

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592974

研究課題名(和文) サイトカインを標的とした口腔癌の増殖・進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of proliferation and development mechanism as the targeting cytokine in oral cancer

研究代表者

坂下 英明 (Sakashita, Hideaki)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：10178551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：IL-23は口腔癌細胞において構成的に発現していた。p53変異株にIL-23 mRNAの発現亢進を認めたと、p53野生株のSAS細胞ではIL-23 mRNAが減少した。p53ノックダウンしたSAS細胞をTNF- α 刺激した時、明らかに時間依存的なIL-23発現量の増大を認めた。口腔癌症例の生検材料を用いてp53とIL-23の局在について免疫組織化学的検索を行った。p53陽性口腔扁平上皮癌22例のうち10例(45.5%)にIL-23陽性所見を認めた。以上の結果から、p53遺伝子変異はIL-23の発現を亢進することで口腔癌の増殖と進展を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：IL-23 was constitutively expressed in oral cancer cells. The up-regulation of IL-23 expression was observed, especially in p53 mutant cells. In contrast, the reduced expression of IL-23 was observed in SAS cells of p53 wild type. p53 knockdown in SAS cells led to increase IL-23 mRNA expression. However, there was no significant difference in IL-23 protein level in the transfected-control siRNA cells. Then, when the p53 knockdown-SAS cells were stimulated with TNF- α , a time-dependent increase in the IL-23 protein expression was observed. These data indicate a possibility that IL-23 expression is regulated by p53. In addition, the localization of p53 and IL-23 in the biopsy samples of oral cancer was examined using an immunohistochemical method. The positive reaction for IL-23 was observed in 10 of 22 (p53 positive) cases (45.5%) of SCC. These data suggest that p53 gene alteration leads the growth and proliferation of oral cancer by the enhanced IL-23 expression.

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：口腔癌 サイトカイン p53 IL-23 TNF- α アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年の分子生物学ならびに免疫学的手法の目覚ましい発達、癌の発生・増殖・進展に関与した様々な分子の発見とその機能解析に貢献してきた。なかでも多様なサイトカインとそのレセプターならびに接着分子の同定は、癌の病態を知る上で非常に重要であり、新しい治療法の開発における鍵として期待されている。一方、慢性炎症は悪性腫瘍の発生率の増加と関連すると長い間考えられており、また慢性炎症と悪性腫瘍の制御機構の類似性は100年以上前から示唆されてきた。例えば、自然免疫系の細胞の浸潤、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性の上昇、および血管新生や脈管系の密度の増加などは、慢性炎症と腫瘍関連炎症との類似点の例として挙げられる。こうした炎症局所の細胞間情報伝達において中心的な役割を演じている分子の一つがサイトカインである。近年、インターロイキン(IL)-23はヒトの腫瘍で増加し、MMP9の発現上昇などの炎症反応を促進し、血管新生を増加させるが、CD8T細胞の浸潤は抑制する (Nature 442, 2006)。またIL-23の除去により、形質転換した組織への細胞障害性T細胞の浸潤が増加し、化学物質による発癌に対し抑制効果が示された (Nature 442, 2006)。しかしながら、頭頸部悪性腫瘍の発生・増殖・進展メカニズムにおいてIL-23が関与しているという報告はまだない。そこで申請者は、サイトカインIL-23をターゲットとした頭頸部悪性腫瘍の増殖・進展メカニズムの解析および腫瘍内のNF-κB活性解析に基づく治療戦略を提案し、その研究開発のために本研究課題を申請する。

2. 研究の目的

特に腫瘍の増殖・進展に関与するサイトカインとしてIL-12とIL-23が知られている。両者は共にヘテロダイマーを形成する炎症性サイトカインであり、IL-23の発現はヒトの腫瘍で増加するが、その近縁にあたるIL-12の発現は増加しない。またこれらのサイトカインの発現は、腫瘍の微小環境における局所の炎症反応や上皮内リンパ球の浸

潤を拮抗的に抑制している (Nature 442, 2006)。このことから、頭頸部悪性腫瘍においても腫瘍細胞自身の産生するIL-23が、宿主の免疫監視機構に直接的あるいは間接的に抑制的に作用し、その結果、腫瘍細胞が増殖・進展していくことが考えられる。以上の仮説を証明すべく、多数の頭頸部悪性腫瘍の試料を用いてIL-23およびそのレセプター蛋白の発現検索を行い、その局在と組織学的悪性度、予後との相関性を解析する。

IL-23は、その特異レセプターとの結合によって細胞内情報伝達経路を活性化するため、抗IL-23抗体あるいは抗IL-23レセプター抗体の作用でこの経路が阻止されるはずである。そこで頭頸部悪性腫瘍の培養細胞株におけるIL-23の発現状況を検索し、IL-23陽性腫瘍細胞に抗IL-23抗体あるいは抗IL-23レセプター抗体を作用させた際の細胞増殖阻害効果を検討する。IL-23陽性腫瘍細胞とヒト正常血管内皮細胞を共培養した上で、抗IL-23抗体を介した細胞浸潤および血管新生阻害実験を行うことで腫瘍浸潤におけるIL-23の関与を明らかにする。また、ヌードマウスを用いた腫瘍細胞浸潤・血管新生阻害実験を行い、抗IL-23抗体の抗腫瘍効果における有効性を検討する。さらに、頭頸部悪性腫瘍においては圧倒的に扁平上皮癌が多いことで知られているが、近年、扁平上皮癌においてNF-κBの活性増加が起こっていることが報告されている (Cancer Res., 64, 2004, Gan To Kagaku Ryoho, 32, 2005)。そこにNF-κB活性の阻害剤であるアスピリンを作用させると、腫瘍の増殖に対して抑制的に働き、アポトーシスを導くことが示された (ANZ J Surg., 75, 2005)。一方、H-2ブロッカーであるシメチジンは、消化管の悪性腫瘍(特に腺癌)において転写因子NF-κBの活性を阻害することで増殖・転移抑制することが報告されている (Cancer Res., 55, 1995)。また、IL-23はNF-κBの抑制因子IκBと会合して間接的にNF-κBの活性化をコントロールしていることが確認されるとともに、NF-κBの活性化がIL-23の発現誘導においても重要で

あることが示された(J immunol., 176, 2006), さらに, NF- κ B 活性抑制によるアポトーシスの誘導は IL-23 産生の減少をもたらすことがわかった (Immunity, 22, 2005).

そこで, 頭頸部扁平上皮癌培養細胞株および扁平上皮癌組織における IL-23 陽性腫瘍の NF- κ B 活性動態を解析し, シメチジンやアスピリンを作用させた際の IL-23 および NF- κ B 活性も検索して比較検討を行う。また, この際のアポトーシスを解析する。さらにヌードマウスを用い, 同様の IL-23 および NF- κ B 活性動態を解析し, シメチジンやアスピリンを作用させた際のアポトーシスを検索する。以上の研究から, **IL-23** を標的として口腔癌の増殖・進展メカニズムを解析すると共に NF- κ B のシグナル伝達制御を介した腫瘍の増殖・浸潤メカニズムを明らかにすることで, 効果的治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

当大学病院口腔外科に受診したすべての口腔癌患者の生検組織材料を用いて以下の実験を行う。

すべての試料において, ホルマリン固定パラフィン包埋材料を作製し, HE染色標本にて病理診断を行う。さらに抗IL-23抗体, 抗IL-23レセプター抗体および抗NF- κ B抗体を用いた免疫組織化学的検索を行い, その発現強度および局在を確認する。これらの結果と個々の症例の臨床病理学的諸因子との相関関係について解析を行う。

前述した各ヒト口腔癌由来細胞株を用い, *in vitro*の系で研究を行う。まずIL-23の遺伝子レベルでの発現状況を解析する。各腫瘍細胞株を25 cm²のフラスコにconfluent (1x10⁶個)になるまで培養し, AGPC法にてトータルRNA抽出後, Real time qRT-PCR法によりIL-23 mRNAを定量する。次に各腫瘍細胞株におけるIL-23のタンパク質レベルでの発現状況を検索する。各腫瘍細胞株よりタンパク質抽出・濃度測定後, Western blot法により定量する。

< 腫瘍細胞の増殖阻害効果の検索 >

IL-23発現が認められた培養株に対して抗IL-23抗体を時間と濃度を変えて作用させ, またIL-23 small interfere (si) RNAのトランスフェクトによりIL-23をノックダウンさせた状態で, 腫瘍細胞の増殖阻害効果を細胞増殖活性測定法にて検索する。

< 細胞浸潤および血管新生阻害実験 >
IL-23陽性腫瘍細胞に対してIL-23をノックダウンさせた状態で, ヒト正常血管内皮細胞を共培養した上で, 共焦点レーザー顕微鏡にて形態学的変化を観察し, 細胞浸潤および血管新生阻害実験を行うことで腫瘍浸潤におけるIL-23の関与を明らかにする。次に上述した各種抗癌剤を作用させる。IL-23の活性阻害が起これば腫瘍の増殖抑制が起こるため, それぞれCaspase-Glo assay, Western blot法によるcaspaseの活性化測定によりアポトーシスの状態を確認する(福田)。

< NF- κ B 活性化の解析 > TNF- α はNF- κ Bの発現を増強させるサイトカインであるとの報告があることから (Oncogene 18, 1999), IL-23 陽性を示した細胞株にTNF- α を作用させた上で, 同様にしてReal time qRT-PCR法によりNF- κ B mRNAを定量する。さらにProteoExtract kitを用いて細胞質・細胞膜・核の分画に分けてそれぞれタンパク質抽出を行い, NF- κ Bタンパク質の細胞質から核への移行動態をWestern blot法により解析する。これにより実際にNF- κ Bの活性化が起こって細胞質から核に移行した結果, IL-23タンパク質が発現増強していることが証明できる。さらにDNAと結合したNF- κ Bが活性化して機能しているか否か証明するためにLuciferase reporter assay (現有設備)を行う。

このようにしてTNF- α を作用させた時にNF- κ Bの活性化が証明された培養株に, シメチジンおよびアスピリンあるいは抗IL-23抗体をそれぞれ濃度と時間を変えて作用させたときのNF- κ Bの活性動態を同様にして解析す

る。さらにシメチジン，アスピリンおよび抗IL-23抗体の作用でNF-κBの活性阻害が起これば，アポトーシスが誘導されるため，caspase3，7，8，9の活性化を介したアポトーシスの状態をCaspase-Glo assay，Western blot法にてそれぞれ検討する。

ヌードマウスに IL-23 陽性腫瘍細胞を播種・腫瘍形成した後，抗 IL-23 抗体を濃度と時間をそれぞれかえて直接作用させた際の腫瘍浸潤・血管新生阻害実験を行うとともに，シメチジン，アスピリンおよび抗 IL-23 抗体を濃度と時間をそれぞれかえて直接作用させた際の NF-κB の活性動態を同様に解析し，アポトーシスの検索と副作用の有無を形態的および組織学的に行う。

当該年度に必要な備品はなく，実験試薬，器具，実験動物のみ必要額申請した。

4. 研究成果

5 種類のヒト口腔扁平上皮癌培養株 HSC-2，HSC-3，HSC-4，Ca9-22 (p53 変異株)，KB (p53 野生型，HPV 感染株) および SAS 細胞 (p53 野生株) における，IL-23 遺伝子ならびにタンパク質の発現状況を RT-PCR 法および Western blot 法にて確認したところ，各細胞株において IL-23 mRNA および IL-23 タンパク質の自発的な発現を確認した。さらに各細胞株を用いて Real time RT-PCR (qRT-PCR)法により IL-23 遺伝子の発現量の検索を行ったところ，p53 野生株の KB，SAS 細胞に比べ，p53 変異株である HSC-2，HSC-3，HSC-4 および Ca9-22 に発現亢進が認められた。このことから，HSC-3 細胞 (p53 遺伝子変異株) を用いて，TNF-α (10 ng/ml) にて経時的に刺激した際の IL-23 mRNA の発現量を qRT-PCR にて検索したところ，時間依存的な IL-23 mRNA の発現増強を確認した。次に，各細胞株における IL-23 タンパク質の培養上清中の分泌量を ELISA にて測定したところ，無刺激下ではいずれの細胞株も極微量 (1 pg/ml) であったが，HSC-3 細胞におい

て TNF-α 刺激 (10 ng/ml) により時間依存的な IL-23 タンパク質の分泌を観察し，8 時間で 3 pg/ml であった。HSC-3 および HSC-4 細胞を用いて，TNF-α または IL-23 (10 ng/ml) にて経時的に刺激した際の NF-κB 発現動態をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検索したところ，時間依存的な NF-κB 活性増強を確認した。抗 IL-23 抗体 (0.8 μg/ml) による中和または IL-23 siRNA による IL-23 ノックダウンを行った際の NF-κB の活性動態は，顕著に抑制された。さらに NF-κB の活性阻害剤として知られるシメチジンを作用させた場合，NF-κB 活性低下とともにアポトーシスに陥った。また，抗 IL-23 抗体を作用させた際，NF-κB の活性は低下したがアポトーシスには至らなかった。次に p53 野生株である KB 細胞に IL-23 を作用させた際，NF-κB 活性は刺激後 4 時間でピークに達したものの，その後減少に転じた。以上のことから，IL-23 は樹状細胞やマクロファージだけでなく，口腔扁平上皮癌細胞自身も分泌していることが明らかとなった。このことは，口腔扁平上皮癌における IL-23 の発現増強は腫瘍の増殖促進に関与しているかもしれない。すなわち TNF-α 刺激により腫瘍自身が IL-23 を発現することで autocrine 的に，腫瘍の増殖活性を増強させている可能性が示唆された。さらに，p53 が IL-23 mRNA の発現量を調節している可能性が示唆されたことから，p53 野生株である SAS 細胞に p53 siRNA を導入して p53 発現抑制した際の IL-23 の発現について定量性 RT-PCR 法にて検索した。その結果，p53 mRNA 発現量は明らかに減少し，また IL-23 mRNA レベルはコントロールと比べて増大傾向を示したものの，IL-23 タンパク質の発現量に変化は認められなかった。多くの腫瘍において腫瘍細胞自身が TNF-α を産生して NF-κB の活性化を誘導することによって，悪性腫瘍の増殖・進展においても重要な役割を担っていることが知られて

いる。そこで、口腔癌における局所免疫応答を擬似的に再現する目的で、*p53* 野生型の口腔扁平上皮癌由来株化細胞 SAS の *p53* 発現を抑制した上で、NF- κ B を活性化させるべく TNF- α を添加して IL-23 の発現動態を検索した。その結果、IL-23 の発現が TNF- α 刺激後時間経過とともに増強した。このことから *in vitro* の実験において、*p53* によって IL-23 は制御されていることが示唆された。

明海大学病院にて治療を受けた 52 例の口腔扁平上皮癌患者の生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用い、IL-23、*p53* および NF- κ B に対する免疫組織化学的検索を行い、その発現強度および局在を確認した。その結果、20 例 (38%) の腫瘍細胞膜に IL-23 の弱陽性反応を認めた。また 39 例 (75%) の腫瘍細胞の核に NF- κ B 発現を認め、IL-23 陽性サンプルにおいて特に NF- κ B 発現の強陽性所見が認められた。さらに、21 例 (40%) の腫瘍細胞の核に *p53* 陽性所見を認めた。さらに、最終年度においては口腔扁平上皮癌 55 例における *p53* の発現を検索したところ、22 例 (40%) の生検組織材料に陽性所見を認めたため、この 22 例中の IL-23 の陽性率について検索を行った。その結果、*p53* 陽性口腔扁平上皮癌 22 例のうち 10 例 (45.5%) の、主に腫瘍細胞の細胞膜を主として細胞質にも弱いながら IL-23 陽性所見を示し、また炎症性浸潤細胞にも陽性反応を認めた。ちなみに、33 例の *p53* 陰性例中に IL-23 陽性所見はわずかに 6 例 (18.2%) のみであった。特に *p53* タンパク質の強陽性所見を示す症例において IL-23 陽性所見が多く認められた。なお IL-23、NF- κ B および *p53* 発現と臨床病理学的因子との間に特別な相関関係は認められなかった。

また免疫組織化学的検索においても、口腔扁平上皮癌の *p53* 変異を示唆する症例に IL-23 の発現傾向を認めたことから、IL-23 の発現および機能は *p53*

によって制御されている可能性が示唆された。以上のことから最終的に、*p53* 変異を伴う口腔扁平上皮癌において、腫瘍の増大に伴い IL-23 の発現が亢進することにより腫瘍の増殖・進展に重要な役割を担っていることが示唆された。以上のことから、IL-23 は口腔癌の患者における予後因子として有用であると共に、ここに発生している情報伝達経路を解析することは口腔癌の増殖、進展メカニズムを解明するために重要であると考えられ、また IL-23 を基盤とした治療戦略の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

田中 真, 福田正勝, 菅原良和, 柳下治男, 草間 薫, 坂下英明: 口腔扁平上皮癌における Interleukin (IL)-23 の発現と動態について. Hospital Dentistry & Oral-Maxillofacial Surgery, 査読有, 22. 2: 163-173, 2011.

Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama, Hideaki Sakashita: Molecular insights into the proliferation and progression mechanisms of the oral cancer: strategies for the effective and personalized therapy. Japanese Dental Science Review, 査読有, 48, 23-41, Feb 2012.

菅原良和, 福田正勝, 坂下英明: 口腔扁平上皮癌における *p53* 依存性 IL-23 の発現. 日本小児口腔外科学会雑誌, 査読有, Vol. 22, No. 2. P131-139, 2013.

[学会発表](計 5 件)

Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: **Interleukin (IL)-23 promotes growth and proliferating activity of oral squamous cell carcinomas.** International Conference & Exhibition on Cancer Science & Therapy, Aug. 15-17, 2011, in Las Vegas, USA.

Masakatsu FUKUDA, Syota TAKIZAWA, Yukihiro KAWAMOTO, Yoshito

OHYAMA and Hideaki SAKASHITA:
Resveratrol Induces Autophagic Cell Death In Oral Squamous Cell Carcinoma.
2nd Meeting of the International Association for Dental Research (IADR) – Asia Pacific Region to be held at the Plaza Athenee, Aug. 21-23, 2013, in Bangkok, Thailand.

福田正勝 : **Analysis of proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma which BRAK/CXCL14-targeted .** 第 14 回明海歯科医学会 .

福田正勝 , 大山嘉人 , 川本幸寛 , 瀧澤将太 , 鈴木正二 , 坂下英明 : **口腔扁平上皮癌における RCAS1 の発現とその機能について .** 第 56 回日本口腔外科学会学術総会 2011 年 10 月 21 日-23 日 : 大阪国際会議場

Masakatsu Fukuda, Kaoru Kusama and Hideaki Sakashita: **p53 gene regulates interleukin (IL)-23 to prevent growth and proliferating activity of oral squamous cell carcinomas.** UICC World Cancer Congress, Aug. 27-30, 2012, in Montréal, Canada.

〔図書〕(計 1 件)

Masakatsu Fukuda, Yoshihiro Ohmori and Hideaki Sakashita. The Role of Tumor Microenvironment in Oral Cancer. *IN Tumor Microenvironment and Myelomonocytic Cells.* , 査読有 , (S.K. Biswas, ed.) InTech, Rijeka, Croatia, pp. 201-218, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂下 英明 (HSAKASHITA Hideaki)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号 : 10178551

(2)研究分担者

大森 喜弘 (OHMORI Yoshihiro)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号 : 50194311

福田 正勝 (FUKUDA Masakatsu)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号 : 10311614

(3)連携研究者

()

研究者番号 :