

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10019

研究課題名（和文）振動圧刺激による頭頸部がん細胞のATP放出メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of compression-induced ATP release in head and neck carcinoma

研究代表者

高田 弘弥（Takada, Hiroya）

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30824833

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）：空気と食物の通過路である頭頸部領域の粘膜上皮細胞は、発声や摂食によって繰り返して機械刺激が負荷されると、細胞膜や細胞骨格が変形してその内部にメカニカルストレスが生じる。そこで、摂食や発声などの機能を司り、伸展や声帯振動などの機械刺激が日常的に影響を及ぼす頭頸部領域に着目して、機械刺激に対するATP-Ca²⁺シグナリングの応答を測定し、メカニカルストレスによるがんの進展との関係を解析を検討した。粘膜扁平上皮癌細胞（KB細胞）において、ヒスタミンによる一過性のアレルギー刺激で生じる炎症障害（K⁺チャネル開口抑制）を振動圧刺激によるK⁺チャネルの活性化によって予防・阻止する治療戦略が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部がんは50歳代から60歳代に診断されることが多く、社会の高齢化に伴って罹患率は増加し、世界では年間約65万人、日本では年間約2万人が発症するとされている。形成外科領域では腫瘍切除と同時に、切除された部分に体の別の部分から皮膚・脂肪・筋肉・骨など（自家組織）を移植して、摂食や発声などの機能を維持できるように再建する。切除するだけでは摂食や発声などに大きな障害が生じ、また術後に顔面に変形が残ることもあり、社会的なハンディキャップを負うばかりか、精神的な障害も引き起こる。日常的な機械刺激が頭頸部がんに与えている影響について、K⁺チャネルの関与を見出し、治療戦略を示せた意味は大きい。

研究成果の概要（英文）：Mucosal epithelial cells in the head and neck region, which are the passageway for air and food, are repeatedly subjected to mechanical stimuli caused by vocalization and eating, which causes deformation of the cell membrane and cytoskeleton, resulting in mechanical stress within the cells. Therefore, focusing on the head and neck region, which controls functions such as eating and vocalization and is affected daily by mechanical stimuli such as stretching and vocal cord vibration, we measured the response of ATP-Ca²⁺ signaling to mechanical stimuli and analyzed the relationship with cancer progression due to mechanical stress. A therapeutic strategy was inferred for preventing and inhibiting inflammatory disorders (K⁺ channel opening inhibition) caused by transient allergic stimuli by histamine in mucosal squamous cell carcinoma cells (KB cells) by activating K⁺ channels through vibration pressure stimulation.

研究分野：形成再建再生医学、細胞生理学、生物物理学、メカノバイオロジー

キーワード：メカノバイオロジー ATP-Ca²⁺シグナリング 振動圧刺激 ヒト喉頭癌細胞 K⁺チャネル開口 頭頸部癌

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんは50歳代から60歳代に診断されることが多く、社会の高齢化に伴って罹患率は増加し、世界では年間約65万人、日本では年間約2万人が発症するとされている。形成外科領域では腫瘍切除と同時に、切除された部分に体の別の部分から皮膚・脂肪・筋肉・骨など(自家組織)を移植して、摂食や発声などの機能を維持できるように再建する。切除するだけでは摂食や発声などに大きな障害が生じ、また術後に顔面に変形が残ることもあり、社会生活に大きなハンディキャップを負うばかりか、精神的な障害という新たな問題が引き起こる。頭頸部がんの要因は、喫煙、飲酒、ウイルス感染以外に過度な伸展や声帯振動の機械刺激による慢性的な炎症が考えられているが、日常的な機械刺激が発症に与えている影響についてはほとんど研究が行われていない。正常細胞では機械刺激を受けて放出されたATPは細胞外の分解酵素によって速やかに分解されるが、がん組織や炎症サイトにおいてATP濃度が数百 μM と高いことは以前より知られている。このことから、がん細胞にはATPを持続的に放出・維持する機序があるとの着想を得て、がん細胞に対する機械刺激とATPシグナリング系の解明に着目した。

2. 研究の目的

空気と食物の通過路である頭頸部領域の粘膜上皮細胞は、発声や摂食によって繰り返して機械刺激が負荷されると、細胞膜や細胞骨格が変形(伸展、振動、圧縮)してその内部にメカニカルストレスが生じる。本研究では、摂食や発声などの機能を司り、伸展や声帯振動などの機械刺激が日常的に影響を及ぼすと考えられる頭頸部領域に着目して、機械刺激に対するATP- Ca^{2+} シグナリングの応答を測定し、メカニカルストレスによるがんの進展との関係を解析することが目的である。さらに、それを阻止する新たな治療戦略の可能性についても検討した。

3. 研究の方法

薄層コラーゲンゲル上に播種したヒト頭頸がん由来のHep-2細胞やヒト咽頭がん由来のKB細胞に対して、日本医科大学形成外科で独自開発した非接触超音波圧刺激照射デバイスを用いて振動圧刺激を加え、細胞応答(細胞外ATP放出、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化)を解析した。振動圧刺激下における細胞内 Ca^{2+} あるいは K^{+} 濃度変化を蛍光顕微鏡でリアルタイム観察した。体内で最も大きい振動刺激を受ける頭頸部領域上皮細胞に対して、これまでほとんど研究例のない頭頸部がんの発症メカニズムの詳細な解析を検討した。声帯の発声時の振動は男性で100 Hz前後、女性で250 Hz前後であることから、われわれが開発した非接触超音波圧刺激照射デバイスはそれらの振動数で安定して照射可能である。

4. 研究成果

振動刺激として100 Hz、250 Hzを与えたところリアルタイムイメージングをする際、高振動によって画像が乱れることが多いため、まず、咽頭部に生じる振動としては極めて小さいが1 Hz振動圧刺激を検討し、 Ca^{2+} 応答を観察した。

Hep2細胞において1 Hz振動圧刺激を負荷した場合、その間、細胞内で Ca^{2+} 濃度の上昇と下降をくり返す Ca^{2+} オシレーション(振動)が観察された。図1Aに1 Hz振動圧刺激(45 Pa)による Ca^{2+} 応答の経時変化を示す。図1Bに1 Hz、すなわち1秒間の伸展刺激(一方に20%)による Ca^{2+} 応答の経時変化を示す。代表的な振動圧実験結果のトレースはそれぞれ応答した個々の細胞での測定値($n=12$)であり、縦軸の Ca^{2+} 応答は蛍光強度である。振動圧による Ca^{2+} 応答はゆっくりと減衰し、振動圧を停止すると極端に横ばいになる。図1Bは典型的な細胞応答の例である一方向的、振動圧負荷2分間に9回程度の高頻度振動が観察された。

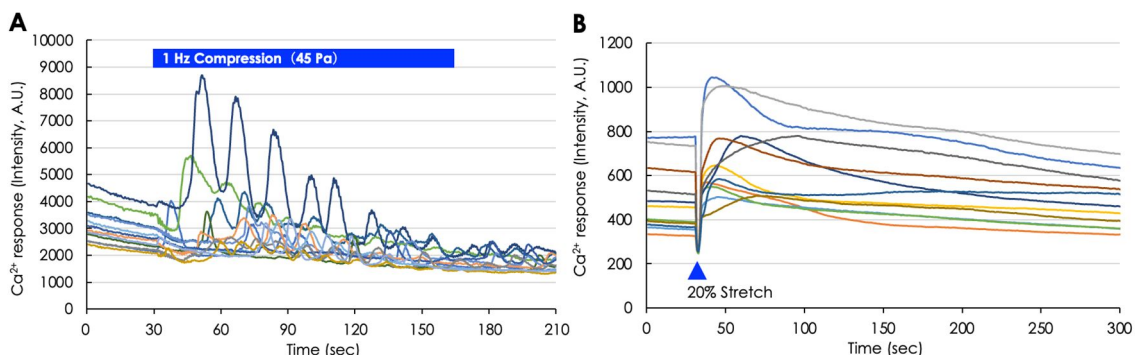


図1. (A) 非接触振動圧刺激(1 Hz, 45 Pa)による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化, (B) 伸展刺激(20%)による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

このことから、振動圧刺激による特徴的な Ca^{2+} オシレーションは、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に先立って細胞外へ ATP が放出されていないと推察された。細胞外 ATP 放出は短時間であっても拡散されるため、一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇（急激に上昇して持続し緩やかに減少する）が生じるからである。

ところで、並行した関連する研究の中で、ヒト検体を用いた鼻ポリープ、慢性副鼻腔炎・アレルギー性鼻炎例および下鼻甲介手術時に切除される組織に対して、鼻呼吸の吸気振動を振動圧刺激を負荷することによって再現した結果、鼻腔自然口が開く 50 Hz の振動では、網羅的な遺伝子解析から K^+ チャンネル遺伝子 (Kv3.1, Kv β 2, Kv7.1, Kv6.1 などの電位依存性 K^+ チャンネル) の発現増加が認められ (図 2)、 Ti^+ 感受性蛍光アッセイ (タリウム感受性蛍光インジケータ試薬 Ti^+ -dye Thalloによる Ti^+ アッセイを行った。 Ti^+ (Ti_2SO_4) は測定開始後 30 秒に投与) から組織中の細胞外 K^+ 放出 (視覚的に輝度の上昇) が観察された (図 3)。

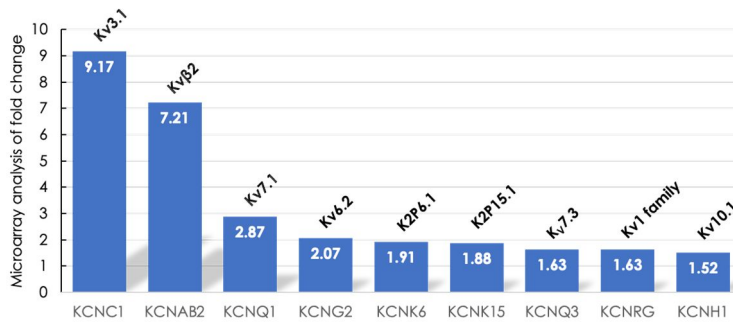


図2. ヒト鼻腔組織の K^+ チャンネル遺伝子発現変化 (50 Hz, 45 Pa, 30 min) 「資料」

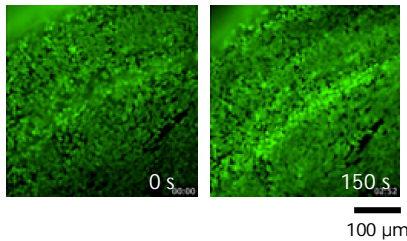


図3. ヒト鼻腔組織に対する 50 Hz 振動圧照射時の細胞外 K^+ 放出の可視化 (50 Hz, 30 min)

次に、1) 50 Hz の振動圧刺激によって一過性の K^+ チャンネル開口と同時に K^+ チャンネルの発現量も増加し K^+ チャンネル応答が増強する、2) K^+ チャンネルが上皮粘膜バリア機能を改善する、とした仮説を立て、粘膜扁平上皮癌細胞 (KB 細胞) にヒスタミン刺激を加えて、 K^+ チャンネル応答をリアルタイムイメージングした。その結果、I 型コラーゲンゲル上に播種した KB 細胞は自発的な K^+ チャンネル応答をするが (Control) ヒスタミン刺激 (2 mg/500 μL) によって K^+ チャンネル開口は顕著に抑制されるが、ヒスタミン刺激 5 分前にあらかじめ振動圧刺激 (鼻腔自然口が開く 50 Hz, 1 or 5 min) を負荷しておく、 K^+ チャンネル応答の改善が認められた (図 4)。

これらの知見から、一過性のアレルギー刺激で生じる炎症障害 (K^+ チャンネル開口抑制) を振動圧刺激による K^+ チャンネルの活性化によって予防・阻止する治療戦略が検討できると推察された。一過性のアレルギーを引き起こす比較的高濃度のヒスタミン刺激を投与しているが、今後、低濃度で持続的なアレルギー病態条件で再現性が得られれば、効率的で分かりやすい治療戦略が描けると思われる。

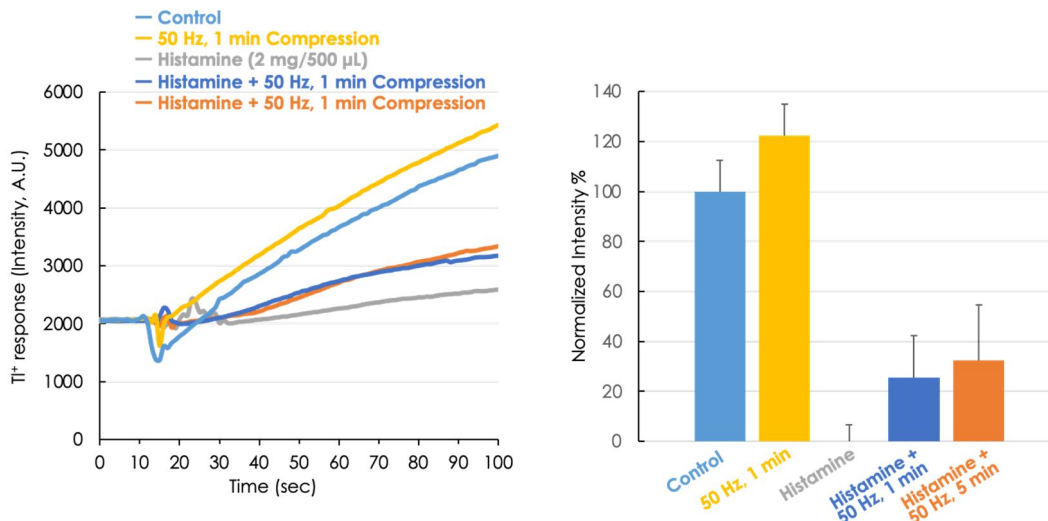


図4. KB 細胞の K^+ チャンネル応答 (Ti^+ assay, 50 Hz, 45 Pa, 1 min)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 三輪正人, 高田弘弥, 村上亮介, 古家喜四夫, 曾我部正博, 小川令	4. 巻 33
2. 論文標題 粘膜上皮K ⁺ 応答の非接触性振動圧刺激による変化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 三輪正人, 高田弘弥, 村上亮介, 大久保公裕, 小川令	4. 巻 34
2. 論文標題 圧およびヒスタミン刺激後の気道粘膜上皮のCa ²⁺ オシレーションの変化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 66-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田弘弥, 田村悦代, 下山明日香, 星 貴之, 小川 令
2. 発表標題 声帯における腫瘤形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 2022AMED-CRESTメカノバイオ領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田弘弥
2. 発表標題 超音波を用いた新しい治療戦略
3. 学会等名 第15回日本整容脳神経外科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田弘弥, 下山明日香, 小川 令
2. 発表標題 声帯におけるポリープ形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 第90回日本医科大学医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村悦代, 高田弘弥, 久保村憲, 小川令, 大上研二
2. 発表標題 声帯におけるポリープ形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田弘弥
2. 発表標題 超音波を用いた新しい治療戦略
3. 学会等名 第21回精密工学会次世代センサ・アクチュエータ委員会定期講習会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田弘弥, 田村悦代, 小川令
2. 発表標題 声帯における腫瘤形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST、PRIME）研究開発領域「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村悦代, 高田弘弥, 久保村憲, 小川令, 大上研二
2. 発表標題 声帯におけるポリープ形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村悦代, 高田弘弥, 久保村憲, 小川令, 大上研二
2. 発表標題 声帯におけるポリープ形成と物理的刺激の関与に関する検討
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2021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