

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11692

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ阻害分子 Sprouty による口腔癌リンパ節転移制御機構の解明

研究課題名(英文) A study of the regulatory mechanism of lymph node metastasis in oral cancer by Sprouty, tyrosine kinase inhibitor molecule.

研究代表者

武富 孝治 (Taketomi, Takaharu)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10553290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：SproutyファミリーはEGFやTGF-による刺激よりもFGFにより発現誘導されるが、その機能はチロシンキナーゼ型受容体下流のシグナル伝達機構の制御のみならず、上皮間葉転換と深く関わりのあるTGF-シグナル伝達機構におけるSmad1/5/8のリン酸化も抑制することが示され、上皮間葉転換を負に制御する可能性を見いだすことができた。また、RaftにおいてMAPキナーゼ経路のみで作用するCaveolinとの結合は、Spryドメインのシステイン richな領域が関与しており、TGF-シグナルの抑制はCaveolin非依存的に作用することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年がん治療における分子標的薬の進歩はめざましく、日々新たな薬が開発されている。この分子標的薬に関して、分子生物学的理解や機能解明は必要不可欠である。がん細胞の細胞内シグナル伝達経路としてMAPK経路やAkt経路が知られているが、他にもTGF-シグナルががん増殖や転移と関係があることが報告されている。本研究の学術的意義は、Sprouty2がMAPK経路やAkt経路のみでなく、TGF-シグナル伝達経路も抑制することを新たに示したことであり、またその社会的意義はSproutyファミリーががんの増殖や転移の抑制に寄与する標的分子になり得る可能性を示したことにある。

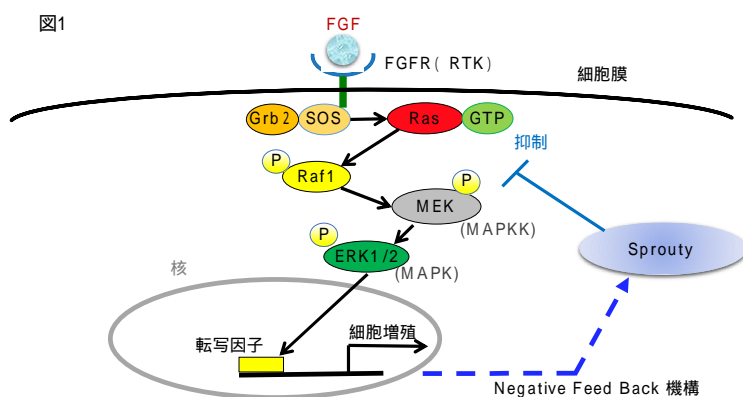
研究成果の概要(英文)：Sprouty family members are induced by FGF rather than by EGF or TGF- , and their function is not only to regulate signaling downstream of tyrosine kinase-type receptors but also to inhibit Smad1/5/8 phosphorylation in the TGF- signaling pathway, which is closely related to epithelial-mesenchymal transition. Phosphorylation in the TGF- signaling pathway, which is closely related to epithelial-mesenchymal transition, and may negatively regulate epithelial-mesenchymal transition. In addition, the cysteine-rich region of the Spry domain is involved in the binding of Caveolin, which acts only in the MAP kinase pathway in Raft, suggesting that the inhibition of TGF- signaling is Caveolin-independent.

研究分野：口腔外科

キーワード：細胞内シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖や分化は、多くの細胞外刺激が細胞表面にあるチロシンキナーゼ型受容体を活性化することにより制御されている。Sprouty ファミリーは、こうしたチロシンキナーゼ型受容体からの刺激により転写・誘導される負の調節因子で、細胞内シグナルを抑制的に制御している(図



1)。その細胞内シグナルは細胞の増殖のみならず細胞の遊走も調節していることから、癌の浸潤/転移の制御にも関与している可能性が高い。口腔癌は、近年その罹患率が増加しており、その解剖学的位置のため、頸部リンパ節へリンパ行性転移を起こ

すことの多い疾患であるが、手術療法以外の治療法で有効なものは確立されておらず、このリンパ行性転移を制御することは口腔癌のみに留まらず、多くの癌で切望されているが、未だ不明な点が多い。近年、血管新生における研究で、血管上皮成長因子 (VEGF) とその受容体 (VEGFR) の解明が進み、リンパ管にも VEGFR3 が発現していることが知られている。一方、我々は過去に VEGF シグナルが PLC -PKC 経路を介して MAPK を活性化する経路において Sprouty が抑制的に作用して VEGF シグナルを抑制することを報告した。そうした中、Sprouty と癌に関しては、乳癌、前立腺癌などいくつか報告されているが、そのほとんどが原発巣のみに関する研究であり、転移に影響を及ぼす細胞内シグナル伝達における Sprouty の作用は不明なままであった。さらに、癌の転移には上皮間葉転換 (EMT) が関与していることが知られており、この EMT に Sprouty がどのような影響を及ぼすかは分かっていない状況であった。

### 2. 研究の目的

チロシンキナーゼ阻害分子である Sprouty が、癌のリンパ節転移に関連する細胞内シグナル伝達経路においてどのような作用を持つかを分子生物学的・生化学的手法を用いて解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

各種増殖因子をリガンドとして細胞を刺激した際誘導される各種 Sprouty ファミリーの mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて調べた。また、Sprouty2 および Sprouty4、さらには Spred1 と Spred2 の全長 cDNA を pcDNA3 ベクターに取り込むべく、TA クローニングを用いて Plasmid を作製した。またその際、SPRY domain の機能する領域を決定するため、C 末端の deletion mutant を作製した。これらの Plasmid を細胞に強制発現させ、各種増殖因子で刺激したあとのシグナル伝達経路における下流の因子の活性化を western blot で解析した。さらに扁平上皮がんの病理組織切片を用いて、免疫組織化学的に Sprouty2 の発現解析を行い、細胞増殖活性を示す Ki-67 との発現と比較した。

また、SPRY domain における deletion mutant で、Raft 分画を採取したサンプルにおける ERK1/2 のリン酸化を western blot で解析した。さらに、Sprouty が Raft 分画で会合している Caveolin1 との結合の有無を deletion mutant で調べ、Caveolin の dominant negative

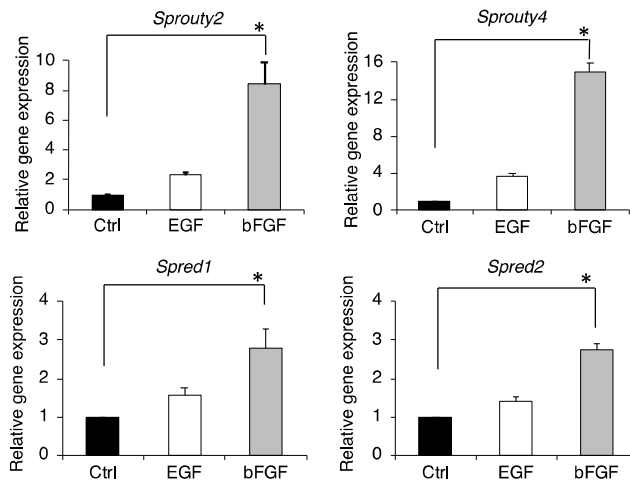
form である DGV-Caveolin1 との結合を Immuno-precipitation により生化学的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) FGF 刺激による癌株化細胞への Sprouty2 の誘導

癌細胞における Sprouty2 の発現誘導を調べるために、real time quantitative reverse

図2

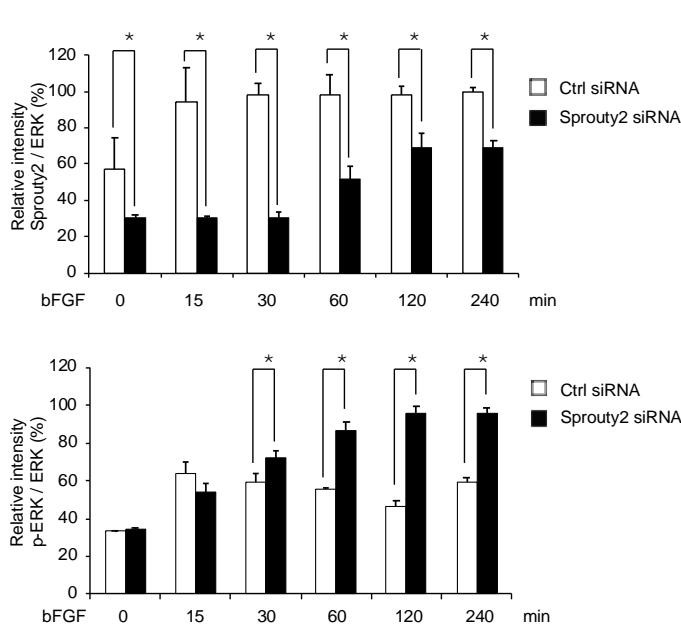


transcription-PCR を実施した。その結果、bFGF 刺激により Sprouty2 の発現が顕著に増加した。また、Sprouty2 以外の Sprouty/Sprad ファミリー遺伝子も bFGF 刺激により有意に発現が誘導されたが、TGF-スーパーファミリーのリガンド刺激はこれらの遺伝子発現に影響を与えなかった(図2)。また、本細胞における Sprouty2 タンパク質の発現量を調べたところ、bFGF 刺激で発現が増加することがわかった。

##### (2) FGF 刺激による細胞増殖シグナルに対する Sprouty2 の影響

癌細胞の増殖に対する Sprouty2 の影響を調べるために、Cell Counting Kit-8 による細胞増殖アッセイを実施した。癌株化細胞において bFGF を投与したところ、対照群に比べ、増殖が促進された。しかし、Sprouty2 強制発現細胞では、この細胞増殖が抑制された。これらの結果は、Sprouty2 が FGF 誘導性の癌株化細胞を負に制御していることを示唆している。bFGF 刺激の

図3

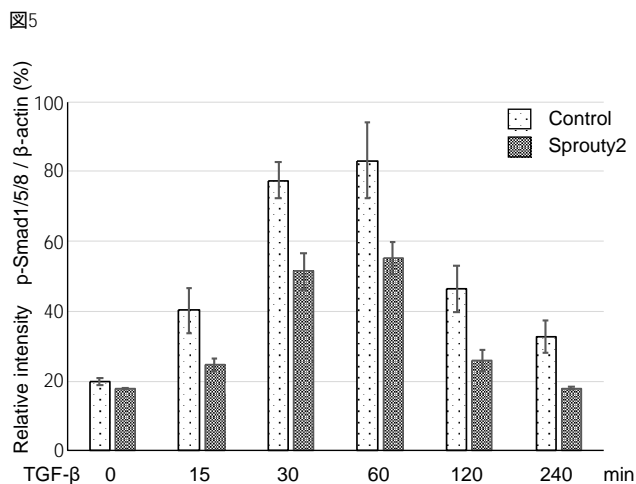
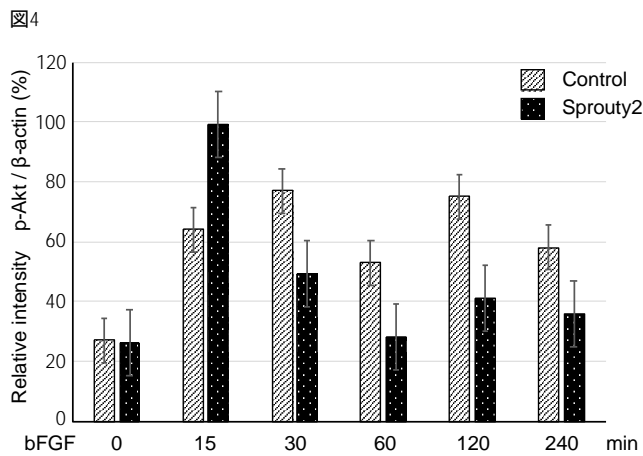


影響を調べるために Myc タグ付き Sprouty2 を遺伝子導入した癌株化細胞を bFGF で刺激し、ERK1/2 活性化をウェスタンブロットングにより経時的に分析した。その結果、bFGF 刺激後 Sprouty2 の発現により ERK1/2 のリン酸化は経時的に徐々に抑制された。逆に、Sprouty2 の siRNA ノックダウン後は、コントロールの siRNA を導入した細胞と比較して、Sprouty2 と phospho-ERK1/2 の ERK2 に対する相対強度を調べたところ、bFGF による ERK1/2 の活性化が増加した(図3)。

一方、Sprouty2 が PI3K-Akt 経路に及ぼす影響を検討するために、Sprouty2 を強制発現し、bFGF で刺激して Akt のリン酸化を調べた。その結果、Sprouty2 は ERK1/2 リン酸化と同様 Akt のリン酸化も抑制した(図4)。

##### (3) Sprouty2 の過剰発現は、癌株化細胞の TGF-β-Smad シグナルを阻害する

近年、Sprouty1 が TGF-β のシグナル伝達を制御していることが報告されているため、これに



ならい、癌株化細胞において Sprouty2 が Smad シグナルに影響を与えるかどうかを検討した。Sprouty2 の Smad シグナルへの影響を調べるために、Myc タグ付き Sprouty2 ベクターを癌株化細胞に遺伝子導入後、TGF-スーパーファミリーのリガンドで刺激し、Smad1/5/8 のリン酸化を調べた。その結果、Smad1/5/8 のリン酸化は Sprouty2 の過剰発現によって負に制御され、Sprouty2 過剰発現細胞では Smad1/5/8 のリン酸化レベルが減少していることが明らかとなった (図5)。

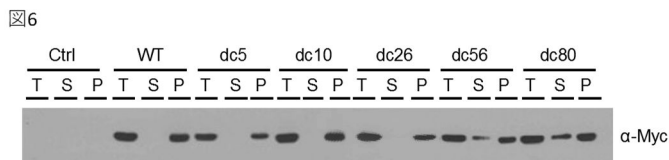
#### (4) 口腔癌病理組織における Sprouty の発現と Ki-67 陽性率との関連

実際の患者の病理組織標本における Sprouty の免疫染色を行い、Ki-67 陽性率との関連を調べるべく免疫組織化学染色を行ったが、ユビキタスに発現

する Sprouty2 の発現は非特異的に染まる箇所もあり、抗体の精度が高いものがなかったことから、免疫染色の結果に関しては有益な結果は得られなかった。

#### (5) Spred1 におけるシステイン rich 領域の働きと Raft における Caveolin との結合

Sprouty/Spredファミリーで、Spred1 の C 末端にパルミトイル化された部分が存在し、これを介して細胞膜の Raft における Caveolin1 との介在を調べるため、Sprouty domain を欠失させた Myc タグ付き Spred1 deletion mutant と Caveolin1 との結合実験を行った。C 末端



を欠失させた dc26 と dc56 で差が出たことから、C 末端の Cysteine rich 領域が Raft における結合に関与することが分かった (図6)。また、Caveolin1 のドミナントネガティブ

変異体である DGV-Caveolin1 を強制発現させることで、Sprouty ドメイン (SPRYドメイン) を欠失させた各種 Spred1 との結合を調べた。その結果、DGV-Caveolin1 でも Raft 分画には移行的に局在が認められた。Sprouty2 がチロシンキナーゼ型受容体を介した古典的 MAPK 経路および PI3K-Akt 経路のみでなく、TGF-β-Smadシグナル伝達経路にも影響を及ぼすというこれまでの結果から、そのターゲット分子と Sprouty2、とくに SPRY ドメインにおける関連を解析し、そのターゲット分子候補を Caveolin1 とした。しかしながら、Caveolin1 自身も古典的 MAPK 経路の制御分子として作用しており、Sprouty2 が Smad1/5/8 と直接会合しているのか、もしくはその上流の分子と会合することで Smad1/5/8 の活性化を抑制しているのかは

未だ不明であり、今後解明されることが望まれる。最終的には Sprouty2 の TGF- $\beta$  シグナルにおける制御機構を解明することで、口腔癌転移に深く関与する Sprouty の上皮間葉転換を介した転移機構における抑制メカニズムの糸口を解明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taketomi Takaharu, Onimura Tomohiro, Yoshiga Daigo, Muratsu Daichi, Sanui Terukazu, Fukuda Takao, Kusakawa Jingo, Nakamura Seiji	4. 巻 42
2. 論文標題 Sprouty2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation through the FGF and BMP signaling pathways	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.10876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taketomi Takaharu, Nakamura Ken, Teratani Yui, Matsuo Katsuhisa, Kusakawa Jingo	4. 巻 22
2. 論文標題 Solitary Neurofibroma of the Hard Palate: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Case Reports	6. 最初と最後の頁 e929674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12659/AJCR.929674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakao Yuki, Fukuda Takao, Zhang Qunzhou, Sanui Terukazu, Shinjo Takanori, Kou Xiaoxing, Chen Chider, Liu Dawei, Watanabe Yukari, Hayashi Chikako, Yamato Hiroaki, Yotsumoto Karen, Tanaka Urara, Taketomi Takaharu, Uchiumi Takeshi, Le Anh D., Shi Songtao, Nishimura Fusanori	4. 巻 122
2. 論文標題 Exosomes from TNF- $\alpha$ -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 306 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2020.12.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤宮梨紗、篠崎勝美、安陪由思、武富孝治、中村謙、中村守蔵、楠川仁悟
2. 発表標題 上大静脈症候群を発症した下顎歯肉癌の1例
3. 学会等名 第87回（公社）日本口腔外科学会九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武富孝治、中村謙、江崎由唯、楠川仁悟
2. 発表標題 口蓋に発生した孤立性神経線維腫の1例
3. 学会等名 第64回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠川仁悟、中村守庵、緒方絹子、轟圭太、篠崎勝美、喜久田翔伍、武富孝治
2. 発表標題 口腔癌の新旧TNM分類での比較
3. 学会等名 九州地区口腔癌研究会第22回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古川由加里、喜久田翔伍、日野聖慧、緒方絹子、轟圭太、中村守庵、武富孝治、中村芳明、楠川仁悟
2. 発表標題 多発転移を伴った巨大な下顎エナメル上皮癌に対し化学放射線治療を行った1例
3. 学会等名 第86回(公社)日本口腔外科学会九州支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠川仁悟、緒方絹子、篠崎勝美、轟圭太、田上隆一郎、武富孝治、中村守庵
2. 発表標題 頸部郭清術へのEnergy Deviceの応用
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	讃井 彰一  (Sanui Terukazu)  (70507780)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	
研究 分担者	福田 隆男  (Fukuda Takao)  (80507781)	九州大学・大学病院・講師   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------