

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18777

研究課題名(和文) 唾液腺上皮におけるGBP-1の癌細胞動態への影響の解明

研究課題名(英文) The effects of GBP-1 on dynamics of cancer cells in human salivary gland duct epithelium.

研究代表者

宮田 遼 (Ryo, MIYATA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00610875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺癌は全頭頸部癌のうち比較的稀で、切除不能例や遠隔転移例に対して新規治療法が望まれる。今回我々は、IFN γ により特異的に誘導されるGuanylate binding protein-1 (GBP-1)の唾液腺癌の悪性化における役割を正常ヒト唾液腺上皮細胞およびヒトp63陽性唾液腺管癌細胞株(A253)を用いて検討した。正常唾液腺管上皮においては、GBP-1はバリア機能を含めた上皮ホメオスタシスの維持に重要と考えられた。p63陽性唾液腺癌においては、p63/TGF- β /JNKシグナルを介したタイト結合分子が癌の悪性化抑制に関与し、治療にはHDAC阻害剤やシグナル阻害剤が有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、GBP-1の唾液腺癌の悪性化における役割を解明できただけでなく、唾液腺癌の新規悪性化の機序解明により治療法の開発にも有用であった。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland cancer is relatively rare among all head and neck cancers, and new treatments are desired for unresectable cases and distant metastases. Guanylate-binding protein-1 (GBP-1) is an interferon-inducible large GTPase involved in the epithelial barrier at tight junctions. To investigate the role of GBP-1 in normal human salivary gland duct epithelial cells, the cells were treated with the proinflammatory cytokines including IFN γ . GBP-1 plays a crucial role in barrier function of normal human salivary gland duct epithelium and it may perform a preventive role in cancers. The p53 family p63 gene is essential for the proliferation and differentiation of various epithelial cells, and it is overexpressed in some salivary gland neoplasia. Inhibition of Histone deacetylases (HDACs) and signal transduction pathways inhibited cell proliferation and migration, induced tight junctions, and promoted differentiation in p63-positive salivary duct adenocarcinoma (SDC).

研究分野：細胞生物学

キーワード：唾液腺癌 正常唾液腺管上皮細胞 GBP-1 3細胞間タイト結合分子 angulin-1/LSR p63シグナル 悪性化 HDAC阻害剤

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

唾液腺癌は頭頸部癌の中でも稀な腫瘍であり、手術治療が基本となるものの、切除不能例や遠隔転移を認める症例に対しては有効な治療法が確立されていない。そこで、唾液腺の腺管上皮における Guanylate binding protein-1 (GBP-1) に着目した細胞分子学的検討を行う。GBP-1 は、癌細胞の増殖や浸潤に深く関与する細胞間接着装置であるタイト結合の発現を調整しており、近年では乳癌における新たな治療標的分子として注目されている。本研究では、唾液腺腺管上皮細胞を用い、GBP-1 が唾液腺癌の病態においてどのような役割を担い、癌細胞動態にどのような影響を及ぼしているか、分子生物学的手法を用いて検討を行い、唾液腺癌の新たな治療法の開発につながる基礎的知見を得ることを目標とする。

2. 研究の目的

唾液腺癌は全頭頸部癌の5%未満と比較的稀であることに加え、多くの組織型とその亜型が存在している。一般に治療は手術加療が基本となるが、確立された有効な化学療法がないことから、切除不能例や遠隔転移を認める症例に対しては、治療選択に苦慮することが少なくなく、新たな治療方法が望まれている。

われわれはこれまでに、ヒト唾液腺の腺管上皮における Guanylate binding protein-1 (GBP-1) の役割について研究を行ってきた。GBP-1 とは、endocytosis 時の細胞膜からの小胞形成への関与で知られる GTPase の dynamine スーパーファミリーに属しており、多くの細胞において IFN γ により特異的に誘導されることが知られている (Britzen-Laurent, et al. Carcinogenesis 2013)。われわれはこの GBP-1 が、タイト結合分子である Claudin-7 や LSR の発現増加を誘導し、ヒト唾液腺腺管上皮における上皮バリア機能の調節に関与していることを明らかにした。

一方、唾液腺癌と組織学的に近似することが多い乳癌において、GBP-1 の knock down が癌細胞増殖に影響を及ぼすことが報告され、GBP-1 が乳癌の新たな治療標的になりうる可能性が最近になって示されている (Quintero M, et al. BMC Cancer 2017)。

また、頭頸部癌においては、癌細胞浸潤能、増殖能および遊走能に、タイト結合分子が深く関与することをわれわれは示してきており (Takano K, et al. Anticancer Res 2016; Kurose M, et al. Adv Otorhinolaryngol 2016; Kakuki T, et al. Oncotarget 2016; Kondoh A, et al. Acta Otolaryngol 2011)、GBP-1 がタイト結合分子を介して癌細胞動態に影響を及ぼしている可能性は高く、実際、primitive ではあるが予備実験からも示唆されている。

以上の背景から、手術療法以外に有効な治療法が確立されていない唾液腺癌の新たな治療標的分子の候補として、GBP-1 に着目した研究を行い、上皮バリアを担うタイト結合分子を介した唾液腺癌の増殖および遊走を抑制するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 組織を用いた検討

まず、過去に得られた唾液腺癌組織における GBP-1 およびタイト結合分子 (occludin, claudin-1, -4, -7, LSR, tricellulin) の発現を、免疫組織学的染色法により評価する。唾液腺癌には多数の組織型が存在することから、臨床的に比較的遭遇頻度が高く、かつすでに検体が得られている多形腺腫由来癌、唾液腺導管癌、粘表皮癌、筋上皮癌、腺様嚢胞癌に絞って評価を行う。同時に、対照として頸部郭清等で得られた正常唾液腺、多型腺腫、ワルチン腫瘍においても評価を行う。発現の程度 (grading system)、局在、臨床所見との相関等について検討する。

各組織における GBP-1 およびタイト結合分子の mRNA レベルでの発現については、RT-PCR、Western blot 法にて比較検討を行う。

(2) ヒト唾液腺腺管上皮細胞を用いた検討

われわれが確立しているヒト正常唾液腺由来の唾液腺腺管上皮培養細胞 (Abe A, et al. J Mol Histol 2016) を用いた検討を行う。

予備実験においてこの細胞が安定したタイト結合分子の発現と上皮バリア機能を持ち、かつ GBP-1 が発現していることを確認している。さらに IFN γ 処置において、GBP-1 の発現上昇とそれに伴うタイト結合分子 (Claudin-7, LSR など) の発現増加を認める。この細胞を用いて、まず正常唾液腺腺管上皮細胞における以下の検討を行う。

GBP-1 発現増加における細胞増殖能、浸潤能、遊走能の検討

これまでの検討から、IFN γ 処置や PKC 細胞内シグナル伝達抑制により、GBP-1 の発現増加は誘導されることがわかっている。GBP-1 の発現誘導により、細胞の増殖能、浸潤能、遊走能の变

化を、われわれが他の細胞でも行っている各種アッセイ系を用いて検討する。

細胞周期変化の検討

Cell cycle assay にて、GMP-1 の発現変化が唾液腺腺管上皮細胞の細胞周期（G0/G1，S，G2/M 期）にどのような変化を及ぼすのかを解析する。

細胞内シグナル伝達系の解析

予備的実験では様々なシグナル伝達阻害剤の処置により、癌の悪性化に密接な関与が考えられている Wnt, EGFR, p38 MAPK, Hedgehog シグナル, p63/GATA-3/Ikk 経路の関与が示唆されている。GBP-1 の発現変化とこれらの細胞内シグナル伝達系の変化について、各種 inhibitor を用いながら、免疫細胞染色法, Western blot 法にて解析する。さらに、タイト結合分子の発現変化、上皮バリア機能の変化についても合わせて検討する。

(3) ヒト唾液腺癌培養細胞を用いた検討

すでに確立している唾液腺腺管上皮細胞の培養系を用いて、手術で得られたヒト検体から、唾液腺癌上皮細胞の培養を行う。(2) で述べた ~ の検討を同様に行い、正常唾液腺腺管上皮細胞で得られたデータと比較検討する。予備的検討からは、癌細胞では GBP-1 が発現低下しており、その結果として各タイト結合分子の発現が低下し、浸潤能および遊走能が増強されていることが予想される。さらに、各種シグナル伝達阻害剤を用いて、どのような細胞内シグナル経路が GBP-1 の発現に関与しているのか同定していく。

(4) 唾液腺癌細胞株を用いた検討

唾液腺癌は比較的稀であり、十分な検体量が得られない可能性もある。そこで、ヒト唾液腺癌由来細胞株である A-253 および WR21 株を用意している。(3) と同様の検討を行い、正常唾液腺腺管上皮細胞とのデータを比較していく。

4. 研究成果

siRNA を用いて A253 細胞の p63 の発現低下させた結果、DNA アレーにおいてチュブリン結合タイト結合分子である Cingulin (CGN) および CGN 結合タイト結合分子 ZO-3 の著しい mRNA の亢進がみられた。免疫染色においては、核内の p63 発現低下細胞において、処置前ではほとんどみられない CGN および ZO-3 の膜への誘導がみられた。その他のタイト結合分子 LSR, occludin, Tricellulin, claudin-4 の膜への誘導、さらに電顕的に明らかなタイト結合構造物も認められた。この変化は、TGF- 阻害剤 EW-7197 および JNK シグナル阻害剤 SP600129 の同時処置によりさらに亢進した。さらに抗腫瘍作用をもち p63 の発現を低下させることができる HDAC 阻害剤処置によっても同様の変化がみられた。いずれの処置により p63 の発現低下細胞の増殖能および細胞遊走は低下していた。細胞外フラックスを用いてミトコンドリア呼吸能を測定した結果、p63 の発現低下により呼吸能の亢進がみられた。

以上のことより、p63 陽性唾液腺癌においては、p63/TGF- /JNK シグナルを介した angulin-1/LSR を始めとしたタイト結合分子が癌の悪性化抑制に関与し、治療的には HDAC 阻害剤およびシグナル阻害剤が有用と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaneko Y, Konno T, Kohno T, Kakuki T, Miyata R, Ohkuni T, Kakiuchi A, Yajima R, Ohwada K, Kurose M, Himi T, Takano K, Kojima T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Induction of airway progenitor cells via p63 and KLF11 by Rho-kinase inhibitor Y27632 in hTERT-human nasal epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Transl Res.	6. 最初と最後の頁 599-611
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 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 -

1. 著者名 Kakiuchi Akito, Kakuki Takuya, Ohwada Kizuku, Kurose Makoto, Kondoh Atsushi, Obata Kazufumi, Nomura Kazuaki, Miyata Ryo, Kaneko Yakuto, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Himi Tetsuo, Takano Ken-Ichi, Kojima Takashi	4. 巻 45
2. 論文標題 HDAC inhibitors suppress the proliferation, migration and invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells via p63-mediated tight junction molecules and p21-mediated growth arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.7997	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 Ohwada Kizuku, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Nakano Masaya, Ohkuni Tsuyoshi, Miyata Ryo, Kakuki Takuya, Kondoh Masuo, Takano Kenichi, Kojima Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of HMGB1 on Tricellular Tight Junctions via TGF- Signaling in Human Nasal Epithelial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8390 ~ 8390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22168390	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 -

1. 著者名 Nakano Masaya, Ohwada Kizuku, Shindo Yuma, Konno Takumi, Kohno Takayuki, Kikuchi Shin, Tsujiwaki Mitsuhiro, Ishii Daichi, Nishida Soshi, Kakuki Takuya, Obata Kazufumi, Miyata Ryo, Kurose Makoto, Kondoh Atsushi, Takano Kenichi, Kojima Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of HDAC and Signal Transduction Pathways Induces Tight Junctions and Promotes Differentiation in p63-Positive Salivary Duct Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2584 ~ 2584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14112584	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野雅也、大和田築、金野匠、幸野貴之、小幡和史、角木拓也、宮田遼、黒瀬誠、近藤敦、高野賢一、小島隆
2. 発表標題 p63陽性唾液腺癌の新規病態解明と治療への応用
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野雅也、大和田築、金野匠、小幡和史、角木拓也、宮田遼、黒瀬誠、近藤敦、高野賢一、幸野貴之、小島隆
2. 発表標題 p63陽性唾液腺癌細胞の特性およびHDAC阻害剤に対する反応性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
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
---------	---------