代表的なものとしてスベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) が挙げられる。HDAC阻害剤は細胞分化誘導、細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、細胞浸潤・転移の抑制、血管新生の抑制といった様々な作用機序により抗腫瘍効果を示すとされる。これらの作用は、上述したSTAT3の作用と相反する。本研究では、SAHAの作用機序とSTAT3の関与の検索を行う。

そして、薬剤抵抗性口腔扁平上皮癌細胞にHDAC阻害剤の前処理をすると、抵抗性を示していた薬剤によって細胞死が誘導されることを我々は既に確認していることから、HDAC阻害剤の前処理により腫瘍細胞の遺伝子発現がどのように変化したのか、細胞死がどのように誘導されたのか、STAT3やARF-p53腫瘍抑制系ネットワークへどのように関与するのか、といった方向にも興味広がる。

2. 研究の目的

癌治療をする上で、腫瘍における抗癌剤をはじめとする薬剤への抵抗性は大きな障害となるが、腫瘍の薬剤抵抗性のメカニズムは未だ十分には解明されていない。そこで、口腔扁平上皮癌をはじめとする多くの悪性腫瘍で恒常的に高発現し、細胞周期停止や細胞死誘導を回避する因子であるSTAT3に着目した。

本研究では、STAT3抑制により薬剤抵抗性口腔扁平上皮癌細胞の薬剤抵抗性が減じて細胞死が誘導されるのかを検討し、その作用機序を解明する。また、この薬剤抵抗性口腔扁平上皮癌細胞はHDAC阻害剤の前処理により細胞死が誘導されることから、その機序にSTAT3がどのように関与しているのかを検討する。

3. 研究の方法 & 4. 研究成果

癌治療を困難にする原因のひとつとして、腫瘍の薬剤抵抗性が考えられる。そこで、多くの悪性腫瘍で恒常的高発現が見られ、細胞死誘導抵抗性に関わるsignal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)を標的因子として腫瘍抑制系ネットワークへの関与を解析し、以下の結果が得られた。

OSCC生検および切除標本を用いて、IL-6とリン酸化STAT3の発現局在を免疫組織化学染色法にて検索し、臨床病理学的に統計解析を行った。IL-6陰性群および低発現群に比べ、IL-6高発現群では癌細胞の核内にpSTAT3の発現を認め、頸部リンパ節転移と遠隔転移の発生頻度が有意に高く、術前放射線化学療法による抗腫瘍効果が病理組織学的には乏しかった。また、予後が不良であった。

複数のOSCC細胞株においてIL-6とIL-6Rの発現が認められた。抗癌剤の濃度上昇につれて細胞生存率の低下を認めたが、IL-6の発現量が多い細胞株では抗癌剤に対し抵抗性を示した。また、添加したrhIL-6 proteinの濃度上昇につれ、抗癌剤による細胞生存率の低下が抑制された。

OSCC細胞におけるIL-6の発現が抗癌剤に対する抵抗性の獲得に関与しており、STAT3シグナルを介した伝達経路がその重要な役割を果たしていると考えられた。

抗癌薬剤として注目されているV-ATPase阻害剤に対する口腔扁平上皮癌細胞株の抵抗性について検討した。V-ATPase阻害剤のConcanamycin A (CMA)の効果を検討した処、細胞死が誘導され、感受性を示す細胞株(MISK-81-5、HSC-4、SAS)がある一方、SQUU-B株はCMA抵抗性を示した。

近年腫瘍の示す薬剤抵抗性を解除して抗癌薬剤の抗腫瘍効果を改善させると報告されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(SAHA)をCMA抵抗性細胞株にCMAと併用し、細胞増殖抑制効果の検討も行った。

CMA抵抗性SQUU-B株に対してSAHAを併用すると、細胞増殖抑制効果が確認された。SAHAを併用されたSQUU-Bでは、BaxやBcl-2の発現変化が見られ、Bcl-2の上流因子STATのリン酸化にも変化が認められた。また、Bcl-2阻害剤やsiRNA処理下におけるCMAによるSQUU-Bの細胞増殖抑制効果も見られた。

口腔扁平上皮癌に対してCMAの抗癌効果はある程度認められるものの、CMA抵抗性口腔扁平上皮癌に対してはSAHA併用の有効性が示唆され、その抵抗性の解除にはSAHAによるBcl-2発現抑制が影響していることが示唆された。

上述のようにHSC-2とSASは細胞死が誘導され、薬剤感受性を示す一方、SQUU-B株は抵抗

性を呈したことで、癌細胞の薬剤抵抗性に関与が注目した。細胞内ストレスに関係するGlucose-related Protein 78 (GRP78)が介する細胞死誘導の解明を試みた。まず、未処理細胞内のGRP78発現量と細胞内局在部位をwestern blotting法や免疫蛍光細胞染色法を用いて各々検索した。検索した細胞株によってGRP78発現量は異なっていた。予想とは反し、検索した細胞株の中でSQUU-B株が最もGRP78発現量は低かった。細胞内局在部位はいずれの細胞株においても細胞質内にびまん性の陽性像を認めた。また、共焦点レーザー顕微鏡にて核内に局在するGRP78も確認した。cisplatin、SAHA処理による癌細胞株の細胞死誘導における関連因子発現変化とGRP78発現量変化について検討した。

STAT3は、OSCC細胞株に対して様々な扁平上皮分化マーカーの発現に影響を及ぼした。種々のサイトケラチンは、発現に影響を受けたマーカーに含まれる。また、そのサイトケラチンの発現制御には、Hedgehogシグナル経路も関与しているという。そこで、我々はこのHedgehogシグナル経路に注目し、口腔扁平上皮癌の癌形質に対するHedgehogシグナル経路の関与を検討した。また、そのサイトケラチンの癌形質への影響を検討した。

Hedgehogシグナル経路に対するある阻害薬を添加すると、OSCC細胞株の細胞残存数が非添加群と比較して阻害薬濃度依存的に減少していた。Annexin-V染色、TUNEL法やDNA ladderにより、Hedgehogシグナル経路に対する阻害薬によるアポトーシス誘導が確認された。これにより、OSCCにおけるHedgehogシグナル経路阻害が新たな癌の標的となる可能性が示唆された。また、種発現に影響を受けたサイトケラチンの発現調節を行うと、細胞増殖や扁平上皮分化マーカーである他のサイトケラチンの発現にも影響し、癌形質への関与が示唆された。

口腔扁平上皮癌の骨への浸潤破壊はしばしば認められ、治療法や手術範囲や予後を左右する。骨粗鬆症治療の第一選択薬であるビスフォスフォネート(BP)は、癌による骨量減少に対する有効な治療薬としても注目されている。ところが、抜歯などの外科的侵襲を契機に顎骨壊死を引き起こす、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死が知られ、原因としてBPによる破骨細胞の分化抑制が考えられる。そこで、BPによる破骨細胞の分化抑制とBPの効果調節

を検討したところ、*in vitro* および *in vivo* 実験にてある薬剤の添加にて BP による破骨細胞の分化抑制の回避する可能性が示唆された。

これらの結果と、結果を得る過程で生じた問題点や改善点は次期戦略の礎として有用である。将来的にはがん組織に応じて多種多彩な標的因子から効果的な因子を選択することが出来るように、上記検索から得られた問題点や改善点を踏まえてさらに研究を展開していく。

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)

- (1) Kiyoshima T., Yoshida H., Wada H., Nagata K., Fujiwara H., Kihara M., Hasegawa K., Someya H. and Sakai H.

Chemoresistance to concanamycin A1 in human oral squamous cell carcinoma is attenuated by an HDAC inhibitor partly via suppression of Bcl-2 expression.

PLoS One 8(11): e80998 (2013).

DOI: 10.1371/journal.pone.0080998.

査読あり

- (2) Sasaki M., Kajiya H., Ozeki S., Ikebe T. and Okabe K.

Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16(INK4a).

Biochem Biophys Res Commun. 452(3): 622-8 (2014).

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.08.123.

査読あり

- (3) Jinno T., Kawano S., Maruse Y., Matsubara R., Goto Y., Sakamoto T., Hashiguchi Y., Kaneko N., Tanaka H., Kitamura R., Toyoshima T., Jinno A., Moriyama M., Oobu K., Kiyoshima T. and Nakamura S.

Increased expression of interleukin-6 predicts poor response to chemoradiotherapy and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma.

Oncol Rep. 33(5): 2161-8 (2015).

DOI: 10.3892/or.2015.3838.

査読あり

- (4) Nagaoka Y., Kajiya H., Ozeki S., Ikebe T. and Okabe K.

Mevalonates restore zoledronic acid-induced osteoclastogenesis inhibition.

J Dent Res. 94(4): 594-601 (2015).

DOI: 10.1177/0022034514564187.

査読あり

- (5) Someya H., Fujiwara H., Nagata K., Wada H., Hasegawa K., Mikami Y., Jinno A., Sakai H., Koyano K. and Kiyoshima T.

Thymosin beta 4 is associated with RUNX2 expression via the Smad and Akt signaling pathways in mouse dental epithelial cells.

Int. J. Mol. Med. 35(5):1169-78 (2015).

DOI: 10.3892/ijmm.2015.2118.

査読あり

- (6) Furukawa S., Moriyama M., Kawano S., Tanaka A., Maehara T., Hayashida JN., Goto Y., Kiyoshima T., Shiratsuchi H., Ohya Y., Ohta M., Imabayashi Y. and Nakamura S.

Clinical relevance of Küttner tumour and IgG4-related dacryoadenitis and sialoadenitis.

Oral Dis. 21(2): 257-62 (2015).

DOI: 10.1111/odi.12259.

査読あり

[学会発表](計 11 件)

清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、坂井英隆

口腔扁平上皮癌細胞株間における V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A 感受性について

第 102 回日本病理学会総会

2013/6/6-8, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道)

Hisashi Yoshida, Ying Wang, Tamotsu Kiyoshima, Hidetaka Sakai

Analysis of the Anti-tumor Effects of V-ATPase inhibitor, Concanamycin A1, on Oral Squamous Cell Carcinoma

103rd USCAP (United States & Canadian Academy of Pathology) Annual Meeting

2014/3/1-7, San Diego Convention Center
(San Diego, CA)

清島保、永田健吾、和田裕子、藤原弘明、
坂井英隆

V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A 抵抗性口
腔扁平上皮癌細胞株に対する SAHA 併用
による細胞増殖抑制効果

第 103 回日本病理学会総会

2014/4/24-26, 広島国際会議場・ANA クラ
ウンプラザホテル広島 (広島)

Abe M., Nagata K., Jinno A. and Kiyoshima T.
Immunocytochemical detection of glucose-
related protein 78 in oral squamous cell
carcinoma cell lines.

Kyudai Oral Bioscience

2015/2/28, Fukuoka Recent Hotel (Fukuoka)

Fukawa T, Kajiya H, Katsumata Y, Nagaoka
Y, Sasaki M, Naganuma K, Nagashima K,
Ikebe T, Ozaki S, Alex Soltermann

Is Maspin expression on tumor budding able
to be a prognostic factor in Squamous cell
carcinoma?

22th Congress of European Association for
Cranio-Maxillofacial Surgery

2015/9/24-26, Prague (Czech Republic)

Mina Sasaki, Hiroshi Kajiya, Katsunori
Nagashima, Fumie Tanaka, Yoshiyuki
Nagaoka, Yuri Katsumata, Teruhisa Fukawa,
Koji Okabe, Tetsuro Ikebe and Satoru Ozeki

Reactive oxygen species promotes cellular
senescence in normal human epidermal
keratinocytes through suppression of
methylateon on p16INK4a promoter.

22th Congress of European Association for
Cranio-Maxillofacial Surgery

2015/9/24-26, Prague (Czech Republic)

和田裕子、金城亜紀、山田裕一、孝橋賢一、
杉浦剛、小田義直、清島保

右下顎骨腫瘍

第 54 回日本骨軟部腫瘍研究会

2015/5/30, 九州大学コラボレーション
(福岡)

清島保、和田裕子

リガンド依存性受容体 DCC 蛋白による口
腔扁平上皮癌へのアポトーシス誘導

第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2015/9/11-13, 朱鷺メッセ 新潟コンベンシ
ョンセンター (新潟)

永田健吾、和田裕子、藤原弘明、三上友理
恵、神野彰子、安倍みさき、清島保

硬組織形成期歯胚における Glucose
regulated protein-78 タンパクの発現局在に
ついて

第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会

2015/9/11-13, 朱鷺メッセ 新潟コンベンシ
ョンセンター (新潟)

首藤俊一、府川晃久、池崎晶二郎、田中文
恵、橋本憲一、平木昭光、池邊哲郎

舌癌における Tumor budding (簇出) の臨
床的検討

第 34 回日本口腔腫瘍学会科学会

2016/1/21-22, 横浜市開港記念会館 (横浜)

三上友理恵、森山雅文、見立英史、家田晋
輔、川野真太郎、清島保、中村誠司

舌尖部に生じた低悪性筋線維芽細胞肉腫
(low-grade myofibroblastic sarcoma) の 1 例

第 34 回日本口腔腫瘍学会科学会

2016/1/21-22, 横浜市開港記念会館 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大関 悟 (OZEKI SATORU)

独立行政法人国立病院機構九州医療セン
ター (臨床研究センター)・その他

研究者番号: 80117077

(2) 研究分担者

橋下 憲一郎

(HASHIMOTO KENICHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 00412619

清島 保 (KIYOSHIMA TAMOTSU)

九州大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 20264054

(3) 連携研究者

なし