

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463069

研究課題名(和文) 口腔がん多段階発がん過程におけるスフィンゴシン-1-リン酸シグナル調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on sphingosine-1-phosphate signaling pathways in multistage carcinogenesis of the oral cancer

研究代表者

安部 貴大 (Takahiro, Abe)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：20383250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴ脂質の代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)が悪性腫瘍、動脈硬化や糖尿病、骨粗鬆症などの病態進行を調節する重要な因子として最近注目を浴びている。S1Pは様々な細胞から分泌され、5つの特異的なGタンパク質共役型受容体を介するシグナル伝達因子として、オートクライン、パラクラインに作用するが、口腔がんにおけるS1Pシグナル伝達については未だ不明な点が多い。本研究では、口腔癌細胞株を用いて、S1Pによる細胞増殖能や細胞遊走能への影響について検討し、さらに細胞株のS1P受容体サブタイプ(S1PR1-5)の発現様式を確認のうえ、そのシグナル伝達経路についていくつかの知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a metabolized product of the sphingolipid. It acts as an important factor in regulating malignant tumor progression, arteriosclerosis, diabetes, osteoporosis, etc. Therefore, it has attracted a lot of attention in the recent times. S1P is secreted by various cells and acts in an autocrine or paracrine manner as a signaling factor through five specific G protein-coupled receptors, but S1P signal transduction in oral cancer is still not clear. In this study, we examined the influence of S1P on cell proliferation and cell migration by using cell lines of oral squamous cell carcinoma. We obtained some knowledge about S1P-signaling only after confirmation with an expression pattern of the S1P receptor subtype (S1PR1-5) of the cell lines.

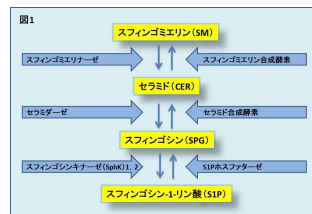
研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 S1P

1. 研究開始当初の背景

悪性化した組織は自身を増殖維持しながら、同時にリンパ行性あるいは血行性に遠隔に転移する性質を有する。その増殖、浸潤、転移の特質はがん種により異なるが、取り巻く周囲組織との環境において、さまざまな因子や伝達系を介して複雑に相互作用する一定の病態基盤が存在すると思われる。がん細胞が生存し遠隔への転移能力を保持するためには、生体の免疫防御システムや細胞外マトリックスバリアーの克服、そして栄養源となる血流を獲得していく必要があり、これら多段階の発がん過程において多様な key factor が存在している。それゆえに、がんの進行を食い止めるためにはがん種の特徴を把握し、ステージに即した治療戦略が必要となることは言うまでもなく、治療の効果を上げるにはこれらを制御する key factor のシグナル調節機構を明らかにし、分子標的を適切に選択していく必要がある。

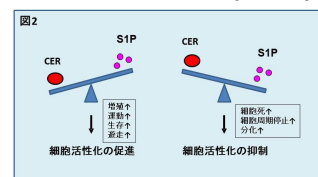
近年、スフィンゴ脂質の代謝産物であるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)が悪性腫瘍、動脈硬化や糖尿病、骨粗鬆症などの病態進行を調節する重要な因子として明らかになりつつある。S1P はスフィンゴミエリン(SM)の代謝産物であるセラミド(CER)がセラミダーゼによってスフィンゴシン(SPG)となり、さらにスフィンゴシンキナーゼ(SphK1、SphK2)でリン酸化を受けることによって産生され、多くの細胞から分泌されている(図1)。S1P はこれまで



同定されている5つの特異的なGタンパク質共役型受容体(S1PR1-S1PR5)を介して細胞内へのシグナル伝達因子としてオートクライン、パラクラインに作用し、主に細胞の増殖、生存、遊走などの活性化因子として位置づけられている。特にS1P産生に必要となるSphKについてはスフィンゴ脂質代謝経路において重要な酵素であり、うちSphK1については様々なヒト腫瘍でそのmRNA発現レベルの増加がみられることや、線維芽細胞や上皮細胞由来のTNF- α によって誘導されることなどが明らかにされている(Maceyka M, et al. Trends Cell Biol. 2012)。最近、抗がん剤の耐性とSphK1の活性、細胞内CER/S1P比との相関がイマチニブ耐性K562細胞株(Baran Y, et al. J Biol Chem. 2007)あるいはカンプトテシン耐性の異なる前立腺がん細胞株(Akio Y, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006)等で認められることや、SphK1の高発現が赤白血病を進行させる癌遺伝子の発現に参与しているなどの報告があり、SphK1が抗がん剤の感受性予測因子や抗がん化学療法の新規分子標的となる可能性を支持するものである。また、CERにつ

いても1989年に岡崎らによりヒト白血病細胞株HL60のビタミンD3による分化に際して、SMが分解されCERの増加が起こることがすでに報告されており、細胞死や老化の促進因子として位置づけられるなど(Okazaki T, et al. J Biol Chem. 1989)、S1Pシグナル伝達系のがんへの役割が注目されている(Pyne NJ, et al. Nature Rev Cancer. 2010)。Spiegelらは、これらCERとS1Pの量的バランスが細胞の運命を決定するとして sphingolipid rheostat model を提唱した(Cuvillier O, et al. Nature 1996; Hait NC, et al. Biochem Biophys Acta. 2006)。この説によれば、スフィンゴ脂質代謝酵素系の活性変化や酵素タンパク質量の変化によってスフィンゴ脂質代謝産物の量的変化が生じ、細胞の生存や増殖動態が影響されるというものである(図2)。

このように、S1P代謝経路ががん細胞の活性化において重要な役割を果たしている



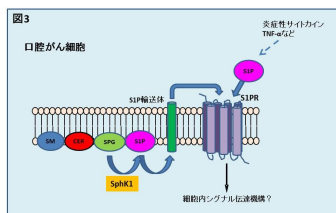
ことはこれまでの報告で明らかにされてきているところであるが、口腔がんでの研究はわずかであり、特にS1P受容体を介するシグナル伝達系の詳細は未だ未解明である。従って、口腔がんの増殖、浸潤、転移のメカニズムの解明にとって重要な知見が得られ、より効果的な新規治療法開発への一助となる課題と考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の活性化において重要な役割を果たしているS1Pの作用に着目し、口腔がんの増殖、浸潤、転移という多段階の発がん過程におけるS1Pシグナル伝達機構の解明と新規分子標的の確立を目指すことを目標に掲げた。

これまで頭頸部がんのスフィンゴ脂質に関する報告は、野田らがpan-SphK阻害剤であるSafingolを用いた研究で、口腔扁平上皮癌由来細胞が脱接着性に細胞死を誘導するとの報告や(Noda T, et al. Apoptosis 2009)、がんの進行ならびに生存率の低下とSphK1の高発現、活性化との相関を示す報告(Facchinetti MM, et al. Cells Tissues Organs 2010; Liu G, et al. BMC Cancer 2010; Shirai K, et al. Cancer Prev Res. 2011)およびSphK1の活性化が放射線抵抗性を示すとする報告(Sinba UK, et al. Head Neck. 2011)などが見受けられるが、S1Pのシグナル解析まで踏み込んだ報告には至っていない。それゆえ口腔がんの進行や、薬剤・放射線感受性のメカニズムを理解するには増殖、分化、遊走、細胞死などの細胞機能に関する転写レベルでの調節機構の解明が不可欠と考える。スフィ

ンゴ脂質代謝産物が図1に示すような代謝カスケードの活性化によって調節がなされていることから、本研究を口腔がんにおける多段階がんのスフィンゴ脂質代謝に関する研究と位置づけ、以下のような研究の遂行を目的とした。すなわち、口腔がん由来の細胞を用いて、これら代謝酵素によるタンパク質修飾について検討し、さらにはS1PR1-5の各受容体発現様式の確認、S1Pシグナル応答の解析、そして活性化に関与すると思われるシグナル伝達や転写因子による作用などの研究を行うというものである(図3)。



3. 研究の方法

口腔がん由来の細胞株を用いて、S1Pによる細胞増殖能や細胞遊走能への影響について検討を加え、さらに異なる細胞株のS1P受容体サブタイプ(S1PR1-5)の発現様式を確認のうえで各S1P-S1PRのシグナル伝達経路を検証する。

(1) S1Pの細胞増殖能の検討

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) アッセイを用いて細胞増殖能を測定する。MTTアッセイは細胞のミトコンドリア活性を測定する方法で、反応に関与するのは生細胞のみである。S1Pの濃度依存性に増殖能を検討し、細胞株別での反応性がどの程度異なるかについて解析する。

(2) S1Pの化学遊走能の検討

S1Pは化学遊走因子としての機能を持ち、Tリンパ球などの細胞がS1Pの濃度勾配にしたがって移動することが知られている(Hla T, et al. *Science* 2005)。この機能が口腔がん細胞に対しても働くか検証するため、S1P濃度が段階的に異なる培地を準備し、間葉系幹細胞のchemotaxisが濃度依存性になっているか確認する。

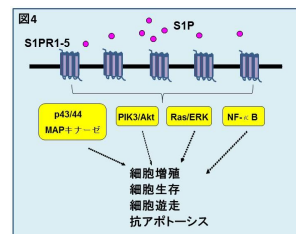
(3) 発現しているS1P受容体サブタイプの確認

S1P受容体は上記のとおり現在までに5種類のタイプがあることが知られているが、そのシグナル伝達経路については1998年以降、本邦の多久和らをはじめ幾つかのグループによってデータが蓄積されている(Rosen, et al. *Nat Rev Immunol.* 2005; Takuwa Y, et al. *Biochem Biophys Acta* 2008)。サブタイプの組織特異性や細胞の発現パターンとGタンパク質との親和性の違いによってシグナル伝達経路が異なることが分かっている。従って、口腔がん細胞やその他の臓器由来の細胞を用いて

S1PR発現パターンを解析する。S1PR1-S1PR5の発現はreal-time RT-PCRにより、口腔がん由来細胞株にいずれのサブタイプがどのような発現様式をしているか調べる。またウエスタンブロット法により、受容体タンパクの発現を見る。

(4) S1P受容体下流のシグナル伝達経路の検証

既知のシグナルに着目し、その選択的阻害剤を用いた阻害実験によって増殖、生存、遊走能について検証する(図4)。



4. 研究成果

がん細胞株は理化学研究所 Cell Bank より口腔扁平上皮癌由来細胞株としてH0-1-u-1, Sa3, SAS, HSQ-89を入手した。

S1Pを介した伝達経路に関する口腔がんの報告は少なく、診断・治療への新規標的因子としての可能性を期待でき、本研究を進展させる意義は大きい。口腔扁平上皮癌細胞株におけるS1P-S1PRシグナルにおける増殖能、遊走能の検討で、その特異的な反応を確認した。また、細胞株HSQ-89, H0-1-u-1, Sa3, SASを用いてS1PRのmRNA, タンパク発現解析を行った。タンパク発現はウエスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫染色で検討した。細胞膜上S1PRの発現で細胞株でのパターンの相違を確認した。

S1PRを介するシグナル伝達経路としては、既知の主要経路である

(1) p43/44 MAPK経路: 選択的MEK阻害剤U0126、

(2) PIK3/Akt経路: 選択的PI3K阻害剤wortmannin、

(3) Ras/ERK経路: 選択的AP-1阻害剤curcumin

(4) NF-κB経路: p65サブユニットのモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、陽性的場合にNF-κB阻害剤helenalinを用いて、特異性を検証する阻害実験を行った。

またドラッグデリバリーの探索として、Antibody-drug conjugate (ADC)を用いたImmunotoxin(IT)の細胞毒性などの解析にも着手した。さらにはITの癌細胞への内在化促進を狙って、1)界面活性作用のあるsaponinの併用、2)癌細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれたITをエンドソームから効率的に細胞質内に放出させる目的で、PhotosensitizerのAIPcS2a, TPPS2aを同時に細胞内に内在化させ、これを650nm, 410nmで励起する事で一重項酸素の発生を誘発する光化学的手法Photochemical internalization(PCI)、などについても、効率的デリバリーへの応用として検討の準備

を開始した。ITと saponin の併用, ITと PCI の併用により, 口腔癌細胞のより効率的な抗腫瘍効果を期待でき、今後の展望として発展させていきたい。S1P-S1PR シグナルをターゲットした免疫療法の可能性, また免疫放射線療法の可能性についても今後の検討項目としての目標に掲げ、癌細胞内への薬物送達法の開発にも視野を広げ、治療応用の可能性を高めていきたいと考える。

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 10 件)

Abe M, Abe T(co-1st), Mogi R, Kamimoto H, Hatano N, Taniguchi A, Saijo H, Hoshi K, and Takato T. A case of cervical necrotizing fasciitis of odontogenic origin in a young healthy patient without pre-systemic disorders. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 査読有, in press.

Abe M, Hoshi K, Shojima M, Suenaga H, Yonenaga K, Kobayashi K, Zong L, Abe T, Takato T. A large pyogenic granuloma with extensive maxillary bone resorption penetrating the maxillary sinus: a rare case report. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol*. 査読有, 29:2017, 254-257.

Abe M, Yamashita S, Mori Y, Abe T, Saijo H, Hoshi K, Ushijima T, Takato T. High-risk oral leukoplakia is associated with aberrant promoter methylation of multiple genes. *BMC Cancer*. 査読有, 16:2016, 350.

Zong L, Abe M, Seto Y and Ji J. Challenge of China's diagnosis of early gastric cancer. *Lancet* 査読有, 388(10060):2016, 2606.

Hori N, Abe T(co-1st), Sato T, Kokabu S, Shimamura Y, Sato T, Yoda T. Data in support of the bone analysis of NOD-SCID mice treated with zoledronic acid and prednisolone. *Data Brief*. 査読有, 7:2016, 1486-90.

Abe T, Sato T, Kokabu S, Hori N, Shimamura Y, Sato T, Yoda T. Zoledronic acid increases the circulating soluble RANKL level in mice, with a further increase in lymphocyte-derived soluble RANKL in zoledronic acid- and glucocorticoid-treated mice stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Cytokine* 査読有, 83:2016, 1-7.

星和人, 安部貴大, 庄島正明, 阿部雅修, 西條英人, 高戸毅: 経静脈的コイル塞栓術を施行後に全摘出した下顎骨動静

脈奇形の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌* 査読有, 第 61 巻 5 号, 2015, 293-297.

Abe M, Mori Y, Kanno Y, Hoshi K, Saijo H, Abe T, Ohkubo K and Takato T. A case of pleomorphic adenoma of the parotid gland with multiple local recurrences through facial to cervical region. *Open Journal of Stomatology*. 査読有, 4:2014, 441-445.

Abe M, Mori Y, Inaki R, Ohata Y, Abe T, Saijo H, Ohkubo K, Hoshi K and Takato T. A case of odontogenic infection by *Streptococcus constellatus* leading to systemic infection in a Cogan's syndrome patient. *Case Reports in Dentistry*. 査読有, 2014:2014, 793174.

高戸毅, 藤原夕子, 星和人, 小笠原徹, 西條英人, 安部貴大, 阿部雅修, 末永英之, 菅野勇樹, 杉山円, 森良之. 顎顔面領域における骨・軟骨再生に関する基礎および臨床研究. *日本口腔科学会雑誌* 査読有, 63(2):2014, 207-215.

[学会発表](計 20 件)

安部貴大: ステロイドを介した骨組織 Circadian clock gene の発現検討と代謝への影響 第 16 回日本再生医療学会総会 2017 年 3 月 8 日, 仙台国際センター会議棟・展示棟(宮城県・仙台市)

小松紀子, 安部貴大, 三井健一, 阿部雅修, 西條英人, 星和人, 高戸毅, 浜窪隆雄: 口腔癌細胞株を用いた軸索ガイダンス因子 Roundabout homolog (ROBO) 1 の発現解析 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会 2017 年 1 月 26-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

倉林くみ子, 安部貴大, 阿部雅修, 菅野勇樹, 西條英人, 星和人, 高戸毅: 硬口蓋に発生した筋上皮腫由来筋上皮癌の 1 例 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会 2017 年 1 月 26-27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

阿部雅修, 森良之, 安部貴大, 西條英人, 星和人, 高戸毅: 口腔白板症の悪性化リスクと密接に相関する新規サイレンシング遺伝子の同定 第 61 回日本口腔外科学会総会 2016 年 11 月 25 日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

小松紀子, 安部貴大, 三井健一, 阿部雅修, 西條英人, 星和人, 高戸毅, 浜窪隆雄: 口腔癌細胞株を用いた軸索ガイダンス因子 Roundabout homolog (ROBO) 1 の発現解析 第 40 回日本頭頸部癌学会 2016 年 6 月 9 日, ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)

安部貴大, 小松紀子, 三井健一, 阿部雅修, 西條英人, 星和人, 浜窪隆雄, 高戸毅: 口腔扁平上皮癌における Slit/Robo シグナル作用機構の解析 第 70 回日本口腔科学会総会 2016 年 4 月

16日,福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
井之前貴雄, 安部貴大, 阿部雅修,
波田野典子, 細川瑠美子, 飯田このみ,
茂木立香, 西條英人, 星和人, 高戸毅:
下顎骨半側切除を行った類腱線維腫の1
例 第198回日本口腔外科学会関東支部
学術集会 2014年12月6日 鶴見大学
記念館記念ホール(神奈川県・横浜市)

高才東, 安部貴大, 森良之, 阿部雅
修, 末永英之, 菅野勇樹, 西條英人, 星
和人, 高戸毅: 当科で行った19年間の下
顎骨区域切除症例に関する調査 第198
回日本口腔外科学会関東支部学術集会
2014年12月6日 鶴見大学記念館記念
ホール(神奈川県・横浜市)

阿部雅修, 森良之, 安部貴大, 西條
英人, 星和人, 高戸毅: 口腔扁平上皮癌
における新規不活化遺伝子の同定と癌関
連遺伝子変異との関連性. 第59回日本
口腔外科学会総会 2014年10月17-19
日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

稲木涼子, 阿部雅修, 森良之, 菅野
勇樹, 安部貴大, 西條英人, 星和人, 高
戸毅: 上唇に発生した Mammary Analogue
Secretary Carcinoma の遺伝学的検討.
第59回日本口腔外科学会総会 2014年
10月17-19日 幕張メッセ(千葉県・
千葉市)

安部貴大, 立石晶子, 小宮山雄介,
波田野典子, 細川瑠美子, 阿部雅修, 小
笠原徹, 高戸毅: 顎関節を初発部位とす
る早期関節リウマチに対してエタネルセ
プトを用いた1例. 第27回日本顎関節学
会総会 2014年7月19-20日 九州大学
医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

波田野典子, 森良之, 井之前貴雄,
安部貴大, 高戸毅: 両側顎関節症を疑わ
れたパーキットリンパ腫の1例. 第27回
日本顎関節学会総会 2014年7月19-20
日 九州大学医学部百年講堂(福岡県・
福岡市)

阿部雅修, 森良之, 安部貴大, 末永
英之, 古賀陽子, 西條英人, 星和人, 高
戸毅: 口腔扁平上皮癌における新規サイ
レンシング遺伝子の同定および既知がん
遺伝子・がん抑制遺伝子の変異との関連
性についての検討. 第68回日本口腔科
学会総会 2014年5月7-9日 京王プ
ラザホテル(東京都・新宿区)

Abe M, Yamashita S, Mori Y, Abe T,
Saijo H, Ushijima T and Takato T.:
Identification of novel
methylation-silenced genes in oral
squamous cell carcinomas. AACR Annual
meeting 2014, April 5-9, 2014, San
Diego, San Diego Convention Center
(California, USA)

阿部雅修, 森良之, 安部貴大, 西條
英人, 高戸毅: 食道癌において喫煙と相
関する DNA メチル化異常の口腔癌におけ

る検討. 第32回日本口腔腫瘍学会総会
2014年1月23-24日 札幌コンベンシ
ョンセンター(北海道・札幌市)

Ogasawara T, Saito T, Ohba S, Abe
T, Yonehara Y, Takato T: Runx1 and
Runx3 are downstream effectors of
Nanog in the promoted osteogenic
differentiation of mesenchymal cells,
The 35th ASBMR Annual Meeting, October
4-7, 2013 Baltimore Convention Center,
Discovery Hall-Hall C (Baltimore,
Maryland USA)

阿部雅修, 安部貴大, 岡田恵美, 西
條英人, 森良之, 高戸毅: 成人における
原因不明の突発性耳下腺炎 第193回日
本口腔外科学会関東地方会 2013年6月
30日 所沢市立中央公民館ホール(埼玉
県・所沢市)

安部貴大, 小笠原徹, 阿部雅修, 佐
藤稔久, 西條英人, 星和人, 森良之, 高
戸毅: iNOS 発現阻害による炎症時 NO お
よび peroxynitrite の消去が骨芽細胞の
増殖・分化に及ぼす影響 第12回日本再
生医療学会総会 2013年3月21-23日
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

阿部雅修, 森良之, 安部貴大, 西條
英人, 高戸毅: 口腔扁平上皮癌発生の初
期において DNA メチル化により不活性化
される遺伝子のゲノム網羅的検索 第12
回日本再生医療学会総会 2013年3月
21-23日 パシフィコ横浜(神奈川県・
横浜市)

Abe M., Yamashita S., Mori Y., Abe
T, Saijo H, Kawase-Koga Y., Suenaga H.,
Ushijima T. and Takato T.
Identification of novel
methylation-silenced genes which are
associated with malignant
transformation from oral premalignant
lesions to oral cancers. The Ninth
AACR-JCA Joint Conference -
Breakthrough in basic and
translational cancer research,
February, 2013, (Maui, HI, USA)

[図書](計 3件)

安部貴大, 須佐美隆史: 知っておき
たいこと ア・ラ・カ・ルト 顎関節症.
Medical Practice M.P. 32巻9号,
1552-1554 文光堂, 東京, 2015.

Abe T, Kobayashi A, Sato T, Yoda T.
Investigation of recurrent aphthous
stomatitis by measuring salivary
cortisol, secretory immunoglobulin A,
and salivary chromogranin-A in
nursing students. *Oral Science in
Japan*, 2015.

安部貴大, 高戸毅: 診断力ですと 頬
部の痛みと腫れ(解説) *DENTAL DIAMOND*
38巻15号 Page131-132 湯山幸寿, デン

タルダイヤモンド社，東京，2013

6．研究組織

(1)研究代表者

安部 貴大 (ABE, Takahiro)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：20383250

(2)研究分担者

小笠原 徹 (OGASAWARA, Toru)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20359623

阿部 雅修 (ABE, Masanobu)

東京大学・保健・健康推進本部・講師

研究者番号：10392333