

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06329・19K21413

研究課題名（和文）SMAD4を介した口腔癌の発癌・悪性形質獲得機構の解明と新規診断・治療法への応用

研究課題名（英文）The role of SMAD4 expression in carcinogenesis and therapeutic resistance of oral cancer

研究代表者

坂田 純基（Sakata, Junki）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：70823326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌（OSCC）患者において、SMAD4低発現群は化学放射線治療（CRT）の治療効果不良かつ有意に予後が不良であった。OSCC細胞株でSMAD4を抑制すると、5-FUおよびCDDPの感受性の低下を認め、cIAP2の発現が上昇していた。CRTの治療効果不良であった症例の切除標本で、CRT後も生存していた癌細胞でSMAD4の発現低下とcIAP2の高発現を認めた。OSCCにおいてSMAD4低発現は、cIAP2発現上昇による抗アポトーシス作用増強を介して抗癌剤抵抗性に関与している可能性が示唆された。SMAD4がOSCCの治療効果予測因子および治療標的として応用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

口腔扁平上皮癌（OSCC）は口腔癌の80%以上を占める悪性腫瘍であり、近年、OSCCの診断・治療法の選択肢は広がっているが、その5年生存率に大きな改善はみられない。また、わが国での口腔癌および咽頭癌による年間死亡者数は過去15年で約1.5倍に増加しており、その増加傾向の抑制が急務とされる。本研究の成果としてSMAD4が口腔白板症からの癌化予測因子、OSCCの治療効果予測因子および治療標的として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated SMAD4 expression status in biopsy specimens from patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) using immunohistochemical analysis and found that the low SMAD4 expression significantly correlates with poor response to preoperative chemoradiotherapy. Furthermore, we demonstrated that SMAD4 is associated with chemoresistance by activating anti-apoptotic effects via overexpression of cIAP2 in OSCC cells. Therefore, our data indicate that SMAD4 could be useful as a therapeutic biomarker of OSCC. Therapies targeting the SMAD4-dependent anti-apoptotic effects combined with chemotherapy could represent a promising new approach for overcoming chemotherapeutic resistance in OSCC, thereby improving the survival rate.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 治療抵抗性 SMAD4 発癌 口腔白板症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) の診断・治療法の選択肢は広がっているが、その5年生存率に大きな改善はみられない。その原因として、高浸潤・転移能や治療抵抗性をもつ高悪性腫瘍細胞が存在していることが挙げられる。また、わが国での口腔癌による年間死亡者数は過去15年で約1.5倍に増加しており、その増加傾向の抑制が急務とされる。これらの知見から、OSCCの高度悪性形質獲得に関わる分子メカニズムの解明および前癌病変からの発癌機構の解明はOSCCの予後改善に重要であると考えられる。

(2) SMAD4はTGF- β スーパーファミリーシグナルにおいて、そのシグナルを伝達するSMADファミリーの一つとして知られている。いくつかの癌種ではSMAD4の発現低下と発癌、抗癌耐性との関連が報告されており、新たな治療標的や診断ツールとして注目を集めている。しかし、OSCCにおけるSMAD4発現の意義またはその役割に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、OSCCの早期発見や早期治療につながる因子の解明、またOSCC患者に対するより有効性の高い治療法の開発を目指してOSCC発生に関与する前癌病変におけるSMAD4の役割、およびOSCCの浸潤転移能・治療抵抗性へのSMAD4の関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 口腔白板症およびOSCC組織で抗SMAD4抗体を用いて免疫組織化学染色を施行し、SMAD4の発現と各臨床項目との関連を検討する。

(2) OSCC細胞株(SAS, HSC2, HSC3, HOC-313, TSU, OSC-19, OSC-20)と不死化角化細胞株(HaCaT)を用いて、RT-PCR、ウエスタンブロット法で各細胞株のSMAD4発現量を比較検討する。

(3) SMAD4のsi-RNAとコントロールのsi-RNAを導入したOSCC細胞株(SASとHSC2)に各濃度のCDDPまたは5-FUを加え感受性の差を評価する。

(4) SMAD4を抑制したSASとHSC2細胞における抗アポトーシス因子の発現をRT-PCR、ウエスタンブロット法で検討し、さらに術前化学放射線治療の治療効果が不良であったOSCC患者の切除標本を用いて抗SMAD4抗体、抗cIAP2抗体で免疫組織化学染色を行い、発現を評価する。

4. 研究成果

(1) 口腔白板症150例の組織標本で免疫組織化学染色を施行しSMAD4の発現を評価したところ、SMAD4低発現群は有意に口腔白板症の癌化率が高いことが明らかになった(図1)。また、上皮化のリンパ球浸潤に着目したところ、SMAD4低発現は制御性T細胞のマーカーであるFOXP3陽性リンパ球の高浸潤と関連していた。

(2) OSCC 90例の組織標本で免疫組織化学染色を施行しSMAD4の発現を評価したところ、SMAD4低発現は頸部リンパ節転移陽性と術前化学放射線治療の治療効果不良と関連していた。また、SMAD4低発現群は高発現群と比較し有意に予後が不良であった(図2)。他に予後因子として頸部リンパ節転移と術前化学放射線治療の治療効果とSMAD4の発現で多変量解析を行ったところ、SMAD4の発現は有意差を認めなかった。

(3) OSCC細胞株(SAS, HSC2, HSC3, HOC-313, TSU, OSC-19, OSC-20)と不死化角化細胞株(HaCaT)でSMAD4の発現程度をRT-PCRおよびウエスタンブロット法で比較すると、OSCC細胞株では角化細胞株と比較しSMAD4発現が有意に低かった。

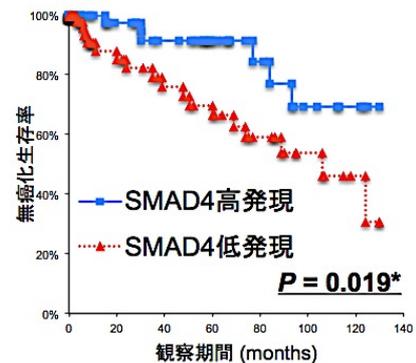


図1: SMAD4発現程度別の白板症の癌化率

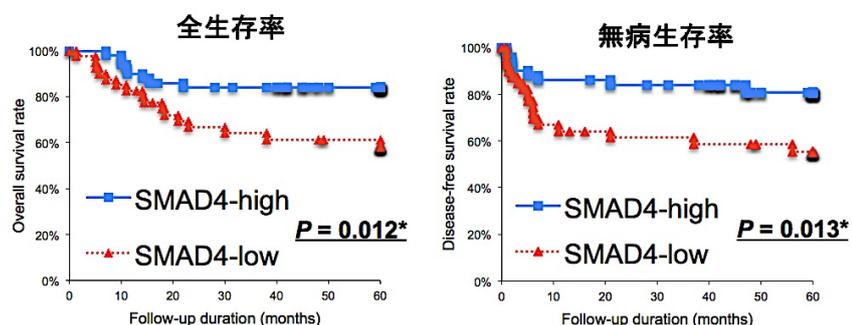


図2: OSCCにおけるSMAD4発現程度別の予後

(4) OSCC 細胞株 (SAS, HSC2) に SMAD4 の si-RNA を導入後、その発現抑制効果を確認し、以降の実験に使用した。SMAD4 の発現を抑制した OSCC 細胞株において抗癌剤感受性の変化について検討したところ、SMAD4 の発現を抑制した細胞においてシスプラチン (CDDP) およびフルオロウラシル (5-FU) への感受性が有意に低下していた (図 3)。また CDDP 10 μ g/ml 投与 24 時間後の細胞において、SMAD4 の発現を抑制した細胞でアポトーシス細胞が有意に減少していた。

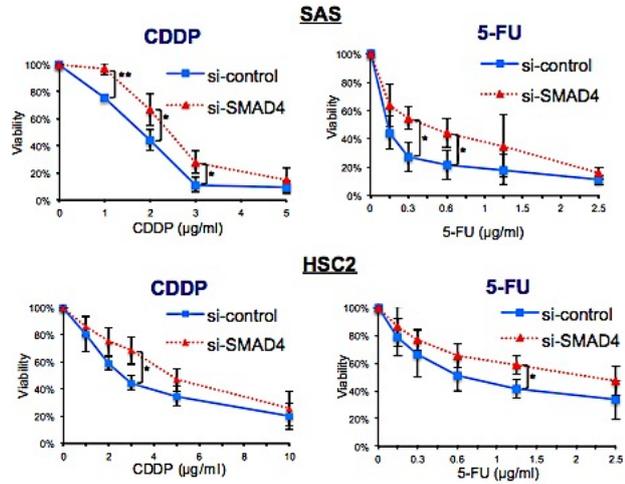


図 3: SMAD4 抑制による抗癌剤の感受性変化

(5) OSCC 細胞株における SMAD4 発現抑制によるアポトーシス抑制因子の変化について検討したところ、SMAD4 抑制によりアポトーシス阻害因子 2 (cIAP2) の発現が上昇し、アポトーシスが抑制されていることが明らかとなった (図 4)。

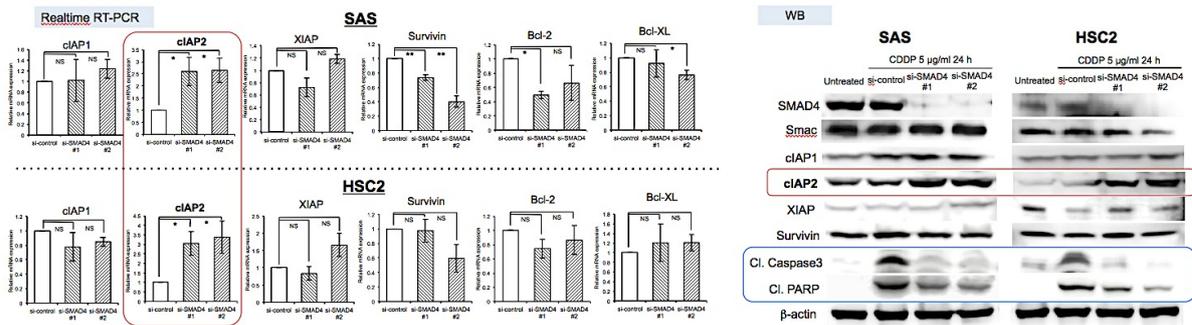


図 4: SMAD4 抑制による抗アポトーシス因子の発現変化

(6) 化学放射線治療 (CRT) 後にも生存していた治療抵抗性の OSCC 組織で免疫組織化学染色を行ったところ、SMAD4 の発現低下および cIAP2 の発現上昇が確認された (図 5)。

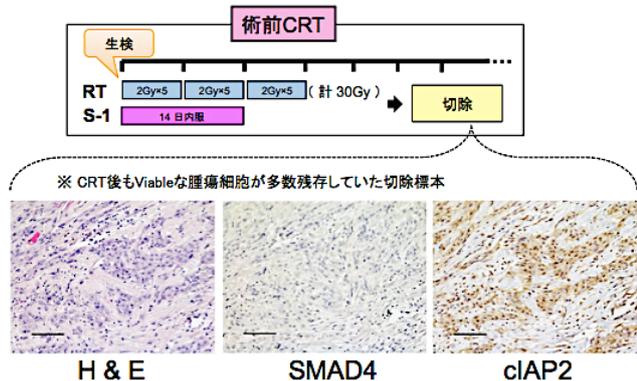


図 5: 化学放射線治療後の OSCC 組織での SMAD4・cIAP2 の発現

(7) 口腔白板症における SMAD4 発現は癌化予測マーカーとして有用であり、OSCC の予防や早期発見に寄与する可能性が示された。また癌化に寄与する機序として SMAD4 の低発現が抗腫瘍免疫の抑制に関与している可能性が考えられた。また、OSCC における SMAD4 の発現が化学放射線療法の治療効果予測や予後予測マーカーとして応用できる可能性が示唆された。また治療抵抗性に寄与する機序として、SMAD4 の発現低下によりアポトーシス阻害因子 cIAP2 の発現が亢進し、抗アポトーシス作用が増強されることで抗癌剤耐性を示した可能性が考えられた。SMAD4 依存的な抗アポトーシス作用を標的とした治療法が治療抵抗性 OSCC の新たな治療戦略になりうる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakata Junki, Yoshida Ryoji, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Hirose Akiyuki, Naito Hisaki, Takeshita Hisashi, Kawaguchi Sho, Gohara Shunsuke, Nagao Yuka, Yamana Keisuke, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Ito Takaaki, Nakayama Hideki	4. 巻 32
2. 論文標題 FOXP3 lymphocyte status may predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.06.005	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 Sakata Junki, Hirose Akiyuki, Yoshida Ryoji, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Yamamoto Tatsuro, Nagata Masashi, Kawaguchi Sho, Gohara Shunsuke, Nagao Yuka, Yamana Keisuke, Toya Ryo, Murakami Ryuji, Kuwahara Yoshikazu, Fukumoto Manabu, Nakayama Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced Expression of IGFBP-3 Reduces Radiosensitivity and Is Associated with Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 494 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020494	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 Sakata Junki, Hirose Akiyuki, Yoshida Ryoji, Kawahara Kenta, Matsuoka Yuichiro, Yamamoto Tatsuro, Nakamoto Masafumi, Hirayama Masatoshi, Takahashi Nozomu, Nakamura Takuya, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Nagata Masashi, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki	4. 巻 20
2. 論文標題 HMGA2 Contributes to Distant Metastasis and Poor Prognosis by Promoting Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2473 ~ 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102473	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田 純基
2. 発表標題 SMAD4の低発現は口腔扁平上皮癌の発癌および抗癌剤抵抗性に関する
3. 学会等名 第73回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田 純基
2. 発表標題 SMAD4の発現低下は口腔白板症の癌化および口腔扁平上皮癌の抗アポトーシス作用を介した抗癌剤抵抗性に関する
3. 学会等名 第73回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019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