

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11724

研究課題名(和文) 脈管内を移動する癌細胞を標的とした転移制御研究

研究課題名(英文) The study to prevent metastases targeting intravascular cancer cells

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔癌の最も重要な予後因子は転移の有無である。しかしながら、未だに転移を克服するのに有効な治療法の開発には結びついていない。これは、従来の着目点が転移巣形成の律速段階をターゲットにできていないためだと考えられる。

本研究では、転移細胞が獲得した細胞死シグナルへの抵抗性を解除し、元来生体が有している癌細胞に細胞死を誘導する能力を賦活化させる方法を検討した。その結果、脈管内で生存し、移動する癌細胞の Src 活性を抑制し、TRAIL(細胞死シグナル)を有効に作用させることで転移巣の形成を阻止できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脈管内を移動中の癌細胞は薬剤のアクセスが最も容易な状況にあり、外的刺激に対しても脆弱であると推測されるため、脈管内を移動する癌細胞が治療の標的として最適であると考えられる。転移を制するために脈管内を移動中の癌細胞に着目し、細胞死を誘導しようとする研究は発展途上の分野である。本研究の成果は、根治治療後に新たな転移巣の形成を阻害するための補助療法としてだけでなく、一次治療中の転移巣形成を阻害する併用療法としても期待できる。

研究成果の概要(英文)： Metastasis is the most important prognostic factor for oral cancer. However, it has not yet been developed an effective treatment to overcome metastasis. This is considered to be due to the fact that the conventional focus point can not target the rate-limiting step of metastatic foci formation. In this study, I examined methods to release the resistance to the cell death signal acquired by metastatic cells and activate the ability of the body to induce cancer cell death.

As a result, it has been suggested that Src inactivation on intravascular cancer cells can dissolve its resistance to TRAIL (death ligand to cancer cells) and suppress the formation of metastatic foci.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 転移 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌は heterogenous な細胞集団であり、絶えず起こる遺伝子変異の結果、転移能を獲得した細胞が選択され、二次臓器で増殖することにより転移巣が形成されると考えられている。転移巣の形成には、癌細胞の原発巣での増殖、原発巣からの離脱と脈管への浸潤、脈管内での生存と移動、転移臓器の脈管への接着、転移臓器内への浸潤、異所環境下(転移臓器内)での増殖が必要である。この過程は連続的に起こらなければならない、従って偶発的に転移が成立することはない。また、この過程において、癌細胞は血液・リンパ液による動態力学的なストレスや生体の免疫排除機構から逃れて生存しなければならない。これらを全てクリアし転移巣を形成できるのは、脈管内に浸潤した癌細胞の 0.01% 以下に過ぎない (Nat Rev Cancer 3: 453 - 458, 2003)。

口腔癌臨床の現場では、原発巣のサイズが T1 のいわゆる早期癌であっても、初診時既に転移を有している症例に遭遇する。逆に、原発巣が大きく広範囲に進展している進行癌であっても、必ずしも転移が見られるわけではない。また、根治治療後、なかには数年におよぶ長期経過後の後発転移例もしばしば経験する。口腔癌患者の末梢血液中から遊離癌細胞の検出を試みた自験例では、ごく早期の癌患者の末梢血液中からも遊離癌細胞が検出されることが明らかになった (Br J Cancer 80: 448 - 452, 1999)。さらに、乳癌患者を対象にした研究ではあるが、自験例と同様にごく早期の癌患者の末梢血液中からも遊離癌細胞が検出されること、非転移性乳癌根治後の患者の 25% から血中遊離癌細胞が検出され、検出されなかった患者より再発や転移が 4 倍多かったことが報告されている (The Lancet Oncology 13: 688 - 695, 2012)。これらの事実は、癌細胞はごく早期に脈管内へ侵入するが、侵入することよりも脈管内で生存することが転移巣形成の律速段階であることを想起させる。

生体は本来、細胞の癌化や癌細胞の転移を阻止するメカニズムとしてこれらの細胞にアポトーシスを誘導する能力を有している。また、癌細胞は脈管内を移動するために腫瘍塊から離脱し、足場を喪失(非接着浮遊状態)するが、この際にアノイキスと呼ばれる細胞死が誘導される。申請者は、アポトーシスとアノイキスに抵抗性を獲得した癌細胞のみが、転移巣を形成できるという仮説の下に研究を進めてきた。これまでの研究から、癌細胞にアポトーシスを誘導する刺激因子として TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) が重要であり、TRAIL への抵抗性と癌細胞の転移能が相関すること、TRAIL への抵抗性には細胞接着の有無が強く関与していることを明らかにした (Mol Cancer Res 9: 249 - 258, 2011)。

2. 研究の目的

口腔癌の最も重要な予後因子は転移の有無である。実験医学の成果が臨床に還元されるようになった今日でも、未だに転移を克服するのに有効な治療法の開発には結びついていない。これは、従来の着目点が転移巣形成の律速段階をターゲットにできていないためだと考えられる。本研究では、アポトーシス/アノイキスに抵抗して脈管内で生存・移動する癌細胞に着目し、この癌細胞に直接的な細胞死を引き起こす方法を探索する。この方法を癌の一次治療に併用することで、一次治療中に生じる新たな転移巣の芽を摘むだけでなく、原発巣や既に形成された転移巣への効果も期待できる新規の口腔癌治療戦略の開発を目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究結果から、本研究では口腔癌細胞のアポトーシス/アノイキス抵抗性に関わる Key molecule として、Src と A20/TNFAIP3 (Tumor Necrosis Factor Alpha-induced Protein 3) に着目することになった。さらに、ヒトが本来有しており、強力なアポトーシス誘導能を有する TRAIL は、癌治療への応用を見据える上で注目されている。そこで、Src の量的、質的(活性化状態)変化と TRAIL の感受性との関係を詳細に検討した。

3 種の口腔扁平上皮癌細胞株 SAS (転移能を持たない親株)、SAS-T5 (親株をヌードマウスで継代し樹立した高転移株)、SAS-L1 (SAS-T5 が転移したリンパ節から樹立された高転移株) 細胞における Src の発現をウェスタンブロッティングにて検討した。

次に、Src キナーゼの選択的阻害剤である PP2 を使用して、Src のキナーゼ活性を抑制した際の影響を検索した。同様に、合成 siRNA を用いて Src の発現を特異的にノックダウンした際の影響についても検討した。siRNA による Src の発現抑制下に、TRAIL によるアポトーシス誘導能についても検討した。

脈管内で生存し、移動する癌細胞を想定し、超低接着性細胞培養プレートを使用して培養細胞を浮遊状態として、TRAIL に対する感受性について検討を行った。

4. 研究成果

3 種の細胞間で Src タンパクの総発現量自体には明らかな差を認めなかったが、活性型 Src を意味するリン酸化された p-Src (Tyr 416) の発現は SAS-T5、SAS-L1 細胞において亢進していた。一方で、抑制型 Src を意味する p-Src (Tyr 527) の発現量は 3 種の細胞間で有意な差を認めなかった。つまり、Src キナーゼの活性亢進が口腔扁平上皮癌の転移能に関与している可能性が示唆された。

PP2 処理によって、3 種の細胞すべてにおいて経時的、かつ濃度依存的に細胞増殖が有意に抑制された。特に、活性型 Src の発現亢進を認めている高転移能株 SAS-T5、SAS-L1 細胞においてその効果が顕著であった。siRNA を用いた検討では、設定した 3 種の siRNA はいずれも Src

タンパクの総発現量を抑制した。SAS、SAS-L1 細胞において、Src の発現抑制による細胞増殖抑制効果が認められ、その効果は高転移能株においてより強く認められた。さらに、Src の発現抑制下での TRAIL の効果を検討したところ、SAS-L1 細胞において TRAIL によるアポトーシス誘導が認められた。

超低接着性細胞培養プレート使用条件下において、TRAIL に感受性のある SAS 細胞ではアノキスによる細胞死に加え、TRAIL によるアポトーシスの誘導が確認された。一方で、SAS-T5、SAS-L1 細胞ではアノキスによる細胞死のみで、TRAIL によるアポトーシスの上乗せ効果はみられなかった。今回使用した細胞群では、転移能の有無とアノキス抵抗性自体に相関はなく、リンパ行性転移を好発するものの、血行性転移は稀であるという口腔癌転移のメカニズムを解明する一助になる可能性がある。また、口腔扁平上皮癌の転移巣形成ステップにおいて、アノキスへの強い抵抗性の獲得よりも、TRAIL に対する抵抗性を獲得することの方が重要である可能性が示された。

転移を可能にするような癌の悪性形質に関わるシグナルの上流に位置する分子の発現に変化があったのではないかと考え、細胞増殖や生存、細胞骨格や形態の調節、運動や遊走、細胞接着など多岐に影響を及ぼす Src に着目した。活性型 Src の発現亢進と口腔扁平上皮癌の転移能の相関が明らかになったとともに、細胞増殖能にも Src シグナルが強く影響していることがわかった。さらに、Src の発現を抑制することによって、転移能を有する SAS-L1 細胞の TRAIL 抵抗性を解除することに成功した。

以上の結果から、脈管内で生存し、移動する癌細胞に TRAIL を有効に作用させることで転移巣の形成を阻止できる可能性が示唆された。脈管内を移動中の癌細胞は薬剤のアクセスが最も容易な状況にあり、外的刺激に対しても脆弱であると推測されるため、脈管内を移動する癌細胞が治療の標的として最適であると考えられる。転移を制するために脈管内を移動中の癌細胞に着目し、アポトーシスを誘導しようとする研究は発展途上の分野である。本研究の成果は、根治治療後に新たな転移巣の形成を阻害するための Adjuvant 療法としてだけでなく、癌の原発巣や既に形成された転移巣への一次治療として、また一次治療中の転移巣形成を阻害する併用療法として期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Goda Hiroyuki, Okamoto Masato, Nakashiro Koichi, Hino Satoshi, 他 2 名
Prognostic impact of preoperative serum interleukin-6 levels in patients with early-stage oral squamous cell carcinoma defined by sentinel node biopsy
Oncology Letter 14; 7965-7969, 2017.
査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

徳永奈津子, 日野聡史, 他 6 名
当院総合診療サポートセンターにおける歯科衛生士の役割
第 15 回日本口腔ケア学会総会学術大会 2018 年
竹本和香, 浜川知大, 合田啓之, 日野聡史, 他 2 名
大動脈瘤による慢性 DIC のため止血に難渋した抜歯後出血の 1 例
第 71 回日本口腔科学会学術集会 2017 年
合田啓之, 中城公一, 浜川知大, 徳善紀彦, 日野聡史, 他 1 名
口腔扁平上皮癌センチネルリンパ節生検における偽陰性症例の検討
第 71 回日本口腔科学会学術集会 2017 年
合田啓之, 中城公一, 日野聡史, 他 3 名
口腔扁平上皮癌 N0 症例におけるセンチネルリンパ節生検 135 例の検討
第 35 回日本口腔腫瘍学会総会 2017 年
渡部覚氏, 渡邊真一, 田中 守, 日野聡史, 他 3 名
ビスホスホネート製剤服用患者における口腔ケアの現状
第 49 回日本薬剤師会学術大会 2016 年
Hamakawa Tomohiro, Goda Hiroyuki, Murase Ryuichi, Hino Satoshi, 他 2 名
Two cases of maxillary osteonecrosis after carbon ion radiotherapy against adenoid cystic carcinoma
23rd Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery 2016 年
西村 萌, 日野聡史, 他 3 名
頬粘膜に生じた乳児血管腫の 1 例
第 45 回日本口腔外科学会中四国地方会 2016 年
Akiyama Hitoshi, Nakashiro Koichi, Tokuzen Norihiko, Tanaka Hiroshi, Hino Satoshi, 他 1 名
Mutation and function of PIK3CA and HRAS in human oral squamous cell carcinoma cells
107th American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016 年

日野聡史, 他 1 名
当科における診療環境の細菌学的汚染調査
第 70 回日本口腔科学会学術集会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/dentistry/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：該当なし
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。