

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1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：2010～2011

課題番号：22890146

研究課題名（和文）新規がん抑制因子 CYLD の多彩な機能と新たな口腔癌治療法の開発

研究課題名（英文）Roles of CYLD and development of novel therapies for oral cancers

研究代表者

神力 悟（SHINRIKI SATORU）

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00583048

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌（OSCC）における CYLD タンパク質の発現や役割を解析した。まず、OSCC 臨床組織において、周囲に浸潤している OSCC 細胞では CYLD 発現が減少していることがわかった。さらに統計学的に浸潤部で CYLD 発現が低い症例ほど予後が不良であった。OSCC 細胞の CYLD 発現を抑制したところ、浸潤・転移に重要な上皮間葉移行（EMT）に類似した現象が誘導された。また、これらの変化はトランスフォーミング増殖因子受容体 1（TGFBR1）の活性化を必要としていることが明らかとなった。一方、浸潤・転移とともに抗がん剤耐性は臨床で大きな問題であるが、CYLD 発現を抑制した OSCC 細胞には抗がん剤シスプラチンが効果を示さないということが判明した。しかし、興味深いことに上皮成長因子受容体（EGFR）に対する阻害剤に対しては逆に著しく感受性が増していた。以上から、CYLD 発現低下により OSCC 細胞は高度な悪性形質を獲得するが、そのような細胞において EGFR はアキレス腱となっていることが示唆される。今後の詳細な分子機構の解析は、OSCC や他の癌の病態解明、新たな病態診断・治療法の開発の発展に貢献すると考えられる。

**研究成果の概要（英文）**: We investigated expression of CYLD and its role in oral squamous cell carcinoma (OSCC). CYLD expression was significantly reduced at invasive lesions in OSCC tissues and correlated with poor prognosis. CYLD knockdown led to EMT-like changes in OSCC cell lines in the TGFBR1-dependent manner. Interestingly, CYLD repression led to resistance to cisplatin, but increased susceptibility to EGFR inhibitors-inducible apoptosis. Downregulation of CYLD may promote OSCC progression but EGFR may be an Achilles' heel of such aggressive cell populations. Further studies probably provide novel therapeutic strategies in OSCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の約 60%を占める疾患であり、その 90%以上を OSCC が占めている。近年、頭頸部癌の診断・治療法の選択肢は広がっているものの、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない。それに加え、寛快した患者でも、部位的特性から日常生活の根本に関わる口腔機能障害を後遺するのが現状である。以上より、OSCC をはじめとした頭頸部癌の、病態に基づいた非外科的治療法の開発が極めて重要である。これまで多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子候補があらゆるがんで同定されその重要性が示されてきているが、その先天性の活性化や不活化（変異や欠失など）がヒトの腫瘍発生を誘導するような遺伝子群は特に重要な役割を担っていると考えられる。このような考えから申請者がこれまで OSCC の病態解析を行ってきたところ、新規がん抑制遺伝子である CYLD の発現が OSCC 組織において著しく低下していることが明らかとなった。興味深いことに、CYLD の発現低下は臨床病期や生命予後の悪化に強く関連していることが判明した。

CYLD 遺伝子は、家族性円柱腫症 (Familial cylindromatosis) で唯一変異を有する原因遺伝子として同定された。これまで CYLD は脱ユビキチン化酵素として NF- $\kappa$ B 活性化の抑制をはじめ、JNK、p38、Wnt などのシグナル伝達を制御することが報告されてきており、腫瘍や炎症免疫反応をはじめとした幅広い病態に関与しているものと考えられている。腫瘍に関しては、多発性骨髄腫、肝細胞癌における CYLD の機能喪失型変異が報告されてきており、発見の経緯も含め、CYLD が機能しないことが腫瘍形成に重要ではないかと考えられているが、未だにその詳細は謎に包まれている。

申請者は多くのヒト OSCC 組織を用いて発現解析を行ったところ、OSCC 組織の中でも特に浸潤部において CYLD の発現は著しく低下しており、さらに CYLD の発現低下は臨床的な腫瘍の増大にも関連していることが明らかとなった。頭頸部癌の生命予後は、腫瘍の増大、浸潤・転移を抑制できるか否かによって極めて大きく左右される。申請者が得た上記の知見は、CYLD が OSCC の増大や浸潤に関連していることを強く示唆するもので

あり、事実 CYLD の発現低下は OSCC 患者の生命予後の悪化と関連していた。以上より、OSCC における CYLD の機能を解明することは、OSCC の病態を理解し治療する上で重要な知見をもとらすと考えられる。

そこで、本研究では、OSCC の病態解明および新たな診断・治療法の開発を目的として、OSCC の発生・進展における CYLD の機能解析を行う。本研究は、OSCC やそれ以外の癌の研究向上に寄与するだけでなく、幅広い病態への関与が示唆されている CYLD の機能や制御機構を解明することで、様々な疾患の治療に貢献するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

### (1) OSCC における CYLD 発現の臨床的意義の解明

OSCC は口腔粘膜上皮の癌化した状態であり、それは一般に上皮内癌 (CIS) を経て浸潤癌へと発展すると考えられている。そこで本研究では、まず CYLD の OSCC における実際の機能を明らかにする手がかりとして、臨床検体における CYLD の発現および変異状況をとらえる。本研究期間中に、正常口腔粘膜組織および OSCC (CIS、浸潤癌) の原発巣や転移巣、また類天疱瘡などの基底膜関連疾患における CYLD タンパク質・遺伝子発現状況および変異の有無を解析することで OSCC における CYLD の臨床的意義を検討する。

### (2) OSCC の発生・進展における CYLD の機能の解明

CYLD はその脱ユビキチン活性や CAP-Gly ドメインを介して、様々な細胞内シグナルや微小管を制御することが報告されてきているが、標的タンパク質や表現系は細胞のタイプや状況によって大きく異なり、またそれらの機能がどの程度病態形成に関与しているかは不明である。本研究では、OSCC において CYLD の発現低下の結果、どのような現象がどのような分子機序で誘導されるか、それが臨床的な知見にどのように関連するのかを検討する。

### (3) CYLD の発現制御機構の解明

近年の分子生物学的解析から、CYLD の多彩な機能が明らかとなってきたにも関わらず、CYLD 遺伝子・タンパク質の発現制御機構に関しては未だほとんどわかっていない。興味深いことに、OSCC において CYLD の発現は特に浸潤部で著しく低下していることから、特定の条件が CYLD の発現低下に関与していることが十分に考えられる。CYLD タンパク質の発現低下は OSCC の生命予後の悪化に関連しており、発現低下をもたらす生体条件や分子機構を明らかにすることは、OSCC の進展機序の解明につながると考えられる。

そこで本研究では、OSCC における CYLD 発現抑制機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) OSCC における CYLD の発現・変異とその臨床的意義の解析

#### ①OSCC における CYLD 発現量の解析

正常組織、OSCC (CIS、浸潤癌の原発巣、転移巣) での CYLD 発現様式を免疫組織化学染色、ウエスタンブロッティング法、リアルタイム PCR 法にて解析する。さらに、その結果と各種臨床情報との関連を統計学的に検討する。

#### ②OSCC における CYLD 変異の解析

家族性円柱腫症や多発性骨髄腫などにおいて各種変異の報告があるため OSCC においても変異の有無を解析する。まず数例の凍結 OSCC 組織から RNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法により全エクソンを解析する。変異を認められた際には、その変異様式や部位に応じてプライマー・プローブを作製し多検体で解析する。変異が認められた場合は、それがタンパク質の発現低下に関連しているかどうかを解析する。

(2) CYLD の発現変動・変異が OSCC の進展に及ぼす影響とその分子機構の解析

CYLD タンパク質量の低下が OSCC の進展に寄与していることが示唆されるため、臨床的な変異の有無に関係無く、CYLD の発現抑制によって起こる現象を *in vivo*、*in vitro* で解析する。

#### ① CYLD の発現抑制による解析 (*in vitro*)

siRNA による CYLD の一過性発現抑制を行う。マトリゲルインベーションチャンバーによる浸潤能の評価、wound healing assay による遊走能の評価、MTS assay による増殖能の評価、抗癌剤などの各種ストレス環境下でのアポトーシスの評価などを中心に行う。また、表現系の変化から重要と考えられる細胞内外関連因子の発現変化をタンパク質 (ウエスタンブロッティング法、免疫染色、ELISA 法など)・遺伝子 (リアルタイム PCR 法など) レベル両面で解析する。

一過性発現抑制系に並行して shRNA および GFP を組み込んだベクターを用いて CYLD 発現抑制株を作製する。このことで多くの項目において幅広い安定した解析が可能になると考える。また個別因子の解析と並行して、CYLD 発現抑制株およびコントロール株より抽出した RNA をもとに Affymetrix 社製 GeneChip (Gene 1.0 ST

Array) システムを用いて網羅的に遺伝子発現変化を解析する。これにより、予測のできない CYLD 関連分子変動の探索を試みる。

#### ② CYLD の発現抑制による解析 (*in vivo*)

SCID マウスに、樹立した CYLD 発現抑制株およびコントロール株を移植し、まず増殖能や転移能の差異を評価する。GFP 発現株であるため、蛍光検出システムにより簡便に転移の部位や程度を評価することが可能となる。続いて、組織学的解析を免疫組織化学染色などにより行う。

これらに並行して、*in vitro* で数種類の OSCC 細胞株 (SCC-NA, SCC-KN, HSC3, Ca9-22) および非悪性上皮細胞 (HaCaT 細胞) を用いて、CYLD の一過性発現抑制で同様の現象が得られるかどうか、すなわち幅広くプログラム化された現象であるかどうかを確認する。また、家族性円柱腫症患者由来の CYLD 変異体を導入することで機能発現に重要な CYLD の領域の決定をこころみる。

#### ③CYLD の発現回復による解析

CYLD 発現抑制株に、CYLD shRNA と拮抗しない CYLD 遺伝子を導入することで CYLD の発現を回復させ、上記の解析で得られた表現系が可逆的なものであるかどうかを検討する。

以上の機能解析で得られた結果が、臨床像を反映しているかどうかをヒト OSCC 検体 (組織、血液など) や *in vivo* 実験 (野生型、CYLD 欠損マウス) で確認する。

(3) CYLD の発現低下誘導メカニズムに関する検討

癌の進展に関わる環境条件や各種因子の CYLD の発現に与える影響を解析する。CYLD の発現抑制条件の解明は、その後の現実的な診断・治療法の開発に貢献すると考えられる。

①現時点で申請者は、低酸素刺激により、SAS 細胞の CYLD mRNA の発現が劇的に抑制されることを見出している。固形癌組織は恒常的に低酸素状態にあり、腫瘍の成長には低酸素から逃れる細胞生存や血管新生の促進などが必要不可欠である。低酸素による CYLD 発現抑制がこれらの現象に寄与しているかを *in vivo*、*in vitro* 両面で解析する。*In vivo* では、CYLD 抑制株やその培養上清をマウス皮下に移植し、血管新生程度 (CD31 染色、ヘモグロビン量の測定など) を評価する。*In vitro* では、特殊なインキュベータを用い低酸素環境下で OSCC 細胞の生存や血管内皮細胞の動態などと CYLD との関連を解析する。

②各種癌進展に関わる因子による CYLD 発現

変化を検討する。TGFβ などの EMT 誘導因子や各種炎症性サイトカインによる発現変化をリアルタイム PCR 法にて解析する。

以上掲げた全ての検討により、CYLD の発現や機能に密接に携わる分子群を見つけ出し、新たな OSCC の診断マーカー、治療戦略の開発を目指す。

#### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌 (OSCC) の臨床組織を用いた免疫組織化学的検討により、正常上皮や上皮内癌とは対照的に、浸潤癌の浸潤部において CYLD タンパク質の発現が著しく低下しており、それは臨床的に、腫瘍サイズの増大、血管新生の亢進、病期の進行、全生存率の低下と有意に関連していた。そこで、5種類の OSCC 細胞株と非悪性 HaCaT 上皮細胞の CYLD 発現を抑制したところ、全ての細胞株において間葉系質の獲得と運動能の亢進 (EMT 様変化) が認められた。これらの変化は、TGFβ 受容体 1 (TGFBR1) の活性に依存していることが判明したが、TGFβ リガンドには依存していないという知見が得られた。また、TGFBR1 の下流で古典的シグナル伝達経路を担う Smad2、Smad3 の発現を抑制したが、上記 EMT 様変化は阻害されなかった。さらなる検討の結果、通常 TGFβ 刺激で活性化される TAK1 の活性を阻害することで、EMT 様変化は完全に遮断された。以上から、CYLD 発現低下により誘導される EMT 様変化には過去にほとんど報告のないリガンド非依存的な TGFBR1 活性化とそれに続く TAK1 の活性化が少なくとも関連していると考えられた。

一方、上記の EMT 様変化に伴い、CYLD 発現低下は、抗がん剤シスプラチンに対する強い抵抗性を誘導することが明らかとなった。このような治療抵抗性で転移能が高いと考えられる CYLD 低下細胞に対する有効な標的治療を開発するため各種検討を行ったところ、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は、むしろ CYLD 発現抑制細胞に高度にアポトーシスを誘導することが判った。この結果は、上記のように高度な悪性形質を獲得した CYLD 発現低下 OSCC 細胞において EGFR はアキレス腱となっていることを示唆している。現在、欧米では本邦に先立って EGFR 標的治療が OSCC 患者に応用されて有効性が確認されているが、患者選択の手段がないこと、効果が十分とはいえないということ、が問題となっている。

今後のさらなる詳細な分子機構の解析は、OSCC や他の癌の病態解明、新たな病態診断・治療法の開発の発展に貢献すると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

①神力悟、厚山恵理、郭建莹、中村拓哉. Cylincromatosis (CYLD) の発現低下はヒト口腔扁平上皮癌の上皮間葉転換を誘導する。第 70 回日本癌学会学術総会、2011.10.3、国際会議場 (名古屋)

②神力悟、城野博史、大林光念、津田幸元、村上慶高、田崎雅義、安東由喜雄. 口腔扁平上皮癌の進展における Cylindromatosis (CYLD) 発現低下の意義についての探究. 第 51 回日本臨床化学会年次学術集会、2011.8.26、札幌医科大学 (北海道)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

神力 悟 (SHINRIKI SATORU)  
熊本大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：00583048

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：