

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17017

研究課題名（和文）口腔癌の腫瘍実質-間質連関におけるTRPシグナル活性化メカニズム解明と臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of TRP signal activation mechanism in tumor-stromal sequence in oral tumor and its clinical application

研究代表者

田尻 祐大 (Tajiri, Yudai)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：30820659

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)において、TRPV4シグナルが細胞外環境により異常活性化するメカニズムの解明を目的とした。構築したYAPシグナルを活性化する実験系にて、TRPV4シグナルはYAPシグナルによる発現制御をうけていなかった。一方、OSCC病理標本における遺伝子発現について、DNAマイクロアレイ法を用いて網羅的に検討した。その結果、発癌過程において、p63の発現が上昇し、浸潤癌においてMAPKが活性化することが示唆された。また、OSCC細胞株を用いた研究から新規癌遺伝子ARL4Cの発現はp63とMEK/ERK-MAPKにより協調的に発現制御されていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍では遺伝子異常が生じるため、細胞が自律的に増殖する。本邦では、病変組織を用いて遺伝子異常を明らかにすることで、患者一人一人に適した治療法を提供できるがんゲノム医療の普及が進められている。一方、口腔癌の90%以上を占めるOSCCにおける特異的な遺伝子異常が少ないため、異常活性化した細胞内シグナルが発癌に寄与すると予想される。本研究では、OSCC病理標本(非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌を含む)における遺伝子発現について、網羅的に検討した。本研究結果によってOSCCの発癌過程において活性化するシグナルが明らかとなった。この学術意義は高く、治療への応用の足掛かりとなる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the underlying mechanism which can regulate TRPV4 signals abnormally activated by the extracellular environment in oral squamous cell carcinoma (OSCC). In our established experimental setting to activate YAP signaling, it was not confirmed that TRPV4 signal expression was regulated by YAP signaling. On the other hand, gene expression in OSCC pathological specimens was comprehensively investigated using DNA microarray method. The results suggested that p63 expression increases during the carcinogenesis process, and MAPK is activated in the invasive carcinoma lesion. Furthermore, together with the research using OSCC cell lines, it is suggested that a novel oncogene ARL4C is cooperatively regulated by p63 and MEK/ERK-MAPK in OSCCs.

研究分野：口腔病理学

キーワード：腫瘍実質-間質連関

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍では、遺伝子異常（遺伝子変異または遺伝子増幅等）が生じるため、細胞が自律的に無秩序に増殖している。本邦では、病変組織を用いて遺伝子異常を明らかにすることで、患者一人一人に適した治療法を提供できる、がんゲノム医療の普及が進められている。一方、口腔癌の90%以上を占める口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma: OSCC）における特異的な遺伝子異常が少ないため（Nature. 7536, 576, 2015.）、異常活性化した細胞内シグナルが発癌に寄与すると予想される。

癌は腫瘍細胞からなる実質と、その周囲の間質から構成される。OSCCが進展すると、細胞外基質（extracellular matrix: ECM）の硬さが変化し硬結（stiffness）として触知するため、OSCCを診断する際の重要な臨床所見として知られている。ECMの硬さが腫瘍形成に与える影響は不明であったため、申請者らは独自の実験系を構築し、細胞外の環境変化がOSCC細胞株の増殖能に影響を与えることを見出した（Lab Invest. 100, 311, 2020.; J Pathol. 253, 80, 2021.）。この結果に基づき、申請者らは、腫瘍実質と間質が相互作用「腫瘍実質-間質連関」しながら腫瘍形成が促進すると仮説を立て、その連関について明らかにしてきた。具体的には、機械受容器と報告されたCa²⁺イオンチャネルのTransient Receptor Potential Vanilloid 4（TRPV4）がECMの硬さを感知し、CaMKII-AKTの活性化を介してOSCC細胞株の増殖を促進することを見出した（Lab Invest. 100, 311, 2020.）。しかし、未だにこのTRPV4の発現制御機構は不明である。さらに、OSCCの発癌過程における網羅的な遺伝子発現変動、および活性化するシグナル伝達については不明である。

2. 研究目的

本研究では、

- 1) OSCCにおいてTRPV4が細胞外環境により発現制御されるメカニズムの解明
- 2) OSCCの発癌過程（非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌）における網羅的な遺伝子発現変化とそれに伴って活性化するシグナル伝達の解明を目的とした。

3. 研究方法

- 1) 申請者らが独自に構築したOSCC細胞株を用いたYAPシグナルを活性化する実験系（浮遊培養系およびYAP活性化型を用いた機能獲得型実験系）を用いて、TRPV4発現制御について検討した。
- 2) OSCC病理標本（同一標本内に非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌領域を含む）からmRNAを抽出し、これらの領域における遺伝子発現について、DNAマイクロアレイ法を用いて網羅的に検討した。また、これらの遺伝子情報をもとにGene Ontology解析を行なった。

4. 研究成果

- 1) 用いたOSCC細胞株においてTRPV4の発現は、LATS/YAP/TAZによる発現制御は認められなかった。
- 2) OSCC病理標本（同一標本内に非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌領域を含む）における遺伝子発現について、DNAマイクロアレイ法を用いて網羅的に検討したところ、非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌において段階的に発現が上昇する遺伝子を 73

個、非腫瘍部と比較して上皮性異形成/上皮内癌および浸潤癌において発現が上昇する遺伝子を 295 個、非腫瘍部、上皮性異形成/上皮内癌、浸潤癌において段階的に発現が減少する遺伝子を 100 個、非腫瘍部と比較して上皮性異形成/上皮内癌および浸潤癌において発現が減少する遺伝子を 476 個単離した (図 1)。

また、それぞれの遺伝子を用いて Gene Ontology 解析を行なった。その結果、上皮性異形成/上皮内癌において発現が上昇する遺伝子として p63 が含まれており、また、上皮性異形成/上皮内癌において MAPK が活性化していることが示唆された (図 2)。

3) 83 症例の OSCC 標本を用いて免疫組織化学染色または蛍光抗体法を用いて検討したところ、p63 は上皮性異形成/上皮内癌において非腫瘍部と比較して発現上昇しており、また、浸潤癌部において ERK のリン酸化および新規癌遺伝子 ARL4C の発現が亢進していた。

OSCC 細胞株を用いた検討から、ARL4C の発現は p63 と MEK/ERK-MAPK により協調的に発現制御されていることを見出した (図 3)。加えて、これらの geneset から MdigDB Hallmark 解析、および ENCODE TF ChIP-seq 解析を行い、OSCC の発癌過程において特異的に活性化しているシグナル伝達、および特異的に機能していると考えられる転写因子を同定した。

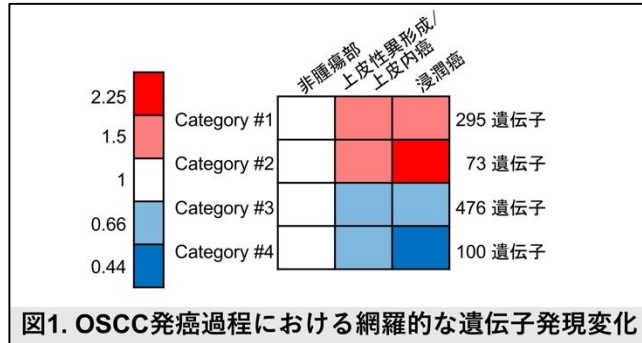


図1. OSCC発癌過程における網羅的な遺伝子発現変化

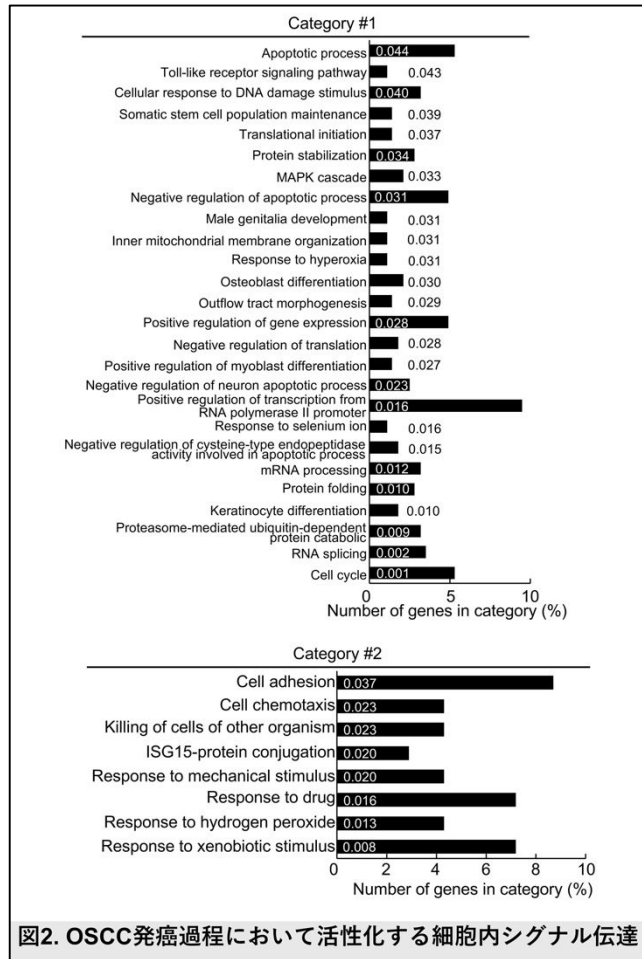


図2. OSCC発癌過程において活性化する細胞内シグナル伝達

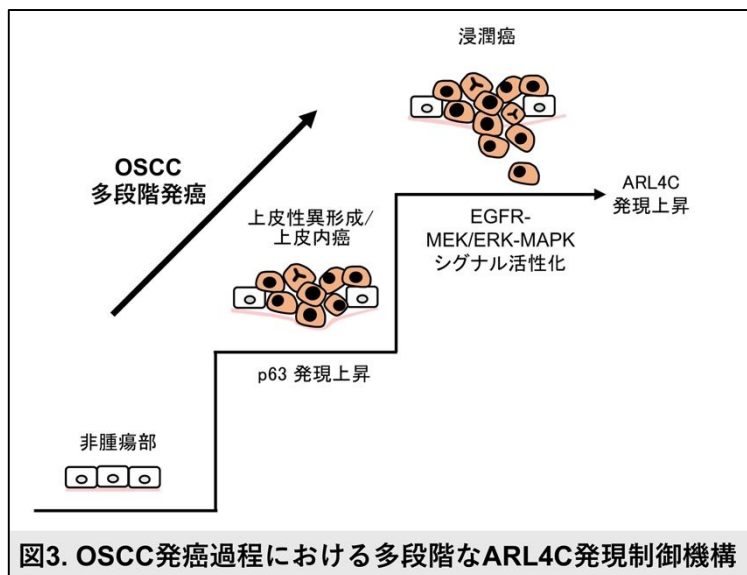


図3. OSCC発癌過程における多段階なARL4C発現制御機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii Shinsuke, Fujimoto Tatsufumi, Hasegawa Kana, Nagano Ryoko, Ishibashi Takuma, Kurppa Kari J., Mikami Yurie, Kokura Megumi, Tajiri Yudai, Kibe Toshiro, Wada Hiroko, Wada Naohisa, Kishida Shosei, Higuchi Yoshinori, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 153991 - 153991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.153991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Alkhatib Dania Zuhier Ragheb, Thi Kim Truong Thinh, Fujii Shinsuke, Hasegawa Kana, Nagano Ryoko, Tajiri Yudai, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 246
2. 論文標題 Stepwise activation of p63 and the MEK/ERK pathway induces the expression of ARL4C to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154493 - 154493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2023.154493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	藤井 慎介 (Fujii Shinsuke)		

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