

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18699

研究課題名（和文）口腔癌におけるミトコンドリア動態が及ぼす抗癌剤耐性機構の解明と新規治療法の創出

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of mitochondrial dynamics for chemoresistance and creation of novel therapeutic methods

研究代表者

川原 健太（Kawahara, Kenta）

熊本大学・病院・助教

研究者番号：90732735

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）：本研究は、口腔癌におけるカルシウム・ミトコンドリアが関与する薬剤耐性機構を解明することである。細胞死誘発カルシウムシグナルを特異的に増強させ、効果的なシスプラチンによる抗腫瘍効果を得るために、細胞外カルシウム除去剤：EGTA、細胞内カルシウム除去剤：BAPTA-AM、ミトコンドリアカルシウムユニporter阻害剤：Ru360を使用した。その結果、シスプラチンにEGTAを併用することで、シスプラチン耐性口腔癌細胞株に対する細胞増殖の抑制、細胞死を認めた。またシスプラチンを曝露させると、耐性株ではミトコンドリア内のカルシウムが減少し、その一方で感受性株ではカルシウムの蓄積を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他癌腫において、カルシウム拮抗薬であるニフェジピンは抗癌剤の組織運搬能を増強させ、ベラパミルは腫瘍の脈管構造を変化させることで放射線感受性を増強させると報告されている。本研究で得られた、口腔癌細胞株におけるカルシウム動態の変化が治療抵抗性に影響を与えているならば、既存するカルシウム拮抗薬をドラッグリポジショニングとして使用することで、より治療効果を高める可能性が示唆された。また口腔癌の中でも放射線や化学療法に抵抗性のある稀少癌：唾液腺癌や、他の領域の癌に対する研究の基盤や治療法の発見にもつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the drug resistance mechanism involving calcium-mitochondria in oral cancer. To specifically enhance cell death-induced calcium signaling and to obtain an effective antitumor effect of cisplatin, we used an extracellular calcium scavenger: EGTA, an intracellular calcium scavenger: BAPTA-AM, and a mitochondrial calcium uniporter inhibitor: Ru360. The results showed that the combination of cisplatin and EGTA inhibited cell proliferation and cell death against cisplatin-resistant oral cancer cell lines. Exposure to cisplatin also decreased mitochondrial calcium in the resistant strain, while calcium accumulation was observed in the sensitive strain.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 シスプラチン耐性 ミトコンドリア カルシウム オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全頭頸部癌の約 40%を占める癌であり、免疫療法も含めた集学的治療が確立している。切除可能な進行口腔癌に対しては、外科療法が第一選択となっているが、QOL に及ぼす影響を考慮すると、臓器・機能温存治療が社会的にも求められてくる。申請者はこれまでに、microRNA の発現調整に必須である Dicer や特定の microRNA 自身が、5-FU 系抗癌剤併用の化学放射線療法への抵抗性に関与しており、それらが予後不良因子であることを明らかにしたが(Kawahara K, et al: *J Oral Pathol Med.* 2013)、口腔癌治療のキードラッグであるシスプラチンについては、抗癌剤耐性機構などの治療抵抗性に関する問題が、依然重要な課題となっている。

近年、癌の代謝経路におけるミトコンドリアネットワークの異常が注目されており、中でもカルシウム(Ca^{2+})の相互作用が抗腫瘍効果に影響を及ぼすことが報告されている。ミトコンドリアの形態異常が細胞死誘発に深く関与しており、癌はもとより神経変性疾患、循環器疾患、糖尿病などさまざまな疾患に関与することが明らかになりつつあることから、基礎ならびに臨床応用の両面から注目を集めている。このミトコンドリアの形態異常推進因子の 1 つに Ca^{2+} がある。 Ca^{2+} は生体内において、細胞の活性化や増殖、細胞死、細胞分裂促進、受精など多くの機能を調節する重要なメッセンジャーである。細胞内 Ca^{2+} の異常は、アルツハイマーや癌、心疾患、糖尿病など、いわゆる社会的に問題になっている生活習慣病とも密接に関係している。この Ca^{2+} が癌治療の新しい標的として見直されてきている。その理由として、 Ca^{2+} シグナル伝達の異常や、それ自身の減少がさまざまな癌で認められ、細胞増殖や血管新生、抗癌剤耐性、細胞死の回避ならびに、細胞生存に関係することが分かってきたからである。複数の癌腫において、ミトコンドリア内 Ca^{2+} の過負荷および欠失がシスプラチンへの耐性を示す報告がある。このような状況を踏まえて、口腔癌においても Ca^{2+} がシスプラチンによる細胞死で重要な役割を果たしているのであれば、細胞死誘発 Ca^{2+} シグナルを特異的に増強することで、効果的なシスプラチンによる抗腫瘍効果を増強できるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、シスプラチンに治療抵抗性のある口腔癌に対して、シスプラチンの抗腫瘍効果における Ca^{2+} ・ミトコンドリアの役割を解明することである。大変興味深いことに、 Ca^{2+} 拮抗薬であるニフェジピンは、癌において抗癌剤の組織運搬能を向上させ(Thews O, et al: *Br J Cancer.* 2000)、ペラパミルにおいては、腫瘍の脈管構造を変化させることで、癌に対する放射線感受性を増強させると報告されており(Wood P.J, et al: *Int J Radiat Biol.* 1989)、これらの結果は、 Ca^{2+} の動態が治療に何らかの影響を与えていることを示唆している。口腔癌の薬剤耐性機構を、 Ca^{2+} を介したミトコンドリア膜電位の変化や形態異常の観点から捉えようとする本研究は、独自性に富んだものであり、口腔癌の中でさらに稀少癌とよばれる唾液腺癌や、他の領域の癌に対する研究の基盤や治療法の発見にもつながると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、治療抵抗性の口腔癌に対して、 Ca^{2+} ・ミトコンドリアネットワークの観点からシスプラチン耐性機構を解明するとともに、細胞死誘発 Ca^{2+} シグナルを特異的に増強させ、効果的なシスプラチンによる癌治療法の創出を目指す。次の 4 つの研究により成り立っている。

ヒト口腔癌細胞株における Ca^{2+} の関与

シスプラチン耐性と Ca^{2+} の関連性について調べるために、シスプラチンに治療抵抗性のあるヒト口腔癌細胞株:HOC-313 および TSU を用いる。これらの細胞に対してシスプラチン投与下に、細胞外 Ca^{2+} 除去剤:EGTA、細胞内 Ca^{2+} 除去剤:BAPTA-AM、ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポーター阻害剤:ruthenium360、一過性受容器電位チャネル阻害剤:AMG9810, capsazepine、 Ca^{2+} 拮抗薬:Verapamil, Nifedipine, Diltiazem, Mibefradil で処理し、細胞増殖や細胞死を測定することで Ca^{2+} の関与を確認する。

Ca^{2+} とミトコンドリア動態の関連性の検討

の結果をもとに、シスプラチンと各種薬剤投与後、細胞質 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) およびミトコンドリア Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{mit}$) 反応性蛍光プローブを用いて、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ と $[Ca^{2+}]_{mit}$ の変化を測定する。またその際に引き起こされるミトコンドリアの形態異常(断片化、膨潤、凝集など)を確認する。さらにミトコンドリアの形態異常による細胞死がアポトーシス由来かどうか、カスパーゼ阻害剤:Z-VAD-FMK を用いて抑制されるかどうかを検討する(図 3)。

抗癌剤耐性を減弱させる薬剤の検索および新たな治療戦略の開発

と併行して、研究協力者らと共に、プラズマ照射液を用いて、ヒト口腔癌細胞株のミトコンドリア内 Ca^{2+} の変化や形態異常を調べる。またシスプラチンにプラズマ照射液を上乗せした効果をj確認する。

PDX モデルを使用した患者由来癌に対する抗腫瘍効果の検討

申請者らの教室では、研究協力者である当大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター：岡田誠治教授らと共に、口腔癌の PDX モデルを積極的に作成している。 -)の研究計画で明らかとなったものを、PDX モデルを活用して抗腫瘍効果を検討し、新たな治療法の創出や臨床への応用につなげる。

4. 研究成果

使用した口腔癌細胞株

複数の口腔扁平上皮癌細胞株にシスプラチンを曝露させた後に、IC:50 をもとにシスプラチン感受性株：SAS、HSC-3 とシスプラチン耐性株：HOC-313、TSU の計 4 株を実験に使用した。

シスプラチン耐性株におけるカルシウム阻害剤併用実験

予備実験において、感受性株および、耐性株にさまざまな濃度のシスプラチンを曝露させたときの細胞内カルシウム濃度を測定した。試薬は細胞内のカルシウム染色剤である Fluo-4 AM を用いて測定している。その結果、図 1 のように濃度依存的に細胞内のカルシウム濃度の上昇を認めため、口腔癌細胞株ではシスプラチン投与によるカルシウムの何らかの影響が示唆された。そこで、代表的なカルシウム阻害剤である細胞外カルシウム除去剤：EGTA、細胞内カルシウム除去剤：BAPTA-AM、ミトコンドリア Ca²⁺ ユニporter 阻害剤：ruthenium360 の 3 剤を使用して、そのシスプラチンとの併用効果を確認した。まずは耐性株におけるシスプラチンの増強効果を確認するために、HOC-313 のみを使用して実験を行った結果、図 2 のように細胞外カルシウム除去剤である EGTA との併用が耐性株におけるシスプラチンの効果を高める結果となった。

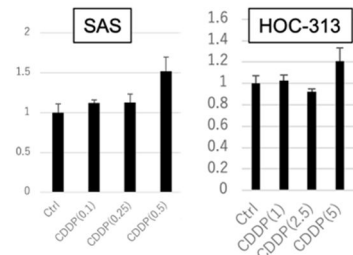


図1 シスプラチン曝露時の細胞内カルシウム濃度

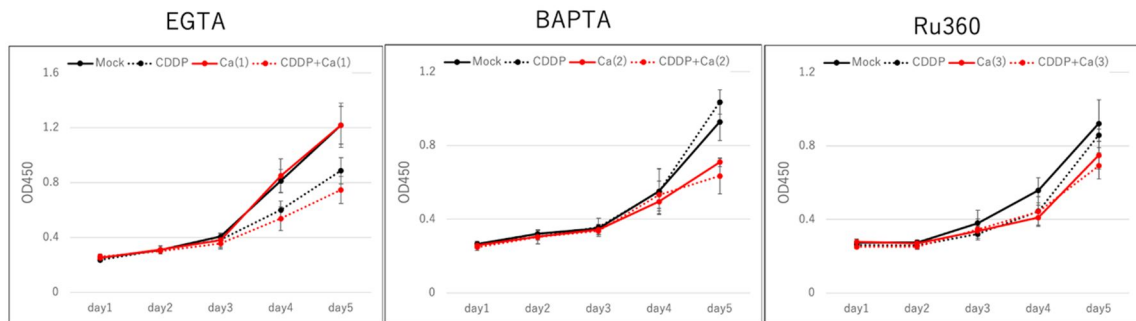


図2 シスプラチンとカルシウム阻害剤の併用による増殖曲線

シスプラチンが及ぼすカルシウム動態への影響

蛍光顕微鏡を用いて、シスプラチン投与時の感受性株と耐性株におけるカルシウム動態を確認した。試薬は Fluo-4 AM、ミトコンドリア染色：Mitotracker、ミトコンドリア内のカルシウム染色剤：Rhod-2AM を使用した。その結果、図 3,4 に示すように感受性株および耐性株において、定常状態では両者とも細胞内のカルシウムの蓄積を認め、それはミトコンドリアと一致していた。しかしながらシスプラチンを曝露させると、耐性株ではミトコンドリアの膜電位の低下を認め(傾向強度の低下)、ミトコンドリア内のカルシウムが感受性株と比較して少ない傾向を認めた(図 5)。

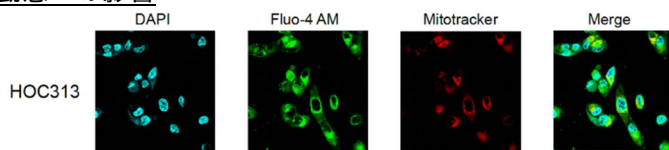
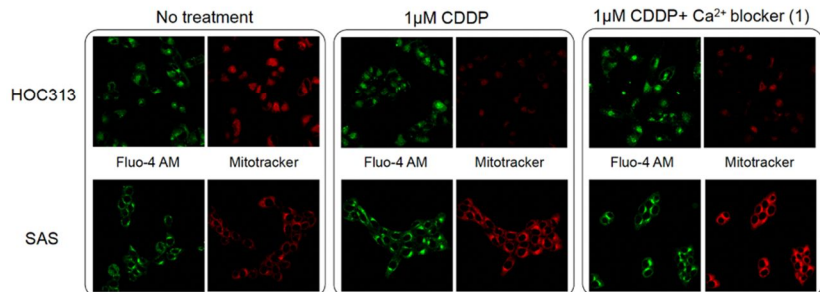


図3 細胞内カルシウム染色

Fluo-4 AM accumulates in cytoplasm and corresponds to mitochondria



CDDP reduced the mitochondrial level in CDDP-resistant OSCCs but not in CDDP-sensitive OSCCs

図4 細胞内カルシウムとミトコンドリア

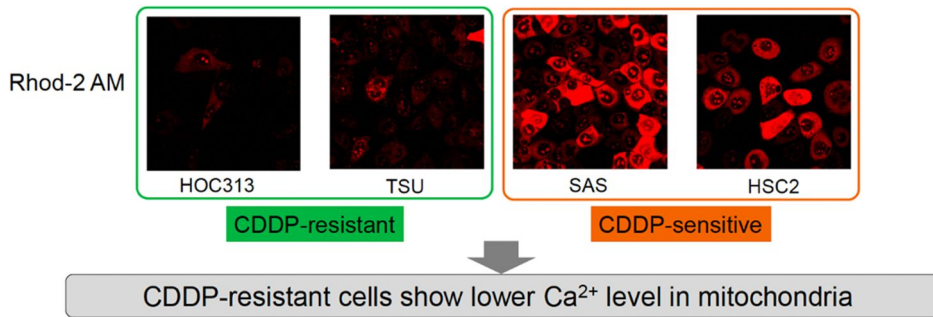


図5 ミトコンドリア内のカルシウム染色

これらの結果より、口腔癌におけるシスプラチン耐性機構には、ミトコンドリアの膜電位の変化やミトコンドリア内へのカルシウムの蓄積の違いが関係している可能性が示唆された。

ミトコンドリアへのカルシウムの取り込み経路

ミトコンドリア内へのカルシウムの移動にはミトコンドリアの膜電位が関係している可能性があるため、JC-1 染色キットを使用してシスプラチン曝露時の膜電位を測定した。その結果、耐性株においてはシスプラチン曝露 24 時間後には過分極の傾向に、感受性株では脱分極を認める傾向となった（図 6）。今回は晩期の反応をみる形となったが、カルシウムの挙動は早期の反応も重要との報告もあるため、今後はシスプラチン曝露後の早期の膜電位についても検討する必要がある。

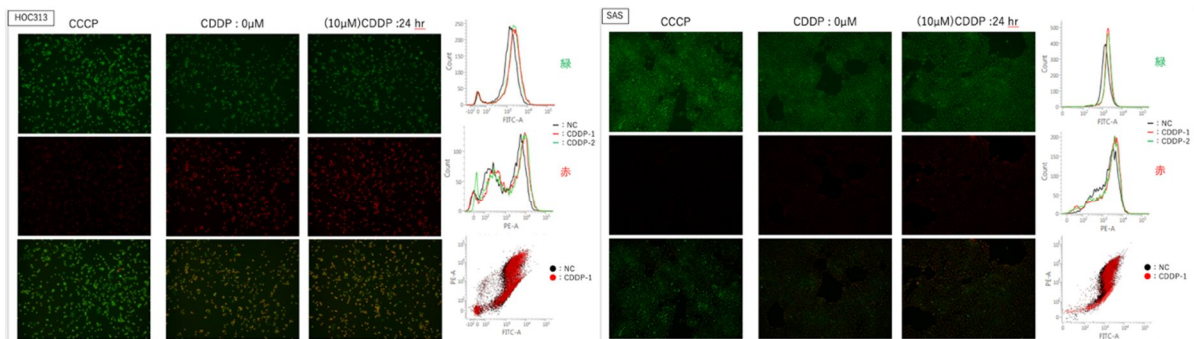


図6 ミトコンドリアの膜電位の測定

→②～④の結果より、口腔癌細胞株におけるシスプラチンの耐性機構には、シスプラチン曝露時のカルシウムの局在やミトコンドリアの膜電位、ミトコンドリアへのカルシウムの流入経路などが関係している可能性が示唆された。今後はどの経路を利用してカルシウムを細胞内やミトコンドリア内へ移動させるのか、またそれらの経路を阻害した場合のシスプラチンの効果などを検討していく。シスプラチンによる細胞死が、アポトーシスメインなのか、それ以外の経路なのかについても検討していく必要がある。

新たな治療戦略の開発

最後に共同研究者らが使用しているプラズマ照射液は、難治性癌である悪性黒色腫や骨肉腫、線維肉腫、神経芽細胞腫に対して腫瘍選択的な細胞死誘発剤であることを報告しており、この難治性癌を細胞死に向かわせたという事実は、治療抵抗性の口腔癌にも応用できる可能性を秘めている。そこで口腔癌細胞株の実験では、プラズマ照射液が細胞死を引き起こしたという結果を得ていたため、マウスを用いた実験を行った。条件設定等の問題のせい、体重減少などの副作用は認めなかったが、*vivo* では明らかな抗腫瘍効果を得ることができなかった。今後はプラズマ照射液の濃度や投与量の調整、シスプラチンとの併用、その際の細胞内やミトコンドリア内のカルシウムの挙動等にも注目していく。

PDX モデルの作成

最終的には PDX モデルを使用した *vivo* の実験へ持って行く予定である。

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 Suzuki-Karasaki Manami, Ando Takashi, Ochiai Yushi, Kawahara Kenta, Suzuki-Karasaki Miki, Nakayama Hideki, Suzuki-Karasaki Yoshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Air Plasma-Activated Medium Evokes a Death-Associated Perinuclear Mitochondrial Clustering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031124	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 Kawaguchi S, Kawahara K, Fujiwara Y, Ohnishi K, Pan C, Yano H, Hirose A, Nagata M, Hirayama M, Sakata J, Nakashima H, Arita H, Yamana K, Gohara S, Nagao Y, Maeshiro M, Iwamoto A, Hirayama M, Yoshida R, Komohara Y, Nakayama Hi	4. 巻 -
2. 論文標題 Naringenin potentiates anti-tumor immunity against oral cancer by inducing lymph node CD169-positive macrophage activation and cytotoxic T cell infiltration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03149-w	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 Kawahara Kenta, Nagata Masashi, Yoshida Ryoji, Hirose Akiyuki, Tanaka Takuya, Matsuoka Yuichiro, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Sakata Junki, Yamana Keisuke, Kawaguchi Sho, Gohara Shunsuke, Nagao Yuka, Hirayama Masatoshi, Takahashi Nozomu, Hirayama Mayumi, Nakayama Hideki	4. 巻 28
2. 論文標題 miR-30a attenuates drug sensitivity to 5-FU by modulating cell proliferation possibly by downregulating cyclin E2 in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101114 ~ 101114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101114	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 川口 翔	
2. 発表標題 CD169の高発現は口腔扁平上皮癌において抗腫瘍免疫を活性化させる	
3. 学会等名 第66回 日本口腔外科学会総会・学術大会	
4. 発表年 2021年	

1. 発表者名 平山 真弓
2. 発表標題 Mitochondrial calcium regulation contributes to CDDP resistance in oral cancer
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
---------	---------