

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18472

研究課題名（和文）口腔がんの遊離と浸潤を抑制する新規治療標的の同定

研究課題名（英文）Identification of novel therapeutic targets in oral cancer

研究代表者

河村 智子（Kawamura, Tomoko）

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：10838642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：口腔がんは浸潤性が高く、頸部リンパ節に高頻度に転移する深刻ながんであるが、その悪性化のメカニズムは解明されていない。本研究では、口腔がん細胞は正常組織の細胞よりも脂質の代謝が亢進しており、それを抑制すると連動してカルシウム依存的に細胞と細胞を接着させる細胞接着分子である E-cadherin の機能を弱めることができ、細胞同士の接着が剥がれると、最終的にがん細胞死を誘導できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、新たな口腔がんのための抗がん薬の標的分子が見出された可能性があり、今後より確実にそれらの分子の機能を阻害する薬剤を開発することで、より特異的な治療法の創出につながるのではないかと考えている。また、接着の制御による新たながん細胞死の誘導の機構を示せたことで、がん細胞における接着の重要性を提唱できたのではないかと考える。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is characterized by invasive phenotypes and high risk of regional lymph node metastases. Currently the mechanisms of the metastatic process are not well understood. In this study, we found that the lipid metabolisms are elevated in the OSCC cells compared to the fibroblasts on the gum tissue, and this increased metabolism leads to the reduced function of E-cadherin, one of a major cell adhesion molecule. We showed that altered E-cadherin function induces the dissociation of cell-cell adhesion in cancer, which promotes cancer cell death.

研究分野：矯正歯科

キーワード：口腔がん 細胞接着 脂肪酸合成 メトホルミン

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

口腔がんは咀嚼・嚥下・発音に影響を与えるため、クオリティーオブライフの著しい低下を招く。またその悪性化は頸部リンパ節への高頻度な転移をきたし、既存の治療法での5年生存率が～50%と低い深刻な疾患である（Kakkar et al, Curr Drug Targets, 2019）。近年、口腔がんの罹患者数が世界的に増加傾向にあるため、口腔がんの新規治療法の開発は急務であり、口腔がん悪性化に関与する因子を同定し、その作用機序を解明することは必須の課題である（Kakkar et al, Curr Drug Targets, 2019）。

2型糖尿病の第一選択薬として世界中で広く使用されているメトホルミンは、血糖値を低下させる作用に加えて、膵臓・肝臓・肺・結腸・乳腺などの様々な組織のがんにおいて抗がん効果が報告されている。このメトホルミンの抗がん効果は、細胞のエネルギーセンサーであるAMPキナーゼ（AMPK）の活性化によるが、正常な細胞においてはAMPK以外の様々な分子シグナルもメトホルミンにより同時に活性化される（Choi and Park, Mol Cells, 2013; Lei et al, Chin J Cancer, 2017）。シグナルの多様性は副作用を引き起こす原因となることから、効果的な抗がん剤の開発には、がん組織やがん細胞に特異的な分子標的を見出す必要がある。ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株Ca9-22細胞や舌扁平上皮癌細胞株SAS細胞を用いて、メトホルミンの抗がん効果を検討した結果、メトホルミンが口腔がん細胞の増殖を有意に抑制することを確認した。加えて、細胞増殖抑制の前段階として、細胞膜の変形を伴う著しい形態変化と細胞間結合の増強を観察した。メトホルミンはAMPK以外にも様々なシグナル経路を活性化することから、AMPのアナログでありAMPKの特異的な活性化剤であるAICARを用いて同様の実験を行ったところ、AICARは細胞増殖と遊走は抑制したが、形態の変化は示さなかった。この結果は、メトホルミンの抗がん作用に関与する口腔がん細胞の形態変化は、AMPKシグナルを介していないことを示唆している。がん細胞は、細胞間結合が弱まり細胞が遊離しやすくなると浸潤（遊走）や転移を促進するため、細胞間結合や細胞膜の形態を制御する機構を見出すことは、がん細胞の転移の初期段階を理解する上で不可欠である。口腔がん細胞の形態変化と細胞間結合増強を示す薬剤を見出したことから、この知見をもとに口腔がん特異的に転移能を阻害する因子が同定できれば、新規口腔がん治療法の開発に繋がるのではないかと考え、本研究の提案に至った。

2．研究の目的

本研究は、口腔扁平上皮がん細胞株で観察された、「メトホルミン刺激による細胞膜の形態変化と細胞増殖の抑制」という、がん悪性化の阻害が期待される新しい知見を元にその分子機序を解明することを目的としている。口腔がんには他の臓器のがんには無い特有の悪性化誘導因子があるのではないかと考え、本研究により悪性化の初期段階を阻害する分子機序が解明されれば、がん悪性化のメカニズムの一旦をも解明することになり、がん遺伝子の特定や代謝変化に注目した研究が多いがん研究に新たな知見をもたらすことになる。本研究では、走査型イオン伝導顕微鏡（SICM）を用いて、生きたがん細胞の表面形態を直接電顕レベルで計測することに挑戦する。SICMは細胞表面の微細構造の「動態」や同一細胞の経時的な観察が可能であることから、がん細胞の形態変化に対し新規の知見を得られる可能性は高い。悪性度の高いがん細胞の新規の形態的特徴が同定されれば、細胞診断への応用も期待できる。

本研究により口腔がんの特異的な悪性化の分子メカニズムの一端を解明し、分子標的を絞ることができれば、口腔がんの新しい治療法の開発へと繋がる。将来的には、従来の治療法と本研究で得られた知見を元に開発した治療法を併せて行うことで、口腔がんの増悪を防ぎ、再発・転移を予防することが期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、口腔がんにおける細胞膜の変形や細胞間結合の変化と浸潤性や転移能などのがん悪性化との関連性を分子生物学的に明らかにし、がん悪性化の律速段階に関与する分子を同定することで、口腔がんの悪性化抑制法の開発に繋がるデータの取得を行う。

計画1: AMPK を介さない口腔がん細胞膜の変形や細胞間結合増強に関与する分子の同定

1. 遺伝子発現解析: メトホルミンと AICAR それぞれの刺激有無の口腔がん細胞株におけるマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現パターンを比較する。発現量に著しい変化が見られる因子をリストアップし、既存のデータベース上の遺伝子機能情報を参考にして、細胞接着や形態変化に関与する因子を絞り込む。同様に細胞増殖の速度調節に関与すると考えられる因子の同定も行う。

2. 細胞間結合因子の発現と細胞内局在の検討: 同定した候補因子は、リアルタイム PCR 法やウェスタンブロットング法、免疫染色法を用いてメトホルミンや AICAR で刺激後の口腔がん細胞株の mRNA やタンパク質の変動や細胞内局在を確認する。また、患者から採取した口腔がんや他組織のがん、さらには正常組織における同定因子の発現量も比較検討する。これらの実験により口腔がん特異的な細胞膜変形因子や細胞間結合増強因子が明らかとなり、口腔がんの転移予防のための標的候補分子を提唱できる。

計画2: 細胞間結合因子や形態維持に関与する因子の口腔がん細胞における機能の解明

1. 同定因子の機能解析: 同定した候補因子の中で、特に発現変化が顕著であった因子の機能解析を行う。候補因子は口腔がん細胞株に強制発現もしくは siRNA や CRISPR/Cas9 システムなどを用いて抑制する。これらの細胞の形態を観察し、続いて細胞間結合能や増殖能、遊走能、細胞骨格の変化、細胞数の変化をそれぞれ調べる。さらに同定した因子を用いてメトホルミンや AICAR で刺激した時のレスキュー実験も行い、口腔がんの転移・増殖に関与する因子を提唱する。

2. 形態観察: 医学部顕微解剖学分野が所有する電子顕微鏡設備を用いて、細胞の接着や運動に関与する候補因子の発現を変化させた口腔がん細胞株の形態や微細構造の動態を観察する。この時、細胞を固定して形態を観察するだけでなく、ライブイメージングも行う。これらの実験によってがん細胞の悪性化の違いによる形態の特徴が明らかになる。

計画3: 舌がんモデルマウスを用いた細胞間結合・形態と悪性化との関連性の解明

1. 同所移植舌癌モデルマウスによる解析: 口腔がん細胞株をヌードマウスの舌に移植し、腫瘍を経時的に観察するとともに、組織学的解析や転移能についても検討する。さらに AICAR を投与した時の形態変化についても観察する。

2. 同所移植舌癌モデルマウスによる解析: 計画1で同定した結合因子の発現抑制細胞と非抑制細胞に蛍光プローブを導入し、それぞれマウスの舌に移植して腫瘍の大きさやリンパ節転移の有無を比較する。さらに電子顕微鏡による形態変化の解析も行い、細胞間結合の変

化を詳細に捉える。加えて、同定因子の発現を調節する既知の薬剤が存在する場合にはこれを腫瘍に投与し、腫瘍の大きさや転移能を検討する。これらの実験により、同定因子が新規口腔がん治療開発の標的になり得るかが明らかになる。

4．研究成果

1) メトホルミン刺激有無それぞれの口腔がん細胞における網羅的な遺伝子発現解析を、マイクロアレイ法を用いて行い、メトホルミン刺激細胞では脂質の代謝異常に関与する遺伝子の発現に大きな変化がある知見を得た。そこで、この分子の発現を正常歯肉線維芽細胞と口腔がん細胞で比較したところ、口腔がん細胞で顕著に上昇しているサブタイプを見出した。siRNA 法にてこのサブタイプの分子の発現を特異的に抑制したが、口腔がん細胞の形態や生存に影響がなかったことから、何らかの分子によるコンペンセーションが起きてしまったのではないかと考えた。そこで、次にこの分子群の阻害薬を用いて口腔がん細胞の形態解析と生存実験を行ったところ、細胞接着が阻害され、細胞死が誘導された。つまり、この脂質代謝関連分子は口腔がんの抗がん剤の標的になりうると考えられた。

2) メトホルミン刺激有無それぞれの口腔がん細胞における網羅的な遺伝子発現解析データを確認したところ、カルシウム依存的に細胞と細胞を接着させる主要な細胞接着分子 E-cadherin が関連候補分子に上がった。そこで E-cadherin の発現量をウエスタンブロッティング法にて確認したところ、成熟 E-cadherin の減少と、代わりに高分子 E-cadherin の出現が認められた。また、免疫染色により、E-cadherin はゴルジ体に集積していることもわかった。現在、高分子 E-cadherin の発現を誘導する分子シグナルを同定し、解析している途中である。今後は、既知の抗がん剤以外的高分子 E-cadherin 誘導薬を探索し、それらが口腔がんの抗がん効果を有するかを検討していく予定である。

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 0件）

| |
|---|
| 1．発表者名 伊藤元貴，河村智子，高木律男，照沼美穂 |
| 2．発表標題 アセチルCoAカルボキシラーゼ阻害剤は口腔扁平上皮癌細胞のE-cadherinの修飾に関与する |
| 3．学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 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 |
|---------|---------|