

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K10111
研究課題名(和文) TGF-による口腔がんの悪性を制御する分子機構を標的とした新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics targeting TGF-beta-dependent oral cancer progression

研究代表者
K A 井上 (INOUE, Katarzyna Anna)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90302877

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)：口腔がんの患者は年々増加しており有効な治療法の開発が急務であり、効果的な治療方法や標的分子の探索が重要である。口腔扁平上皮がん細胞は、TGF-により上皮間葉移行(EMT)が誘導され、細胞運動能・浸潤能が亢進されるが、その分子機構には未解明な部分が多い。本研究では、TGF-により口腔がんの悪性を司る分子機構の解明を目指した。具体的には、機能既知低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、EMTを抑制できる低分子化合物として 2アドレナリン受容体作動薬であるイソクスプリンを同定した。また、口腔がん細胞のEMTの誘導において 2アドレナリン受容体が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全世界で口腔がんの患者は年々増加しており有効な治療法の開発が急務である。現在、外科・放射線療法が一定の効果をおいているが、遠隔転移による死亡率が増加しており、有効な治療法の開発が急務である。本研究の成果により口腔がんの上皮間葉移行の新規機構を解明したことの学術的意義は大きく、間葉上皮移行を誘導する活性を有する薬剤として同定した化合物は口腔がん治療への活用が期待されるため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with oral cancer is increasing every year, and the development of effective treatments is urgently needed. Thus, it is important to develop effective treatment methods and search for novel putative targets. Since TGF- induces epithelial-mesenchymal transition and enhances cell motility and invasiveness in oral squamous cell carcinoma cells, we aimed to develop novel therapeutic agents targeting the molecular mechanisms that regulate TGF-induced malignant transformation of oral cancer. In this study, we screened a library of small molecules with known functions and found that isoxsuprine, a low-molecular weight compound can effectively inhibit epithelial-mesenchymal transition. We have also identified factors related to the induction of EMT in oral cancer cells.

研究分野：生化学・がん生物学

キーワード：TGF- 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮がん（OSCC: oral squamous cell carcinoma）は顎口腔領域に発生する悪性腫瘍であり、日本国内において年間の罹患者数は増え続けている。口腔がんはリンパ節転移ならびに肺・肝臓などの遠隔臓器へ転移しやすいため、予後不良に陥りやすく、その悪性化のメカニズムの解明が急務となっている。その治療法は近年進歩しているものの、未だにがん再発とそれに伴う転移が大きな問題となっている。

口腔がんの大部分は、口腔内または舌の扁平上皮細胞から発生する。扁平上皮がんであることから、口腔がんの転移過程においては、がん細胞が間葉系細胞へと分化転換（上皮間葉移行、EMT: epithelial-mesenchymal transition）を起こすことで細胞間接着性が低下し、運動・浸潤能を獲得することが重要であると考えられている（Takahashi *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2020; Sakakitani *et al.* Cancer Science, 2021）。TGF- β が誘導する EMT を起こした細胞は高い運動・浸潤能を有し、転移をするため、EMT を抑制し、間葉上皮移行（MET）を誘導する薬剤はがん治療作用を有することが期待される。この EMT はがん微小環境における transforming growth factor- β （TGF- β ）などの、様々な因子により誘導されることが報告されている。しかしながら、口腔がんにおいて TGF- β が上皮間葉移行の誘導を制御する機構については未解明な部分が多く残されている。

ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が、がんの浸潤や転移などに関与することが報告されている。また、EMT の過程においては HSPG の発現増加が、TGF- β によるがん細胞の EMT 誘導や浸潤能の獲得に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、EMT における HSPG の効果の詳細なメカニズムに関しては報告されていない。また、がんの進展の過程における TGF- β が誘導する細胞の運動能と細胞増殖の制御には、HSPG が重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、これまでこの仮説を支持する報告はない。

2. 研究の目的

TGF- β が二面性の作用を有することが知られている。TGF- β が EMT を誘導するがん悪性化因子として作用すると同時に正常上皮細胞の増殖を抑制するがん抑制作用を持つことから、TGF- β シグナルを抑制することなく、EMT のみを抑制に特化した治療法を開発することが望ましい。また、口腔扁平上皮がん細胞のがんの進展の過程（上皮間葉移行、浸潤、転移など）が TGF- β シグナルにより制御されることが知られている。そこで、本研究では、TGF- β により口腔がんの悪性化を抑制する新規治療薬の開発を通じて、悪性化を司る分子機構の解明を目的とした。また、EMT における HSPG の役割に関しては未解明の部分が多く残されていることから、口腔がんの悪性化に伴う EMT と HSPG の連関を司る分子機構を解明することも目指していた。

3. 研究の方法

(1) 上皮間葉移行（EMT）及び間葉上皮移行（MET）を可視化できるハイスループットスクリー

ニング系（E-cadherin のプロモーターに依存して GFP が発現するレポーター遺伝子を導入した OSCC 由来 SAS 細胞株）を用いて、低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。同定した低分子化合物を用いて、口腔がん細胞の EMT の誘導抑制を *in vitro* で検討し、定量的 RT-PCR を施行することにより、MET の誘導の指標となる様々な上皮細胞マーカーや間葉系マーカーの発現変動について検討した。また、口腔がん細胞の増殖、及び細胞運動能に対する低分子化合物の効果を検討した。さらに、マウス担がんモデルを用いて、同定した化合物の腫瘍形成において治療効果を評価した。

(2) TGF- β 処理によって EMT を誘導した口腔扁平上皮がん細胞を用いて、口腔がん細胞の TGF- β の刺激に伴う変化について、RNA シーケンシングを用いたトランスクリプトーム解析を行った。また、データサイエンスの手法を用いて、TGF- β の刺激によって変動する遺伝子を抽出し、EMT の誘導、口腔がん細胞の増殖能及び、細胞運動能及びの関連について検討した。さらに公開データベースを用いて、口頭頸部患者の予後及びがんの進展における候補因子との関連について検討した。

4. 研究成果

(1) TGF- β が誘導する EMT を起こした細胞は高い運動・浸潤能を有し、転移をするため、EMT を抑制し、MET を誘導する薬剤はがん治療作用を有することが期待される。本研究において、上皮細胞間から間葉系細胞への移行 (EMT の誘導)、間葉系細胞から上皮系細胞への移行 (MET の誘導) を可視化できるハイスループットスクリーニング系を用いて、約 1,600 個の機能既知低分子化合物ライブラリーの探索を行った。検討した機能既知低分子化合物の中から得られた候補化合物を用いて、間葉系細胞の特徴である運動能を指標として 2 次スクリーニングを行ったところ、 $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬であるイソクスプリンを同定した。イソクスプリンは TGF- β 刺激によって口腔がん細胞において間葉系マーカーである N-cadherin、SM22 α 、vimentin の発現上昇を抑制した。また、詳細な解析を行ったところ、イソクスプリンは TGF- β シグナルを抑制せずに、口腔がん細胞の MET の誘導を介して運動能を低下させた。さらに、マウス担がんモデルに対してイソクスプリンを投与することにより口腔がん細胞による腫瘍形成が有意に低下することを見出した。以上の結果から、口腔扁平上皮がん細胞において $\beta 2$ アドレナリン受容体のアゴニストであるイソクスプリンが EMT を抑制することが初めて明らかとなった。本研究の成果により、 $\beta 2$ アドレナリン受容体シグナルが有望ながん治療標的であることが示唆された。

(2) 口腔がんの悪性化に伴う上皮間葉移行における HSPG の関与の分子機構を解明するために、コアタンパク質の分子種、ヘパラン硫酸鎖の糖鎖の生合成、硫酸化修飾の多様性なども考慮した。そこで、TGF- β で刺激した口腔がん細胞を用いて RNA シーケンシングを用いたトランスクリプトーム解析を行い、TGF- β の刺激によって変動する因子を抽出した。また、公開データベースを用いて、頭頸部がん患者の予後との関連性について検討した。その結果、複数の予後不良因子の候補を見出した。現在、候補分子種の発現変動による上皮間葉移行の誘導及び細胞増殖に対する効果を検討するために、候補分子種の遺伝子欠損口腔扁平上皮がん細胞を樹立する準備を進めている。HSPG は細胞表面に存在し、細胞外マトリクスから細胞へのシグナルを制御する。そこで、EMT の誘導、細胞運動能及び細胞増殖に着目したところ、口腔がんにおいて TGF- β によって増殖が静止したがん細胞の運動能が亢進して転移することが示された (Takahashi, Podyma-

Inoue et al., Cell Reports, 2022)。この細胞において、TGF- β によるがん細胞の運動能亢進と増殖抑制を司る分子、keratin-associated protein 2-3 (KRTAP2-3) を同定した。

〈引用文献〉

1. Takahashi K, Akatsu Y, Podyma-Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi H, Yoshimatsu Y, Koinuma D, Shirouzu M, Miyazono K, Watabe T. Targeting all transforming growth factor- β isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 295 (36): 12559-12572, 2020.
2. Sakakitani S, Podyma-Inoue KA, Takayama R, Takahashi K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Harada H, Watabe T. Activation of β 2-adrenergic receptor signals suppresses mesenchymal phenotypes of oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Science*. 112:155-167, 2021.
3. Takahashi K#, Podyma-Inoue KA#, Saito M, Sakakitani S, Sugauchi S, Iida K, Iwabuchi S, Koinuma D, Kurioka K, Konishi T, Tanaka S, Kaida A, Miura M, Hashimoto S, Okada M, Uchihashi T, Miyazono K, Watabe T. TGF- β generates a population of cancer cells residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via keratin-associated protein 2-3. *Cell Reports*. 40:111411, 2022. #: equal contribution

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 4件）

1. 著者名 Kobayashi Miho, Fujiwara Kashio, Takahashi Kazuki, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Podyma-Inoue Katarzyna A., Watabe Tetsuro	4. 巻 42
2. 論文標題 Transforming growth factor- induced secretion of extracellular vesicles from oral cancer cells evokes endothelial barrier instability via endothelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 38-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00225-7	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 Takahashi Kazuki, Podyma-Inoue Katarzyna A., Saito Maki, Sakakitani Shintaro, Sugauchi Akinari, Iida Keita, Iwabuchi Sadahiro, Koinuma Daizo, Kurioka Kyoko, Konishi Toru, Tanaka Susumu, Kaida Atsushi, Miura Masahiko, Hashimoto Shinichi, Okada Mariko, Uchihashi Toshihiro, Miyazono Kohei, Watabe Tetsuro	4. 巻 40
2. 論文標題 TGF- generates a population of cancer cells residing in G1 phase with high motility and metastatic potential via KRTAP2-3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111411 ~ 111411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111411	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 Kodama Shingo, Podyma-Inoue Katarzyna, Uchihashi Toshihiro, Kurioka Kyoko, Takahashi Hitomi, Sugauchi Akinari, Takahashi Kazuki, Inubushi Toshihiro, Kogo Mikihiko, Tanaka Susumu, Watabe Tetsuro	4. 巻 46
2. 論文標題 Progression of melanoma is suppressed by targeting all transforming growth factor? isoforms with an Fc chimeric receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8148	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 Sakakitani Shintaro, Podyma Inoue Katarzyna A., Takayama Rina, Takahashi Kazuki, Ishigami Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Harada Hiroyuki, Watabe Tetsuro	4. 巻 112
2. 論文標題 Activation of 2 adrenergic receptor signals suppresses mesenchymal phenotypes of oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 155 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14670	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14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 美穂、藤原 花汐、高橋 和樹、井上 カタシナアンナ、渡部 徹郎
2. 発表標題 口腔がん細胞由来エクソソームによる内皮不安定化機構
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Maki Saito, Shintaro Sakakitani, Toru Konishi, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 TGF- β -induced cell cycle arrest is correlated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 時崎 詩織、井上 カタシナアンナ、高橋 和樹、原田 浩之、渡部 徹郎
2. 発表標題 TGF- β を標的とした新規Fc融合タンパク質製剤の開発
3. 学会等名 第46回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue
2. 発表標題 TGF- β generates cancer cells residing in G1 phase with high motility by inducing Slug/HMGA2-independent EMT
3. 学会等名 Virtual TGF- β Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 時崎詩織、井上 カタジナアンナ、高橋 和樹、松本 武、白水 美香子、原田 浩之、渡部 徹郎
2. 発表標題 全てのTGF- アイソフォームを標的とした新規Fc融合タンパク質製剤の開発
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 カタジナアンナ、高橋 和樹、須河内 昭成、飯田 湊太、岩淵 禎弘、鯉沼 代造、栗岡 恭子、小西 徹、田中 晋、戒田 篤志、三浦 雅彦、橋本 真一、岡田 真里子、内橋 俊大、宮園 浩平、渡部 徹郎
2. 発表標題 TGF- は増殖が低下して運動能が上昇したがん細胞集団を形成することで口腔がんの転移を亢進する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Shintaro Sakakitani, Daizo Koinuma, Akinari Sugauchi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Yasuhiro Yoshimatsu, Toshihiro Uchihashi, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Novel approach for treatment of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 FASEB Research Scientific Conference; TGF- Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 和樹、井上 カタジナアンナ、榎谷 振太郎、小西 徹、須河内 昭成、齋藤 万樹、戒田 篤志、鯉沼 代造、吉松 康裕、内橋 俊大、古郷 幹彦、三浦 雅彦、宮園 浩平、渡部 徹郎
2. 発表標題 TGF- により細胞周期が静止した口腔扁平上皮がん細胞は上皮間葉 移行の誘導を介して運動・転移能が亢進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 カタジナアンナ、榊谷 振太郎、高橋 和樹、原田 浩之、渡部 徹郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮がん細胞の上皮間葉移行を標的とした新規治療薬の開発
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原花汐、小林美穂、井上 カタジナアンナ、渡部徹郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮がん細胞が放出するエクソソームによるがん悪性化誘導機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 万樹、高橋 和樹、井上 カタジナアンナ、榊谷 振太郎、小西 徹、須河内 昭成、戒田 篤志、鯉沼 代造、内橋 俊大、三浦 雅彦、宮園 浩平、渡部 徹郎
2. 発表標題 TGF- β により細胞周期が停止した口腔扁平上皮がん細胞は上皮間葉移行の誘導を介して運動能が亢進する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Shintaro Sakakitani, Kazuki Takahashi, Hiroyuki Harada, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Novel approach for treatment of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎谷 振太郎、井上 カタジナ アンナ、高橋 和樹、原田 浩之、渡部 徹郎
2. 発表標題 2-アドレナリン受容体シグナルは口腔扁平癌の進行を阻害する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Inoue, Atsushi Kaida, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Susumu Tanaka, Masahiko Miura, Mikihiro Kogo, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 TGF- β -induced cell cycle arrest is associated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------