

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：37114
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K18301
研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の高浸透圧による増殖亢進機序解明及び新規治療標的としての検討

研究課題名(英文) Investigation of methods to suppress the oral cancer progression in a hyperosmotic condition

研究代表者
吉本 尚平 (YOSHIMOTO, SHOHEI)
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：70780188
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんの周囲では炎症反応に伴う局所的な浸透圧上昇が起こっていると考えられています。しかし、高い浸透圧が癌細胞の増殖、浸潤に与える影響についての検討は十分とは言えません。口腔癌細胞を用いた実験で、高浸透圧はNFAT5を介して、癌の増殖に強く関与している癌の治療標的になっている上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化を促すことがわかりました。NFAT5が活性化することでEGFRの細胞膜への移行を促進し、癌細胞の増殖を亢進させることがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子であるNFAT5(nuclear factor of activated T-cells 5)が核内移行・活性化し、細胞にかかる高浸透圧ストレスを解消する遺伝子の発現に関与しているとされています。最近我々はNFAT5が口腔癌細胞の進展に関与していることを報告しました。現在、癌微小環境を対象とした研究においては、「低酸素」、「低栄養」に着目した研究が広く行われていますが、未だ報告の少ない「浸透圧」の癌細胞への関与を解き明かすことで、癌治療に対する新たなアプローチとなる可能性が考えられます。

研究成果の概要(英文)：In the tumor microenvironment, tumor usually incites inflammation and the inflammation-derived cytokines make a considerable impact on cancer development. In this condition, hyper-osmolarity is also induced but the role of the osmotic stress for the cancer development has not been fully understood. In this study, we clarified one of the essential mechanisms of NFAT5, a key transcription factor in hyper-osmolarity, on the OSCC cells in the hyper-osmotic condition by in vitro and in vivo studies. We finally concluded that in OSCC cells in the hyper-osmotic condition, NFAT5 induced EGFR glycosylation through the activation of DPAGT1, an essential enzyme for the N-linked protein glycosylation, and the consecutive EGFR subcellular translocation from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane was occurred, which finally enhanced the progression of OSCC cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞膜上に発現する上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR) を介した細胞内シグナル伝達は、口腔癌をはじめ種々の癌細胞の増殖において重要な働きを担っている(1,2)。そのため、EGFR は癌治療の標的分子となっており、その抗体・阻害剤が臨床応用され従来の抗癌剤に比し著明な治療効果を得ている。しかし、この分子標的療法においても薬剤耐性の獲得による腫瘍の再燃が問題となっている(3)。従って、耐性獲得の問題を克服できる新機序での抗腫瘍療法の開発が求められている。

一方、癌の進展には炎症細胞、線維芽細胞など周囲組織を含めた癌微小環境が大きく影響しているとされている(4,5)。癌微小環境は低酸素、低栄養という細胞の増殖に不利な状況だが、低酸素、低栄養により誘導される炎症性サイトカインが癌細胞の増殖、浸潤を促進するとされている(6,7)。加えてこの炎症環境下では炎症反応に伴う浸透圧上昇が起こっていると考えられるが(8)、癌細胞の増殖、浸潤に対する浸透圧上昇の影響については十分な検証がなされていない。

そこで、申請者が浸透圧上昇と EGFR を介した癌増殖について検討した結果、口腔癌細胞株である HSC-3 を用いて、高浸透圧刺激応答転写因子:NFAT5(nuclear factor of activated T-cells 5) が小胞体における糖鎖修飾酵素 :DPAGT1 (Dolichol phosphate-dependent N-acetylglucosamine 1-phospho-transferase) の発現亢進に関わることを見出した。それにより、高浸透圧下にて EGFR への糖鎖修飾が活性化され、小胞体から細胞膜への移行が促進されることで EGFR のシグナル伝達経路が活性化され、癌細胞の増殖亢進が起こるとの結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞における高浸透圧刺激による増殖制御機構の解明を目指す。

本研究の特色は、「浸透圧が癌の増殖に係る」という新たな視点に基づいたということであり、独創性は、「癌の治療標的である EGFR の細胞膜上への移行集積が高浸透圧により惹起され、その抑制による新規治療法の開発の可能性に着目した」ことである。現在、癌微小環境を対象とした研究においては、「低酸素」、「低栄養」に対する研究が広く行われているが、未だ着手されていない「浸透圧」の研究を加えることで、癌微小環境研究のブレイクスルーと成り得ると考える。申請者が新たに着目した「浸透圧上昇による癌細胞増殖促進機構」を解明し、それを標的とした制御法を開発することは、口腔癌のみならず広くがん治療の発展に貢献できると考えている。

3. 研究の方法

(1) 高浸透圧応答性転写因子 NFAT5 の癌組織における解析

プロテオミクス解析データベースによると NFAT5、DPAGT1 とともに頭頸部癌組織において高発現を示している。口腔癌手術材料を用い NFAT5、DPAGT1 および関連分子について、タンパク発現解析を免疫組織化学的手法により行い、発現動態の解析からそれぞれの機能と EGFR 細胞膜移行の制御機構との関連についての検討を行う。

福岡歯科大学医科歯科総合病院口腔外科にて 2006 年 4 月から 2015 年 3 月までの間に口腔癌の摘出手術を行った症例を対象とし、抽出、パラフィンブロック検体より切片を作成し実験に用いる (本学倫理委員会許可番号 : 第 312 号)。

さらに NFAT5、および DPAGT1 の発現態度と、手術標本における癌の分化度等の組織学的悪性度との関連について統計学的検討を行う。これにより、口腔癌治療における悪性度の指標と成り得るかを検討する。免疫染色の染色度は Allred スコア (図 1) を用いて評価を行う。

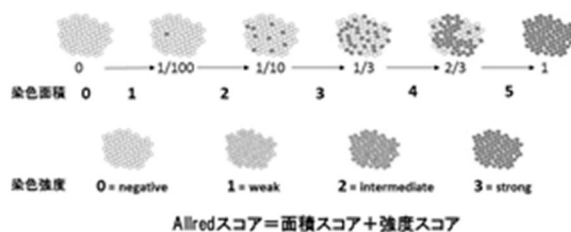


図 1 Allred スコア判定方法

(2) 腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立と解析

ヌードマウスへの口腔癌細胞細胞移植および、浸透圧ポンプ 埋め込みによる腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立を行う。

具体的にはマウスに口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3) を 2×10^7 cells/ml の濃度でマトリゲル (Corning 社) に懸濁し、マウス皮下に移植する。移植後、生着した癌細胞腫瘍の近傍にポンプを

埋入し、腫瘍内にカテーテル経由でマンニトール等の高浸透圧溶液を持続的に作用させる(図2)。癌細胞移植およびポンプ埋入時は適切な麻酔操作を行う。

このモデルを用い、浸透圧変化が生体内での腫瘍の増殖に与える影響が解析可能であると考える。マイクロCTを用い腫瘍の増大、浸潤転移を検討する。腫瘍を摘出、固定後はヘマトキシリン エオジン染色、免疫染色を用いて腫瘍の増殖、浸潤、転移の様式を検討、画像解析ソフトを用い定量解析する。

アルゼット社製浸透圧ポンプ：電源を必要とせず長時間、一定の速度で近傍組織に溶液の供給が可能な生体内埋め込み式ポンプである。



図2 腫瘍高浸透圧刺激モデル

4. 研究成果

(1) NFAT5 および DPAGT1 の癌組織における解析

口腔癌病理組織標本を用いた免疫組織化学的検討において、NFAT5 および DPAGT1 は、癌の組織学的悪性度が上がるにつれて発現の上昇を認めた。また、EGFR もそれに伴い発現増加傾向を示した(図3)。

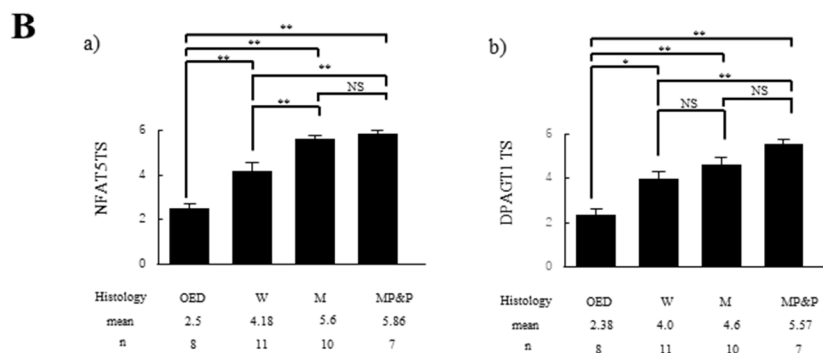
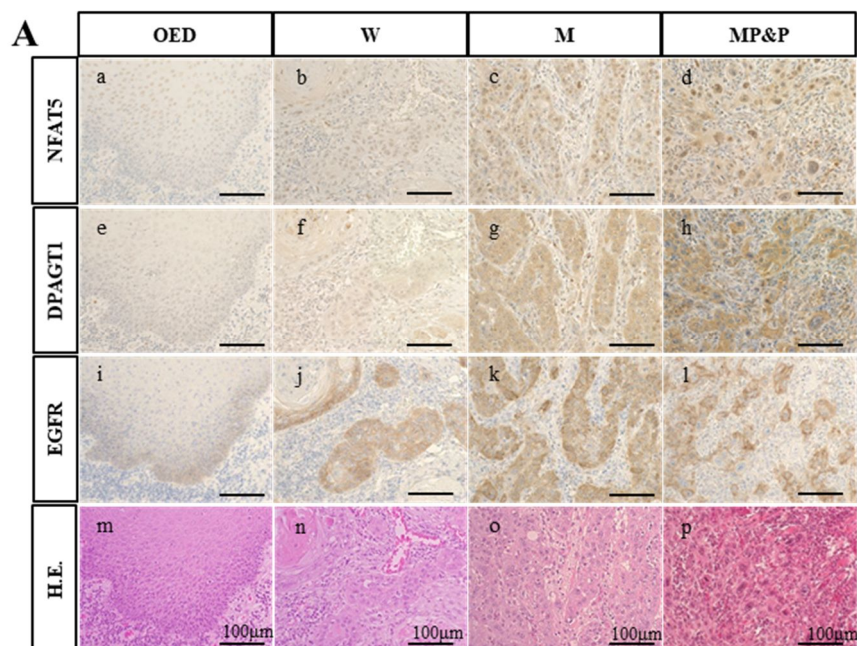


図3 口腔癌組織における NFAT5、DPAGT1、EGFR の発現

A. 口腔上皮異形成 (OED)、高分化型扁平上皮癌 (W)、中等分化型扁平上皮癌 (M)、中等度から低分化型扁平上皮癌および低分化型扁平上皮癌 (MP&P) における NFAT5、DPAGT1、EGFR の免疫染色および HE 染色を示す。B. NFAT5 および DPAGT1 の染色スコアを組織分化度別に示す。NFAT5、DPAGT1 とともに分化度が低下するにつれて染色強度の上昇がみられた。

(2) 腫瘍高浸透圧刺激モデルの確立と解析

ヌードマウスへの口腔癌細胞移植および、浸透圧ポンプ埋め込みによる腫瘍高浸透圧刺激モデルを確立し、in vivoでの腫瘍増殖を検討した結果、高浸透圧刺激群では腫瘍体積の有意な増加が認められた(図4)。加えて、摘出腫瘍組織においてNFAT5、DPAGT1、EGFRの発現を免疫染色にて確認したところ、高浸透圧刺激群において各蛋白の発現増加を認めた(図5)。

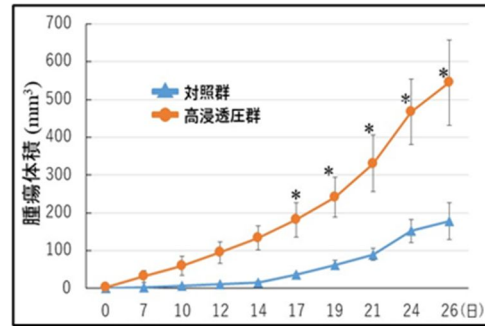


図4 高浸透圧刺激によるマウス移植腫瘍の増大

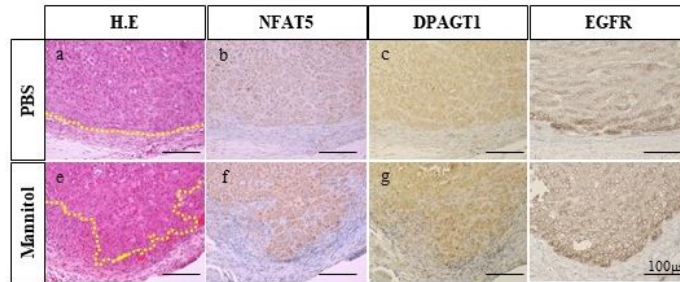


図5 マウス移植腫瘍高浸透圧刺激モデルでの各種蛋白の発現

対照群 (PBS) および高浸透圧刺激群 (Mannitol) における NFAT5、DPAGT1、EGFR の免疫染色および HE 染色を示す。高浸透圧刺激群では腫瘍細胞の浸潤像および NFAT5、DPAGT1、EGFR の発現増加がみられた。

本研究の成果の概略図を下に示す。

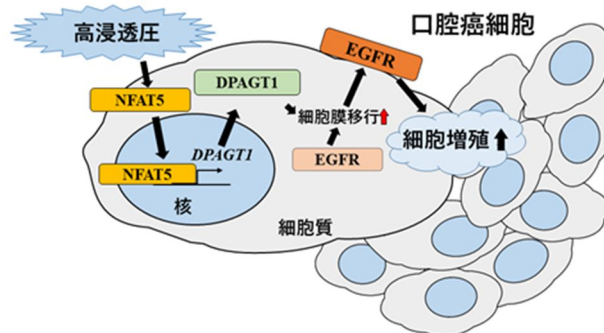


図6 高浸透圧による口腔癌細胞増殖亢進の機序
Yoshimoto et al. Lab Invest. 2021 より一部改変

< 引用文献 >

(1) Iwase M, Takaoka S, Uchida M 他: Oral Oncol, 2008. (2) Hansen AR, Siu LL: J Clin Oncol, 2013. (3) Bardelli A and Jänne PA: Nat Med, 2012. (4) Zhou J, Schmid T, Schnitzer S 他: Cancer Lett, 2006. (5) Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK 他: Nature, 2014. (6) Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA 他: Nat Rev Cancer, 2013. (7) Oshima H, Nakayama M, Han TS 他: Cancer Res, 2015. (8) Jonathan J, Valentin S, Diana F 他: Cell Metab, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshimoto S, Tanaka F, Morita H, Hiraki A, Hashimoto S.	4. 巻 18
2. 論文標題 Hypoxia-induced HIF-1 and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF- β -dependent EMT.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 7822-7832
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.2667.	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 Tanaka F, Yoshimoto S, Okamura K, Ikebe T, Hashimoto S.	4. 巻 9(73)
2. 論文標題 Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT and post-translationally repressing TGIF2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 oncotarget	6. 最初と最後の頁 33745-33761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25850	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 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Matsuda Miho, Katakura Yoshinori, Hirata Masato, Hashimoto Shuichi	4. 巻 101
2. 論文標題 NFAT5 promotes oral squamous cell carcinoma progression in a hyperosmotic environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 38 ~ 50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00486-1	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 Anzai Hiromasa, Yoshimoto Shohei, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻
2. 論文標題 IDO1 mediated Trp kynurenine AhR signal activation induces stemness and tumor dormancy in oral squamous cell carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1109	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 Yoshimoto Shohei, Yoshizumi Junko, Anzai Hiromasa, Morishita Koichiro, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of Alk signaling promotes the induction of human salivary-gland-derived organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.045054	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 Nuclear PKM2 promotes the progression of oral squamous cell carcinoma by inducing EMT
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 高浸透圧環境下におけるNFAT5による口腔扁平上皮癌の増殖促進機序
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 Hypoxia induced HIF-1a and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 HIF1A and ZEB1 gene expression correlate with the malignant transformation of ameloblastoma
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 EMT contributes to the malignant transformation of ameloblastoma.
3. 学会等名 2018IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 Carboxypeptidase M (CPM) expression analysis in the developing and mature mouse lung
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会第54回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉本 尚平
2. 発表標題 Peripheral ameloblastic carcinoma of the mandible with an immunohistochemical evaluation, a case report
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉本尚平
2. 発表標題 NFAT5 is important for proliferation of oral squamous cell carcinoma in hyper osmotic condition
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本尚平
2. 発表標題 GPRC5A is a potential biomarker to predict the malignant transformation of ameloblastoma
3. 学会等名 第28回日本臨床口腔病理学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本尚平
2. 発表標題 エナメル上皮癌におけるEMT誘導とCK15の発現抑制
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------