

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10338

研究課題名(和文) 口腔癌におけるCaveolin-1 とIL-6の役割

研究課題名(英文) Role of Caveolin-1 and IL-6 for oral cancer

研究代表者

光藤 健司 (MITSUDO, Kenji)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70303641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Cav-1ノックダウン細胞を作成し、IL-6刺激時の口腔癌細胞の増殖や転移・遊走の観察を行った。その結果、Cav-1がノックダウンされることでIL-6の増殖促進の機能が抑制された。転移・遊走の検討から、Cav-1は転移・遊走性に関しては明らかな結果が得られず、Cav-1と癌の転移・遊走との関連はない可能性が示唆された。

これらの結果から、Cav-1とIL-6の関連については、癌の増殖にCav-1とIL-6双方が重要な役割を果たすものの、両者の直接的な作用は見られないことが明らかになった。今後はそれらが別々に作用する機序について検討を進めていく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌におけるCav-1の存在下および非存在下でのIL-6誘発性シグナル伝達の影響について検討を行った結果、癌の増殖にCav-1とIL-6双方が重要な役割を果たすものの、両者の直接的な作用は見られないことが明らかになった。この結果は、多面的要因の影響を受ける癌の増殖において、Cav-1とIL-6は独自のシグナルを介して影響を及ぼしていることを明らかにした。本研究は今後Cav-1やIL-6の機能調節を行うキーシグナルを明らかにし、治療ターゲットを見出すきっかけとなる研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：We generated Cav-1 knockdown cells and observed the proliferation, metastasis and migration of oral cancer cells upon IL-6 stimulation. As a result, Cav-1 knockdown inhibited the growth-promoting function of IL-6. Studies on metastasis/migration did not show clear results regarding metastasis/migration of Cav-1, suggesting the possibility that there is no relationship between Cav-1 and cancer metastasis/migration. From these results, regarding the relationship between Cav-1 and IL-6, although both Cav-1 and IL-6 play important roles in cancer growth, there is no direct effect of both. In the future, it is necessary to investigate the mechanisms by which they act separately.

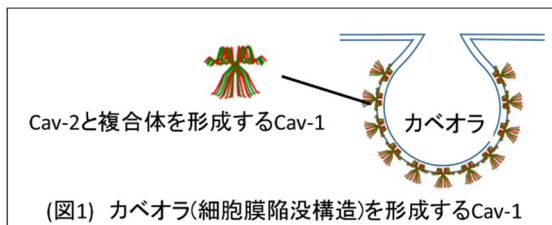
研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 Caveolin-1 IL-6 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

現在、口腔癌に対する治療は標準治療として外科的療法が選択される。しかし、術後の機能・審美障害は常に問題となる。また、口腔癌の再発例や転移を有する患者に対する根治的治療が困難であることや、腫瘍の進展度や患者の全身状態、既往歴など様々な理由により手術不適応となった患者の予後が極めて不良であることも問題点として挙げられる。これらを解消するためには、新たな治療法が求められている。

カベオリン(Cav-1)は、カベオラを構成する主要な膜タンパク質であり、Cav-1、Cav-2 および Cav-3 からなる(図1)。中でも、Cav-1 は様々な癌腫において重要な役割を持つことが報告されている。骨髄腫において Cav-1 は IL-6 受容体 (IL-6R) やシグナル伝達鎖 gp130 と共同している (Podar K et al. *J. Biol. Chem.* 2002)。



(図1) カベオラ(細胞膜陥没構造)を形成するCav-1

また、肝癌において、IL-6/IL-6R の挙動と Cav-1 の発現に相関があり、IL-6 下流シグナルの進行には Cav-1 を有する膜上での機構が関与している (Dought D et al. *J. Biol. Chem.* 2002) などの報告がみられる。そこで本研究では、口腔癌における IL-6R や gp130 の局在や、Cav-1 の存在下および非存在下での IL-6 誘発性シグナル伝達の影響について検討を行う。IL-6 の機能調節を行うキーシグナルを明らかにし、治療ターゲットを見出す。最終的に、口腔癌治療における新たな治療開発に繋げていくことを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、培養口腔癌細胞を用いて Cav-1 を人為的にノックダウンし、IL-6 の機能への影響について明らかにする。Cav-1 は細胞形質転換、腫瘍増殖、細胞遊走、浸潤および転移、細胞死、多剤耐性および血管形成との関与について報告がある (Pin Fu et al. *Onco Targets Ther.* 2017)。Cav-1 の発現に関しては、前立腺癌、膀胱癌、腎臓癌および食道扁平上皮癌、頭頸部扁平上皮癌、子宮頸部扁平上皮癌、舌扁平上皮癌において発現が多くみられる (Prade E et al. *Mol Endocrinol.* 2012), (Hurlstone AF et al. *Oncogene.* 1999), (Liang W et al. *Urol Oncol.* 2014)。これらの報告から、舌扁平上皮癌細胞株で多く発現されているとされる Cav-1 が欠失することで、細胞株の増殖や転移・遊走などに影響を及ぼす可能性があると推測される。

IL-6 と癌と炎症の関連に関しては、様々な説が存在するが、中でも、IL-6/ STAT3 シグナル伝達系が腫瘍の増殖、転移に大きく関与している(Yadav A et al. *Clin Cancer Res.* 2015)。口腔癌においてはそれら以外にアポトーシスの促進、上皮間葉転換 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT) などの関与が報告されている。口腔癌において、Cav-1 と IL-6 それぞれが増殖、転移・遊走に関与するが、それらの過程での Cav-1 と IL-6 の関わりについて検討した研究は少なく、まだ不明な点も多い。本研究において IL-6 の動きには Cav-1 の存在が必要であるという仮説を立て、Cav-1 存在下、非存在下における IL-6 刺激による癌の増殖や転移・遊走への影響及びシグナル伝達の変化について検討する。

3. 研究の方法

先行研究において shRNA レンチウイルスを用いて Cav-1 をノックダウンした舌扁平上皮癌細胞株を用いた実験を行った。舌扁平上皮癌細胞 (HSC-3) に 2 種類の shRNA レンチウイルスを導入し、Cav-1 遺伝子のノックダウンを行い、Cav-1 ノックダウン培養細胞を作成した。それら細胞を用いて増殖や遊走に関して観察を行ったところ、Cav-1 ノックダウン細胞とコントロール細胞では増殖や遊走に関して変化がほとんど見られないことが明らかになった。ここから、増殖・遊走に関与するとされる Cav-1 が欠失しても影響がないものの、何らかのトリガーとなる働きが加わった結果、癌細胞の機能に影響を及ぼすと推定した。IL-6 がそのトリガーになる可能性があり、Cav-1 ノックダウン細胞に IL-6 刺激を加えた時の増殖や遊走などの癌促進的な働きが抑えられるとの仮説のもとに、下記に示す実験で検討した。

先行実験において Cav-1 ノックダウン細胞は確立されており、培養に成功していた。また、IL-6 刺激時の Cav-1 ノックダウン細胞の増殖に関して検討を行った結果、増殖に関しては、Cav-1 がノックダウンされることで IL-6 の増殖促進の機能が抑制されるという結果が得られた。ここから、さらに検討を進めるために下記の実験を行うことを計画した。

【実験 1: IL-6 刺激時の転移・遊走の観察】

先行実験と同様に Cav-1 ノックダウン細胞とコントロール細胞に IL-6 刺激を行った時の遊走への影響を検討する。検討には Cell invasion アッセイと Scratch アッセイを用いる。Cell invasion アッセイでは、細胞の電気抵抗値による経時的な細胞浸潤をモニタリングする。Scratch アッセイは細胞集団の中に傷をつけ隙間をつくり、その隙間が埋まる様子を経時的に観察することで細胞遊走の様子を観察する方法である。

【実験 2：IL-6 刺激時のシグナル伝達経路への影響】

Cav-1 ノックダウン細胞に IL-6 で刺激した際のシグナル伝達経路への影響を調べる。ウエスタンブロッティングで Cav-1 の有無での IL-6/STAT3 経路に関するタンパクの発現について検討する。具体的には STAT3 のリン酸化や、癌増殖に関わる ERK のリン酸化、そのほか、EMT 関連タンパクである E-Cadherin や Vimentin などの発現を観察する。既に先行研究において、Cav-1 ノックダウンによって IL-6 刺激時の STAT3 のリン酸化が抑制されたことを明かにした。

4. 研究成果

Cav-1 ノックダウン細胞を作成し、IL-6 刺激時の口腔癌細胞の増殖や転移・遊走の観察を行った。IL-6 刺激時の Cav-1 ノックダウン細胞の増殖に関して細胞生存アッセイ (XTT assay) を用いて検討を行った。IL-6 刺激によって、コントロール細胞では細胞の増殖が促進されたが、Cav-1 ノックダウン細胞では増殖促進の変化は見られなかった。つまり、Cav-1 がノックダウンされることで IL-6 の増殖促進の機能が抑制された。

また、転移・遊走に関しては、Cell invasion アッセイと Scratch アッセイを用いて検討を行った。Cell invasion アッセイでは Cav-1 ノックダウンによって遊走は阻害されたが、IL-6 刺激による明らかな遊走の抑制は見られなかった。Scratch アッセイでは Cav-1 ノックダウン細胞に対して IL-6 刺激した際の遊走は抑制の傾向がみられたが有意な結果は得られていない。これは n 数の不足による結果であると考えており、投与する IL-6 の量や Starvation の有無によっても結果が影響を受けるか検討する必要があった。これらの結果から、Cav-1 は口腔がん細胞の増殖を促進に働き、転移・遊走性に関しては明らかな結果が得られず、Cav-1 と癌の転移・遊走との関連はない可能性が示唆された。

Cav-1 ノックダウン細胞を用いて、IL-6 刺激時のシグナル伝達の影響についての検討では、IL-6 による STAT3 シグナルの活性は確認できたものの、Cav-1 のノックダウンによる活性化への影響は見られなかった。そのほか、ERK や EMT 関連タンパクの観察についても同様に Cav-1 の関与がみられる変化はなく、Cav-1 が作用する機序に IL-6 との関連はないことが考えられた。

これらの結果から、Cav-1 と IL-6 の関連については、癌の増殖に Cav-1 と IL-6 双方が重要な役割を果たすものの、両者の直接的な作用は見られないことが明らかになった。今後はそれらが別々に作用する機序について検討を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ishikawa S, Umemura M, Nakakaji R, Nagasako A, Nagao K, Mizuno Y, Suzuki F, Osawa K, Kioi M, Mitsudo K, Ishikawa Y
2. 発表標題 EP4 promoted cell migration via mitochondrial biogenesis in oral cancer cells.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2023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	梅村 将就 (UMEMURA Masanari) (50595353)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

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