

令和 7 年 5 月 23 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K10077

研究課題名（和文）PXDNによるがん代謝と微小環境を標的とした口腔癌の治療ストラテジー

研究課題名（英文）Therapeutic strategies for oral cancer by targeting cancer metabolism and microenvironment with PXDN

研究代表者

栗原 都（Kurihara, Miyako）

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40453170

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）：がん細胞と間質細胞との相互作用により形成される腫瘍微小環境は、がん細胞の増殖・浸潤・転移や治療抵抗性に深く関与することが知られている。申請者らはPXDNが口腔癌のエネルギー代謝や口腔癌局所における微小環境の形成に寄与する可能性があることを見いだしているが、PXDNに関連するシグナルや分子の異常については不明な点が多いため、本研究を行った。その結果、PXDNはmムチンであるMUC20や扁平上皮への分化を司るSPRR1B、転写因子であるEGR-1をはじめとした幾つかの新規分子を制御することで、口腔癌の浸潤や転移、微小環境形成に寄与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は難治性の希少がんであり、術後の重大な審美・機能障害も大きな問題である。本研究成果により、PXDN関連シグナルを標的とした新たな口腔癌分子診断・治療システムの開発、社会実装に直結する可能性が期待される。また、これらの分子のうちMUC20とSPRR1Bは分泌タンパクであることも示され、腫瘍マーカーとしての臨床応用も期待される。これらの分子は唾液中にも分泌される可能性があることを見いだしており、唾液を用いた簡便かつ低侵襲な口腔癌診断システムとしての有用性も期待される。今後も臨床現場への還元を目指すべく、さらなる研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：The tumor microenvironment formed by the interaction between cancer cells and stromal cells is known to be deeply involved in the proliferation, invasion, metastasis, and treatment resistance of cancer cells. We have found that PXDN may contribute to the energy metabolism of oral cancer and the formation of the local microenvironment in oral cancer. However, there are many unknowns about the abnormality of signals and molecules related to PXDN, so we conducted this study. As a result, it was revealed that PXDN contributes to the invasion, metastasis, and formation of the microenvironment of oral cancer by controlling several novel molecules, including MUC20, an m-mucin, SPRR1B, which controls differentiation into squamous epithelium, and EGR-1, a transcription factor.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 PXDN シグナル伝達

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞と間質細胞との相互作用により形成される微小環境が、がん細胞の増殖・浸潤・転移や治療抵抗性にも深く関与することが明らかとなっている。がん微小環境選択的な分子標的療法の開発が重要ながん治療戦略となることが期待される。がん細胞は主に解糖系でエネルギーを産生することが知られているが (Warburg 効果)、その際に PXDN が口腔癌局所の乳酸と ATP の産生亢進と ROS の産生抑制を促すと同時に、HO-1 との相互作用により口腔癌が浸潤しやすい微小環境を形成することで予後不良を促進させることを報告している。

PXDN は Warburg 効果に関与しているが、がんにとって Warburg 効果は促進的なのか抑制的なのかについては議論の余地が多い。近年では、間質の線維芽細胞が好気性解糖を行い、その代謝物をがん細胞に渡すことでエネルギー産生に利用されるという逆 Warburg 効果の概念も提唱されている。また、口腔癌において PXDN は ROS の産生を抑制するが、ROS の機能はがんにとって諸刃の刃であり、濃度によってその役割が大きく変わる。さらに PXDN と微小環境の形成やがん代謝に関する機構は今も不明な点が多い。口腔癌における PXDN のさらなる機能、特にがん代謝と微小環境の関係を解明することで臨床応用の可能性を探るべく、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では口腔癌における PXDN とその関連シグナルの機能を明らかにし、口腔癌の新たな診断・治療標的としての有用性を模索することを目的とする。PXDN とその関連シグナルの詳細を明らかにすることで、特にがんの微小環境とがん代謝の新たな関係性が示されることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### in vitro での PXDN ならびに関連シグナルの機能解析

**【RNA-Seq 解析】:** PXDN の機能を明らかにするために関連シグナルの同定は不可欠である。PXDN の発現が確認されている 5 種類の口腔癌細胞株を用い、siRNA による PXDN ノックダウン処理群とコントロール群で発現変化される遺伝子群を RNA シークエンシングにより網羅的に抽出する。これにより代表的な 10 個程度の PXDN 関連シグナルの候補を絞り込む。

**【PXDN 関連シグナルの機能解析】:** 上記の PXDN 関連シグナルの候補を過剰発現ないし発現抑制した口腔癌細胞株を作製し、増殖/浸潤/遊走能、アポトーシス誘導能・薬剤耐性能等への影響、発現調節機構等を調べる。これらを通して PXDN 関連シグナルの詳細な機能を解明する。

また申請者らは PXDN が口腔癌の微小環境の形成や腫瘍免疫に関与することを見いだしている。網羅的発現解析の結果をもとに、口腔癌細胞株と間質系細胞の共培養の系を用いた PXDN ならびに関連シグナルの血管・リンパ管新生能、線維芽細胞への影響を検討する。さらに FACS により PXDN が免疫細胞へ及ぼす役割もあわせて解析する。

#### 臨床検体による発現解析

**【パラフィン切片からの免疫組織化学・リアルタイム RT-PCR】:** 口腔癌以外における PXDN の発現レベルは不明であるため、市販の組織アレイを用いた免疫組織化学を行う。なお PXDN を認識する抗体は既に作製済みである。PXDN 関連シグナルの口腔癌における臨床病理学的な意義を明らかにするため、パラフィン切片から抗体を用いた免疫組織化学を行う。市販抗体が入手できない場合、別途抗体作製を依頼する。またパラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにより分離したがん細胞や間質細胞から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行う。またパラフィン切片からレーザーマイクロダイセクションにより分離したがん細胞や間質細胞から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) PXDN に関連した新たな分子

新たな PXDN 関連分子として MUC20、SPRR1B、EGR-1 を同定した。がんにおける各分子の機能は不明な点が多いため、分子ごとに詳細な検討を行った。

#### (2) MUC20 と SPRR1B

MUC20 はムチンの産生に関与する分子であり、消化器領域や婦人科領域のがんにおいて腫瘍促進性に働くことが報告されている。一方、SPRR1B では扁平上皮への分化を司るマスター分子のひとつであることが示されている。我々の検討では MUC20 と SPRR1B のいずれも TANGO により発現調節されることが明らかとなった。

MUC20 の発現を上昇、抑制させた口腔癌細胞株にそれぞれ TANGO の抗体処理、リコンビナントタンパク添加を併用すると MUC20 の発現レベルは低下ないし回復し、TANGO により

MUC20 が活性化されることを意味する。MUC20 を遺伝子導入した細胞株では TANGO との相互作用により c-met のリン酸化が亢進することで増殖能が上昇し (図 1)、細胞接着に関わる E-cadherin の分泌低下と間質の破壊を促進する matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の分泌増加により浸潤能の促進にも寄与する (図 2)。

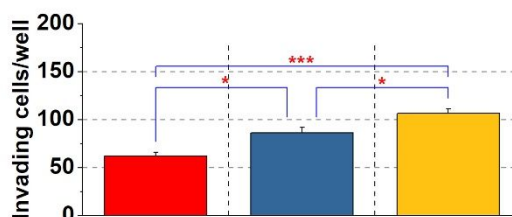
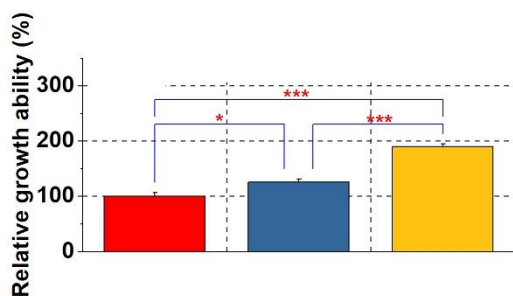
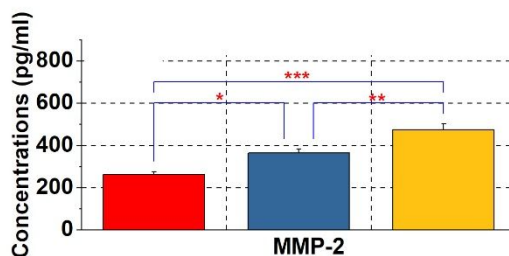
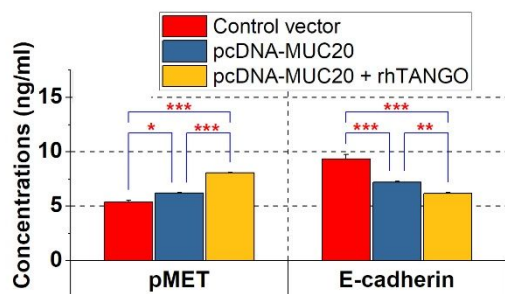


図 1

図 2

さらに、TANGO-MUC20 系は口腔癌細胞株からの vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) と VEGF-C の分泌レベルを上昇させ、血管/リンパ管内皮細胞の遊走能・増殖能・管腔形成能の獲得ならびに口腔癌細胞株と内皮細胞の接着性増強を誘導することも見いだした。口腔癌の凍結検体 30 例を用いてリアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) をおこなったところ、正常口腔粘膜と比して高いレベルでの MUC20 の発現が確認された。さらに、口腔癌症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 標本による免疫組織化学において MUC20 の陽性率は 30.1% (64/213) であり (図 3) その発現は臨床病期 (T グレード)、リンパ節転移、微小血管密度 (microvessel density; MVD)、微小リンパ管密度 (lymphovessel density; LVD) と有意に相関しており、MUC20 陽性症例は陰性症例よりも予後不良であった (図 4)。

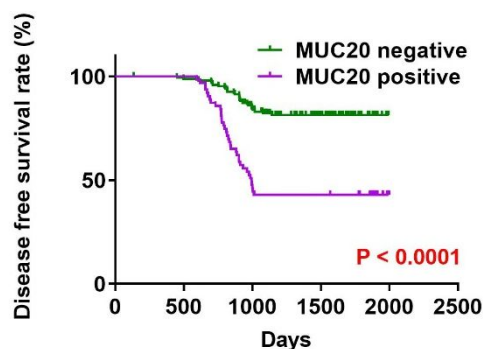
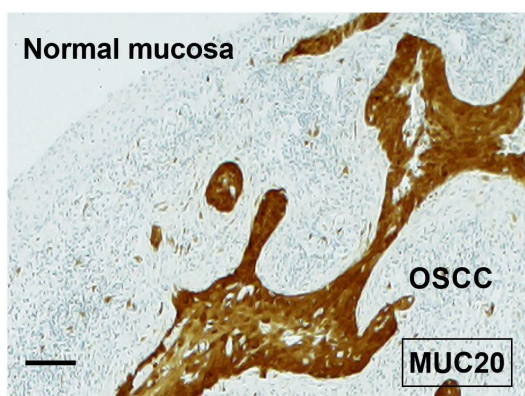


図 3

図 4

一方、SPRR1B 遺伝子を導入した口腔癌細胞株では、角化マーカーである involucrin や keratin 1 の発現や MAPK p38 のリン酸化を介した増殖能が増強し、これらの事象は TANGO のリコンビナント処理により増強された。免疫組織化学による SPRR1B の陽性率は 63.9% (136/213) であり、分化度が低い症例ほど陽性率は低かった。なお、MUC20 とは異なり、SPRR1B の発現は口腔癌の予後と有意な相関を認めなかった。

### (3)EGR-1

EGR-1 は転写因子の 1 つであり、がんの種類により腫瘍抑制性にも促進性にも作用することが知られている。口腔癌における EGR-1 の機能を調べたところ、TCGA データベースを持ちいたビッグデータ解析において、口腔癌を含む頭頸部扁平上皮癌では EGR-1 の発現が正常組織よりも有意に低いことが示された。EGR-1 の発現の高い口腔癌細胞株に EGR-1 ノックダウン処理

を行ったところ、コントロールの細胞株と比較して細胞増殖能、浸潤能（図 5） 遊走能が亢進し、細胞周期 G0/G1 期の細胞が減少した。また、細胞周期調節因子や MMP2/9、Vimentin の発現上昇も確認された。一方、EGR-1 の発現量が低い口腔癌細胞株に EGR-1 を強制発現させたところ、細胞増殖能、浸潤能、遊走能が有意に低下し、細胞周期 G0/G1 期の細胞が増加した。さらに上記関連分子の発現も有意に減少した。口腔癌患者の mRNA を用いたリアルタイム RT-PCR を行ったところ、健常者と比較して有意に EGR-1 の発現レベルが減少していた。さらに、口腔癌のパラフィン切片を用いた免疫組織化学では、ほぼすべての口腔癌症例において、正常部位と比較して腫瘍胞巣における EGR-1 の発現レベルが低下していた（図）。

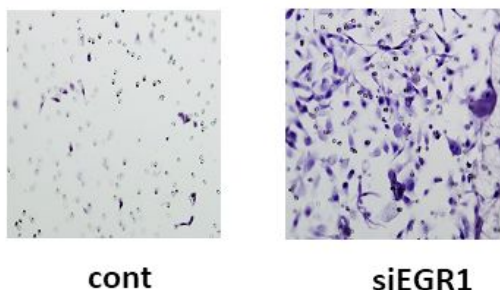


図 5

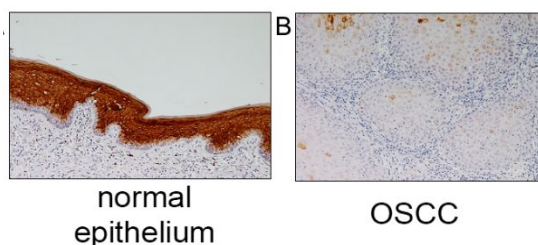


図 6

以上の結果より、新たに見いだした PXDN 関連分子は微小環境の形成だけではなく、それらの発現が上昇ないし抑制されることにより口腔癌の進展や予後、分化度等に関与することが明らかとなった。これらの分子を標的とした新規口腔癌診断・治療システムの開発が期待され、今後のさらなる研究が望まれる。

## 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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Shimomura H, Bosserhoff AK, Kirita T	4. 巻 147
2. 論文標題 Identification of oral squamous cell carcinoma markers MUC2 and SPRR1B downstream of TANGO	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1659-1672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-021-03568-9.	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 該当する
1. 著者名 Sasahira T, Kurihara-Shimomura M, Shimomura H, Kirita T	4. 巻 26
2. 論文標題 SERPINE2 is an oral cancer-promoting factor that induces angiogenesis and lymphangiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1831-1839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-01970-4.	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 該当する
1. 著者名 Nguyen Phuong Thao, Shimojukkoku Yudai, Kajiya Yuka, Oku Yasunobu, Tomishima Ayami, Shima Kaori, Sasahira Tomonori	4. 巻 19
2. 論文標題 Gene alterations in the nuclear transport receptor superfamily: A study of head and neck cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0300446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0300446	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 該当する
1. 著者名 Shimojukkoku Yudai, Nguyen Phuong Thao, Ishihata Kiyohide, Ishida Takayuki, Kajiya Yuka, Oku Yasunobu, Kawaguchi Koshiro, Tsuchiyama Takahiro, Saijo Hideto, Shima Kaori, Sasahira Tomonori	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of early growth response-1 as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Discover Oncology	6. 最初と最後の頁 714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12672-024-01611-y	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 直山俊介、Nguyen Thao、加治屋由佳、下拾石雄大、嶋 香織、笹平智則
2. 発表標題 Insight into nuclear transport receptor in head and neck cancers
3. 学会等名 第83回日本癌学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 下拾石雄大、Nguyen Phuong Thao、嶋 香織、石田喬之、笹平智則
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における癌抑制遺伝子としてのEGR - 1 の機能解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下拾石雄大、Phuong Thao Nguyen、嶋 香織、石田喬之、石畑清秀、笹平智則
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるearly growth response-1のがん抑制遺伝子としての役割
3. 学会等名 第69回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 下拾石雄大、Nguyen Phuong Thao、嶋 香織、石田喬之、土山貴弘、奥 康伸、川口晃史郎、西條英人 笹平智則
2. 発表標題 MCTP2は口腔扁平上皮癌の浸潤と遊走を促進する新規因子である
3. 学会等名 第43回日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2025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
研究 分担 者	笹平 智則  (Sasahira Tomonori)  (90405374)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授    (17701)	

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
---------	---------